Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Biosíntesis de bacterioclorofila en Rhodopseudomonas palustris : Sistemas enzimáticos reguladores

Viale, Alberto Américo

1978

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Viale, Alberto Américo. (1978). Biosíntesis de bacterioclorofila en Rhodopseudomonas palustris : Sistemas enzimáticos reguladores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1570_Viale.pdf

Cita tipo Chicago:
Viale, Alberto Américo. "Biosíntesis de bacterioclorofila en Rhodopseudomonas palustris : Sistemas enzimáticos reguladores". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1978.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1570_Viale.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

U N I V E R S I D A D D E B U E N O S A I R E S

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOSINTESIS DE BACTERIOCLOROFILA EN *Rhodopseudomonas palustris*

SISTEMAS ENZIMATICOS REGULADORES

ALBERTO AMERICO VIALE

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

Departamento de Química Biológica

Reg. nº 1570
ej. 2

- 1978 -

Director de tesis

Dra. EVA ADELA NIDER DE XIFRA

Profesor Asociado de Química Biológica

A mi esposa e hijas,
por todo su amor.
la memoria de mis padres.

Agradecimientos

A la Dra. Eva Adela Wider de Xifra, a Evi, en quien he encontrado, además de una excelente directora, a una gran amiga, con quien ha sido un gusto la realización del presente trabajo.

A la Dra. Alcira Batlle de Albertoni, por su continuo apoyo y estímulo, por su ayuda en circunstancias muy difíciles de mi vida.

Al Dr. Juan H. Tramezzani, por haber facilitado los medios para las observaciones por microscopía electrónica.

A las licenciadas Alicia S. Lorenti y Mirta L. López, por su colaboración en algunas de las experiencias.

ABREVIATURAS

AA: aminoacetona
AA pirrol: 2,4-dimetil-3-acetil-pirrol
Acetil-CoA: acetil coenzima A
ALA: ácido delta amino levúlico
ALA-D: ácido delta amino levúlico dehidrasa (E.C. 4.2.1.24)
ALA pirrol: 2 metil-3 carbetoxi-4 (3-ácido propiónico)-pirrol
ALA-S: ácido delta amino levúlico sintetasa (E.C.2.3.1.37)
BChl: Bacteriocloroflla
C: Chlorobium
CCCP: m-cloro-fenilhidrazona del carbonil cianuro
Chl: Clorofila
Chr: Chromatium
CoA: Coenzima A
Copro: Coproporfirina
Coprogen: Coproporfirinógeno
Cps: Chloropseudomonas
DNA: ácido desoxirribonucleico
Firia: Firiaporfirina = porfirina heptacarboxílica
Firiagen: Firiaporfirinógeno = porfirinógeno heptacarboxílico
Hexa: porfirina hexacarboxílica
Hexagen: porfirinógeno hexacarboxílico
Mg-DVP: magnesio- 2,4 -divinil-porfirina a_5
Mg-Proto IX: magnesio- protoporfirina IX
PBG: Porfobilinógeno
Penta: porfirina pentacarboxílica
Pentagen: Porfirinógeno pentacarboxílico
Proto: protoporfirina
Protogen: protoporfirinógeno
PyP: fosfato de piridoxal
R: Rhodospirillum
Rps: Rhodopseudomonas
Succinil-CoA: succinil-coenzima A
Succinil-CoA-S: succinil coenzima A sintetasa= succínico tio-quinasa (E.C.6.2.1.5.)
Uro: uroporfirina
Urogen: uroporfirinógeno

I N T O D U C C I

I. BACTERIAS FOTOSINTETICAS

I.1. Introducción

Mediante el estudio de las bacterias sulfúreas verdes y púrpuras, se demostró que el metabolismo normal de estos organismos representa un proceso fotosintético verdadero, que difiere en algunos aspectos del que realizan las plantas. Sus actividades bioquímicas se interpretaron como una reducción fotoquímica del dióxido de carbono por hidrógeno que proviene del sulfuro de hidrógeno y no del agua. Este proceso ocurre en condiciones anaerobias y sin desprendimiento de oxígeno (1,2).

Van Niel (1) sugirió que las bacterias púrpuras no sulfúreas o Athiorhodaceae en la nomenclatura de Molish(3), que requieren sustancias orgánicas para su crecimiento, podrían constituir un grupo de organismos en los cuales la función de dador de electrones para la reducción fotoquímica del dióxido de carbono estaría cumplida por dichos compuestos orgánicos. Esta suposición fue ampliamente apoyada por las experiencias de Gaffron (4,5) , quien demostró que representantes de Athiorhodaceae realizan una reducción del dióxido de carbono dependiente de la luz y de la presencia de sustratos orgánicos o hidrógeno molecular.

Al demostrarse que la función de los sustratos orgánicos era la de ser dadores de hidrógeno para la fotosíntesis (6), se delineó sobre bases firmes la principal característica bioquímica de este grupo, esto es, la de ser fotoheterotróficos. Muller (7) demostró que también algunos miembros de las bacterias púrpuras sulfúreas o Thiorhodaceae en la nomenclatura de Molisch (3) pueden utilizar compuestos organícos simples en lugar de sulfuro de hidrógeno para la fotosíntesis, con lo cual quedaron establecidas similaridades fundamentales en el metabolismo de Thio - y Athiorhodaceae.

Se han revisado con detalle varios aspectos del problema de fotosíntesis en bacterias (8- 17), tema que ha sido objeto de un simposio (18), y además se han publicado diversas revisiones sobre los eventos fotoquímicos del proceso (19-22).

El uso de nombres ambiguos y de definiciones inadecuadas provocó en el pasado mucha confusión, agravada por el incompleto conocimiento de las actividades fisiológicas de las varias bacterias púrpuras.

Molish (3) creó en 1907 el orden Rhodobacteria en el que incluyó los organismos que él consideraba "bacterias púrpuras", caracterizadas por contener un sistema pigmentario complejo, constituído por un pigmento verde, "bacterioclorina", y uno o más pigmentos rojos, "bacteriopurpurina". El orden fue dividido en dos familias, Thiorhodaceae y Athiorhodaceae distinguidas por la presencia de inclusiones de azufre en las células de organismos de la primera, mientras que los representantes de la segunda nunca presentan dichas inclusiones.

Estos dos grupos de bacterias púrpuras pueden distinguirse por una diferencia fundamental en su metabolismo: las Thiorhodaceae representarían organismos con un modo autotrófico de vida, mientras que las Athiorhodaceae serían representantes de un modo heterotrófico de vida; las primeras oxidan sulfuro de hidrógeno, las segundas sustancias orgánicas (23).

Winogradsky demostró en 1887 (24,25) que las bacterias púrpuras sulfúreas contienen glóbulos de azufre sólo cuando crecen en medios que contienen sulfuro, y que utilizan este producto alamacenado durante los períodos en los cuales ellas están expuestas a ambientes libres de sulfuro . Dado entonces que la caracterización morfológica no es siempre estrictamente válida por estar sometida a influencias ambientales, parecería mejor usar los caracteres fisiológicos intrínsecos como base de la diferenciación, más bien que una expresión morfológica transitoria.

Nadson (26) introdujo la idea, como posibilidad teórica, de la existencia de tipos intermedios entre los grandes grupos de bacterias púrpuras, aunque Buder (23) no pudo hallar evidencia experimental en favor de ella. Sin embargo, se ha demostrado que todos los representantes típicos de Thiorhodaceae, en cultivo puro, no dependen de la presencia de sulfuro, sino que pueden utilizar en cambio sustratos orgánicos (7,27 -29), y además que la más común de las bacterias púrpuras no sulfúreas, Rhodopseudomonas palustris , es capaz de oxidar triosulfato durante el crecimiento fotoautrófico(30).

A primera vista parecería que esto elimina la clara diferenciación fisiológica enunciada por Buder, pero debe recordarse que en la naturaleza las bacterias púrpuras sulfúreas no se encuentran en ambientes libres de azufre, por lo que no hay razón para negar la naturaleza esencialmente autotrófica de las mismas. Se puede considerar demostrado que existe una rigurosa separación de las bacterias púrpuras en los dos grupos de Molisch: Thio- y Athiorhodaceae, ya que está basada en criterios ecofisiológicos más que morfológicos.

I.2. Breve descripción de las bacterias fotosintéticas

Las bacterias fotosintéticas son un grupo de microorganismos acuáticos con características muy particulares. Para clasificarlas Pfennig y Truper (33) crearon el orden Rhodospirillales, introducido en la 8ª edición del Manual de Bergey.

La siguiente descripción está basada en parte en las revisiones de van Niel (2,30,31), en la de Pfennig (32) y en el Manual de Bergey (33,34).

Las bacterias fotosintéticas poseen bacteriocloro-filas y carotenoides. La fijación del dióxido de carbono transcurre a través del ciclo reductivo de las pentosas-fosfato. Todas las cepas estudiadas poseen citocromos, ubiquinonas y ferroproteínas no hemínicas del tipo de la ferredoxina (35). Los fotopigmentos se localizan en sistemas membranosos internos, continuos con la membrana citoplasmática, o bien en vesículas, características del género Chlorobium, las que se disponen adosadas a la membrana citoplasmática (70).

Las bacterias fotosintéticas comprenden esencialmente tres grupos diferentes: las bacterias púrpuras no sulfúreas o Rhodospirillaceae (antes denominadas Athiorhodaceae) , las bacterias púrpuras sulfúreas o Chromatiaceae (antes denominadas Thiorhodaceae) y las bacterias verdes sulfúreas o Chlorobiaceae (antes denominadas Chlorobacteriaceae).

Se han publicado determinaciones del %GC en bacterias fotosintéticas (32,33,36-38), como así también una recopilación de los medios de cultivo usuales (39).

I.2.1. Bacterias púrpuras no sulfúreas: Rhodospirillaceae

Los representantes de esta familia, ampliamente distribuídas en la naturalezam poseen células por lo general pequeñas, esféricas, o bastones cortos o largos, o bien vibrioides o espiraladas, móviles por flagelo polar, excepto en un género que posee flagelos perítricos. Son todas Gram negativas. La multiplicación es por fisión binaria o bien por brotación. No poseen vacuolas gaseosas.

Son generalmente microaerófilas, aunque muchas crecen aeróbicamente en la luz u oscuridad. Pueden cultivarse a expensas de una gran variedad de sustratos orgánicos simples, tales como alcoholes, ácidos grasos, hidroxiácidos, aminoácidos, etc. Requieren vitaminas del grupo B para el crecimiento. El hidrógeno molecular sirve como dador de electrones para muchas cepas. Se ha demostrado también la fijación de nitrógeno molecular por muchas de ellas.

Poseen bacterioclorofila a ó b y diversos carotenoides. Como materiales de reserva alamacenan polisacáridos, poli- β-hidroxibutirato y polifosfato.

El rango de la relación de bases en el DNA es de 61,2 a 72,4 %GC.

En esta familia se reconocen tres géneros: Rhodopseudomona Rhodospirillum, Rhodomicrobium, diferenciados sobre bases estrictamente morfológicas (30,31,33).

En el género Rhodospirillum se clasifican las bacterias espiraladas, Gram negativas, móviles por flagelo polar, y que se multiplican por fisión binaria . Rango de la relación de bases en el DNA: 61,7- 65,8%GC.

El género Rhodopseudomonas comprende a las bacterias con forma de bastones u ovoides a esféricas, Gram negativas, móviles por flagelo polar, que se multiplican por fisión binaria o por división asimétrica (brotación sin formación de pedúnculo). Con bacterioclorofila a ó b y una variedad de carotenoides que determinan el color de los cultivos, que van del verde al púrpura, con una gama intermedia de tonos rojos y marrones.

En las especies que se multiplican por fisión binaria, los pigmentos se localizan en un sistema membranoso vesicular o tubular, mientras que en las que se reproducen por brotación dichos pigmentos se encuentran en un sistema

membranoso lamelar.

Crecen anaeróbicamente a la luz a expensas de sustratos orgánicos, desarrollando sistema pigmentario fotosintético; también son capaces de crecer en forma aerobia o microaerofila. La presencia de oxígeno tiene poco o ningún efecto sobre el crecimiento a la luz, excepto en el caso de mutantes carentes de carotenoides, los que en estas condiciones mueren rápidamente por una fotooxidación sensibilizada por la bacterioclorofila (40).

Rango de la relación de bases en el DNA: 62,2 - 72,4 %GC.

En el género Rhodomicrobium se clasifican las bacterias ovoides que se multiplican por brotación (41) y que por su tipo de desarrollo se asemejan a las incoloras Hyphomicrobium. Son móviles por flagelos perítricos, Gram negativas. Contienen bacterioclorofila a y carotenoides en membranas internas de tipo lamelar. No contienen vacuolas gaseosas. Rango de la relación de bases en el DNA: 61,8 - 63,8%GC.

I.2.2. Bacterias púrpuras sulfúreas: Chromatiaceae

Las bacterias de esta familia presentan en sus hábitat naturales una variedad de tipos morfológicos que difieren en forma tamaño, color y modo de agregación, todo lo cual permite diferenciarlas satisfactoriamente sólo sobre bases morfológicas. Por esto Winogradsky (25) propuso una división del grupo basándose enteramente en observaciones de materiales recogidos de fuentes naturales, sin obtener cultivos puros. Un gran avance en el estudio de esta familia se logró con la introducción de medios definidos simples de cultivo (2) con los que se realizaron varios aislamientos en cultivo puro. Las sucesivas modificaciones de dichos medios y de las condiciones de incubaciones, han permitido aislar un gran número de especies en cultivo puro (42-46).

Las células aisladas tienen forma esférica, ovoide, de bastón, vibroide o espiralada; son Gram negativas, móviles o no, con o sin vacuolas gaseosas. Las formas móviles tienen flagelo polar, pudiendo verse, en las formas mayores, el penacho de flagelos polares al microscopio de campo claro. Poseen bacterioclorofila a ó b y diversos carotenoides.

La mayoría de las especies son anaerobias estrictas y asimilan dióxido de carbono fotolitotróficamente en presencia de azufre elemental o sulfuro. Acumulan azufre intracelularmente, excepto en el género Ectothiorhodospira que lo hace extracelularmente. Todas las cepas fotoasimilan sustratos orgánicos simples, tales como acetato o piruvato, por lo cual todas las formas son potencialmente mixotróficas. Para muchas cepas se ha demostrado la fijación de nitrógeno molecular. Como materiales de reserva almacenan polisacáridos, poli-β -hidroxibutirato y polifosfato.

Las formas mayores requieren vitamina B_{12}.

Rango de la relación de bases en el DNA: 45-70,4% GC.

En esta familia es notable el hecho de que las formas mayores (Thiospirillum, Chr. okenii, Chr. weissei, Chr. warmingii) tienen valores considerablemente más bajos que los encontrados para otras especies de la misma familia (32,22).

I.2.3. Bacterias verdes sulfúreas: Chlorobiaceae

Presentan células de forma esférica, ovoide o de bastón, que se multiplican por fisión binaria o binaria más terciaria. Son inmóviles, excepto el género Chloropseudomonas cuyas células poseen flagelos polar. Algunos géneros presentan vacuolas gaseosas. En presencia de sulfuro depositan glóbulos de azufre elemental extracelularmente, nunca intracelularmente. Dependiendo de las condiciones ambientales, la mayoría de las formas puede desarrollar como células aisladas o en masas celulares embebidas en limo.

Poseen bacterioclorofilas c y d en mucha mayor cantidad que bacterioclofila a. En las formas de color marrón se encuentra también bacterioclorofila e (47). Poseen distintos carotenoides según la especie.

Materiales de reserva: usualmente polifosfatos; nunca ha sido hallado poli-β -hidroxibutirato en las cepas estudiadas; se han identificado polisacáridos sólo en Cps. ethylica.

Rango de la relación de bases en el DNA: 48,5-58,1%GC.

I.3 Rhodopseudomonas palustris

Pueden encontrarse descripciones detalladas de este microorganismo realizadas por van Niel (30), en el Manual de Bergey (33,34) y otras publicaciones (48-50).

I.3.1. Morfología:

Tiene forma de bastón, aunque en ciertos medios y especialmente en cultivos jóvenes, pueden predominar organismos muy cortos, ligeramente curvados, similares a vibrios. El tamaño es extraordinariamente variable aún para la misma cepa, y es fuertemente influenciado por la edad del cultivo y composición del medio. Las células más pequeñas se observan en cultivos jóvenes en extracto de levadura, en condiciones fotosintéticas, midiendo 0,6 a 0,8 por 1,2 a 2,0 μ , siendo móviles por medio de un flagelo polar. En cultivos viejos es característico la formación de rosetas y racimos en los cuales las células se unen por sus polos flagelados. En medios orgánicos complejos las células pueden alcanzar un tamaño de 10 μ , de forma irregular que puede dar ramificaciones. Estas formas muestran una fuerte reminiscencia a especies de Corynebacterium y Mycobacterium, siendo por regla general inmóviles. Este comportamiento es el hecho morfológico más fácilmente distinguible de la especie.

I.3.2. Color:

Los cultivos líquidos anaeróbicos son al principio rosa pálido, virando luego al rojo o rojo parduzco ;los cultivos viejos son de un color marrón- rojizo profundo. Los cultivos aerobios son incoloros o, a lo sumo, rosados.

El color, esto es, la producción de pigmentos, depende del medio: en malonato, tiosulfato, glicerol, donde el desarrollo es pobre, predominan las tonalidades más pálidas, mientras que en medios con ácidos grasos se tornan casi marrones. Los pigmentos que posee son la bacterioclorofila a y carotenoides tales como licopeno, rhodopina, spiriloxantina.

I.3.3. Fisiología:

En extracto de levadura crece en un rango de pH entre 6 y 8,5; la temperatura óptima es de 30 - 37°C.No se detectan olores característicos, salvo en cultivos viejos, en los

que puede desarrollarse una leve fragancia a ionona.

La mayoría de las cepas pueden crecer sobre la superficie de placas de agar. Ninguna cepa es capaz de licuar gelatina.

Crece en medios minerales con sustratos orgánicos simples y bicarbonato, suplementados con p-aminobenzoato como factor de crecimiento; algunas cepas requieren además biotina.

I.3.4. Características bioquímicas:

Todas las cepas crecen a expensas de tiosulfato y desarrollan profusamente en medios con glutarato y etanol. Ninguna crece en soluciones con manitol, sorbitol, glucosa o manosa como dador de electrones, pero si el medio contiene un dador adicional utilizable, el desarrollo es normal y los hidratos de carbono no son inhibitorios. El hidrógeno molecular puede ser oxidado, y la leucina ser utilizada como sustrato. Como fuente de nitrógeno es capaz de utilizar sales de amonio.

Entre las enzimas se pueden detectar hidrogenasa catalasa, fórmico hidrogenliasa (49) y un sistema inducible capaz de oxidar tiosulfato (51).

Los materiales de reserva están constituídos por polisacáridos, poli-ß-hidroxibutirato.

La relación de bases en el DNA es de 64,8-66,3%GC.

I.3.5. Reproducción:

Se produce por brotación. La célula madre origina un tubo delgado, de hasta dos veces la longitud de la célula original, en el polo opuesto al flagelo; el extremo del tubo se ensancha (formación del brote) y la célula hija se vuelve tan grande y opaca como la célula original, produciendo un organismo con forma de clava; tiene lugar entonces una división asimétrica, que produce una célula hija ovoide, quedando la célula madre con el tubo.

I.3.6. Cultivos de enriquecimiento

De acuerdo con las características generales de la especie, ésta puede ser fácilmente obtenida por enriquecimiento en medio de sales con etanol, glutarato o tiosulfato. También es posible obtenerla en medios de enriquecimiento con benzoato como única fuente de carbono y ácido p-aminovenzoico como factor de crecimiento (52).Enriquecimientos

con p-hidroxibenzoato también producen Rps. palustris (53)

I.4. Citología de las bacterias fotosintéticas

La ausencia de cloroplastos en las células de las bacterias fotosintéticas es una propiedad que las distingue de los organismos eucarióticos, y esto ha dado origen a numerosas investigaciones respecto a las relaciones entre estructura y función.

Mediante centrifugación de extractos de R.rubrum, se aisló una fracción con una constante de sedimentación de 190S, que presentaba un espectro de absorción similar al de las células intactas (54,55). La microscopía electrónica de esta fracción mostró estructuras con formas de discos, con un diámetro de alrededor de 1100 Å(56). Estas partículas eran capaces de realizar una fosforilación fotoinducida (57, 58).

Estas partículas,llamadas "cromatóforos", han sido consideradas como la unidad estructural del aparato fotosintético, idea apoyada por el estudio de secciones ultrafinas de R.rubrum (59), las que mostraron en células crecidas a la luz, estructuras similares a los cromatóforos. En secciones ultrafinas de Rps.spheroides se encontraron vesículas unidas a la membrana (59), de tamaño más pequeño pero de aspecto similar a las de R.rubrum, e idénticos resultados se obtuvieron con Chromatium D (60).

Sin embargo, pronto se comprendió que estas unidades estructurales son artificios de preparación. No pudo obtenerse cromatóforos de R.rubrum si éste se lisaba por medio de un shock osmótico suave (61). Por otra parte, las estructuras vesiculares no son un rasgo característico de las bacterias púrpuras. Los estudios de cortes ultrafinos de R.molischianum (62), Rhodomicrobium vannielii (63),R.fulvum, Rps.palustris y Rps. viridis (64) mostraron líneas de lamelas apiladas regularmente, situadas cerca de la periferia de las células. Además, por estudios microscópicos de R.molischianum (65,66), R.rubrum (67) y Rps.spheroides (68) se obtuvo evidencia de la existencia de una continuidad de las lamelas o estructuras vesiculares con la membrana citoplasmática (61,69).

Es conveniente distinguir los términos morfológicos de los funcionales (70), y en este sentido se recomienda adoptar el término "membrana citoplasmática" para nombrar a la

membrana que limita al citoplasma y que está por debajo de la pared celular, y el de "membrana intracitoplasmática" para designar a toda estructura membranosa ubicada dentro de la célula (95). Se usa el término "aparato fotosintético" para denominar las unidades funcionales que llevan a cabo las reacciones de transporte de electrones dependientes de la luz, independizando a este término de la localización del aparato fotosintético. El sistema respiratorio comprende a todas las unidades funcionales que transfieren electrones desde NADH u otro dador al oxígeno. En estos dos últimos términos se incluyen las reacciones de fosforilación.

En la figura 1 se ha bosquejado un resumen de los diferentes tipos de membranas intracitoplasmáticas.

El material cromatofórico de R.rubrum,Rps.spheroides y Chromatium puede separarse en dos fracciones mediante centrifugación en gradiente de sacarosa (88-90). Estas fracciones se denominan "pesada" y "liviana" de acuerdo a sus posiciones en el gradiente.En el caso de Rps.spheroides estas fracciones no sólo difieren en sus velocidades de sedimentación sino también en la relación de bacterioclorofila a carotenoides y en el espectro de absorción de la bacterioclorofila (89). Aparentemente estos resultados no son debidos a artificios de preparación.

Los cromatóforos de R.rubrum tienen una contante de sedimentación de 190 S(54); para la fracción liviana de Rps. spheroides se han reportado valores de 153 S (89) y 165 S (191); para las partículas aisladas de Choromatium el valor hallado es de 120 S (60).

La microscopía electrónica demuestra que una gran parte de los cromatóforos aislados son partículas esféricas de 50nm de diámetro. Por difracción de rayos X se calculó que para la fracción liviana de Rps.spheroides el diámetro es de 60nm(92); para Chromatium se encontró un diámetro de 65nm.

En preparaciones de R.rubrum y Rps.capsulata observadas al microscopio electrónico luego de realizar una tinción negativa, se hallaron subunidades estructurales de 50 Å de diámetro (93). Aparecen a veces como protuberancias uniformes, ordenadas con alguna regularidad sobre la superficie de las vesículas (94). La función de estas partículas es motivo de discusión. Dado que se han aislado factores de acoplamiento de la fosforilación a partir de membranas intracitoplasmáticas de Rps. capsulata y Chromatium (95,96), y por

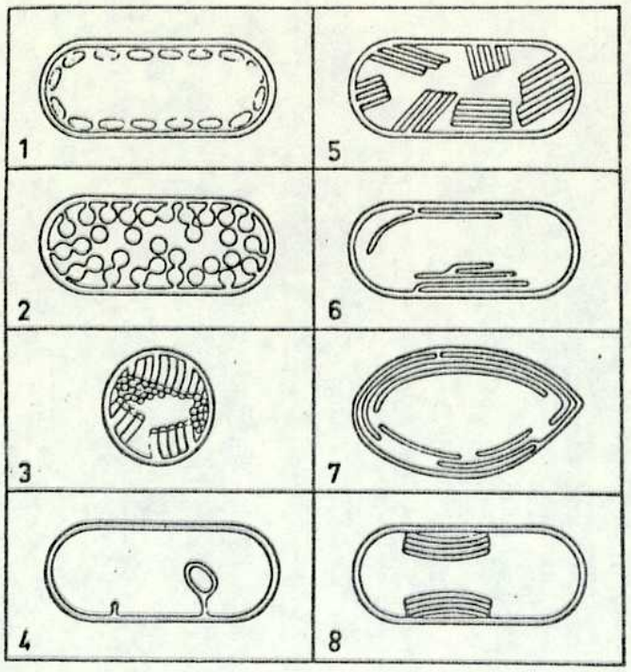


Fig.1 Ordenamientos de las estructuras de membranas intracitoplasmáticas de bacterias fotosintéticas (tomado de (70)).

1:vesículas de Chlorobium(30 x 120nm) en C.limicola (71,72),C. thiosulfatophilum (71,72), C.phaeovibrioides (32), C.phaeobacteroides (73), Pelodyction clathratiforme (73), Pelodyction aggregatum (74), Cps. ethylica (74) y Prosthecochloris aestuarii (75).

2:sistema de membrana vesicular, diámetros 30- 80nm en R.rubrum (59,68),Rps. spheroides (68), Rps.capsulata (76),Chromatium D (77,78), Chr.okenii (71), Chr.weissei (71). Thiospirillum jenense (71) y Thiocapsa roseopersicina (71,79).

3:Sistema de membrana tubular en Thiocapsa pfenigii (80).

4:invaginaciones simples de membranas, pequeñas e irregulares en Rps. gelatinosa (81) y R.tenue (82).

5:apilamientos de dobles membranas cortas unidas a la membrana citoplasmática en R.molischianum (66,83),R.fulvum (84),Ectothiorhodospira (85) y R.photometricum (32). Las membranas en los apilamientos forman un ángulo agudo con la membrana citoplasmática en R.molischianum y R.fulvum pero no en Ectothiorhodospira .

6:lamelas paralelas continuas eon la membrana citoplásmatica, parcialmente ramificadas y con estructuras dispuestas irregularmente en Rps.palustris (50) , Rps.acidophila (32).

7:Capas concéntricas de dobles membranas en Rhodomicrobium vannielii (63).

8:Apilamientos similares a granas de dobles membranas parcialmente curvadas, paralelos a la membrana citoplasmática en Rps.viridis (86,87).

analogía con resultados similares obtenidos con cloroplastos (97), se ha supuesto que el factor de acoplamiento estaría localizado en la superficie de las protuberancias.

Las bacterias verdes sulfúreas poseen características en su estructura fina que las diferencian de otros microorganismos fotosintéticos. Los elementos más notables son vesículas grandes, oblongas, de 300-400 Å de ancho por 1000-1500 Å de largo, dispuestas inmediatamente debajo de la membrana citoplasmática a todo lo largo de la región cortical de las celúlas. Estas vesículas están rodeadas de una membrana delgada, opaca a los electrones, y de un espesor de 30 Å (71). Esta membrana está, en algunas partes, adherida a la membrana celular propiamente dicha, pero es diferente de ella. Cuando los especímenes para la observación al microscopio electrónico son embebidos con Vestopal o metacrilato, las vesículas aparecen transparentes a los electrones y vacías; sin embargo, cuando son embebidos con resinas epoxi, el contenido de las vesículas aparece opaco a los electrones y muestra una estructura fina fibrilar.

Las secciones ultrafinas de bacterias verdes sulfúreas muestran, además de las vesículas ya mencionadas, estructuras membranosas intracitoplasmáticas similares en apariencia y localización a los mesosomas (64,71,98).

II. Propiedades generales de los tetrapirroles

Existen en la biósfera innumerables compuestos pigmentados de origen natural. Entre ellos se destacan tres grupos químicamente relacionados, pues todos son tetrapirroles cíclicos. Un primer grupo está representado por el pigmento rojo hemo; otro grupo lo está por el pigmento verde clorofila, y el tercer grupo comprende a las cobalaminas. Habría que mencionar también otro grupo de tetrapirroles, los no cíclicos, que incluye a los pigmentos biliares y a las ficocianinas y ficoeritrinas de las cianobacterias.

Se han publicado un gran número de libros y revisiones sobre los tetrapirroles. El libro de Lascelles (99) presenta un excelente tratamiento de l s aspectos biológicos de estos compuestos , y el de Falk (100) se ha convertido en el libro de consulta para todo trabajo sobre la química de porfirinas y metaloporfirinas. Smith (101) publicó una revisión de este último libro, haciendo una especial énfasis en los aspectos sintéticos y espectroscópicos de los tetrapirroles. Entre las revisiones deben destacarse, el trabajo de Burnham (102) y el de Granick y Sassa (103) sobre la regulación de la síntesis de hemo y clorofila.

Hoppe-Seyler comprobó en 1880 (104) que el hemo y la clorofila estaban muy relacionados entre sí. Las cobalaminas fueron descubiertas mucho despúes, pero al poco tiempo del aislamiento de la vitamina B_{12} en forma simultánea por Smith en Inglaterra (105-106) y por Rickes y colaboradores en Estados Unidos (111) los estudios químicos sobre su estructura demostraron que era un tetrapirrol cíclico, y por tanto emparentado al hemo y a la clorofila.

Willstatter y colaboradores (107) demostraron que el hemo y la clorofila son tetrapirroles y el grupo de Fischer (108) determinó la posición de las varias cadenas laterales unidas a los mismos. La estructura del hemo se estableció en 1928 y la de la clorofila en 1934. La confirmación de la estructura del hemo mediante síntesis total de la molécula fue realizada por Fischer y colaboradores (108). La síntesis total de la clorofila fue realizada por Woodward y colaboradores (109,110).

Varios grupos de investigadores han contribuído al esclarecimiento de la estructura de la vitamina B_{12}(111-117), ya sea mediante los análisis químicos clásicos o bien mediante cristalografía de rayos X.

En la figura 2 pueden verse las estructuras del hemo, clorofila y vitamina B_{12}. El examen de estas estructuras y su comparación con las mostradas en la figura 3 demuestran que el hemo y la clorofila son derivados de la porfina y que la vitamina B_{12} es un derivado de la corrina.

La similaridad en propiedades entre porfina, corrina, hemo, clorofila y cianocobalamina decrece marcadamente en el orden mencionado, pero este hecho no es tanto debido al átomo de metal o a los varios sustituyentes en, las posiciones β de los pirroles, sino más bien a las alteraciones en la conjugación dentro del anillo macrocíclico.

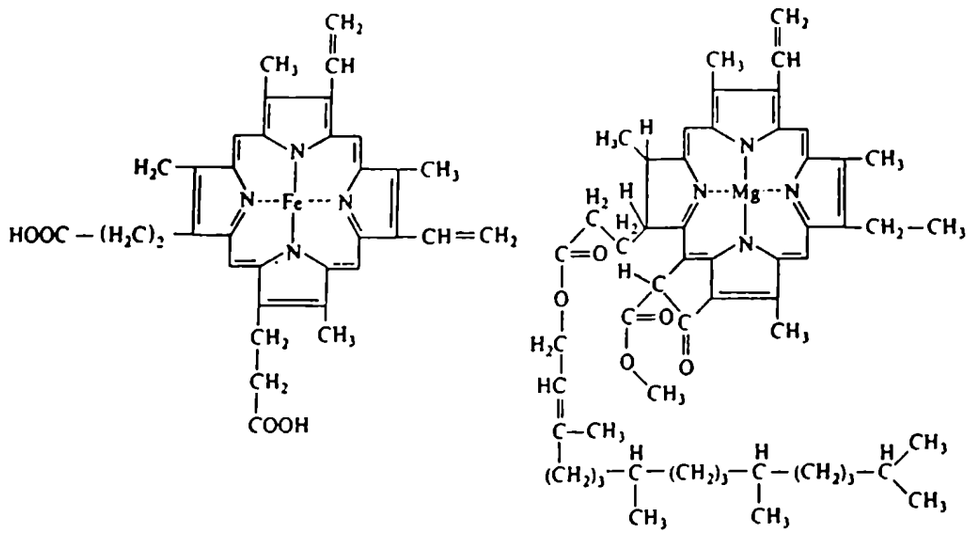
II.1. Estructuras químicas y propiedades espectrales

Para una mejor consideración conviene dividir a los tetrapirroles en varias clases de compuestos.

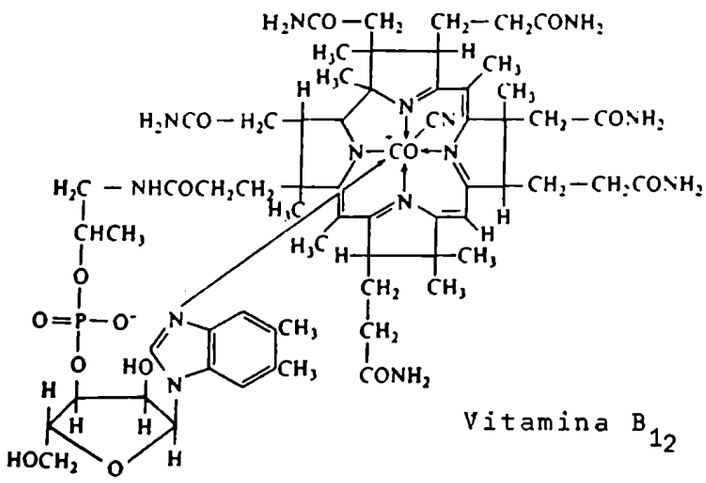
Por definición, las porfirinas son tetrapirroles cíclicos libres de metales. Los anillos se designan por las letras A,B,C, y D, y están unidos por puentes metínicos denominados α,β,γ, y δ , que unen las posiciones α de los pirroles. En las porfirinas, los hidrógenos de las posiciones β de los pirroles de la porfina están sustituídos por grupos alquílicos (ver fig.3).

Las moléculas de porfirina son aproximadamente planas, y miden alrededor de 10 Å por cada lado. Los estudios con rayos X (118-120) demostraron que el esqueleto porfina es un poco más flexible de lo que generalmente se cree, permitiendo esta flexibilidad desacomodarse a los anillos pirrólicos del plano medio del anillo, y más aún, el átomo metálico en algunas metaloporfirinas está bastante afuera del plano medio del anillo de la porfirina (120,121).

La estructura tetrapirrólica macrocíclica que se presenta en las porfirinas tiene once dobles ligaduras. La alta estabilidad de estas estructuras se debe principalmente a su estabilización por resonancia. La teoría de la valencia atribuye la estabilidad de las porfirinas al gran número de híbridos de resonancia de igual o aproximadamente igual energía. La teoría orbital molecular explica esta estabilidad por

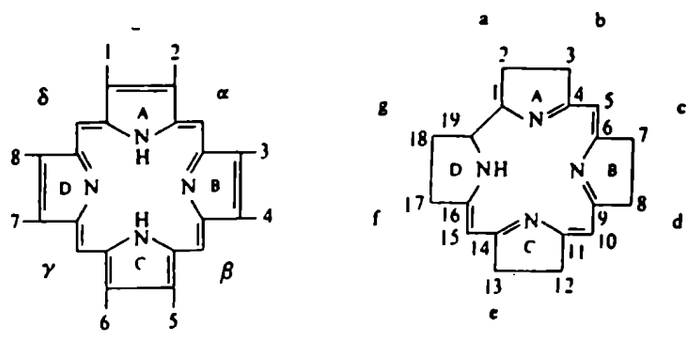


Hemo Clorofila



Vitamina B_{12}

Figura 2: Estructuras de Metalo-Tetrapirroles Típicos



Porfina Corrina

Figura 3: Sistemas de numeración para porfina y corrina. Existen dos convenciones diferentes, tal como puede verse. Algunas porfirinas de interés tienen los siguientes sustituyentes:

Uroporfirina III : 1,3,5,8 acetato; 2,4,6,7 propionato
Uroporfirina I : 1,3,5,7 acetato; 2,4,6,8 propionato
Coproporfirina III: 1,3,5,8 metil ; 2,4,6,7 propionato
Coproporfirina I : 1,3,5,7 metil ; 2,4,6,8 propionato
Protoporfirina IX : 1,3,5,8 metil ; 2,4,vinil;6,7 propionato
Mesoporfirina IX : 1,3,5,8 metil ; 2,4, etil; 6,7 propionato
Hematoporfirina IX: 1,3,5,8 metil ; 2,4 hidroxietil; 6,7 propionato.
Deuteroporfirina IX: 1,3,5,8 metil ; 2,4 hidrógeno; 6,7 propionato.

la deslocalización de los electrones que les permite moverse a través de un anillo conjugado plano, o sea que no están restringidos a orbitales atómicos sino que se mueven en un orbital molecular. Cuanto más extenso sea el sistema conjugado, menor es la diferencia de energía entre el estado normal y el excitado, ocasionando esto que la absorción de luz se produzca a longitudes de onda cada vez mayores.

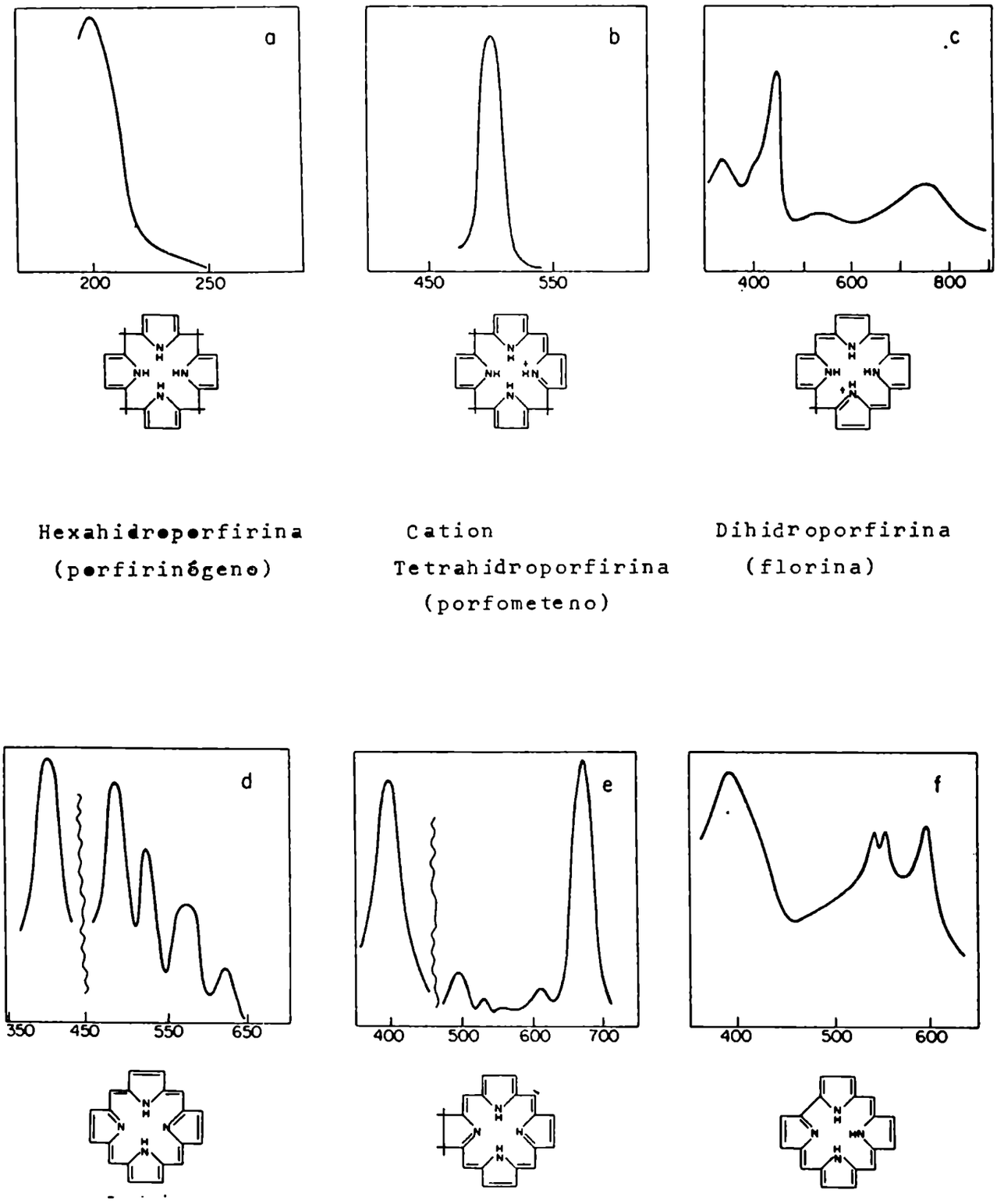
La estabilidad del anillo de las porfirinas es también una estabilidad termodinámica, puesto que la disposición plana conjugada y cíclica tiene un mayor calor de formación desde sus elementos que el que tendría un sistema no conjugado.

El anillo porfirina es, además, muy estable químicamente: es estable frente a ácidos y bases fuertes, y las sustituciones se logran sólo con dificultad. Todos los tetrapirroles naturales conocidos están sustituídos en las ocho posiciones β del anillo, lo que disminuye más la posibilidad de sustituciones. Pero por otro lado, los tetrapirroles son altamente susceptibles a las reacciones catalizadas por la luz; además forman rápidamente quelatos muy estables con metales de transición, aunque en la naturaleza sólo se encuentran tetrapirroles funcionales unidos a magnesio, hierro y cobalto.

La designación del anillo básico de la vitamina B_{12} es corrina, que contiene seis dobles ligaduras (122). La corrina difiere de la porfina en uno de los puentes metínicos (γ) está ausente, y por tanto los anillos pirrólicos A y D están directamente unidos a través de sus posiciones α . El anillo corrina es más reducido que el de porfina.

Los corroles se definen como tetradehidrocorrinas y contienen diez dobles ligaduras. Los corroles y las porfinas tienen un grado de conjugación similar y poseen análogas características químicas y físicas . Se han podido sintetizar algunos corroles simples (123,124) (ver figura 4).

Es posible adicionar seis átomos de hidrógeno al núcleo porfina uniéndolos a los puentes metínicos y a los átomos de nitrógeno pirrolenínicos. Tal porfirina reducida se conoce como porfirinógeno, y su estructura puede verse en la Figura 4. Estos compuestos no tienen conjugación, por lo cual son muy inestables e incoloros. Absorben luz en la zona de 200 nm, característica de la absorción de los monopirroles.



Hexahidroporfirina (porfirinógeno)

Cation Tetrahidroporfirina (porfometeno)

Dihidroporfirina (florina)

Porfirina

Clorina

Corrol

Figura 4: Estructuras básicas y espectros generales de algunas tetrapirroles.

Es muy importante hacer notar aquí que en la biosíntesis de porfirinas, excepto en la etapa de inserción del metal, los verdaderos intermediarios son los porfirinógenos.

La clorina tiene reducidas las posiciones β de uno de los anillos pirrólicos, pero como hay retención de la conjugación cíclica, los derivados de ella muestran más similaridad con las porfirinas que cuando la conjugación se pierde. Las clorinas tienen bandas de absorción alrededor de 400 y 680 nm. En la figura 4 se muestran las estructuras y espectros de porfirinas, de porfirinas con diferentes grado de reducción y del corrol.

Entre los derivados de porfirinas existen varios compuestos de interés biológico que son parcialmente reducidos, como ser la clorofila a tiene dos átomos de hidrógeno adicionados a posiciones β del anillo D y así se convierte en una clorina; la bacterioclofila a esta reducida en los anillos B y D, y por tanto es una dihidroclorina.

Las porfirinas, clorinas y corroles presentan espectros de absorción típicos. Todos ellos muestran una muy intensa absorción en la zona de 350-450nm, llamada "banda de Soret", y que está presente cuando existe una conjugación cíclica completa. Además tienen otras bandas en la zona visible del espectro. Las sustituciones producen alteraciones en las longitudes de onda a las que se produce absorción, como así también alteración de los coeficientes de extinción, aunque estos cambios son relativamente pequeños para la banda de Soret, comparados con los dramáticos efectos que se producen en la zona visible del espectro. La absorción de la banda de Soret es muy intensa (E_m=1-5x 10^5), mucho mayor que la absorción de las bandas en la zona del visible.

Es muy importante el efecto de los metales sobre las propiedades espectrales de las porfirinas. Así, el típico espectro de una porfirina, con cuatro bandas en la zona del visible se transforma en uno de dos bandas cuando un metal se une a la misma.

Todos los tetrapirroles cíclicos libres de metales exhiben una intensa fluorescencia roja cuando son irradiados con luz ultravioleta, propiedad de particular valor para la medición cuantitativa de porfirinas en sistemas biológicos.

II.2. Bacteriocloroflilas

Es importante enfatizar que no existe una correlación entre los diversos grupos taxonómicos de bacterias fotosintéticas y el tipo de bacteriocloroflila que ellas poseen. La BChl a, que es el pigmento característico de las bacterias púrpuras, se presenta también, aunque en pequeñas cantidades, en las bacterias verdes sulfúreas (125), aparentemente localizada en los centros de reacción. La BChl b se presenta en una especie de Rhodopseudomonas y en otra de Chromatiaceae. La Cloribium-clorofila 660 (BChl c) está presente en C. thiosulfatophilum junto con clorobium-clorofila 650 (BChl d). Especies marrones de Chlorobiaceae , p.ej. C. phaeobacteroides y C.phaeovibrioides poseen clorobium-clorofila 650 y BChl e.

Se ha propuesto un sistema racionalizado de nomenclatura de las clorofilas bacterianas (125), donde todas reciben el nombre genérico de "bacteriocloroflila", distinguiéndose entre ellas por una letra como sufijo.

En la figura 5 se muestran las relaciones entre la clorofila a y las diversas bacteriocloroflilas.

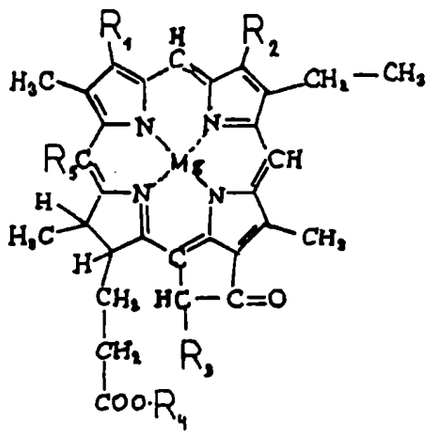
II.2.1. Estado natural de la bacteriocloroflila

La BChl a adquiere "in vivo" propiedades particulares que dependen del microorganismo en que se halle.

Al examinar los espectros de absorción de los cromatóforos aislados de varios microorganismos que poseen BChl a se destaca la presencia de la banda de Soret (370-380nm), la de una banda típica a 590nm y una serie de bandas entre 800 y 900 nm. Se observa además una banda a 265nm que se debe en parte a la BChl a, como así también picos entre 310-320nm (130).

El espectro en el infrarrojo cercano de R.rubrum consta de dos bandas, mientras que la mayoría de las bacterias púrpuras presentan por lo menos tres bandas de absorción en dicha zona. La intensidad relativa de los picos depende de las condiciones de crecimiento de la bacteria.

El espectro de absorción de Rps.palustris y de Rhodomicrobium vannielii (131) se asemejan superficialmente al de R.rubrum. Sin embargo, en aquellas dos bacterias el espectro muestra un hombro hacia el lado de las mayores longitudes de onda, lo que indica que existe un tercer



	R_1	R_2	3,4	R_3	R_4	R_5
Clorofila a	$-CH=CH_2$	$-CH_3$	-	$-COOCH_3$	Fitilo	-H
Clorofila b	$-CH=CH_2$	$-CH_0$	-	$-COOCH_3$	Fitilo	-H
Bacterioclorofila a	$-CH-CH_3$	$-CH_3$	dihidro	$-COOCH_3$	Fitilo	-H
Bacterioclorofila b	Estructura desconocida					
Bacterioclorofila c	$-CHOH-CH_3$	$-CH_3$	-	-H	Farnesilo	$-CH_3$
Bacterioclorofila d	$-CHOH-CH_3$	$-CH_3$	-	-H	Farnesilo	$-CH_3$
Bacterioclorofila e	$-CHOH-CH_3$	-CHO	-	-H	Farnesilo	$-CH_3$

Figura 5: (adaptada de cita 32) Relaciones entre las clorofilas a y b y las diversas bacterioclorofilas . Hay otros posibles sustituyentes en las posiciones 4 y 5 y δ-meso de la BChl c(126-128), en las posiciones 4 y 5 de la BChl d(126-127) y en la posición 4 de la BChl e(129).

pico no resuelto debido a una concentración relativamente baja de BChl a que absorbe a esas longitudes de onda mayores.

Todas las bandas del infrarrojo cercano se transforman en una única banda con máximo en 772 nm cuando el pigmento se extrae con solventes orgánicos (132-134).

Las bandas de absorción que se observan entre 420 y 550nm en las preparaciones cromatofóricas, se deben a la presencia de carotenoides, los que varían mucho de una especie a otra.

El marcado corrimiento hacia el rojo de las bandas de absorción de la BChl a "in vivo" permite suponer que ésta se encuentra en un estado de gran organización, tal como pudo demostrarse para la clorofila a en monocapas y cristales (135). Estas y otras evidencias basadas en estudios de propiedades espectrales de la BChl a (136,137), permiten sugerir que las distintas formas de agregación son las responsables de las particulares características espectrales de la BChl a "in vivo" (138,139).

Otro punto de vista, distinto al anterior, es considerar que "in vivo" existen diferentes complejos lipoproteína-BChl (134). Apoya esta idea el hecho de que colorantes unidos a macromoléculas tienen diferentes propiedades espectrales a las del colorante en solución (140,141). Se han podido aislar diversos complejos clorofila-proteína de Chlorella (142,143), de cloroplastos de espinaca (142) y complejos BChl a-proteína de bacterias verdes sulfúreas (144-147), de un mutante azul-verde de Rps. spheroides (148-150) y de R.rubrum (151).

Se ha realizado mucho trabajo para demostrar una relación entre el contenido de carotenoides y las relaciones de las alturas de los picos de BChl a "in vivo" en la zona del infrarrojo cercano (152-153). Sin embargo, en una cepa salvaje y en un mutante carente de carotenoides de Rps. spheroides pudo demostrarse que la intensidad luminosa y el contenido total de BChl en las células son los factores más importantes que determinan las contribuciones relativas de las tres formas de BChl a (154).

III. BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES

III.1. Introducción: Todos los pasos de la biosíntesis del hemo se conocen con mayor o menor detalle (102,155-157). En la figura 6 se muestran los precursores, intermediarios y enzimas que intervienen en dicho camino metabólico. La unión de glicina con succinil-coenzima A (succinil-CoA) produce ácido delta-amino levúlico (ALA) que se autocondensa dando un pirrol, el porfobilinógeno (PBG). A continuación, cuatro moléculas de PBG se unen para formar un anillo tetrapirrólico incoloro, el uroporfirinógano (Urogen). En la naturaleza, esta unión puede realizarse de dos maneras, dando como resultados los isómeros I y III, que se diferencian por la posición de los sustituyentes sobre el macrociclo. Ambos Urogen son descarboxilacos con eliminación de cuatro moléculas de CO_2 de los grupos carboxilo terminales de los restos acético sustituyentes, llegándose así a coproporfirinógano (Coprogen). Los porfirinógenos dan por oxidación las respectivas porfirinas con igual número de grupos carboxilo. El Coprogen III-pero no el isómero I- sufre luego una descarboxilación oxidativa de las cadenas laterales de las posiciones 2 y 4 dando Protogen IX, el que por oxidación produce Protoporfirina IX (Proto IX). A esta última molécula si el une el ion Fe^{++}, resultando así el hemo.

En este camino metabólico se requiere energía para que ocurra la reacción de activación del succinato para producir succinil-CoA. Las demás reacciones están termodinámicamente favorecidas.

Las demás reacciones están termodinámicamente favorecidas.

Las enzimas succinil-CoA sintetasa (de varias fuentes),ALA-sintetasa, coprogenasa, protogen-oxidasa y ferroquelatasa son mitocondriales, en los organismos que poseen estas organelas. Las demás enzimas son solubles.

III.2. Precursores, Intermediarios y enzimas comunes en la biosintesis del hemo y clorofilas

El rol de la glicina, succinato, ALA y ALA-S en este camino metabólico será comentado más adelante.

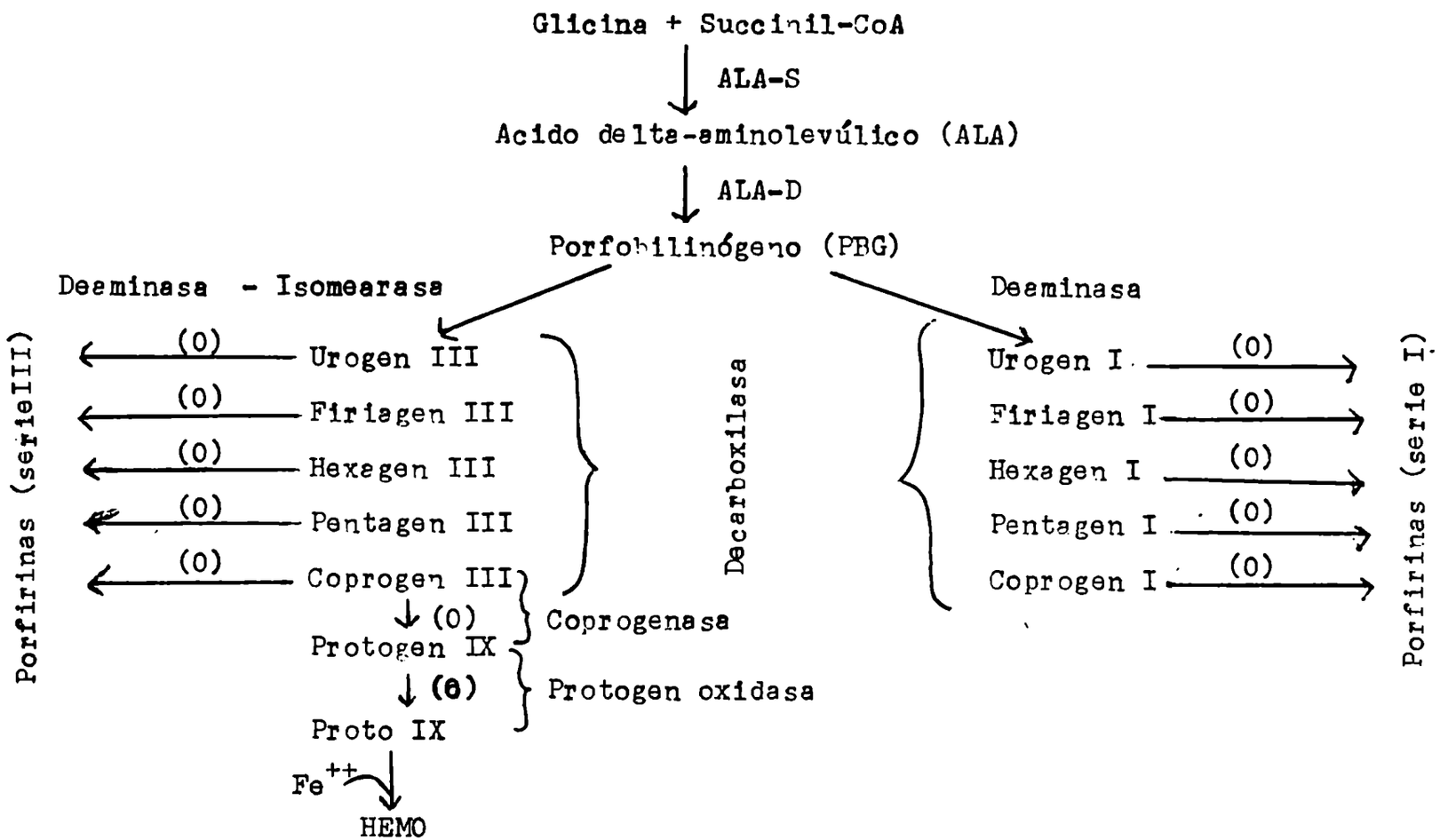


Figura 6: Biosíntesis del hemo.

III.2.1. Succinil-Coenzima A sintetasa

La formación de succinil-CoA está catalizada por la enzima succinil-CoA-S,(E.C.6.2. 1.5), que utiliza en la reacción un nucleósido trifosfato.

Ha sido aislada y estudiada de diversas fuentes, animales (158-160), vegetales (161-167) y microbianas (168-171).

III.2.1.1.Propiedades: La enzima presenta un pH óptimo entre 6,8 y7,5 en las diversas fuentes. En tejidos animales su localización intracelular es mitocondrial (158-160,173); en tejidos vegetales es de cloroplastos, mitocondrial o citoplasmática según la fuente (162,163,165,166,172); en Escherichia coli se halla en la fracción particulada (174) mientras que en Micrococcus denitrificans se la detectó en una fracción sobrenadante de 25.000 x g (170).

Requiere iones Mg^{++} ó Mn^{++} indistintamente. La enzima de mamíferos puede utilizar GTP ó ITP (159), mientras que la de vegetales o bacterias requiere ATP.
En todos los casos el succinato es un sustrato específico, siendo el malonato un inhibidor competitivo (164).En algunos tejidos la enzima es sulfhidrílica (163-165).

El peso molecular de la enzima varía según la fuente: en corazón de cerdo es 45.000 (175), en plantas y bacterias 140.000 (176-178). Se ha demostrado que está compuesta de subunidades: la de corazón de cerdo es un dímero tipo $\alpha\beta$ (175) y la de Escherichia coli un tetrámero tipo $\alpha_2\ \beta_2$ (178).

Se ha propuesto que en callos de semillas de soya podría tener un efecto regulatorio en la biosíntesis de porfirinas (179). La idea de que jugaría un rol directo en la biosíntesis de tetrapirroles está apoyada por el hecho de ser inducible en hígado de ratón por drogas porfirinogénicas (160).

III.2.1.2.Mecanismo de acción: Se ha estudiado con gran detalle el mecanismo de acción de esta enzima de diversas fuentes (180,181), entre ellas la de callos de semillas de soya (182-184). El primer paso de la reacción es la formación de una fosfoenzima (162,174,185,186):

$$E + NTP \rightleftharpoons E\sim P + NDP$$

uniéndose el fósforo el N3 de un resto histidina de la proteína

(187). En el caso de Escherichia coli la subunidad α cataliza su propia fosforilación, mientras que los sitios de unión para otros sustratos están en la subunidad β o comprenden parte de cada una de las sububidades (188).

III.2.2. Ala dehidrasa

El PBG se forma por condensación de dos moléculas de ALA, catalizada por la enzima ALA-D, (E.C.4.2.1.24) , la que a diferencia de ALA-S es fácilmente detectable en extractos animales, vegetales o bacterianos (189).

El PBG fué primeramente detectado en orina (190, 191), hígado y heces (192,193) de pacientes con porfiria aguda. Su estructura química, la de un β-dialquil α-aminometil pirrol con un grupo α-aminometilo reactivo, se demostró por varios métodos tales como la preparación de derivados (194-196), difracción de rayos X (197) y síntesis química (198-201).

Es convertido con gran eficiencia a una mezcla e porfirinas por hemolizados de eritrocitos de pollo (202), a la misma velocidad y productos finales que si se usara ALA como sustrato, lo que indica que es un intermediario entre el ALA y los tetrapirroles(203). Los eritrocitos intactos son impermeables al PBG (204), lo mismo que las células enteras de Rps.sphaeroides (205) y los cloroplastos intactos aislados de Euglena gracilis (206).

III.2.2.1. Propiedades: La enzima ha sido purificada y estudiadas sus propiedades de una variedad de fuentes: hígado de buey (189), hígado de vaca (207), glándula de Harder de rata (208), eritrocitos humanos (209), hojas de trigo (210), hojas de espinaca (211), callos de semillas de soya (212), Euglena gracilis (213), Rps.sphaeroides (214,215),Spirillum itersonii (216),Rps. capsulata (217), Propionibacterium shermanii (218,219), Ustilago sphaerogena (220),Saccharomvees cerevisiae (221).

En animales el ALA-D se encuentra con alta actividad en hígado, riñón, y médula ósea. En la mayor parte de los sistemas estudiados se encuentra en la fracción soluble (155,222), salvo en tejidos vegetales donde estaría localizada en plásticos (223), quizá asociada a la membrana del cloroplasto (224), y se ha postulado que en los fraccionamientos la enzima pasaría rápidamente de los plásticos a la fracción soluble (211).

En una típica proteína sulfhidrílica que, en la gran mayoría de los casos, requiere cisteína o glutation para un máximo de actividad (189,208,214,225,226). La enzima es específica para ALA e inhibida por sus análogos, presentando valores de Km entre $5x10^{-4}$ y 10^{-3}M. Es relativamente estable el calor, alcanzando en muchos casos la velocidad máxima de reacción entre 50 y 65°C. El pH óptimo varía según la fuente entre 7,0 y 9,7. Es inhibida por metales pesados (189,208 221,225) y EDTA (189,212,219,221,225); el ión Cu^{++} está fuertemente unido a la enzima de Ustilago spheerogena siendo esencial para su actividad, habiéndose postulado que este metal ocuparía algún lugar en el sitio activo puesto que el sustrato protege contra la inhibición por agentes quelantes (220).

Se demostró que el ALA-D de Rps.sphaeroides es una enzima alostérica (215) que en presencia de iones K^+, Rb^+ ó NH_4^+ presenta una cinética normal. Los iones K^+ permiten la asociación en dímeros y trímeros activos. El sustrato tiene un efecto cooperativo homotrópico, lo que origina una curva sigmoidal de actividad en función de la concentración de sustrato (227); los diones K^+, Li^+, Rb^+ y NH_4^+ ejercen efectos cooperativos heterotrópicos, lo que origina una curva hiperbólica de actividad en presencia de ellos. Es de interés destacar las características alostéricas del ALA-D de Rps. sphaeroides en relación a la regulación de la biosíntesis de tetrapirroles. La enzima de Rps. capsulata no requiere iones Na^+,K^+, Mg^{++} o Mn^{++} para su actividad, ni el sustrato ejerce efecto cooperativo homotrópico (217).

Para la enzima de hígado se determinó un peso molecular de 140.000 (207) y para la de Rps. sphaeroides uno de 250.000 (215), disociándose ésta en subunidades de pesos molecular 100.000 a 130.000 en presencia de urea 1 M (227,228). En Rps. capsulata el peso molecular es de 260.000 (217).

El ALA-D de Euglina gracilis ha sido purificada y se han estudiado comparativamente las propiedades de la enzima soluble y de la insolubilizada sobre geles de agarosa(229). El peso molecular de la enzima de este tejido es de 280.000.

Nuevas investigaciones demostraron que el ALA-D de hígado bovino tiene un peso molecular de 285.000 (230), y que está compuesta de 8 subunidades de peso molecular 35.000 (231). Observando preparaciones de la enzima pura al microscopio electrónico se demostró que consiste de lóbulos discretos

ubicados en las cuatro esquinas de un cuadrado, postulándose que las 8 subunidades estarían dispuestas con una simetría diédrica. El diámetro de cada subunidad resultó de 4,4 nm(230).

Previamente se había reportado números de subunidades variables entre 6 y 8 (232-236), suponiéndose que esta discrepancia no sería debida a la fuente de la enzima sino quizá a problemas derivados de la carencia de material suficiente para estudios detallados, y en el caso de la enzima de bacterias, a propiedades particulares de asociación y disociación.

En varios tejidos se demostró que bajas concentraciones de hemina inhibían al ALA-D (209,210,214,237), lo que llevó a pensar en un posible rol regulatorio de esta enzima en la biosíntesis del hemo. Se comprobó además que en vegetales hay un aumento de la actividad del ALA-D por iluminación, paralelo al incremento de clorofila (224,238,239).

No pudo detectarse actividad de ALA-D en extractos de Propieonibacterium shermanii crecido aeróbicamente (218), condición en la que no sintetiza corrinas, las que se forman en condiciones anaeróbicas (240,241). Un paso enzimático en la formación depropionato a partir de piruvato es dependiente de coenzima B_{12}(242-244). Al crecer la bacteria en condiciones aerobias y cambiar así el aceptor final de electrones no se requiere coenzima B_{12}. Pareciera que el efecto del oxígeno es directo sobre el ALA-D y que no se forma un inhibidor endógeno de la enzima (218).

También se ha postulado que el ALA-D sería el principal sitio de regulación de la síntesis del hemo en Neurospora crassa (245) y hojas de poroto (238).

Las evidencias indican que el ALA-D podría estar sometida a un control por "feed-back" y que además sería inducible y reprimible.

III.2.2.2. Mecanismo de acción: En todos los casos estudiados parecería que el mecanismo de formación del pirrol implica la formación intermedia de una base de Schiff entre la enzima y el sustrato (227,230,246). Se ha postulado el mecanismo de la Figura 7, en el cual una de las dos moléculas de ALA forma una unión covalente con la enzima. La reducción de esta base de Schiff con BH_4Na ha permitido determinar el número de sitios activos por molécula (230): pareciera que de las 8 subunidades sólo 4 reaccionan con el sustrato a través del grupo ε-amino de un resto de lisina, lo que está de acuerdo a lo

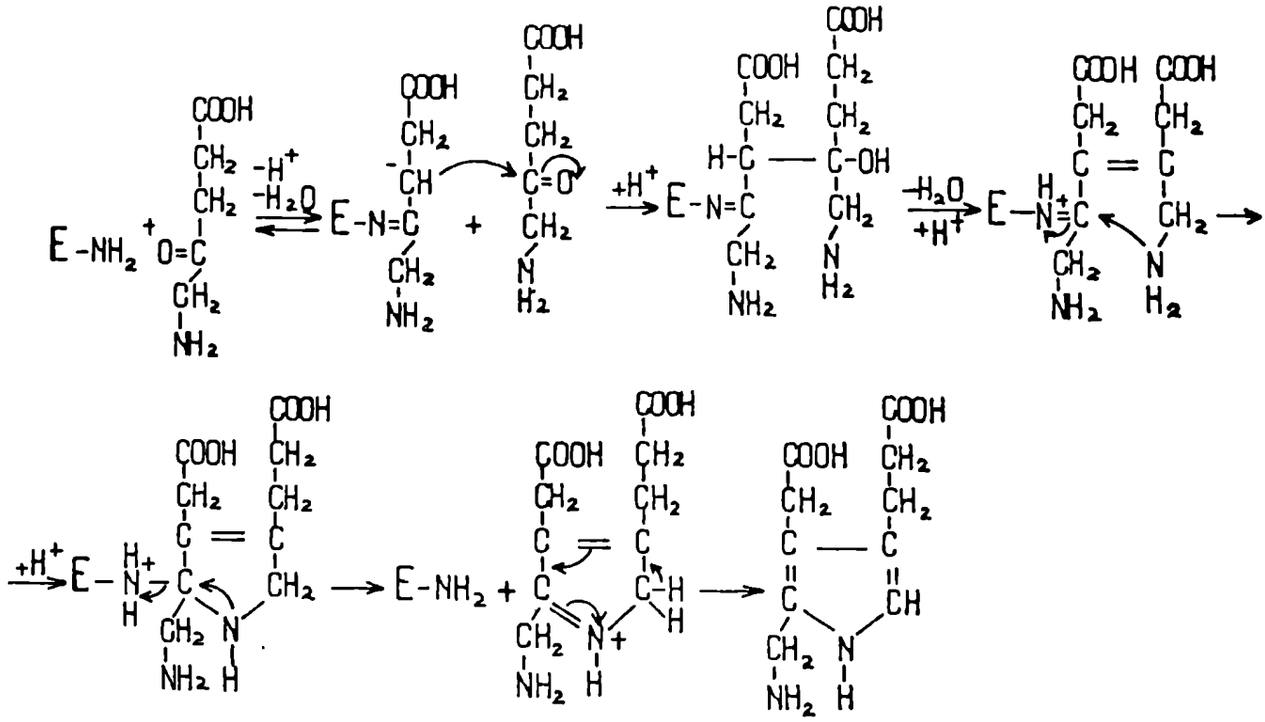


Fig. 7: Mecanismo de síntesis de PBG a partir de 2 moléculas de δALA catalizada por la δALA dehidrasa propuesta por Nandi y Shemin .

previamente determinado en Rps. sphaeroides (215). Se ha determinado que la estructura mínima para que exista actividad de ALA-D sería un dímero (247).

III.2.3. Porfobilinogenasa

La porfobiligenasa (PBGasa) cataliza la condensación de 4 moléculas de PBG liberando 4 de amoníaco y produciendo Urogen III, primer tetrapirrol cíclico de este camino biosintético, el que al oxidarse espontáneamente forma Uro.III. La condensación no enzimática en condiciones aerobias produce en cambio, una mezcla de los isómeros de Uro en proporciones que dependen del pH y temperatura (191,248-250).

III.2.3.1. Propiedades: La formación de Urogen III a partir de PBG requiere la cooperación de dos enzimas, una de las cuales es mucho más estable al calor que la otra (251-253). La enzima estable es la llamada porfobilinógeno deaminasa ó uroporfirinógeno I sintetasa (abreviadamente:deaminasa), que convierte el PBG en Urogen I. La enzima menos estable es la llamada uroporfirinógeno III consintetasa ó isomerasa (abreviadamente: cosintetasa).El PBG en presencia de deaminasa y un exceso de cosintetasa origina Urogen III.

III.2.3.2. Mecanismo de acción: En la conversación enzimá-

tica de PBG se produce el compuesto inesperado. Si se piensa sólo en el camino químico más simple- independientemente de las enzimas-se deduciría que mediante uniones cabeza-cola el producto que debiera formarse es Urogen I. Sin embargo, los organismos vivos han desarrollado un camino para sintetizar Urogen III, un isómero del anterior.

Se han realizado numerosas investigaciones con el objeto de aclarar el mecanismo de esta condensación, y se han postulado numerosos esquemas, muchos de los cuales han sido ya descartados (156,254-256).

Se encontró que 4 moléculas de PBG son convertidas por el sistema deaminasa-cosintetasa en Urogen III (252,253, 257) y que en la solución final no se hallan sustancias pirrólicas detectables por el reactivo de Ehrlich. Tampoco pudo encontrarse formaldehido libre en los medios de incubación y además, ni el formaldehido -C^{14} (258,259) ni el ácido opsopirroldicarboxílico (260) son incorporados en el anillo mecrocíclico. Este último diácido era un supuesto intermediario clave en algunos mecanismos especulativos. Por otra parte, se comprobó que la cosinterasa no transforma al PBG en un sustrato para la deaminasa (como podría ser el isoporfobilinógeno) ni une moléculas de PBG(252,253). Además, el isoporfobilinógeno no es incorporado en Urogen III por el sistema deaminasa-cosintetasa (261), actuando en realidad como inhibidor del sistema enzimático (262). Debe destacarse como un hecho fundamental que el Urogen I no se convierte en el isómero III ni por la cosintetasa ni por el sistema deaminasa-cosintetasa (225,252, 253, 263).

Estudios realizados con enzimas de eritrocitos de ave y Euglenagracilis mediante el empleo de pirroles marcados con C^{13} y análisis de las señales de resonancia nuclear magnética de los productos obtenidos, indicarían que el ensamblaje de las cuatro moléculas de PBG dando Urogen III es el mismo en ambos sistemas, independientemente de la profunda brecha evolucionaria que existe entre ambos (264). Usando estas técnicas pudo establecerse la naturaleza del proceso de transposición por el cual se sintetizan las porfirinas tipo III (264), caracterizado por:

(a) Las tres unidades que forman el anillo A y el puente δ -meso unido a él, el anillo B y el puente α -meso y el anillo C y el puente β-meson, son incorporadas intactas sin transposición.

(b) La unidad de PBG que forma el anillo D se forma con una transposición intramolecular respecto a esa unidad de PBG.

(c) El carbono transpuesto se convierte en el puente γ-meso. Los diferentes mecanismos propuestos y que cumplen con los puntos mencionados anteriormente difieren en la etapa en la cual se propone la transposición.

Para tratar de establecerla se realizaron experiencias de incorporación y dilución isotópica de pirrometanos. Pareciera que pirrometanos del tipo AP-AP o bien PA-AP debieran ser considerados como intermediarios entre PBG y Urogen III (264,265). Otros autores han llegado a diferentes conclusiones (266) habría evidencias de que bajo condiciones normales la reacción tiene lugar a través de un proceso tipo "cierre relámpago" sobre la superficie de la enzima. La consintetasa actuaría como una "proteína especificadora" de la deaminasa, cambiando el modo de condensación del PBG desde el comienzo de la reacción, llevándola así a la formación de Urogen III. En este caso resulta obvio que no pueden existir intermediarios comunes a Urogen I y Urogen III. La formación de ambos isómeros por dos sistemas enzimáticos distintos representaría los caminos por los cuales el PBG comienza su autocondensación: una condensación cabeza-cola, con eliminación de NH_3, o una condensación cabeza-cabeza con desplazamiento de un grupo metilo activado, comstamtemente transferido a través del pirrilmetano que se alarga. Mientras que la deaminasa funciona sólo como una enzima deaminante, el complejo deaminasa-cosintetasa debiera comportarse como una enzima del tipo metil-transferasa.

Se ha postulado otro mecanismo (267) que tiene en cuenta el efecto del ión Mg^{++} en el sistema enzimático de callos de semilla de soya (268) y que implica la posibilidad de la existencia de un catión divalente en el sitio catalítico de la enzima.

III.2.4. Decarboxilasa

La etapa siguiente a la formación de Urogen III consiste en la descarboxilación de las 4 cadenas de los restos acético a 4 grupos metilo. Este proceso es catalizado por la uroporfirinógeno decarboxilasa, llamada también porfirinógeno carboxiliasa o simplemente decarboxilasa.

Esta enzima ha sido investigada en *Chlorella vulgaris* (251), *Rps. sphaeroides* (269,270), eritrocitos humanos (271), de

conejo (272) y ave (273-277), bazo de ratón (278) y glándula de Harder (279).

III.2.4.1. Porfirinógenos como intermediarios en la biosíntesis de tetrapirroles: Los sobrenadantes de eritrocitos de pollo son capaces de utilizar el PBG dando Uro y Copro (203) pero no descarboxilan Uro III (280). Con extractos de hojas de espinaca a partir de PBG se detectó un compuesto incoloro que era sustrato de las enzimas de carboxilantes de Chlorella (252), el que por oxidación producía Uro I. Las preparaciones de Chlorella no utilizan Uro I ó III como sustratos para la síntesis de porfirinas con menos de 8 grupos carboxilo, lo que indicaría que dicho oompuesto incoloro las originaba sin pasar por Uro. Incubando Urogen I se obtiene Copro I, mientras que la incubación de Urogen III produce Copro III y Proto IX(281).

Les extractos de Rps. sphaeroides tampoco transforman Uro I ó III en Copro (269), pero a partir de PBG ó Urogen I ó III se forman las respectivas coproporfirinas sin isomerización, ya que sólo el Urogen III se transforman en Coprogen III mientras que el Urogen I produce exclusivamente Coprogen I.

Los hemolizados de eritrocitos humanos también utilizan el Urogen III para dar Copro III (271). Los eritrocitos de conejo descarboxilan Urogen I ó III dando los respectivos coproporfirinógenos como producto final, aunque pueden ailarse previa oxidación, porfirinas con 5 a 7 grupos carboxilo (272).

Por otra parte, la incorporación de Fe^{59} en hemina por hemolizados de eritrocitos de pato es estimulada por el agregado de Urogen III (282), mientras que Uro I ó III no estimulan. El Urogen III también produce dilución isotópica cuando se utilizan glicina-2-C^{14} como precursor del hemo.

Todos estos datos permiten asegurar que los uroporfirinógenos son los verdaderos sustratos del sistema decarboxilante y que las porfirinas que se detectan son productos de oxidación de los intermediarios formados.

Al demostrarse que un porfirinógeno heptacarboxílico (Firiagen) (273,274) y porfirinógenos con 6 y 5 grupos carboxilo (275) son intermediarios en la biosíntesis de Proto IX, quedó claramente confirmado que la descarboxilación del Urogen transcurre pasa a paso hasta llegar al Coprogen respectivo.

III.2.4.2. Propiedades: La decarboxilasa purificada no actúa sobre ALA,PBG Uro ó Copro, aunque descarboxila los cuatro isómeros del Urogen a distintas velocidades: III > IV >II ≥I(272). Normalmente se la halla en la fracción soluble; requiere anaerobiosis para actuar, especialmente si está purificada (269,270, 272,276,281), aunque también es activa en aerobiosis (273,275,282)

La enzima purificada de eritrocitos de pollo pareciera ser una única proteína , quizá con dos itios catalíticos distintos (276).

La decarboxilasa es sensible al calor (251,276,278) aunque los agentes quelantes no modifican su acción. La inhibición parcial por oxígeno se atribuye a una oxidación de los sustratos (272).

Se trata de una enzima sulfhidrílica, inactiva en su ausencia de glutation (272) o mercaptoetanol (270). Es inhibida por metales pesados, iodoacetamida, p-cloro-mercuribenzoato y DTNB (270,272,278). El Na^+ inhibe parcialmente la enzima de erotrocitos humanos (283) y de pollo (276).

En extractos de Rps. sphaeroides, eritrocitos de pollo hígado de cerdo y levadura se ha demostrado la existencia de un factor termoestable requerido para la actividad (270); otros autores también lo encontraron en eritrocitos de pollo (284), aunque no se pudo confirmar este hecho en eritrocitos humanos (283).

III.2.4.3. Mecanismo de acción: Mediante el estudio del curso de reacción con Urogen III y Firiagen III como sustratos y al de velocidades de reacción a diferentes temperaturas se pudo concluir que la descarboxilación enzimática de la serie III consta de dos etapas definidas: 8-COOH → 7-COOH → 4-COOH, de las cuales la primera es la más rápida (277). Las dos etapas tienen cierto grado de independencia entre sí.

Incubando distintos porfirinógenos isoméricos hepta- y pentacarboxílicos con hemolizados de eritrocitos de aves, se comprobó que todos son convertidos en Proto IX pero a distintas velocidades (285-287). En base a estas evidencias se postuló que la conversión de Urogen III a Coprogen III es un proceso por pasos y que siguen un camino preferido: los grupos acético son descarboxilados secuencialmente en sentido de las agujas del reloj, comenzando sobre el anillo D y siguiendo por los anillos A,B y C.

III.2.5.Coprogenasa

La conversión de Coprogen III a Protogen IX es realizada por la enzima coproporfirinógeno decarboxilasa ó coprogenasa.

III.2.5.1.Propiedades La localización de esta enzima es mitocondrial (203,204,288-289). Ha sido purificada de mitocondrias de hígado bovino (290) y de hígado rata (291). Se trata de una enzima muy específica para su sustrato, el Coprogem III, y por tanto, en condiciones normales y patológicas siempre se forma Proto IX. Si bien ha sido demostrado que la enzima actúa sobre Coprogen IV dando Proto XIII (292), esto no invalidaría el aserto anterior pues no hay pruebas del rol biólogico de los isómeros IV.

La enzima requiere oxígeno para actuar y no utiliza otros aceptores de electrones (290,291). Sin embargo, ella está también presente en la bacteria Chromatium D (293) que es estrictamente anaerobia, debiendo ser el aceptor de electrones diferente al oxígeno.

En Rps. sphaeroides crecida en condiciones fotosintéticas puede medirse actividad de coprogemasa incubando extractos bacterianos anaeróbicamente en oscuridad, en presencia de ión Mg^{++}, ATP, y L-metionina. En estas condiciones los extractos de células crecidas aeróbicamente son inactivos (294-296). Por otra parte, ambos tipos de extractos son capaces de convertir Coprogen III en Proto IX incubados en condiciones aerobias. A fin de explicar estas observaciones se propuso un mecanismo para la coprogenasa anaerobia, que postula que ella es activida por piridín nucleótidos oxidados y que además está asociada una flavoproteína a la reacción (291,295,296).

Los extractos crudos de Chromatium D poseen actividad de coprogenasa anaerobia en presencia de S-adenosil metionina o bien de ATP y metionina. En este caso el requerimiento de otros cofactores es variable (296).

III.2.6.2.Mecanismo de acción: Han sido postulados varios mecanismos para la coprogenasa aerobia, que implican ya sea la formación de porfirinógenos tricarboxílicos (279,290), o bien que la cis-2,4-diacrílico deuteroporfirina IX sea un intermediario (297), o la formación de la porfirina S411 (2-acrílico, 4-propiónico deuteroporfirina IX) (298).

Pudo demostrarse que el trans-2,4-diacrílico deuteroporfirinógeno IX y el monopropiónico, monoacrílico deuteroporfirinó-

geno IX no son sustratos de la coprogenasa (290).

Una hipótesis que estaría de acu rdo con la participación del oxígeno molecular implica la formación de un 2,4-bis (3-hidroxipropiónico) deuteroporfirinógeno IX como intermediario (291,297,299). Este compuesto fué sintetizado como una mezcla de isómeros y resultó ser utilizado por una preparación de coprogenasa mitocondrial (299).

Por estudios de la estructura y síntesis de la harderoporfirina (2-vinil, 4-propiónico deuteroporfirina IX) se concluyó que su porfirinógeno debía ser un intermediario normal entre Coprogen III y Proto IX(300). Por otra parte se pudo demostrar que el harderoporfirinógeno es convertido a Proto IX por Euglena gracilis (301) y por hemolizados de eritrocitos de pollo (302) más eficientemente que su isómero isoharderoporfirinógeno, sugiriéndose así que existe un camino preferido.

Otros autores investigaron la posibilidad de que el porfirinógeno S411 (en realidad un dehidro Coprogen III) sea un intermediario, tal como había sugerido (298), pero en realidad experimentos de incorporación de Coprogen OIII en Proto IX realizados con Euglena gracilis (303) descartan esta posibilidad, habiéndose supuesto que se formaría entonces un derivado hidroxipropionato en los restos propiónicos de 2 y 4, el que formaría un diacrílico deuteroporfirinógeno óddirectamente Protogen IX (304,305) , aunque no hay pruebas experimentales concluyentes a favor de ninguna hipótesis.

III.2.6. Protogen oxidasa

Hasta hace poco tiempo se pensaba que la coprogenasa convertía los restos propiónicos de las posiciones 2 y 4 del Coprogen III en vinilos y que además realizaba la deshidrogenación a porfirina. En la actualidad se dispone de variada evidencia para postular que la deshidrogenación de Protogen IX a Proto IX es catalizada por una enzima distinta a la coprogenasa, y que ha sido denominada protogen oxidasa.

Al detectarse un pigmento con una banda de absorción con máximo en 503 nm, denominado P_{503}, se postuló que podría ser un intermediario en la biosíntesis de Proto IX (306). Este mismo pigmento fué también hallado en Saccharomyces cerevisiae crecida anaeróbicamente (307) identificándoselo como una tetrahidroporfirina que podría obtenerse tanto por reducción de Proto IX como autooxidación de Protogen IX (308). El pigmento

P_{503} ha sido encontrado también en Escherichia coli (309).

El pigmento de Saccharomyces cerevisiae ha sido identificado como una Proto-tetrahidroporfirina IX y se ha postulado que es un intermediario de la síntesis de Proto IX (310). Altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo de la levadura reprimen la síntesis de hemo y se acumula P_{503} y Protogen IX, lo que indicaría que en este caso se produce una deficiencia de la Protogen oxidasa (308,311).

III.2.6.1. Propiedades: La enzima has sido parcialmente purificada de Saccharomyces cerevisiae (311 a). Se trata de una enzima sulfhidrílica, termolábil, con un peso molecular de 180.000. Tanto Urogen I ó III como Coprogen I ó III no son sustratos de la misma. Se forma en las mitocondrias y no en el citoplasma.

III.2.6.2. Mecanismo de reacción: No ha sido aún estudiado en detalle. Se ha podido sin embargo demostrar que el proceso de oxidación del Protogen IX a Proto IX es estereoespecífico (304,311 b) eliminándose los hidrógenos de un sólo lado de la molécula ya que incubando Coprogen III marcado con tritio en las posiciones meso con hemolizados de eritrocitos de pollo hay una pérdida del 50% de la marca de tritio.

IV. Diversas ramificaciones de la biosíntesis de tetrapirroles

IV.1. Rama Fe en la biosíntesis de tetrapirroles

La serie de reacciones que comienzan con la inserción del ion Fe^{++} en Proto IX, conocida como la rama Fe de la biosíntesis de tetrapirroles, conduce a la formación de hemos y citocromos.

Es bien conocido que diversos iones, tales como Fe^{++}, Zn^{++} , etc.,pueden acomplejarse con diversas porfirinas; sin embargo hay numerosas evidencias de que la inserción del ión Fe^{++} en Proto IX "in vivo" se realiza enzimáticamente (312-314). Dado que la actividad se lozaliza en determinados compartimientos celulares y que se incrementa la actividad específica con pasos de purificación, puede pensarse con fundamento que este proceso es enzimático; además la incorporación de Fe^{++} por extractos celulares es mucho más alta que para un proceso no enzimático (313).

La enzima que cataliza esta reacción es la Proto-hemo hierro-liasa, conocida también como hemo sintetasa o ferroquelatasa. Ha sido estudiada de diversas fuentes animales (313-323), vegetales (324-327) y microbianas (328-331).

La ferroquelatasa es poco específica para el sustrato porfirina, pudiendo formar diversos derivados con distintas porfirinas (314,316,328). Se ha demostrado que los porfirinógenos o porfirinas parcialmente reducidas no son sustratos de la enzima (320,329). Para el otro sustrato, el metal, la enzima de diversas fuentes muestra una alta especificidad por el ión Fe^{++}(314,322). En base a estos resultados se propueso que la enzima se une el metal y a la Proto IX por dos sitios diferentes (321).

Esta enzima tiene las características de una proteína sulfhidrílica que se reactiva luego de diálisis o envejecimiento, por agentes reductores (321,332-334).

La síntesis de hemo "in vitro" es favorecida por condiciones anaeróbicas (320,321,335) ; en las incubaciones realizadas al aire hay una total inhibición de la actividad en extractos solubles (320). Pero como hay numerosos ejemplos de síntesis aeróbica de hemo en hemolizados de eritrocitos de ave y homogenatos de hígado, se ha propuesto que los procesos oxidativos en estas preparaciones crudas mantienen condiciones anaeróbicas

en el sitio de inserción del Fe^{++}(320); los agentes reductores usados en las incubaciones ayudarían también a mantener reducido al ión metálico.

Es interesante destacar que la ferroquelatasa tiene un pH óptimo que varía entre 7,4 y 8,4 según las preparaciones, y que en algunas puede presentar dos máximos de actividad, sugiriendo la presencia de más de una enzima (320), aunque otros autores sostienen que esto sería debido a inestabilidad de los sustratos (331).

La actividad de ferroquelatasa en Spirillum itersonii se localiza predominantemente en membrana, y siendo menos del 20% citoplasmático (331). La enzima de membrana usa Proto IX, deutero- y mesoporfirina en orden creciente de actividad, y también incorpora Zn y Co, aunque menos eficientemente que Fe^{++}.

Un mutante de Spirillum itersonii que requiere hemina para su crecimiento carece de ferroquelatasa de membrana, en tanto que la actividad citoplasmática es similar a la de la cepa salvaje (331). El aislamiento de este auxótrofo para hemina descarta la posibilidad de una incorporación no enzimática de Fe^{++} en Proto IX, a la vez que muestra el significado fisiológico de la enzima de membrana en la síntesis de citocromos.

La actividad de ferroquelatas citoplasmática no jugaría ningún rol en la síntesis de citocromos en Spirillum itersonii, ya que Proto IX no es sustrato de ella (331). Una actividad similar se encontró en la fracción citoplasmática de Rps. sphaeroides (330) y también se concluyó que su significado era dudoso.

Se demostró que las actividades de zinc-quelatasa y de ferroquelatasa son estimuladas por el agregado de éter, acetona o acetato de etilo (336,337), tanto en cromatóforos de bacterias fotosintéticas como mitocondrias de hígado. Se propuso que los solventes orgánicos actuarían activando una enzima lipo-proteica o bien exponiendo la enzima inmersa en la matriz lipo-proteica de los cromatóforos y mitocondrias (337).

Se acepta que los lípidos tienen una función específica en la inserción del metal, aunque no se conoce aún el mecanismo de acción (156). Se ha postulado la formación de un complejo lipoproteico de la ferroquelatasa (338) y también que un fosfolípido cargado participaría en la activación de la enzima (339).

Hay evidencias de que una vez formada la ferro-Proto IX esta se combina con la globina para dar hemoglobina (315,317, 340); esta formación de hemoglobina no transcurriría vía unión de la globina con Proto IX dando un complejo en el cual se insertaría el ión Fe^{++}, tal como se había postulado (341).

IV.2 Rama magnesio en la biosíntesis de tetrapirroles

Se conoce con este nombre a la secuencia metabólica que conduce a la biosíntesis de las diversas clorofilas.

Al aislarse un mutante del alga Chlorella incapaz de sintetizar clorofila y que además acumulaba cantidades importyan tantes de Proto IX, se tuvo el primer indicio de que existiría una secuencia común, al menos en parte, para la síntesis de hemos y clorofilas (342). Se demostró que la misma porfirina puede acumularse en vegetales superiores incubando cortes de cebada crecida en oscuridad con ALA (343). Pareciera que la adición al medio de este compuesto evita algún paso regulatorio, ya que se forman también grandes cantidades de protoclorofilida y otras magnesio-porfirinas (343). Este mismo grupo de porfirinas fue hallado en hojas de mutantes de cebada carentes de clorofila (344). En otro mutante de Chlorella carente de clorofila se encontraron Mg-Proto IX y Mg-Proto IX monometil ester (343,345), con lo cual se hizo evidente la secuencia metabólica mostrada en la Figura 8.

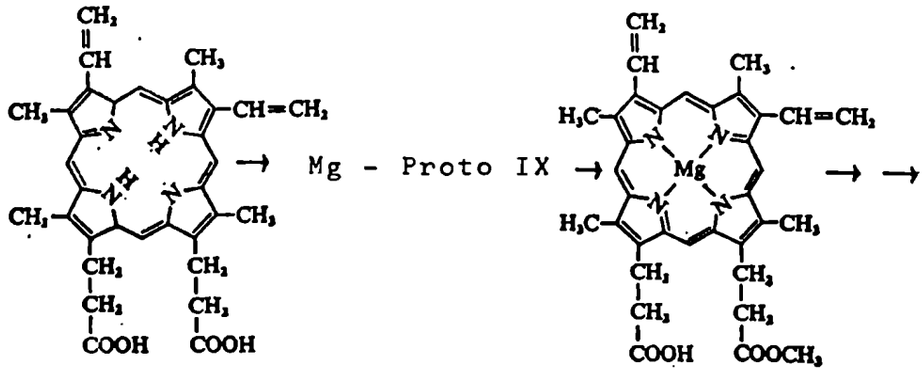
No hay hasta el presente, sin embargo, evidencias directas que la Proto IX sea convertida en Chl a.

Los cotiledones etiolados de pepino, sometidos a iluminación, forman Mg-Proto IX monometil ester junto con otras metalo-porfirinas que podrían ser intermediarios entre dicho ester y la protoclorofilida (346). Además, los cloroplastos en desarrollo formados en estas condiciones al ser incubados en oscuridad, al aire y en presencia de ALA y cofactores (347) también también son capaces de formar "in vitro" Mg-Proto IX monometil ester y otras metaloporfirinas.

Los vegetales contienen todas las enzimas requeridas para la síntesis de Proto IX desde ALA: ALA-D (348),PBG-deaminase y cosintetasa (251), coprogenasa (349). En algunos casos se ha detectado actividad de ALA-S(350).

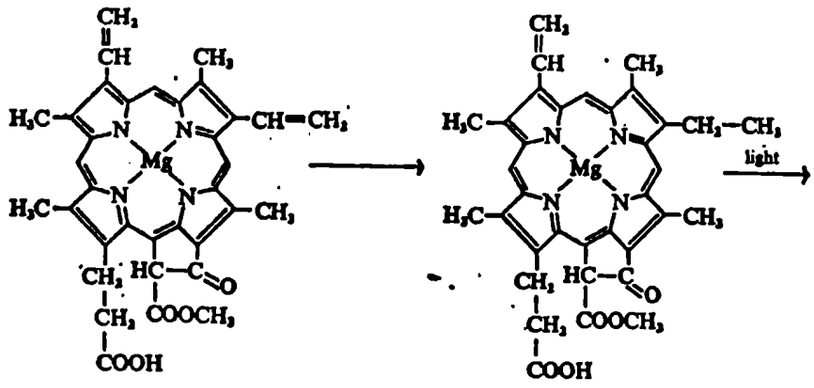
Se ha demostrado que ocho moléculas de ALA producen una de protoclorofilida (351). Además el PBG en determinadas condiciones es capaz de estimular la síntesis de Chl a (352). Todos estos datos, junto con el hecho de que el ALA exógeno esti-

Precursores → ALA → PBG → Urogen →→ Coprogen →→



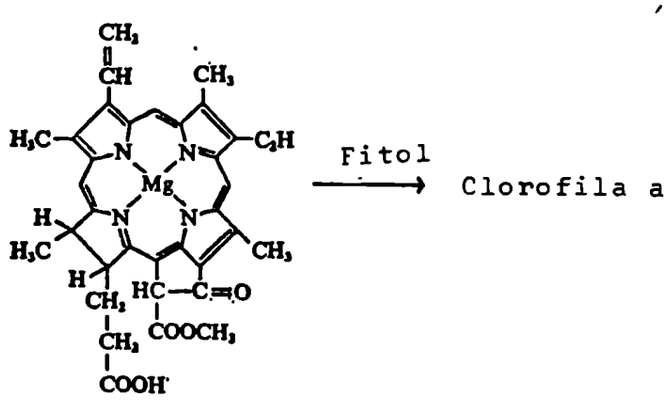
Proto IX

Mg - Proto IX monometil ester



Mg- 2,4 divinil peoporfirina a monometil ester

Protoclorofilida



Clorofilida a

Figura 8: Camino propuesto para la biosíntesis de clorofila a

mula la formación de Coprogen, Proto IX y Mg-Proto IX en brotes etiolados, que además el ALA-C^{14} es transformado en magnesio-tetrapirroles,(353) que por otra parte al incubar etioplastos y cloroplastos en desarrollo de pepino junto con ALA y cofactores se produce la síntesis y acumluación de protoclorofila acompañada de la síntesis de Proto IX, copro y Uro y metaloporfirinas (354) apoyan la idea de que los primeros pasos de la biosíntesis de Chl a son comunes con los de proto-hemo.

Se acepta que Proto IX, Mg-Proto IX y Mg-Proto IX monometil ester son intermediarios en la biosíntesis de Chl a puesto que son acumulados por tres mutantes diferentes de Chlorella (342,343,345) y vegetales superiores en determinadas condiciones (346), pero aún no ha sido posible preparar ningún tipo de extracto de organismos fotosintéticos capaz de insertar Mg^{++} en Proto IX. En vegetales superiores se encontró una quelatasa localizada en plásticos (326,327) que no inserta Mg^{++} en porfirinas, por lo que se piensa que estaría asociada a la síntesis de hemos.

Las células enteras de Rps.sphaeroides son capaces de incorporar Mg^{++} en Proto IX exógena, aunque el producto resultante es Mg-Proto IX-monometil ester y no Mg-Proto IX (355,356). Se ha propuesto que en esta bacteria la inserción del ión está obligatoriamente acoplada con la metilación de la magnesio-porfirina. Quizá esto no sea así en vegetales superiores ya que mutantes de cebada y Chlorella pueden acumular Mg-Proto IX libre.

La S-adenosilmetionina-magnesio protoporfirina metil transferasa, la enzima metilante que forma Mg-Proto IX-monometil ester, fué detectada en Rps. sphaeroidas (357), en cloroplastos de maíz (358), en cloroplastos y proplástidos de Euglena gracilis (359), en Chlorobium tiosulfatophilum (360). Su actividad incrementa cunado las células se transfieren de oscuridad a luz. En todos los casos estudiados el mejor sustrato de la enzima es Mg-Proto IX.

Las semillas de angiospermas que germinan en la oscuridad no forman clorofila, aunque en los etioplastos se forman pequeñas cantidades de protoclorofilida, sustancia que rápidamente se convierte en clorofilida si las plantas se transfieren a la luz. Se acepta pues, que la reducción del anillo D es un proceso fotodependiente.

La protoclorofilida de hojas etioladas se presenta

en más de una forma: el grueso de ella tiene un máximo de absorción alrededor de 650nm(P650); otra forma presenta un máximo de absorción cerca de 636nm(P636), y existe otra forma hallada a menudo en tejidos envejecidos que absorbe alrededor de 628nm(P628).Similarmente a lo que ocurre con la clorofila, si estas protoclorofilidas se extraen con solventes orgánicos sólo se encuentra una forma con un máximo de absorción en 623nm. Pareciera que las diversas formas espectroscópicas halladas "in vivo" son debidas a diferencias en el entorno de las moléculas de protoclorofilida, las que podrían estar agregadas o acomplejadas con proteínas específicas. La protoclorofilida extraída no sufre ninguna fototransformación.

P650 y P636 pueden convertirse en P628 por diversos tratamientos:calor,ácidos, congelamiento y descongelamiento, acción de distintos reactivos (361-364).

Se demostró que por iluminación la forma P628 no sufre fototransformaciones, mientras que las formas P636 y P650 son fototransformables (365). Pareciera haber una transferencia de energía entre P636 y P650, sugiriendo que ellas están físicamente cercanas. Otra interpretación del hecho es que las bandas de 636 y 650 nm corresponden a un equilibrio dinámico (366).

Las hojas etioladas, suplementadas con ALA y en oscuridad, producen grandes cantidades de protoclorofilida (343,367), lo que indica que las enzimas para las reacciones de la secuencia metabólica entre ellos no son limitantes. La protoclorofilida formada absorbe alrededor de 636 nm y no es fototransformable cuando las hojas se exponen a iluminación constante (368). Se ha postulado que esta inactividad se debe a la carencia de suficiente proteína catalítica que una el exceso de protoclorofilida y la convierta en el complejo fototransformable protoclorofilida-holocromo. Apoya esta idea el hecho de que hojas suplementadas con ALA y expuestas a flashes de luz y períodos de oscuridad alternativos, utilizan la protoclorofilida inducida por el ALA (369,370), ya que en este caso la proteína catalítica tiene tiempo de recombinarse con la protoclorofilida formando un complejo activo durante los períodos de oscuridad.

Mediante estudios espectroscópicos se ha presentado evidencia de que la protoclorofilida formada por administración de ALA exógeno a hojas etioladas de poroto, y que no es fototransformable, está en un estado físicamente distinto de las otras formas de protoclorofilida de la hoja (371). Los espectros "in vivo" a- 196°C de las protoclorofilidas formadas por la edición de ALA o por desnaturalización térmica de P650 y P636, o combinación de los trata-

mientos, son iguales, pero los picos de emisión de fluorescencia a 22°C de las protoclorofilidas originadas en el tratamiento térmico difieren significativamente del pico de emisión de las especies formadas por el tratamiento con ALA. Estos resultados han sido confirmados en hoja de trigo (372).

En hojas tratadas con ALA e iluminadas mediante flash se produce una desaparición de P650 y formación de clorofilida; durante el período de oscuridad subsiguiente se forma más P650, quizá del "pool" de P636. La reacción luminosa transcurre a 5°C mientras que la reacción en la oscuridad es lenta a esa temperatura (373).

El primer producto de la fotoconversión de protoclorofilidaholocromo "in vivo" es una forma de clorofilida con un máximo de absorción en 678 nm, la que en oscuridad se convierte rápidamente en una forma con máximo de absorción en 683 nm (374,375). Ocurre aluego una reacción en oscuridad, más lenta, que lleva a la formación de una forma de clorofila con un máximo de absorción en 673 nm (376).

En la figura 9 se representan la secuencia de eventos en la fotoconversión de la protoclorofilida (377).

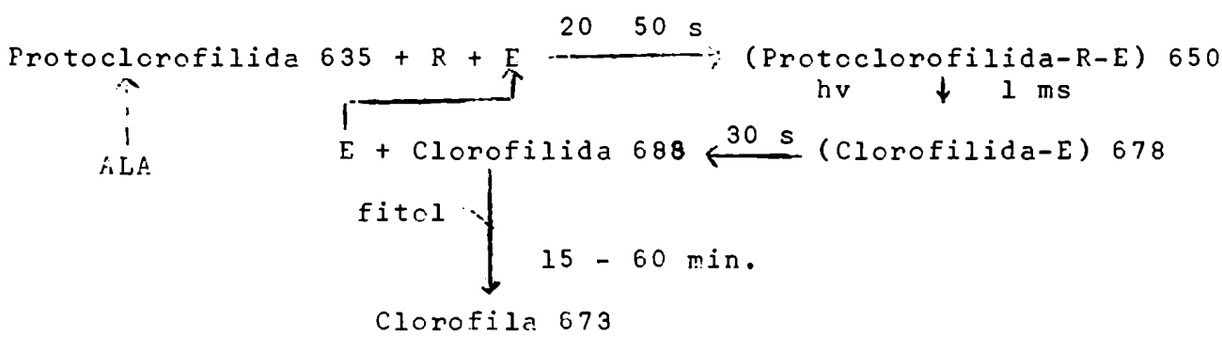


Figura 9. Representación de los primeros eventos en la formación de Chla (377).R es un reductor, probablemente NADPH (378);E es una fotoenzima. Los números luego de los paréntesis se refieren a los máximos de absorción en la zona del rojo.

La adición de ALA provoca la formación de P636, el que por combinación con una proteína específica y un reductor se convierte en P650. La clorofilida 678 está unida a una proteína específica, y la separación de ambas provoca el"shift"espectroscópico a 683 nm. El "shift" espectroscópico final a 673 nm coincide con la fitilación de la molécula.

Estudios de dicrísmo circular han evidenciado una

interacción pigmento-pigmento y se ha propuesto que algunas formas espectroscópicas son producidas por dímeros de protoclorofilida (379,380). Esta postulación no es incompatible con el esquema de la figura 9, ya que la agregación de las moléculas puede ser una consecuencia de su unión a proteínas específicas; además, la fitilación podría catalizar también la desagregación del dímero.

Es posible extraer y purificar el complejo protoclorofilida-holocromo. Para él se han reportado distintos pesos moleculares, tales como 960.000 (381), 600.000(382), como así también la separación de dos formas con pesos moleculares 300.000 y 550,000 (374). Se ha propuesto que por cada molécula de proteína habría hasta veinte de cromóforo (383), y como por extracción de hojas con saponina se pueden preparar subunidades fotoconvertibles de peso molecular 63.000 (384), hay pocas dudas de que el complejo original tenga más de un cromóforo por molécula.

El rendimiento cuántico de la fotoconversión de protoclorofilida en clorofilida es aproximadamente 0.6(385). La velocidad de la transformación es independiente de la concentración de holocromo y de la viscosidad del medio, por lo que esta reacción no involucra un proceso de colisión.

Se demostró que las membranas de etioplastos enriquecidos en P636 retienen la capacidad de transformar no sólo P650, sino, que iluminándolos mediante flashes, también retienen la capacidad de usar P636 (378). Para que este último compuesto sea fototransformado es necesario suministrar al medio un reductor, siendo el más efectivo NADPH. Se dedujo que el suministro de NADPH limita la conversión de P636 en clorofilida y que ese reductor, directa o indirectamente, interviene en la reducción del anillo D de la protoclorofilida.

La conversión de Mg-Proto IX monometil ester en protoclorofilida requiere dos operaciones: la reducción del vinilo de la posición 4 a etilo y la formación del anillo isocíclico a partir del grupo propionil-metil ester de la posición 6. El orden de los eventos es motivo de discusión.

Tratando cultivos de Rps.sphaeroides con 8-OH-quinolina se inhibe la síntesis de BChl y se acumula un pigmento con espectro muy similar a protoclorofilida (386) identificado como Mg-2,4-divinil feoporfirina a_5 monometil ester (MgDVP) (387). Como parece evidente que la clorofilida es intermediario de la biosíntesis de BChl (388) puede pensarse que la MgDVP precede

directamente a protoclorofilida, aún en plantas verdes, donde ha sido también hallado (389,390).

Una evidencia de su rol de intermediario en la biosíntesis de clorofila se obtuvo incubándolo con membranas de etioplastos de cebada bajo iluminación por flashes (391).Sólo en presencia de un sistema generador de NADPH se logra una rápida producción de clorofilida. El ester de la feoporfirina es usado a la misma velocidad que la protoclorofilida, y el producto final es clorofilida a. En base a esto parece evidente que MgDVP es un intermediario real de la biosíntesis de Chl a, y que la formación del anillo isocíclico precede a la reducción del grupo vinilo de la posición 4.

En base al estudio de los Mg-tetrapirroles acumulados por mutantes de Chlorella se postuló un camino alternativo desde Mg-Proto IX monometil ester hasta clorofilida a (392-394) (ver además revisiones 157,395). Se han identificado compuestos con grupos vinilo reducidos y también con modificaciones en la cadena del ester del ácido propiónico, sugiriendo que el anillo isocíclico se formaría por sucesivas deshidrogenación, hidratación y una posterior deshidrogenación de dicha cadena lateral. Se ha detectado también Mg-mesoporfirina y Mg-divinil feoporfirina a_5, lo que lleva a suponer que podría haber varias rutas para llegar a protoclorofilida, algunas de las cuales son abortivas. Además se pudo demostrar que NADH tritiado marca a las porfirinas producidas cuando se lo incuba con homogenatos de hojas etioladas de trigo y Mg-Proto IX(396,397). La marca se incorpora en la fracción correspondiente a Mg-monoetil-monovinil-deuteroporfirina; por otra parte, el MgDVP no es un sustrato de esta reducción.

Queda aún por determinar la real significación del camino propuesto por Ellsworth y colaboradores.

La enzima clorofilasa cataliza la hidrólisis del fitol del grupo propionil ester de la Chl a. Es una enzima activa con altas concentraciones de solventes orgánicos, y en soluciones metanólicas ó etanólicas intercambia metanol o etanol por fitol. Actúa sobre clorofilas y feofitinas con el anillo D reducido, incluso BChl a y clorobium-clorofilas, especificidad que sería dable esperar si la enzima trabajara "in vivo" en la dirección de síntesis de las clorofilas. Sin embargo, preparaciones de la enzima de cebada no esterifican a la clorofilida con fitol (398).

La actividad de clorofilasa incrementa en los tejidos en verdeo (399,400), lo que también sugiere funciones de síntesis para ella, aunque se ha demostrado que es más activa en reacciones de transesterificación, catalizando la fitilación de metil-clorofilida a y no la de clorofilida ó feoforbido a (401-404).

En bacterias fotosintéticas se ha encontrado una forma de BChl a esterificada con trans-geranilgeraniol (405).De esto puede deducirse que quizá las últimas etapas de la biosíntesis de fitol ocurran luego de que un precursor ha esterificado a la clorofilida a. Sin embargo no puede descartarse la suposición de que la fitilación sea en realidad una reacción de transesterificación.

La BChl a se forma por la ruta a través de clorofilida a, sustancia que ha sido aislada de cultivos de Rps. sphaeroides (40,386). De esta misma bacteria se aisló 2-devinil-2-hidroxietil-clorofilida a pero sin Mg (406,407), lo que sugiere que el grupo acetilo de la BChl a puede formarse por hidratación y deshidrogenación del grupo vinilo de la clorofilida a.

Otro pigmento que se acumula en algunos mutantes de Rps.spheroides es bacterioclorofilida a (408), con lo cual se hace evidente esta secuencia para la biosíntesis de BChl a:

Clorofilida a----> 2-devinil-2-hidroxietil -clorofilida a---
----> bacterioclorofilida a ----> bacterioclorofila a.

Se ha publicado una revisión sobre los últimos estudios acerca de la biosíntesis de BChl (409). Cuando esta sustancia, aislada de Chlorobium tiosulfatophilum se cromatografía en columnas de Celite, se separan seis componentes con diversos sustituyentes sobre el macrociclo (410,411).

Pudo establecerse que los grupos metilo terminales en las funciones 4-n propilo, 4-isobutilo, 5-etilo y δ meso-metilo provienen de la L-metionina en Chloropseudomonas sthylica .

Por otra parte, en base a estudios de incorporación de diversos porfirinógenos marcados pudo deducirse que algunos componentes de la BChl c se originan por una ramificación del camino biosintético, quizá a la altura del Pentagen, mientras que otros componentes se formarían por la ruta Coprogen-Protogen.

Se ha postulado que en este camino biosintético el porfirinógeno pentacarboxílico es un intermediario clave, al nivel de cual se ramificaría la secuencia metabólica para llegar a deter-

minadas formas de la DChl c (409).

IV.3 Rama cobalto en la biosíntesis de tetrapirroles.

Esta secuencia metabólica conduce a la formación de las diversas corrinas, de vitamina B_{12} y de coenzima B_{12}. Ella no es conocida en detalle, por lo que se han propuesto varias hipótesis para explicar la formación de los diversos compuestos. Recientemente, mediante el empleo de C^{13} como trazador y el uso de la resonancia nuclear magnética (NMR) pudieron establecerse con precisión algunos pasos.

Se sabe que el ALA (412) y que el PBG(413) son precursores del nucleo corrina. El primero es incorporado con una distribución de radiactividad análoga a la observada en la biosíntesis de porfirinas (414).

Se había supuesto que de ALA provendría el grupo α-metilo ubicado sobre C_1(415) , pero mediante estudios de incorporación de ALA-5 C^{13} y análisis de los espectros de NMR de los productos formados, pudo comprobarse que dicho grupo no proviene de ese precursor (416) aunque uno de los grupos β -metilo del anillo C proviene de ALA (417).

Dado que ALA y PBG se incorporan al macrociclo queda pordecidir a que nivel divergen las ramas hierro y cobalto, o sea donde se inserta el metal y donde se pierde el carbono δ -meso. Una posibilidad es que el anillo corrina se forme directamente de PBG sin pasar por Urogen III, la que se vió avalada por el hecho de que algunos autores no lograron incorporar dicho porfirinógeno marcado en vitamina B_{12}(418,419). Sin embargo, muchos microorganismos anaerobios tales como Clostridium tetanomorphum y Clostridium perfringens, que son capaces de sintetizar corrinas y no pueden sintetizar hemos, producen Uro III cuando se los incuba con ALA y fumarato (420); además, extractos libres de células de Clostridium tetanomorphum incubados con ALA producen también Uro III (421). Estos últimos hechos apoyan la suposición de que Uro III o Urogen III son reales intermediarios entre PGB y corrinas.

En la actualidad se acepta la hipótesis de que las ramas hierro y cobalto divergen luego de la formación de Urogen III (420,102).

En trabajos posteriores a los comentados se atribuye la falta de incorporación del Urogen III - C^{14} en vitamina B_{12} al no

haberse usado las condiciones adecuadas para lograrla. Al parecer ellas son bastante estrictas, pero si se respetan se logra una incorporación significativa del porfirinógeno (422,423) con lo que quedaría demostrado que él es un intermediario en esta rama.

Mediante el empleo de sustratos enriquecidos en C^{13} y el estudio de las señales de NMR se ha podido comprobar que ocho moléculas de ALA-2-C^{13} se incorporan en vitamina B_{12} sintetizada por Propionibacterium shermanii, mientras que el ALA-5 C^{13} marca sólo siete átomos de carbono de cianocobalamina, o sea que un grupo aminometil se pierde en el proceso (424). Siete grupos metilos de la vitamina B_{12} provienen de metionina enriquecida en C^{13} H_3 (424,425). La quiralidad del agrupamiento gem-dimetil en C-12 es R(426).

Se ha podido preparar un sistema enzimático soluble a partir de Propionibacterium shermanii que convierte ALA-C^{14} y Urogen III-C^{14} en ácido cobirínico en presencia de Co^{++}, Mg^{++}, S-adenosilmetionina y glutation (422,427).

El uso de uroporfirinógenos con marcas múltiples(C^{13}, C^{14},H^3) ha permitido demostrar que su incorporación en el nucleo corrina se realiza sin redistribución de las misma (428,429).

De acuerdo a las evidencias experimentales obtenidas, se postuló la siguiente secuencia para la formación de ácido cobirínico a partir de Urogen III (428,429):

i. Descarboxilación del resto acético unido a C-12
ii. Pérdida del carbono meso 20(como formaldehido, formiato ó CO_2) y formación de una nueva unión entre C-1 y C-19.
iii. Introducción de los siete grupos metilo extra a partir de S-adenosil metionina.
iv. Reducción parcial del macrociclo.
v. Inserción del cobalto.

Sobre la formación de cobinamida(o sea, la incorporación de grupos amino, de isopropanolamina y del grupo 5'-deoxiadenosil a ácido cobirínico) y la de cobamida (o sea la incorporación de 5,6 -dimetil benzimidazol y de otras bases) se han publicado varias revisiones (430,431).

V. Biosíntesis del ácido delta amino levulico

V.1. ALA como intermediario en la biosíntesis de tetrapirroles.

La primera evidencia de que una molécula compleja, tal como la de Proto IX puede ser edificada a partir de moléculas más pequeñas se obtuvo al demostrarse la incorporación en hemo de deuteroacetato y glicina-N^{15}, suministrados a ratas y humanos (432,433).

Por degradación de la molécula de Proto IX marcada se pudo determinar el origen de cada átomo (434-437), Así, se demostró que la glicina provee los cuatro átomos de nitrógeno, los átomos de carbono de los puentes metínicos y un átomo de carbono en cada anillo pirrólico, ubicado en la posición alfa, debajo de las cadenas laterales vinilo y ácido propiónico (figura 10). Sólo el carbono alfa de la glicina contribuye a la molécula de Proto IX, requiriéndose ocho de aquellas para la síntesis de una de ésta.

Estudios similares con acetato-C^{14} mostraron que el resto de los átomos de carbono provienen de esta molécula. Por la distribución relativa de los átomos de carbono de los grupos metilo y carboxilo del acetato se dedujo que éste es incorporado como un compuesto asimétrico de cuatro átomos de carbono, el que provendría del ciclo de Krebs. Esta hipótesis fué confirmada al demostrarse que el succinato es el precursor de 26 de los 34 átomos de carbono de Proto IX y que el malonato inhibe su incorporación. Esto indica que la glicina se condensa con succinato, presumiblemente bajo la forma activada de succinil-CoA que podría provenir directamente del succinato o vía ciclo de Krebs a partir de α- cetoglutarato (439).

El conocimiento de la estructura del ALA, producto de condensación de la glicina con succinil-CoA, fue el resultado de especulaciones teóricas que luego se vieron confirmadas al demostrarse que el ALA sintético, ya sea marcado con N^{15} o bien con C^{14} en el carbono delta, es incorporado activamente en Proto IX con el mismo modelo de marcación que la glicina (440) siendo además convertido en porfirinas por eritrocitos hemolizados (441,442).

La síntesis de ALA a partir de glicina y succinato o α-cetoglutarato fue demostrada originalmente en hemolizados de eritrocitos de pollos anémicos (443,444). La reacción es estimulada por CoA y fosfato de piridoxal;también es utilizada succinil-CoA (444). La reacción entre glicina y succinil-CoA para dar ALA también se demostró en extractos libres de células de Rps.spaheroides (445,446). El fosfato de piridoxal es un cofactor esencial para esta reacción.

La participación de CoA y fosfato de piridoxal en la formación de ALA explica el hecho de que deficiencias nutricionales en pantotenato y piridoxina causen una anemia hipocrómica (447-449). Tetrahymena vorax crecido en medio deficiente en vitaminas no forma porfirinas a partir de glicina pero sí a partir de ALA (450); hallazgos similares se obtuvieron con hemolizados de pato deficientes en vitaminas (451).

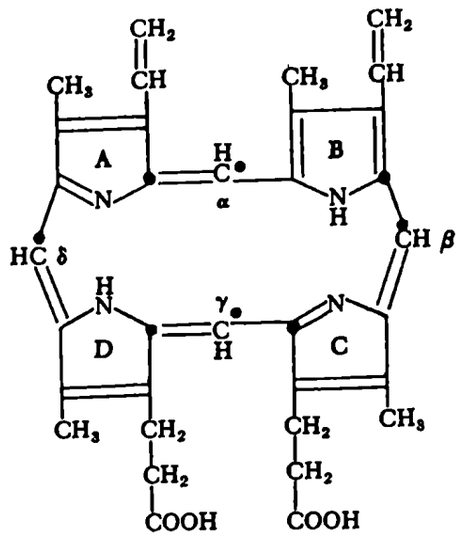
V.2 Acido delta-aminolevúlico sintetasa

La enzima ALA-S (E.C.2.3.1.37) parece estar muy difundida en la naturaleza, aunque debido a su gran inestabilidad en la mayoría de las fuentes se hace muy difícil su detección, aún en tejidos en los cuales no existe duda sobre su existencia (156).

V.2.1.Fuentes de la enzima: El ALA-S ha sido detectada en Rps.sphaeroides (445,446,452-454), en R. rubrum (445), en Chromatium D (454), en Spirillum itersonii (27), en Micrococcus denitrificans (170) en Propionibacterium Shermanii (218); en mitocondrias de Saccharomyces cerevisiae (221), en extractos libres de células de Torulopsis utilis (456,457) en eritrocitos de aves tratadas con fenilhidracina (443); en mitocondrias de hígados de cobayos porfíricos (458), en homogenatos de hígados de ratas normales y porfíricas (460), en mitocondrias de glándula de Harder de ratas normales (279), en corazón de rata (461), en glándula suprarrenal de rata y bovina (462); en reticulocitos de conejo (463), en reticulocitos humanos (464), en hígado, eritrocitos y fibroblastos humanos (465), en plasma humano (466), en extractos de callos de semillas de soya (350); en mitocondrias de abejas obreras (467), en mitocondrias de mosca casera (468).

En bacterias, el ALA-S tiene mayor actividad específica cuando ellas crecen en condiciones que poseen alto contenido de bacterioclorofila y/o hemoproteínas (214,218,469-471).

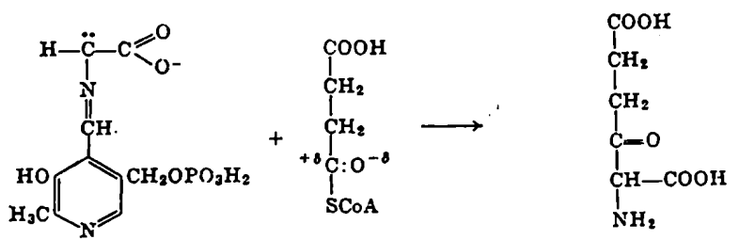
Una demostración indirecta de la existencia de ALA-S en Rps. sphaeroides se obtuvo aislando mutantes de dicha bacteria



C^*H_2 NH_2 COOH

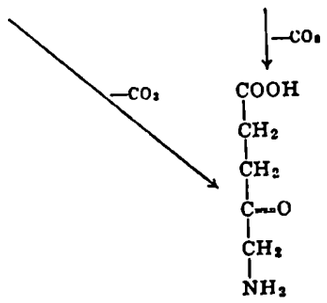
Protoporfirina IX

Figura 10: Incorporación del Cα de la glicina en Proto IX (438)



glicina - P_yP Succinil- CoA

ac.α NH_2 - βceto adipico



ALA

Figura 11: Mecanismo propuesto para la formación del ALA

que carecen de esa enzima (408).

V.2.2. Mecanismo de reacción: La formación de ALA a partir de glicina y succinil-CoA es el primer paso que conduce a la formación de porfirinas en muchos tejidos. Se ha propuesto un mecanismo de la reacción (472) según el cual se formaría primero un carbanión estable a partir de glicina y fosfato de piridoxal, el que reaccionaría con el átomo de carbono electrofílico del carbonilo de la succinil-CoA para producir ácido α-amino β -cetoadípico , y luego perdiendo CO_2 llegaría a ALA. El aminomalonato (α -carboxiglicina) es un inhibidor competitivo de la reacción (473), además se sabe que el ácido α-amino β -cetoadípico se descarboxila instantáneamente en solución neutra (474). El problema es decidir si éste se forma y descarboxila unido a la enzima o bien si lo hace libre en solución, pero además si es en verdad o no un intermediario real, puesto que es posible que la condensación y la descarboxilación ocurran en forma concertada (figura 14).

El hecho de que preparaciones de eritrocitos y extractos bacterianos con actividad de ALA-S también catalicen la formación de aminoacetona a partir de glicina y acetil-CoA por una reacción análoga a la de formación de ALA, sugeriría que la enzima no es específica para succinil-CoA. Sin embargo, hay evidencias de que en mitocondrias de hígado estas reacciones son catalizadas por diferentes enzimas (475).

En base al conocimiento actual de las reacciones de transformación de aminoácidos en las cuales participa el fosfato de piridoxal se puede postular dos tipos de mecanismos para la biosíntesis de ALA a partir de glicina y succinil-CoA(figuras 12 y 13). En ambos, el primer evento de la transformación sería la formación de una base de Schiff entre la enzima unida al fosfato de piridoxal y la glicina [2]. Esta unión altera las propiedades de los grupos C-H y -COOH de la glicina, labilizando uniones que son muy estables en el aminoácido primitivo como consecuencia de la atracción de electrones por el núcleo piridínico. Se supone que en reacciones dependientes de fosfato de piridoxal la propiedad de atracción de electrones puede verse exaltada por la presencia, en el sitio activo de la enzima, de un grupo capaz de protonar al N de la piridina, como se muestra en [2] . Se ha postulado en el mecanismo 1 que una reacción de descarboxilación formaría el carbanión [4] , el que se condensaría con succinil-CoA

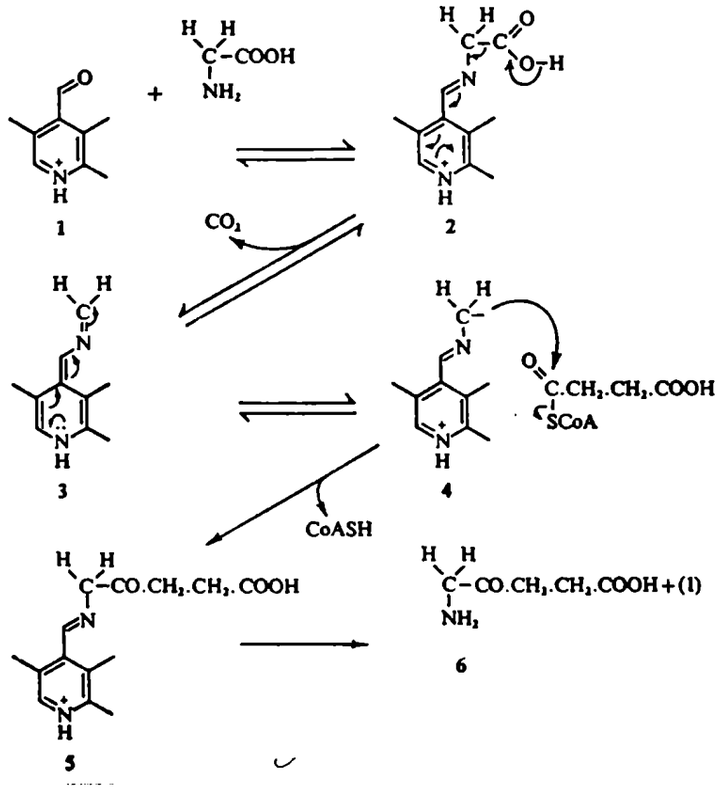


Figura 12: Mecanismo 1 para la reacción del ALA-S
La estructura 1 representa la enzima unida a fosfato de piridoxal (476).

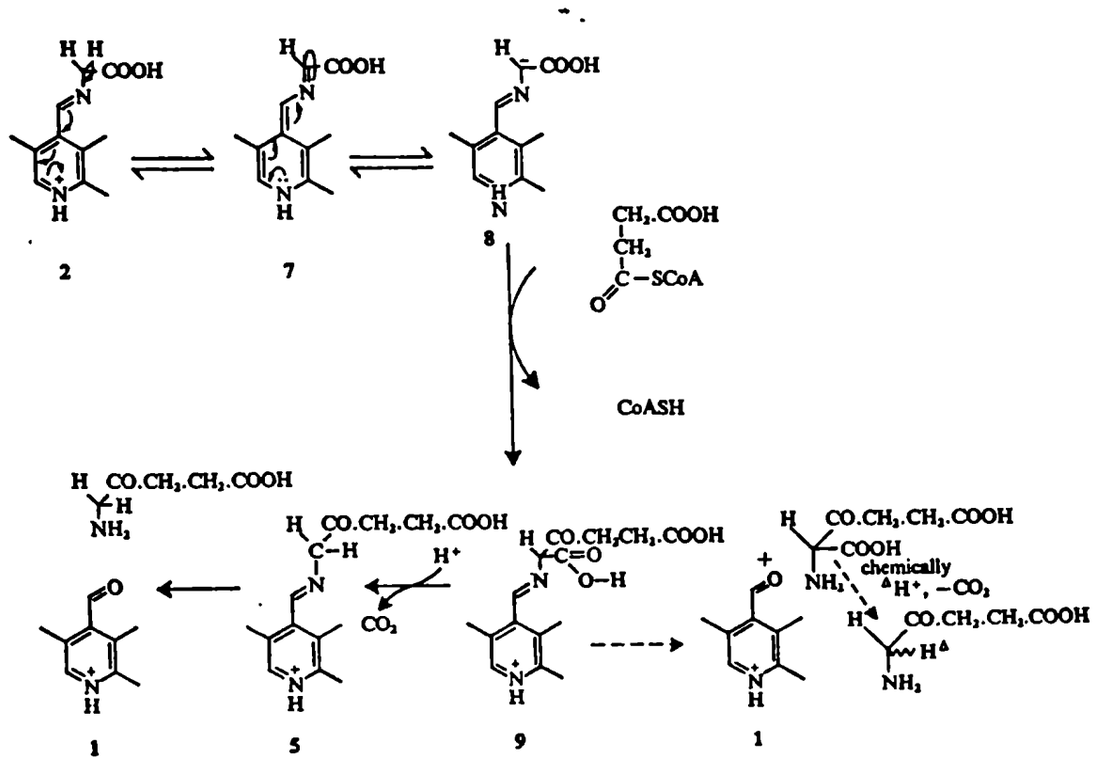


Figura 13: Mecanismo 2a(→) y 2b(--→) para la reacción del ALA-S (476).

dando un complejo de base de Schiff de ALA encadenado a la enzima unida al fosfato de piridoxal [5], complejo que por hidrólisis produciría ALA libre (figura 12). En el mecanismo 2 el primer paso sería la eliminación de un protón para dar otro tipo de carbanión [7 →8] , el que reaccionaría con succinil-CoA quedando los seis átomos de los sustratos encadenados al complejo enzima-fosfato de piridoxal como ácido α-amino β-cetoadípico [9] . Ahora habría dos alternativas para la formación de ALA: en una (mecanismo 2a) ocurriría una descarboxilación por la presencia de un grupo beta-carbonilo, resultando un complejo enzima-fosfato de piridoxal-ALA [5], el que por hidrólesis produciría el ALA libre. La otra alternativa involucra la hidrólesis del intermediario [9] liberando ácido α -amino β-cetoadípico, que se descarboxilaría no enzimáticamente produciendo ALA.

Para determinar el verdadero mecanismo de la reacción del ALA-S se prepararon glicinas quirales, conteniendo tritio estereoespecificamente localizado en orientación R ó S (476,479), aprovechando que la enzima serina-transhidroximetilasa, que interviene en la interconversión de glicina y serina dependiente de ácido tetrahidrofólico, intercambia estereoespecíficamente un átomo de hidrógeno pro-S del carbono α de la glicina con protones del medio (477-480). Incubando la enzima en presencia de glicina ($2RS-H^3_2$ $2-C^{14}$), fosfato de piridoxal y ácido DL-tetrahidrofólico, la glicina resultante pierde la mitad de la marca de tritio quedando el resto en la posición pro-R (478,479). El otro enantiómero, el que tiene la marca de tritio en la posición pro-S se preparó incubando glicina en presencia de T_2O con serina-transhidroximetilasa y coefactores.

Las glicinas quirales así preparadas se usaron como sustrato de ALA-S purificada de Rps. sphaeroides. El ALA formado se redujo con BH_4Na y el dihidroderivado se oxidó con periodato, transformándose el C5 en formaldehido (481). Durante este procediriento se mantiene la integridad de los átomos de hidrógeno del C5 del ALA, y además, el ALA formado enzimáticamente no intercambia hidrógenos del C5 por protones del medio al pH óptimo de la enzima.

Así pudo demostrarse que cuando se incuba glicina ($2RS-H^3_2$) con ALA-S en presencia de succinil-CoA y los cofactores necesarios, se encuentra en el ALA formado la mitad de la radiactividad proveniente del tritio. Por otra parte, el ALA proveniente de la incubación con glicina ($2R-H^3$) no posee radiactividad

correspondiente a tritio, pero el que proviene de glicina (2S-H^3) mantiene el total de la marca original (481), con lo que queda demostrado que la formación de ALA se produce con la pérdida y de un sólo hidrógeno, el de la posición pro-R. Estos resultados permiten descartar el mecanismo 1 (figura 12) debiendo transcurrir la reacción según el mecanismo 2a ó 2b (figura 13).

Para decidir cual de estos dos mecanismos es el real, debe considerarse que en el mecanismo 2a las reacciones de eliminación y de formación de nuevas uniones llevan a la creación de un C5 estereo-específico del ALA, ya que ocurren mientras todos los intermediarios están unidos a la enzima, y que en mecanismo 2b la unión del hidrógeno al C5 del ALA no debe ser estereoespecífica, pues ocurre con la participación de una descarboxilación no enzimática. El estudio experimental se ve complicado por el hecho de no disponerse de procedimientos de oxidación del ALA que mantengan la quiralidad en C5. Por ello se ideó un procedimiento indirecto, usándose ALA-S y ALA-D purificadas de Rps. sphaeroides, las que incubadas con glicina (2RS-H^3_2) y los cofactores necesarios producen PBG marcado, el cual fué aislado y degrado produciendo glicina tritiada, la que resulta tener quiralidad S (482).

La formación de un centro quiral en el C5 del ALA biosintetizado a partir de glicina (2RS-H^3_2) permite descartar la participación del mecanismo 2b (figura 13).

En la figura 14 se postula un mecanismo para el ALA-S, basado en las evidencias presentadas de que el primer evento es la eliminación del hidrógeno pro-R del complejo enzima-fosfato de piridoxal-glicina [13] , dando el carbanión [14] , el cual se condensaría con succinil -CoA para dar [15] . Hay evidencias adicionales en favor de la formación de dicho carbanión, ya que incubando ALA-S altamente purificada con glicina (2RS-H^3_2) en ausencia de succinil-CoA se obtiene un intercambio estereoespecífico del hidrógeno pro-R, resultando glicina (2S-H^3). El átomo de hidrógeno intercambiado es el mismo que el eliminado en la biosíntesis completa del ALA (483). El átomo de hidrógeno pro-S de la glicina es retenido y ocupa la posición pro-S en el C5 del ALA.

Si de glicina (2RS-H^3_2) se elimina el átomo de hidrógeno pro-R y se llega a ALA-C5(S-H^3), debe invertirse la configuración de algún intermediario. Podría postularse que esta inversión ocurre en los primeros pasos, pero dada la preponderancia de

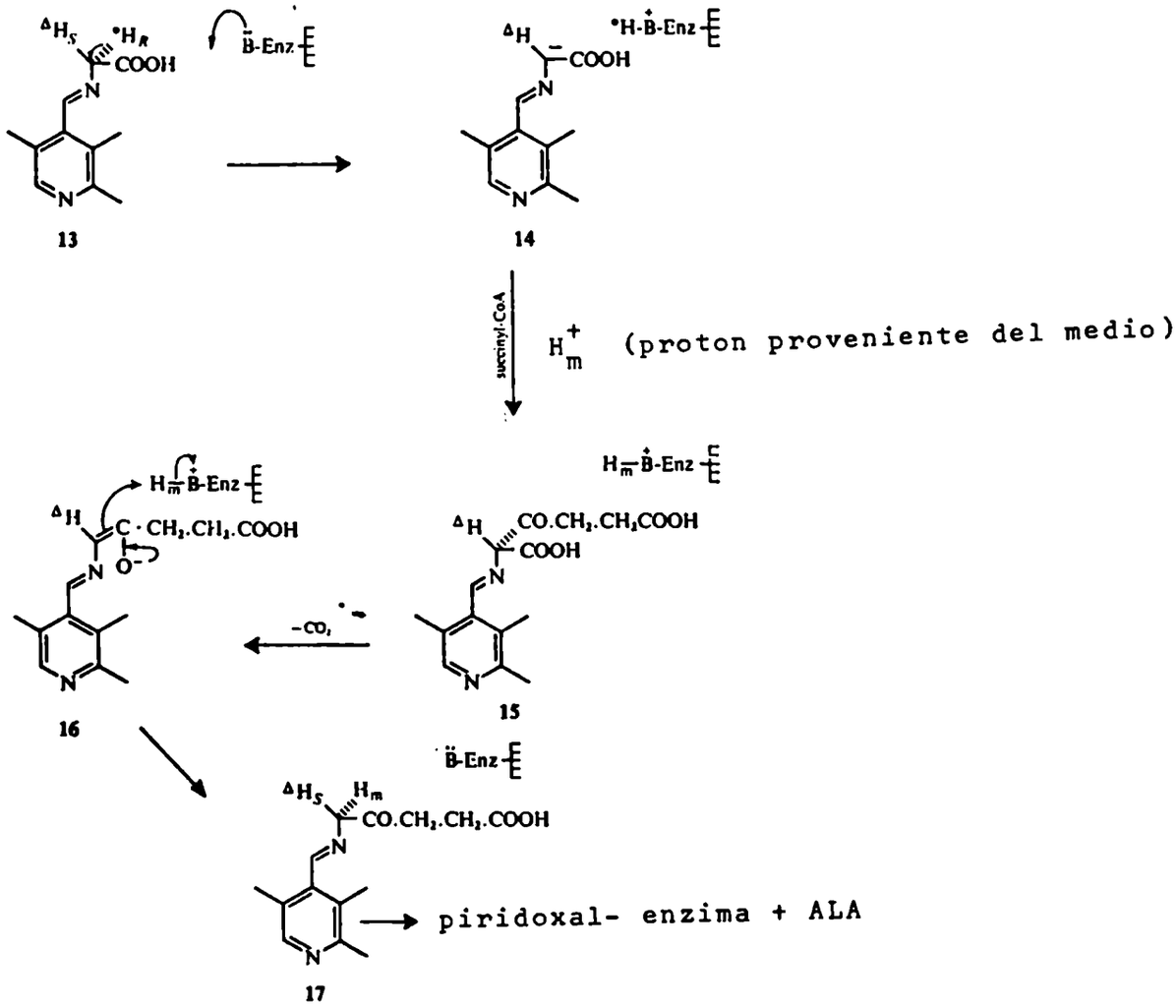


Figura 14: Mecanismo y estereoquímica postulados para la reacción del ALA-S. Se supone que en la conversión 14→ 15 el hidrógeno separado por el grupo básico de la enzima se intercambia con un protón del medio (476).

mecanismos con retención en reacciones biológicas de reemplazos de uniones C-H por C-C, puede pensarse que dicha primera etapa ocurriría con retención de la configuración (476).

V.2.3. Inestabilidad del ALA-S: Como ya se ha mencionado, esta enzima es generalmente inestable (214,445), y esto hace que aún en organismos y tejidos donde existe una casi absoluta certeza de su existencia, sea dificil detectarla. El nivel de ALA-S en hígado de cobayo normal es apenas detectable, pero si se induce porfiria experimental tiene una actividad adecuada para su medición (459). Perfeccionando técnicas se han desarrollado métodos para medirla en tejido hepático normal (460,484-486).

El ALA-S más activa se encuentra en Rhodospirillaceae (444,445,487), pero es dificil de detectar en Chromatiaceae, organismos que sintetizan tanta bacterioclorofila como los otros. Tampoco ha sido detectada en microorganismos deficientes en hierro que excretan activamente porfirinas al medio, tal como Arthrobacter globiformis (102).

¿Porqué es tan difícil trabajar con esta enzima ? No se dispone de una respuesta completa a esta pregunta, pero algunos hechos experimentales mencionados a continuación y algunas especulaciones permiten dar una respuesta parcial.(i) la enzima es muy inestable tanto en extractos crudos como parcialmente purificada; (ii) la enzima es inhibida por varias sustancias naturalmente presentes en la célula, como así también por reactivos de uso común con proteínas; el hemo y hierro inórganico a bajas concentraciones inhiben a la enzima (214) y se ha comunicado la existencia de un factor con actividad inhibitorias en células de Rps. sphaeroides crecida anaeróbicamente (488); (iii) algunos sistemas tienen una deacilasa muy activa (459) que compite con el ALA-S por el succinil-CoA, privando al sistema de uno de sus sustratos; (iv) los requerimientos de cofactores parecen variar de un organismo a otro; esto no significa que haya dudas sobre el requerimiento de fosfato de piridoxal o de CoA y ATP en sistemas quer generan succinil-CoA "in situ", pero aparentemente hay diferencias en cuan fuertemente están unidos los cofactores, y en algunos casos es necesario añadir cofactores exógenos; el rol del hierro en la reacción no es claro,ya que es un inhibidor de la enzima de Rhodospirillaceae aunque participa como un cofactor de la enzima de eritrocitos de aves (489,490).

La inestabilidad de esta enzima debe considerarse desde dos puntos de vista, inestabilidad termodinámica debida a una peculiar estructura proteica e inestabilidad metabólica.

Su desnaturalización espontánea en función del tiempo, aún almacenada a-15°C pareciera indicar inestabilidad termodinámica. Ella se debería a una propiedad inherente al ALA-S dictaminada por su estructura. Es necesario que se hagan los estudios apropiados con enzima altamente purificada para tener un mayor conocimiento de este aspecto.

Otro problema complicado es el de la inestabilidad metabólica de la enzima. Pareciera que el ALA-S tiene una alta velocidad de recambio. Su vida media en cultivo de tejido de hígado de embrión de pollo es de 4 a 6 horas (491); para la de hígado de rata es de 70 minutos. El nivel enzimático decae rápidamente en células de Rps.sphaeroides colocadas en condiciones adversas (487,493); la actividad en suspensiones de esta bacteria que no están en crecimiento, o bien en sonicados no fraccionados, decae rápidamente (214),habiéndose sugerido que la pérdida de actividad es por un proceso activo.

Se acepta generalmente que el ALA-S es una enzima clave en la regulación de la síntesis de porfirinas, y pudiera ser que las respuestas rápidas de los niveles enzimáticos sean un mecanismo regulatorio importante (214,491,494).

El etanol (102) y el glicerol(495) son estabilidantes de la enzima de algunas fuentes, aunque el 2-mercaptoetanol sea quizá el más popular y efectivo de sus estabilizantes, si bien su efecto es menos notorio con la enzima purificada, volviéndose finalmente inhibitorio con enzima altamente purificada (463,496). Se demostró que el glicerol y el etilenglicol no sólo protegen a la enzima de la inactivación sino que también reactivan a la enzima inactivada (497). Se midieron los valores de Km para fosfato de piridoxal y glicina con enzima recientemente preparada de Rps. spaheroides, con una preparación parcialmente inactivada y con enzima reactivada por acción del glicerol o etilenglicol. Las tres preparaciones exhiben el mismo valor de Km para glicina, mientras que para el fosfato de piridoxal, los valores con enzima inactivada son mayores que con enzima fresca. Por reactivación el valor disminuye a los niveles correspondientes a los de enzima fresca. Estos resultados sugieren que la labilidad de la conformación proteica alrededor del sitio de unión al fosfato piridoxal es la responsable, al menos en parte, de la inactivación que sufre la enzima.

V.3. Caminos metabólicos del ALA distintos del de tetrapirroles

Se ha sugerido que el ALA podría ser metabolizado por otra vía diferente a la biosíntesis de tetrapirroles (440,498). El ALA por transaminación daría γ-cetoglutaraldehido, el que perdería grupo- CHO regenerando succinato y produciendo un fragmento de un átomo de carbono que podría intervenir en otras rutas metabólicas, por ejemplo en la biosíntesis de purinas. En la figura 15 se muestra la serie de reacciones que constituirían el ciclo succinato-glicina. Hay alguna evidencia experimental que apoya la existencia de este ciclo (499,500).

No se ha evaluado aún enteramente el significado cuantitativo de este camino metabólico del ALA, pero algunos hechos sugieren que dicho ciclo es de poca significación metabólica. En primer lugar, con muy pocas excepciones, la capacidad de la mayoría de los tejidos para sintetizar ALA es muy baja como para pensar en otro destino distinto a los tetrapirroles. En segundo lugar, en la mayoría de los sistemas el punto de control de la biosíntesis de porfirinas es el ALA-S(214,487,491), confirmando la regla general de que los puntos de control están antes, y no después, de las ramas principales de los caminos biosintéticos. Dado que el ciclo succinato-glicina es una ramificación a nivel de ALA, parece dudoso que represente una ruta metabólica significativa.

En tejidos de mamíferos (501) y en microorganismos (502,503) se ha demostrado la existencia de enzimas que catalizan la transaminación entre ALA y α-cetoácidos. La enzima ha sido purificada de Rps. sphaeroides (504,505). Aunque la reacción es reversible, el equilibrio favorece la formación de ALA. La enzima puede usar una variedad de sustratos como dadores del grupo amino: alanina, ácido γ-amino n-butírico, ácido γ-amino n-valérico, ácido ε-aminocaproico. La importancia de las reacciones de transaminación en la formación de ALA, o bien como una ruta metabólica alternativa de éste, tampoco han sido evaluadas con detalle.

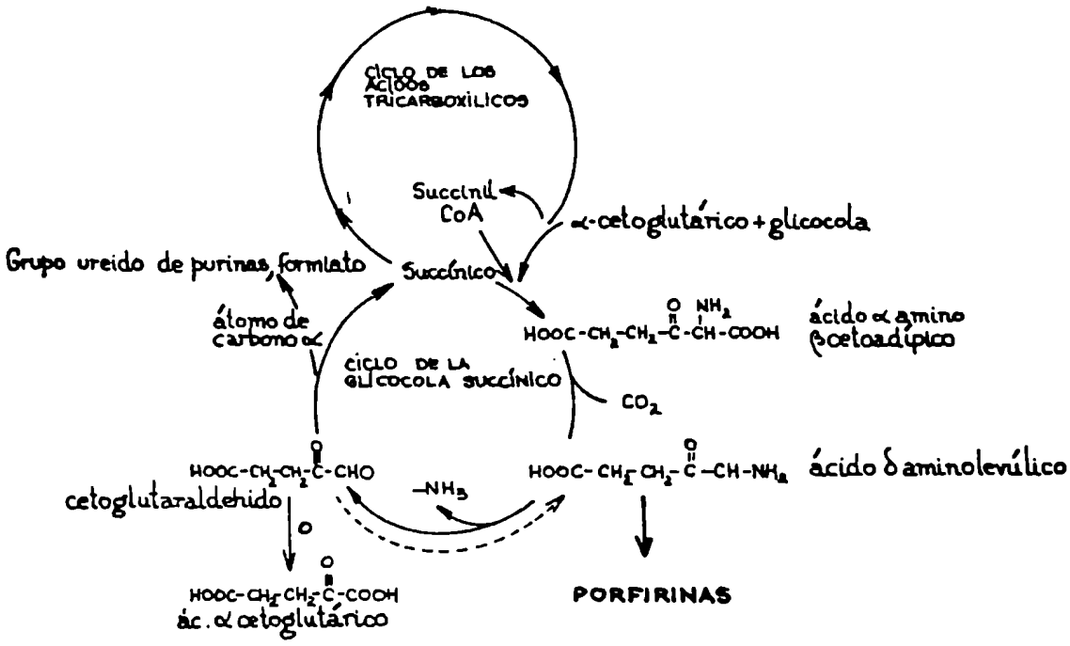


Fig.15 Ciclo de la glicocola-succínico propuesto por Shemin, Russel y Abramsky

V.4. Biosíntesis de ALA en tejidos vegetales

La enzima ALA-S ha sido detectada en dos tejidos vegetales callos de semillas de soya (350) y cáscara de papa.

Algunos autores, discuten su rol en vegetales y han propuesto otro camino para la formación de ALA en dichos tejidos (506-509) basándose en el hecho de que glicina y succinato radiactivos no son incorporados en ALA, mientras que sí lo son tanto α -cetogluterato como glutamato y glutamina. Además, la degradación química del ALA-C^{14} formado permitió demostrar que su C5 surge del C1 del glutamato y que su cadena se incorpora intacta en ALA (509). Este modelo de marcación es incompatible con la reacción de ALA-S.

VI. Acido Delta Amino-Levulico Sintetasa de microorganismos no fotosintéticos

Esta enzima ha sido detectada ha sido detectada en mitocondrias de Saccharomyces cerevisiae (221), en Torulopsis utilis (457), Propionibacterium shermanii (218) y en Micrococcus denitrificans (170).

En la levadura Torulopsis utilis sólo se la pudo detectar en células crecidas anaeróbicamente (457), pero resultó ser tan inestable que fué imposible determinar su localización subcelular.

Se ha demostrado que células enteras de Saccharomyces cerevisiae incorporan glicina -$2C^{14}$ en los grupos prostéticos de los citocromos que se forman en la adaptación a la respiración de estas células, sugiriendo así la participación del ALA-S(510).

La adicicón de glucosa en presencia de oxígeno a células en reposo de Saccharomyces cerevisiae provoca una rápida desaparición del ALA-S, cuya actividad no se recupera aún despúes de nueve horas (511). La presencia de glucosa es la responsable de la desaparición del ALA-S, ya que no ocurre si ella no está presente en el medio de adaptación, o sea que el efecto sería independiente de la presencia de oxígeno (511). Esto es parecido a la acción de la glucosa sobre la síntesis inducida de ALA-S hepática por agentes porfirinógenicos (492,512,513), la cual se ejerce a nivel mitocondrial (514-516).

En base al estudio de la derrepresión de enzimas respiratorias en células en reposo de Saccharomyces cerevisiae, donde el ALA-S alcanza un máximo de actividad a las 5 horas y luego decae, se postuló que la enzima existiría en dos formas, una basal y otra derreprimible, ambas sometidas a rapida degradación. La forma derriprimible aería sería sintetizada en citosol pero requeriría para su actividad la presencia de un producto mitocondrial (517).

En extractos de Propionibacterium shermanii crecido aeróbicamente la actividad de ALA-S es un 60% de que se encuentra en extractos de células crecidas aeróbicamente el ALA-D prácticamente desaparece (218). Esto descartaría un control regulatorio del ALA-S en la biosíntesis de corrinas por este microorganismo.

La actividad de ALA-S en extractos de Spirillum itersonii está correlacionada con la síntesis de citocromos. Experiencias realizadas con mezclas de extractos de células crecidas con alta o baja aereación demuestran que no se forman inhibidores

de la enzima (455).

Estas observaciones son consistentes con un rol central del grupo prostético de las ferroporfirinas en la regulación de la síntesis de citocromos, según puede verse en la figura 16, aunque no se han dado evidencias directas para el mismo (455):

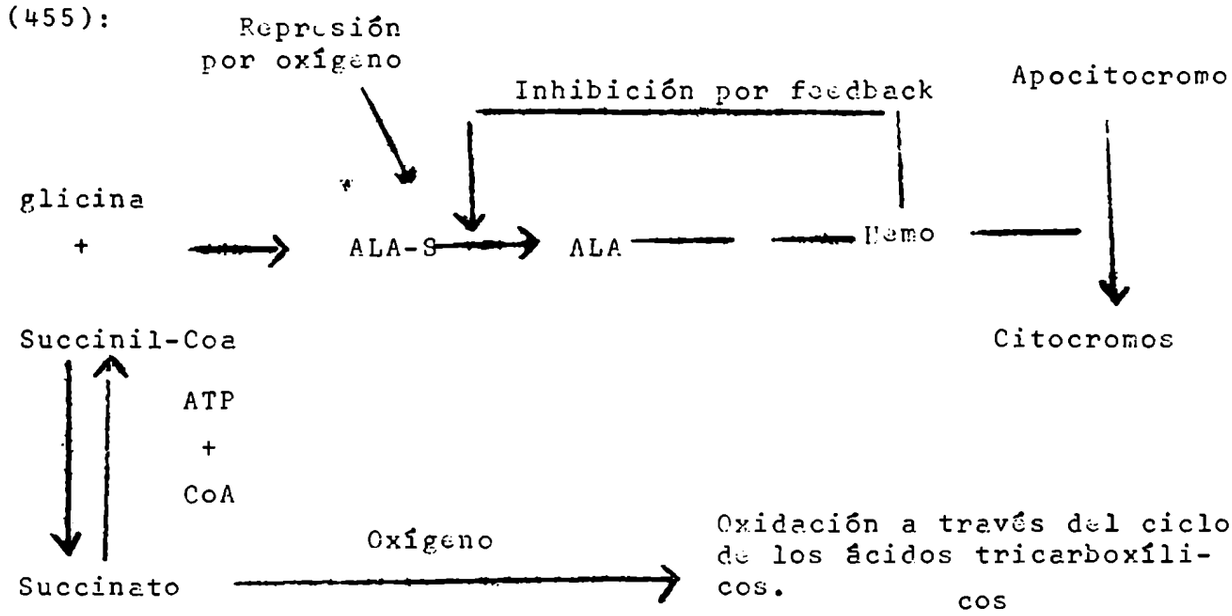


Figura 16: Posible mecanismo involucrado en la regulación de la síntesis de citocromos.

No existe acumulación de hemo o precursores cuando la síntesis proteica está inhibida, ni acumulación de precursores proteicos cuando la síntesis de hemo está limitada por deficiencia de hierro. Esto implica que la síntesis del grupo prostético hemínico y de la unidad proteica estánasociadas.

El comportamiento del ALA-S está de acuerdo con un posible rol en la regulación de la síntesis del hemo. La enzima es reprimidad por oxígeno e inhibida por hemina, un regulador por feed-back. La represión por oxígeno es un hecho común a la síntesis de clorofila y citocromos en algunas bacterias. Es posible que el oxígeno influencie la formación de citocromos actuando sobre la síntesis del grupo prostético hemínico. También podría actuar regulando la cantidad de succinil-CoA disponible para la síntesis de ALA. En el ciclo de los ácidos tricarboxilicos, la oxidación de succinato es un paso limitante en condiciones de baja presión de oxígeno y éste puede acumularse (518). Se ha sugerido que la enzima succinil-CoA-S participaría en el control de la síntesis de hemo en hígado (160) y en callos de semilla

de soya (179).

ALA-S ha sido detectada en extractos de Micrococcus denitrificans (170). Su actividad es alta en células crecidas anaeróbicamente en medio definido con nitrato, pero es baja en células crecidas en medio deficiente en hierro o bien aerobicamente. La enzima ha sido purificada y presenta un peso molecular de 68.000. Es inhibida por hemina y Proto IX. La baja actividad de ALA-S en células deficientes en hierro se incrementa adicionando sales de hierro a los medios sólo bajo condiciones en que exista síntesis proteica. Si se incuban células en condiciones que dicha síntesis proteica esté inhibida (por adición de cloranfenicol o puromicina), se produce una rápida pérdida de actividad de ALA-S, lo que es impedido por acción de CNNa o N_3Na agregados junto con el antibiótico. Para que se produzca la pérdida de actividad es necesario, además de la interrupción de la síntesis proteica, que funcione el sistema de transporte de electrones. Los resultados obtenidos no son suficientes para decidir mediante que mecanismos pierde actividad el ALA-S de Micrococcus denitrificans. Se ha sugerido (170) que la enzima no sufriría un alto turnover durante el crecimiento, pero que se degradaría rápidamente bajo condiciones especiales, como ser el cambio de condiciones anaerobias o aerobias, o cuando se detiene la síntesis proteica sin alterarse el transporte de electrones.

VII. Acido delta amino-levulico sintetasa de microorganismos fotosintéticos y su rol en la regulación de la biosíntesis de tetrapirroles

Se ha demostrado que extractos libres de células de Rps. sphaeroides y R.rubrum crecidos anaeróbicamente a la luz (452) y los de Rps. sphaeroides crecida aeróbicamente (446), catalizan la formación de ALA.

Se han estudiado los requerimientos de determinados cofactores, tales como CoA, ATP, Mg^{++} y fosfato de piridoxal, en la formación de ALA por extractos de Rps. sphaeroides y R.rubrum (445), habiéndose comprobado la existencia de un sistema generador de "succinato activo" que requiere CoA, ATP y Mg^{++}. El succinil-CoA reemplaza a succinato + CoA + ATP; el succinil-CoA, que a partir de ellos se origina, se condensa con un derivado de "glicina activada" con fosfato de piridoxal, produciéndose ALA y CO_2. Pareciera que las células enteras de Rps. sphaeroides son impermeables al succinil-CoA ,ya que con este sustrato la reacción sólo ocurre con células rotas (444,469).

El espectro de absorción de la enzima purificada de Rps.sphaeroides se altera por la adición de glicina, mientras que la adición de glicina luego de una cantidad limitada de Succinil-CoA produce otro cambio espectral. Estos resultados confirman la hipótesis de que la glicina es el primer sustrato, deducida mediante análisis cinético (519). De todas estas consideraciones se postuló para la reacción el siguiente mecanismo secuencial:

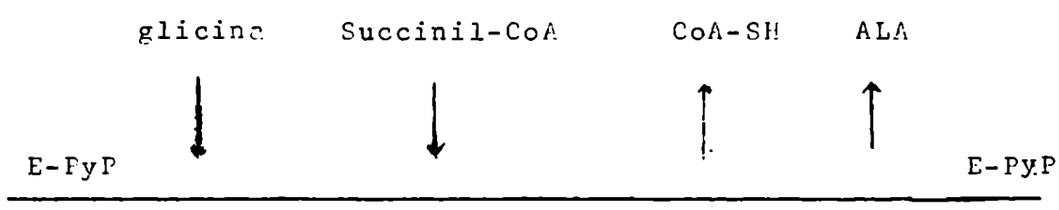


Figura 17 : Mecanismo secuencial para el ALA-S (519).

La enzima es altamente específica para el Succinil-CoA y tiene una capacidad limitada para condensar otras acil-CoA con glicina. El amino-malonato la inhibe, compitiendo probablemente con la glicina en la formación de la base de Schiff del complejo Enzima-fosfato de piridoxal (520).

Los reactivos de grupos -SH tales como PCMB, Cl_2Hg y NEMI inhiben a la enzima purificada de Rps. sphaeroides , al igual que algunos iones metálicos tales como Cu^{++}, Zn^{++}, Fe^{++} y F^{+++} (496). En ambos casos, la inhibición es parcialmente revertida por el 2-mercaptoetanol. Por otra parte, distintas sales de hierro inhiben la formación de porfirinas por la misma bacteria, a partir de glicina y α -cetoglutarato, aunque no a partir de ALA (205).

Es de capital importancia el hecho de que algunos metabolitos de la rama hierro de la biosíntesis de tetrapirroles, tales como protohemo y hemina, inhiben al ALA-S (214,521), aunque esta inhibición es fácilmente reversible (522). La hemina no sólo inhibe a la enzima de fuentes bacterianas sino también a la reticulocitos de conejo (463) y a la de hígado de ratas porfíricas (523), siendo en este caso la inhibición no competitiva respecto a Succinil-CoA y mixta respecto a la glicina. En todos los tejidos estudiados, la acción de la hemina es una inhibición por "feed-back", lo que ha llevado a postular que este es uno de los mecanismos por los cuales se regula la biosíntesis de porfirinas (99).

La hemina inhibe al ALA-S formando un complejo de coordinación a través de su átomo de hierro (524). Esto se comprobó observando la disminución de la inhibición al convertir la hemina en el quelato bis-imidazólico. Además, la capacidad de un número de ligandos de disminuir la inhibición por hemina está correlacionada con su afinidad por la misma. Aumentando la concentración de imidazol se revierte la inhibición por hemina.

Se ha demostrado que nucleótidos y nucleósidos tienen acción sobre la biosíntesis de porfirinas en Rps.sphaeroides hígado de rata y callos de semillas de soya. Adenina, adenín-nucleósidos y nucleótidos inhiben esta biosíntesis (525), sugiriendo que su acción es anterior a la formación de ALA ya que ATP no inhibe cuando aquel es usado como sustrato (526). En Rps. sphaeroides la biosíntesis de porfirinas es inhibida por ATP, y en menor grado por ADP y AMP; se ha supuesto que el ATP aumentaría la formación de un hipotético inhibidor fisiológico de la síntesis

de proteínas (527).

ATP,GTP,CTP y UTP a concentraciones de 1mM decrecen marcadamente la cantidad de Copro excretada por Rps.sphaeroides iluminada en un medio con glicina, succinato y fumarato (528), efecto impedido por etionina (529). El ATP es incorporado del medio por las células (528) e influencia marcadamente el metabolismo de la glicina, ya que en su presencia se incrementa la incorporación del átomo de carbono del grupo metileno de ésta en los ácidos grasos de fosfolípidos, perdiéndose el resto carboxilo quizá como CO_2. Por las evidencias presentadas no pueden vincularse directamente los efectos del ATP sobre la excreción de porfirinas y el metabolismo de la glicina, pero es muy posible que un incremento de la utilización de la glicina para la producción de ácidos grasos en presencia de ATP, disminuya la glicina intracelular y por tanto ocurra un descenso en la síntesis de porfirinas.

El ATP 10^{-3} M inhibe un 75% el ALA-S purificada de Rps. sphaeroides (530), resultado consistente con una función regulatoria del mismo en la biosíntesis de tetrapirroles. Este hecho explicaría la relación inversa observada entre biosíntesis de BChl y nivel intracelular de ATP en Rps. sphaeroides (531), R.rubrum (532)y Chromatium vinosum (533), resultados confirmados por estudios de los niveles de BChl y ATP durante las transiciones inducidas por cambios en las intensidades luminosas (534).

Se ha medido la actividad de ALA-S de Rps. shaperoides durante las transiciones que siguen a los cambios de intensidad luminosa (535), comprobándose que a una alta velocidad de síntesis de BChl corresponde an mayor nivel de ALA-S y viceversa. Estos resultados también sufieren que el ATP podría actuar a nivel enzimático de ALA-S.

Estas observaciones deben asociarse con los siguientes hechos: ratas intoxicadas con agentes porfirinógénicos muestra un descenso altamente significativo en los niveles de ATP hepático (536-538); en la porfiria originada por Sedormid y durante su remisión espontánea existe una correlación negativa significativa entre los niveles de ATP y porfirinas en hígado (539); en las tratas intoxicadas con allil-isopropil-acetamida ó dicarbetoxi-dihidro-collidina se comprueba un descenso signi-

ficativo en el NADH a las 2 horas de administrada la droga; se observa en cambio, un incremento significativo del nivel de ALA-S hepática recién a las 3 horas (540).

La intoxicación aguda por etanol en ratas ocasiona una acumulación hepática de NADH, disminución de ATP y aumento de ALA-S, cambios que desaparecen al administrar glucosa (513),la cual podría actuar incrementando el nivel de ATP.

Al añadir glucosa al medio de crecimiento de Rps. sphaeroides se inhibe la síntesis de porfirinas (541). Se ha postulado que la glucosa actuaría permitiendo la síntesis o activación de un inhibidor. Este supuesto inhibidor es de naturaleza proteica, termolábil y no dializable; su acción se localizaría a la altura de la etapa que precede a la formación de ALA (541). Se han presentado evidencias experimentales a favor de que el efecto inhibitorio de la glucosa exógena sobre la biosíntesis de porfirinas por Rps. sphaeroides, podría deberse , al menos en parte, a la formación de ATP durante la glucólisis anaerobia (542) El efecto de la glucosa presenta las mismas características que el de ATP añadido a suspensiones de esta bacteria (543,544). Se ha demostrado que la inhibición de la síntesis de porfirinas por Rps.sphaeroides por glucosa y ATP o intermediarios glicolíticos fosforilados, no está correlacionada con una modificación significativa de las actividades de ALA-S y ALA-D (545), lo cual es un resultado inesperado.

Al crecer Rps. sphaeroides en aerobiosis, se detectan niveles muy bajos de BChl y ALA-S, pero al ser transferida a condiciones de baja aereación, luego de una fase "lag" en la que se forma ALA-S, comienza a sintetizarse BChl (546). Al ser aereados cultivos creciendo anaeróbicamente de Rps.sphaeroides cesa inmediatamente la producción de BChl y decae rápidamente la actividad de ALA-S (487).

Se ha estudiado detalladamente la cinética de la síntesis de pigmentos en Rps.sphaeroides y R. rubrum (547). Ambos microorganismos responden similarmente a factores ambientales que afecten la síntesis de pigmentos. En condiciones anaeróbicas y a la luz, la velocidad de síntesis de los mismos es inversamente proporcional a la intensidad luminosa. Si dicha intensidad cambia bruscamente, la población ajusta su contenido de pigmentos: un incremento de la intensidad luminosa ocasiona supresión de la síntesis de ellos, mientras que un descenso la estimula. En condiciones aeróbicas, tanto en luz como oscuridad, la síntesis de BChl

y carotenoides está suprimida. Sobre la base de estas observaciones se postuló que la velocidad de síntesis de pigmentos está gobernada por el estado de oxidación de un componente del sistema de transporte de electrones: cuando este componente está reducido, la síntesis de pigmentos transcurre a alta velocidad; cuando se oxida, la velocidad de síntesis disminuye, alcanzando a cero a un nivel crítico de oxidación del componente regulatorio. En base al estudio del efecto de inhibidores del transporte de electrones y de la fosforilación sobre la síntesis de fotopigmentos en Rps. sphaeroides, se obtuvo evidencias de que la síntesis de los pigmentos está controlada por la relación NADH/NAD (548). Sin embargo, investigaciones sobre el balance redox de piridín-nucleótidos y citocromos b y c_2 en condiciones de baja aereación, no indican que estos componentes estén involucrados en la regulación de la síntesis de BChl en R.rubrum (549). En cambio, en oscuridad y anaerobiosis puede correlacionarse la síntesis de BChl con un alto nivel celular de piridín- nucleótidos y un bajo nivel de ATP (550).

Si bien algunos autores descartan la idea de que el ATP tenga una función regulatoria en la síntesis de BChl (64), se ha acumulado mucha evidencia a favor de dicha función regulatoria, la que estaría interrelacionada con ADP y AMP en el concepto de "carga de energía " ([ATP] + 1/2 [ADP] / [AMP] + [ADP] + + [ATP]) (551-556). Así, una"carga de energía " alta conduciría a una inhibición de la síntesis de BChl y formación de membrana intracitoplasmática, mientras que bajos valores inducirían la formación de ambas entidades. En concordancia con estas suposiciones, altas concentraciones de ATP en el medio de cultivo de Rps. capsulata inhiben la síntesis de BChl. Otros autores sostienen que sólo el ATP regula la formación del aparato fotosintético (531,533), ya que además inhibe la síntesis de porfirinas (525,527,528) y en Rps. sphaeroides inhibe el ALA-S (530).

La regulación de la síntesis de BChl en baja aereación y oscuridad es difícil de interpretar en función del ATP. Si se parte de un cultivo en anaerobiosis y oscuridad de R.rubrum y se incrementa la presión parcial de oxígeno, se produce un incremento de la síntesis de BChl y del crecimiento (557), a una cierta presión parcial crítica la síntesis de pigmentos disminuye y el crecimiento alcanza un valor constante. La velocidad de crecimiento está relacionada directamente al nivel celular de compuestos ricos en energía e inversamente al contenido de BChl (64,558).

Recíprocamente, a bajas presiones de oxígeno, al aumentar el nivel de compuestos de alta energía resulta un incremento de la síntesis de tetrapirroles. Quizá, en estas condiciones, además de su rol regulatorio, el ATP se use a velocidades considerables en la formación del aparato fotosintético (532); a bajas presiones parciales de oxígeno podría activarse el mecanismo regulatorio para la inducción de la formación del aparato fotosintético y BChl, pero los niveles de ATP bajos limitarían estas biosíntesis; al incrementarse los niveles de ATP, las reacciones sintéticas se acelerarían hasta que a una determinada presión parcial de oxígeno el mecanismo regulatorio se convertiría en inhibitorio.

Se han postulado tres posibilidades de mecanismos de regulación coordinada de la síntesis de membrana intracitoplásmatica y BChl: (i) balance redox de un componente del sistema de transporte de electrones, incluídos piridín-nucleótidos; (ii) ATP sólo o relacionado a otros adenín-nucleótidos a través de la"carga de energía"; (iii) un efecto directo del oxígeno. Probablemente todos estos factores estén involucrados e interrelacionados (70).

Cuando se establecen las condiciones que inducen la síntesis de BChl se incrementan las concentraciones de las enzimas iniciales de la síntesis de tetrapirroles, ó particularmente ALA-S y en menor extensión ALA-D (559).Al reprimirse la síntesis de pigmentos, decaen los niveles de ALA-S, habiéndose postulado que su rápida respuesta sería un importante factor regulatorio (99).

Se comprobó que la síntesis de BChl por suspensiones de Rps.sphaeroides en oscuridad y baja presión parcial de oxígeno ó en las transferencias a anaerobiosis y luz, es inhibida por inhibidores de la síntesis proteica (546).La síntesis inducida de pigmentos es inhibida completamente por acriflavina, cloranfenicol, mitomicina C ó phleomicina, y en gran medida por actinomicina D y 8-azaguanina, mientras que la de ALA-S casi no es afectada por mitomicina C o phleomicina pero completamente inhibida por cloramfenicol y acriflavina (560). Estos resultados sugieren que la formación inducida de fotopigmentos por Rps. sphaeroides requiere indispensablemente la síntesis de DNA, RNA y proteínas, mientras que no se requiere síntesis de DNA para la síntesis inducida de ALA-S.

Mediante el estudio de los niveles de ALA-S en células de Rps. sphaeroides crecidas fotosintéticamente o bien en

oscuridad y aerobiosis, y sometidas tanto a oxigenación como exposición a cloramfenicol o puromicina, se obtuvo evidencias de que en el primer tipo de células existirían dos formas de ALA-S con diferentes estabilidades, mientras que en segundo sólo existiría una forma de enzima relativamente estable (561). Se postuló que el ALA-S de células crecidas a la luz o en las que la enzima ha sido inducida es metabólicamente inestable, y que la estabilidad "in vivo" está muy afectada por los cambios en el estado redox intracelular. La actividad inducible de ALA-S correspondería a una enzima inestable, mientras que la medida en células crecidas aeróbicamente sería constitutiva y metabólicamente estable.

Se han aislado y purificado dos especies de ALA-S que difieren sólo en su contenido de grupos -SH(519,562). Ambas especies enzimáticas aparecen compartimentalizadas en Rps. sphaeroides Y (563). Una de estas especies parece relacionada con el metabolismo respiratorio en oscuridad y es una enzima citoplasmática, mientras que la otra, inducida sólo a la luz, se encuentra en cromatóforos y su actividad se correlaciona con el fotometabolismo.

Al ser oxigenadas células de Rps. spaheroides, decae la actividad de ALA-S un 90% en una hora (564), pero la actividad no sea altera si se añaden inhibidores de la síntesis proteica (471). La inactivación por oxígeno parece depender de una síntesis proteica continua.

El ALA-S de Rps. sphaeroides crecida semianaeróbicamente, se activa espontáneamente durante la primer hora luego de la ruptura sónica de las células y almacenamiento de los extractos a 4°C(565). La actividad de ALA-S proveniente de células oxigenadas antes de la sonificación no se activa espontáneamente. Además se detectó una fracción de bajo peso molecular y termoestable en células semianaeróbicas que reactiva el ALA-S de células oxigenadas, como así también otra fracción termoestable y de bajo peso molecular, en células oxigenadas, que inhibe la activación espontánea de la enzima. Por tanto se postuló que el efecto del oxígeno sobre la biosíntesis de BChl podría estar mediado por alteraciones en las concentraciones de estos activador e inhibidor del ALA-S.

El proceso de activación espontánea del ALA-S de Rps.sphaeroides no ocurre en presencia de azida o cianuro (566). Para que se produzca la activación debe oxidarse algún compuesto,

quizá vía la cadena de transporte de electrones; la activación ocurre en dondiciones anaerobias a la luz, probablemente por fotooxidación.

Con ALA-S altamente purificada de Rps. sphaeroides no se obtienen curvas sigmoidales de (v) vs (s) para glicina o Succinil-CoA (495); sólo el fosfato de piridoxal de gráficos cinéticos que no son hiperbólicos, lo que la diferencia de las características generalmente observadas para las enzimas alostéricas. Además, la presencia de dodecil-sulfato de sodio no la separa en subunidades. El peso molecular de la enzima resultó de 57.000. En extractos crudos es inhibida parcialmente por dithiothreitol y 2-mercaptoetanol, pero la enzima purificada no es inhibida por ellos y en cambio la estabilizan.

Se ha detectado la presencia deun inhibidor muy lábil, sensible a la luz, del ALA-S en extractos de Rps. sphaeroides (488), que no afecta ni al ALA-D ni a la Succinil-CoA-S. Al ser eliminado, por ejemplo por diálisis, incrementa la actividad del ALA-S. El inhibidor no es ni hemina, ni Proto IX ó BChl, ni ningún compuesto relacionado. Se sugirió que este inhibidor intervendría en la biosíntesis de tetrapirroles por Rps.sphaeroides controlando la actividad de ALA-S.

Otros autores han purificado también el ALA-S de Rps. sphaeroides obteniendo un peso molecular de 60.000 (567).El proceso de purificación reveló la presencia de dos tipos de ALA-S, FI, y FII, fracciones que no son separables por Sephadez G-200. Además, FI representa en dos formas en los extractos crudos, activa e inactiva. La FI inactiva puede convertirse en FI activa por diálisis. Los valores de Km para glicina y Succinil-CoA en FI y FII son similares, difiriendo en los de Km para fosfato de piridoxal. Estos hechos deben relacionarse con la mencionada activación espontánea del ALA-S de Rps.sphaeroides(565). La transformación de FI de activa en inactiva podría jugar un rol importante en el control de la síntesis de BChl en este microorganismo (567).

Se realizaron mediciones de las actividades de FI y FII de ALA-S de Rps. sphaeroides incubada en diferentes condiciones ambientales (568). La actividad de ALA-S en células crecidas anaeróbicamente a la luz es tres veces superior a la de células crecidas aeróbicamente en oscuridad. La actividad enzimática en estas células se incrementa una tres veces si ellas se incuban tres horas con baja aereación en la oscuridad. El incremento de actividad es debido al incremento de actividad de FI; el aumento de actividad de FII es insignificante. Por el contrario, si las células se incuban semianaeróbicamente a la luz, aumentan marcadamente las actividades de FI y FII. En células crecidas aeróbicamente en oscuridad y transferidas tres horas aeróbicamente a la luz, no se incrementa la actividad de FII. Estos resultados permiten suponer que la síntesis de FI y FII estaría reprimida bajo alta presión parcial de oxígeno; FI podría ser inducida sólo por la reducción de la tensión de oxígeno, mientras que la inducción de FII requiere además iluminación. Se piensa que Rps. sphaeroides tiene dos sistemas de control de ALA-S y que la síntesis de FI y FII son controladas independientemente.

La forma inactiva de FI del ALA-S de

Rps.sphaeroides puede convertirse en forma activa incubándola con mitocondrias de hígado de rata (569). La FI inactiva no es activada por 2-mercaptoetanol o dithithreitol, ni por sustancias de bajo peso molecular que otros autores encontraron activadoras (565). La FI inactiva tiene un peso molecular de 100.000 y la activa 80.000, cambio pequeño, que desacartaría que el proceso sea por disociación o asociación de subunidades de FI; quizá ocurran modificaciones enzimáticas sobre la molécula de FI.

La FI inactiva puede activarse por incubación con sustancias de bajo peso molecular y una fracción proteica presentes en Rps. sphaeroides (570).L-cistina, D,L-homocistina y glutation oxidado reemplazan a dichas sustancias de bajo peso molecular. La fracción proteica sería una enzima que modificaría a FI inactiva en presencia de compuestos con disulfuros. Incubando FI inactiva con el sistema activante en presencia de cistina-C^{14} no se incorpora radiactividad en la FI activa,sugiriendo que la activación no está asociada a la incorporación de cisteína en la enzima. Los autores no comprobaron si existe incorporación de azufre marcado.

Se ha purificado la enzima activante de FI de extractos de Rps.sphaeroides (571,572), comprobándose que las células crecidas fotosintéticamente tienen mayor cantidad de ella, y que la actividad activante incrementa al transferir células aerobias a anaerobiosis. Es posible que esta enzima sea inducible como el ALA-S. El peso molecular de la enzima activante de FI es 90.000.

La actividad de FII purificada incrementa si se preincuba con L-cistina y una fracción proteica de Rps. sphaeroides (572). Este proceso de activación pareciera ser enzimático pero no es realizado por la enzima activante de FI. El peso molecular de ambas formas de FII, activa e inactiva, es de 67,000.

La FI activa es la forma más sensible a hemina, mientras que la FII activa resulta ser la más sensible a Mg-Proto IX de las cuatro formas de ALA-S (572).

Otros autores han purificado ALA-S de Rps. sphaeroides empleando distinta metodología (496). La enzima es inhibida por Mg-Proto IX y hemina, y menos por Proto IX. Dimetilprotohemina IX, mesohemina IX y deuterohemina IX inhiben tanto como la hemina. Hemoglobina y mioglobina son ligeramente inhibidoras, mientras que citocromo c y citocromo a no la inhiben.

El efecto de la oxigenación de un cultivo de Rps. sphaeroides sobre la actividad de ALA-S, es influenciado por el contenido del medio de crecimiento (573), ya que decae un 90% si se realiza sobre los microorganismos suspendidos en el medio en que han crecido, mientras que decae sólo un 40% cuando ellos están

resuspendidos en medio fresco. Este efecto protector es dependiente de sulfato. Al oxigenar células en el medio en que han crecido, el contenido celular de glutation + glutation oxidado y cisteina + cistina decae marcadamente y se forma homolanticnina. Tanto la caída de actividad del ALA-S como los cambios en el metabolismo de compuestos sulfurados son prevenidos por compuestos que estimulan la síntesis "de novo" de cisteina o bien que inhiben la conversión de cisteína en homocisteína. La actividad máxima de ALA-S obtenida luego de su activación espontánea, es proporcional al contenido de glutation + glutarion oxidado en extractos celulares. Los compuestos sulfurados no interaccionan directamente con el ALA-S sino que su efecto es mediado por otros factores endógenos.

Se pudo purificar un activador del ALA-S a partir de Rps.sphaeroides (574), que incrementa la actividad de la enzima tanto en extractos celulares como purificada, sin que parezca requerir otros factores endógenos. La activación de la enzima purificada requiere la presencia de fosfato de piridoxal o succinato de sodio, factores sin los cuales el activador produce un decaimiento de la actividad.

Calentando cistina a 110°C en ClH 6M por 16 hs. se produce cistina trisulfuro (bis- [2-amino-2-carbetoxil] trisulfuro) que activa el ALA-S de baja actividad de Rps. sphaeroides (575). También activa a la enzima purificada, mientras que cistina no lo hace.Rps. sphaeroides crecida semianaerobicamente a la luz contiene polisulfuros orgánicos de estructuras desconocida.

Se ha propuesto un modelo para explicar estos resultados, sugiriéndose que la actividad del ALA-S está controlada por la concentración de trisulfuros (576). Su formación y degradación estaría regulada por una enzima dependiente de la cupla-SH / -S-S- y que estaría vinculada a la cadena de transporte de electrones.

Al cosechar células de Rps.sphaeroides crecidas anaerobicamente a la luz desciende la actividad de ALA-S (573), quizá porque las células se volverían más reducidas cuando se las retira de la luz (547). El activador se convertiría de trisulfuro en disulfuro. Almacenando extractos libres de células en presencia de aire se reformaría el trisulfuro y aumentaría por eso la actividad del ALA-S. El efecto de la oxigenación sería una consecuencia del descenso de los niveles de glutation y cisteina, con lo que las células no podrían mantener una alta concentración de trisulfuros, y la actividad de ALA-S decaería. El activador de ALA-S presente en extractos de Rps. sphaeroides crecida semianaerobicamente ha sido

caracterizado como una mezcla de cistina trisulfuro (CySSSCy) y glutation trisulfuro (GSSSG)(577). La oxigenación de un cultivo semianaerobio de Rps. sphaeroides produce en 1,5 hs. un descenso del 90% en el contenido intracelular de CySSSCy y GSSSG. Por cromatografía sobre DEAE-Sephadex se confirmó la presencia de múltiples formas del ALA-S como se había demostrado previamente (567,572). La oxigenación de un cultivo semianaeróbico produce la desaparición de laenzima de alta actividad (Forma a) y la acumulación de enzima de baja actividad (Forma b). Tanto la activación espontánea (565) como por cistina trisulfuro producen la conversión de Fb en Fa.

La cistationasa extraída de Rps. sphaeroides crecida semiaeróbicamente a la luz, puede catalizar la formación de cistina trisulfuro a partir de cistina, mientras que rodanasa extraída de la misma fuente, puede catalizar la degradación de cistina trisulfuro en presencia de sulfito, formando cistina y tiosulfato (578).

Se ha postulado un esquema para el control del ALA-S de Rps. sphaeroides, donde se supone que la caída del contenido de trisulfuros por oxigenación es el resultado de cambios den los niveles de sustratos para la cistationasa y quizá rodanasa, y no de las cantidades de estas enzimas, cuyas actividades no cambian al oxigenarse un cultivo (578). La oxigenación produce alteraciones del metabolismo de los sulfuros en Rps. sphaeroides, llevando a una drástica caida del contenido de glutation y de cisteina + cistina y concomitantemente, acumulación de holantionina (573). Esta disminución del contenido de cistina reduciría la síntesis de trisulfuros por la cistationasa. El efecto del oxígeno sobre el metabolismo de sulfuros sería la inhibición de la reducción de sulfito y de la conversión de homocisteina a metionina. Es conocido que la adición de tiosulfato a cultivos de Rps. sphaeroides antes de ser oxigenados previene la inactivación de ALA-S, mientras que el sulfito no es efectivo (573), y se ha supuesto que la inhibición de la conversión de sulfito a tiosulfato disminuiría el contenido celular de tiosulfato, con lo que aumentaría la degradación de trisulfuros por rodanasa.

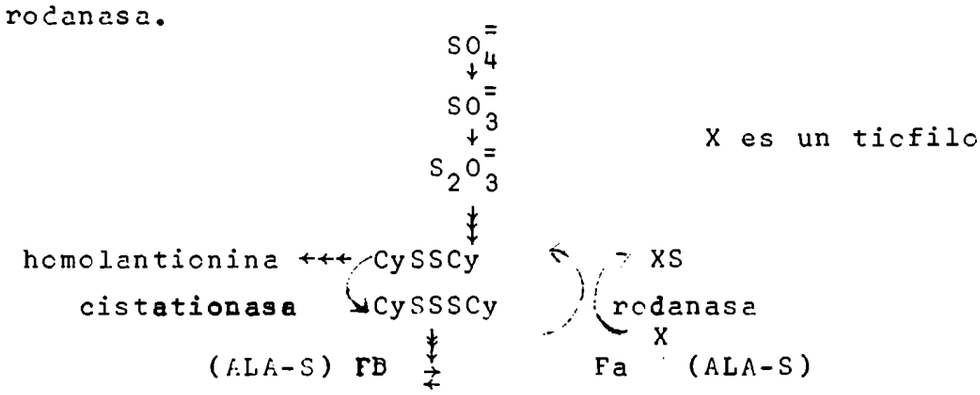


Figura 18: Esquema postulado para el control del ALA-S de Rps sphaeroides (578)

El mecanismo de la activación de Fb a Fa por trisulfuros es desconocido. Quizás estos compuestos puedan modificar la enzima por transferencia de sulfuro o actuar cataliticamente en la formación de un puente disulfuro intramolecular.

La enzima activante de FI (571) y la cistationasa tienen diferentes pesos moleculares, pero tienen similares comportamientos sobre columnas de DEAE-Sephadex (578).

El ALA-S Rps.sphaeroides ha sido extensamente purificada y su pureza establecida por su comportamiento electroforetico en presencia o ausencia de dodecil-sulfato de sodio y ultracentrifugación analítica (579). El peso molecular, determinada por varios métodos resultó ser 80.300. El peso molecular de la enzima desnaturalizada con dodecil-sulfato de sodio o clorhidrato de guanidina resultó 45.000 y 41.000 respectivamente. Esto indicaría que la enzima estaría compuesta de dos subunidades. Una estructura cuaternaria similar se ha reportado para el ALA-S de mitocondria de hígado de embrión de pollo (580).

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

I. Materiales e Instrumental

I.1. Especies bacterianas

Se usaron a lo largo del trabajo cepas salvajes de Rhodopseudomonas palustris y Rhodopseudomonas sphaeroides pertenecientes a la colección de la cátedra de Microbiología e Inmunología (FCEN).

I.2. Drogas, reactivos y solventes

Todos estos materiales empleados fueron de grado analítico y se usaron sin posterior purificación, excepto en los casos expresamente indicados.

Se menciona a continuación unos ejemplos de los materiales usados:

ATP sal disódica, Coenzima A, Fosfato de piridoxal, Acido delta amino levúlico y D(-) threo-2,2 dicloro - N[β -hidroxi -α (Hidroximetil)-p-nitrofenetil] -acetamida (Cloramfenicol) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.USA.

Glicina, reactivo de Folin-Ciocalteau y sulfato de amonio: provenientes de E.Merck ,Darmstadt, Alemania. En algunas oportunidades se utilizó sulfato de amonio calidad para fines enzimológicos, cedido gentilmente por la Dra. María S. de Passerón.

Succinato de sodio: obtenido de BDH,Gran Bretaña.

m-cloro fenilhidracina del carbonil cianuro (CCCP): obtenido de E.I. du Pont de Nemours and Co.USA.

2-4 dinitrofenol: obtenido de Fischer Scientific Co.,USA.

Amital: obtenido de Eli Lilly Co.,USA.

Acetil-acetona: proveniente de Hopkin y Williams, Ltd. Inglaterra.

Fue necesario redestilar este reactivo, usándose la fracción de PE entre 135-139°C.

Metanol, grado FU, obtenido de Carlo Erba, Italia; este solvente fue redestilado usándose la fracción de PE 63-64,5°C.

Papel para cromatografía Whatman n°1, obtenido de W. y R. Balston, Inglaterra.

Extracto de levadura Oxoid, obtenido de Oxo Ltd., Inglaterra.

Bacto-Peptona: obtenida de Difco, USA.

Agar, provisto gentilmente por Laboratorio Dabo, Buenos Aires, y Bacto-Agar de Difco, USA.

Glataraldehido, Tetróxido de Osmio y Oxido de propileno: obtenido de Ladd,USA.

El Kit de Epon: obtenido de Ernest F. Fullam Inc.,USA.

Resina Dowex 50W X8 , obtenida de Baker Chemical Co., USA.

Sephadex 6-100, obtenido de Pharmacia Fine Chemicals, Suecia.

En la preparación de todas las soluciones se utilizó siempre agua bidestilada sobre vidrio.

I.3. Instrumental

Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio de campo claro marca Nikon, en un microscopio de contraste de fases marca Carl Zeiss y en un microscopio electrónico marca JEOL modelo JEM 100 C ó bien en uno marca Siemmens modelo Elmiskop IA.

La intensidad luminosa se determinó con un fotómetro de Photovolt Corporation modelo 20,USA.

Las células se rompieron mediante un sonicador modelo W 185 D de Heat Systems-Ultrasonics, Inc.USA.

La absorbancia de soluciones se midió en un espectrofotómetro Beckman modelo DU o en un colorímetro Spectronic 20 de Bausch y Lomb.

II. Métodos

II.1. Cultivo de las bacterias

Rhodopseudomonas palustris: se creció en la mayoría de los casos en medio de Cohen-Bazire et al. (547) con algunas modificaciones, adicionado de peptona y extracto de levadura.

El medio se prepara a partir de estas soluciones:

Solución 1: Buffer fosfato de potasio 0,5 MpH 6,8

Solución 2: Acido DL-málico.....134,0 g

Acido L(+)-glutámico..... 50,0 g

Acetato de sodio ..... 50,0 g

Cloruro de amonio..... 50,0 g

Se ajusta el pH a 6,8 con hidróxido de sodio y se lleva a 1 litro con agua destilada.

Solución 3: EDTA disódico.$2H_2O$.....12,8 g

Sulfato de magnesio.....14,5 g

Cloruro de calcio.$2H_2O$..... 3,67g

Molibdato de amonio..... 9,3 mg

Sulfato ferroso.$7H_2O$.....99,0 mg

Acido nicotínico.....50,0 mg

Clorhidrato de tiamina.....25,0 mg

Biotina..... 1,0 mg

Metal 44.....50,0 ml

Se disuelve primero el EDTA disódico y se ajusta el pH a 6,8. Toda la mezcla se lleva a 1 litro con agua destilada y se controla el pH.

Metal 44 es una solución de sales consistente en:

EDTA disódico.$2H_2O$.....2,90 g
Sulfato de zinc.$7H_2O$.....10,95 g (2,5g Zn)
Sulfato ferroso.$7H_2O$.....5,00 g (1 g de Fe)
Sulfato de manganeso.H_2O.....1,54 g (500 mg de Mn)
Sulfato de cobre.$5H_2O$.....0,392g (100 mg Cu)
Nitrato de cobaltp.$6H_2O$.....0,248g (50 mg de Co)
Borato de sodio.$10H_2O$.....0,177g (2 mg de B)

Se lleva a 1 litro dcon agua destilada y se agregan unas gotas de ácido sulfúrico para retardar la precipitación.

Para hacer un litro de medio se mezclan 40 ml de solución 1 y 20 ml de las soluciones 2 y 3. Se adiciona 1 g de extracto de levadura y 1 gramo de peptona y se controla el pH. Se esteriliza un autoclave 15 minutos a 121°C. Se forma un copioso precipitado que se redisuelve al enfriar.

R.palustris también fue cultivada en medios como los recomendados por van Niel (30) con trisulfato o benzoato como dadores de electrones, a los que se introdujeron ligeras modificaciones. El medio consiste en

Sulfato de amonio.....1,0 g
Sulfato de magnesio.....0,2 g
Cloruro de sodio.....2,0 g
Benzoato de sodio ó bien
tiosulfato de sodio..... 2 g
Bicarbonato de sodio.....0,5 g
Acido micotínico.....0,1 mg
Clorhidrato de tiamina.....0,1 mg
Biotina.....0,01 mg
Acido p-aminobenzoico.....0,01 mg
Extracto de levadura.....0,1 g

todo llevado a 1 litro en buffer fosfato de potasio 0,006 M pH 7,0.

Como medio de mantenimiento se usó extracto de levadura 1%, agar 1% creciéndose la bacteria en punción.

Generalmente se inicia el crecimiento en medio líquido a partir de punciones, en frascos de 30 ml, que luego se transfieren a frascos de 125 ml, lográndose así suficiente cantidad de inóculo para crecer en volúmenes mayores. Los inóculos usados son de aproximadamente 3%.

Los frascos usados (de hasta 1 litro)eran con tapón esmerilado y se llenaron totalmente para asegurar anaerobiosis. En este caso y en los crecimientos en punción las incubaciones se realizaron

a 30°C por aproximadamente 72 hs. y bajo una intensidad lumincsa de 50 bujías-pie.

Para el crecimiento fototrófico de Rps. sphaeroides se usaron los mismos medios y condiciones.

Para el crecimiento aerobio en oscuridad de Rps. palustris se procedió a estriar de inóculos crecidos a la luz en caja de Petri con medio de mantenimiento, y se las incubó 72 horas en oscuridad a 30°C, luego de lo cual se tomó de una colonia típica y se la inoculó en 16 ml de medio de Cohen-Bazire et al. colocados en un erlenmeyer de 125 ml y se los incubó 72-96 hs. a 30°C en oscuridad con agitación, a 160- 180 revoluciones por minuto. Luego estos inóculos fueron transferidos cada uno a erlenmeyers de 2 litros con 500 ml de medio y se los incubó de igual manera.

Pudo lograrse un crecimiento "semianaeróbico" de la bacteria incubándola en erlenmeyers sin llenar y a la luz.

En todos los casos las células se cosecharon por centrifugación a 3200 x g, se lavaron dos veces con solución fisiológica y se almacenaron a -15 °C hasta el momento de usar.

Se hicieron controles de los cultivos de ambas bacterias mediante coloración de Gram (581) y cultivo en placa.

II.2. Microscopía de contraste de fases

Se prepararon extendidos sobre portaobjetos, se secaron por 30 minutos a 37°C, se fijaron con etanol 70% por 15 segundos y se montaron en medio de cultivo. Se obtuvo así un buen contraste sin alteraciones morfológicas.

II.3. Microscopía electrónica

La preparación de los especímenes para este tipo de observación se realizó como ya ha sido descripto por Margulies y Michaels (582), con algunas modificaciones.

Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron y resuspenden en buffer de Millonig (583) pH 7,4. Se agregó glutaraldehido hasta una concentración del 4% (v/v); se dejó a 0°C por 20 minutos, se centrifugó y resuspendió en buffer de Millonig 20 minutos a 0°C; esta suspensión se centrifugó y las células se resuspendieron en tetróxido de osmio 1% en buffer de Millonig, dejándose 60 minutos a 0°C, luego de lo cual se lavó tres veces con agua destilada durante 5 minutos.

Una vez fijada la preparación se incluyó a las células en agar al 0,75% ; el bloque se cortó en trozos pequeños los que se deshidrataron por sucesivos pasajes en etanol de concentraciones crecientes.

La muestra desecada se trató con óxido de propileno 2 veces por 5 minutos cada una y finalmente se embebió con Epon-óxido de propileno, mezclados en partes iguales, por 30 minutos a 0°C y luego en Epon 30 minutos a 0°C.

Se incluyó la muestra en cápsulas de gelatina con Epon y se dejó en estufa a 60°C por 48 horas. Los tacos se cortaron con cuchilla de vidrio con un micrótomo Porter-Blum (Servall); los cortes se levantaron con grilla de 300 mesh y se colorearon con acetato de uranilo y citrato de plomo.

II.4. Determinación de la relación entre peso seco y absorbancia a 680 nm.

Células de Rps. palustris se resuspendieron en buffer fosfato de sodio y potasio 0,05 M pH 7,5. De suspensiones bacterianas de diferentes absorbancias a 680nm se tomaron alícuotas y se secaron en estufa a 85°C toda la noche sobre vidrios de reloj previamente tarados (584) y se descontó el peso de las sales del buffer.

La curva de calibración es una recta la que fué calculada por el método de cuadrados mínimos y corresponde a la ecuación:

Peso seco(mg/ml) = 0,66 x Absorbancia a 680 nm

II.5 Preparación de una fracción enriquecida en succinil-CoA-S de Rhodopseudomonas sphaeroides

Las células cosechadas y congeladas se descongelaron lentamente y se resuspendieron en buffer fosfato de sodio y potasio 0,05 M y pH 7,5 hasta una densidad óptica de 100 a 680 nm. Todas las operaciones se realizaron en baño de hielo. La suspensión bacteriana se sonicó durante 3 minutos a 100 Vatios, luego de lo cual el extracto se diluyó 4 a 5 veces con buffer y se centrifugó a 15.000 x g durante 15 minutos. La fracción sobrenadante posteriormente se centrifugó a 140.000 x g durante 2 horas.

El sobrenadante de la ultracentrifugación se precipitó con sulfato de amonio, obteniéndose la fracción que precipitaba entre 45 - 60% de saturación. Se obtuvo así una fracción con una actividad específica de aproximadamente 1,8 unidades /mg proteina, determinada según el método descripto más adelante.

II.6. Preparación de extractos de Rhodopseudomonas palustris

Las células cosechadas y congeladas se descongelaron

lentamente y se resuspendieron en buffer fosfato de sodio y potasio 0,05 M pH 7,5 hasta una densidad óptica de 50 (equivalente a unos 30 mg/ml de suspensión). La suspensión se sonicó durante un minuto a 100 vatios, luego de lo cual se centrifugó a 15.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante resultante, en algunos casos, se centrifugó a 140.000 x g durante 2 horas.

II.7. Determinación de actividades enzimáticas

II.7.1 Acido delta aminolevúlico sintetasa:

Los extractos bacterianos o las preparaciones se incubaron mediante una modificación del sistema descripto por Burnham (454).

El sistema contenía succinato de sodio 50mM, glicina 50mM, CoA 60 µM, fosfato de piridoxal 40 µM, cloruro de magnesio 6mM, ATP 5 mM en buffer Tris-ClH 25mM a pH 7,5. El volumen final fue de 1ml. La incubación se realizó generalmente por 60 minutos a 37°C; en algunos ocasiones el tiempo de incubación fue diferente estando especificado en cada caso. Cuando se ensayaron fracciones enzimáticas prevenientes de precipitación con sulfato de amonio, se agregó al sistema alrededor de 0,9 unidades de Succinil-CoA-S para generar el Succinil-CoA.

Unidad enzimáticas: Se definió una unidad enzimática de ALA-S como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de ALA en 60 minutos en las condiciones standard de incubación. La actividad específica se expresa como unidades/mg proteína.

II.7.1.1. Determinación del ALA formado en las incubaciones:

Para ello se empleó el método de Mauzerall y Granick (585) consistente en transformar el ALA en ALA-pirrol mediante una condensación de Knorr y posterior reacción del mismo con p-dimetil aminobenzaldehico, lo que produce un color característico.

Luego de realizada la incubación, esta se detuvo mediante el agregado de 1 ml de ácido tricloracético 10%; se dejó en frío 15 minutos y luego se centrifugó 5 minutos a 600 x g; se decantó y se tomó 1 ml que se llevó a pH 4.6, se le agregó 1 ml de buffer acetato pH 4,6 y 0,05 ml de acetilacetona purificada.

La mezcla se hirvió a baño maría 10 minutos, se enfrío y se agregó 2 ml del reactivo de Ehrlich modificado, 2N en ClO_4H (585); se leía a los 15 minutos a 553 nm. El coeficiente de extinción es 6,8 x 10^4 M^{-1} cm^{-1}.

II.7.1.2 Caracterización del producto formado en las incubaciones

II.7.1.2.1. Mediante espectro de absorción: El producto de condensación del reactivo de Ehrlich 2N en ClO_4H tiene un espectro característico con un hombro en 525nm y un máximo en 553 nm. El espectro de absorción de esta reacción, obtenido con ALA-pirrol purificado presenta una relación de absorbancias entre 525 y 555 nm igual a 0,69 (585).

II.7.1.2.2. Mediante aislamiento del producto formado : Este se realizó mediante el mediante el método de Ebert et al. (586).Resina Dowex 50 W-X8 200-400 mesh se convirtió de la forma ácida a la forma sódica calentándola 3 veces en NaOH 2 M a 50°C hasta que no se observó color en el lavado. Se lavó profusamente la resina con agua y luego se la equilibró con buffer acetato 0,1M pH 4,0.Con la resina equilibrada se armó una columna de 2cm de alto por 1 cm de diámetro.

El desproteinizado tricloroacético de incubaciones se llevó a pH 3,9 - 4,0 y se añadió 1/2 volumen de buffer acetato 1M pH 4,0. La muestra se hizo fluir por la columna, y entonces se la lavó con:

1.20 ml de buffer acetato 0,1 M pH 4,0.

2.20 ml de metanol-buffer acetato 0,1 M pH 4,0(2:1, v/v)
3.10 ml de ClH 0,01 M.
4.3 -5 ml de NH_4OH 1 M.

En el paso 4 eluyó el ALA y, de estar presente, la aminoacetona. Este eluído fué neutralizado con ClH y evaporado a sequedad en un evaporador rotativo a presión reducida. El residuo se tomó con una pequeña porción de etanol.

El extracto etanólico se cromatografió según Elliot (587) corriéndose con etanol-ácido acético 1 M-piridina-agua (95:10:3:3,v/v) que separa ALA de AA(R_f ALA: 0,15, R_fAA: 0,30). El extracto también se corrió en butanol-ácido acético-agua (4:1:5) fase superior, si bien en este sistema no se separa el ALA de la AA; R_f ALA : 0,32 (588).

Una alícuota del extracto etanólico se evaporó a sequedad bajo nitrógeno, se tomó con buffer acetato 1 M pH 4,6 y se efectuó la reacción de condensación para obtener el pirrol, luego de lo cual se sembró y corrió en butanol-ácido acético-agua. El ALA-pirrol tiene en este sistema un $R_f$de 0,90.

II.7.2. Succinil Coenzima A sintetasa.

Se incubó la preparación enzimática en presencia de succinato de sodio 25mM, CoA 60 μM, Cloruro de Magnesio 3mM, ATP 2, 5mM Tris-ClH 12,5 mM pH 7,5, Hidroxilamina 0,58 M y glutation 50mM en un volumen final de 2ml, durante 60' a 37°C. La reacción se detuvo por agregado de 1 ml de una mezcla que contiene en partes iguales ácido tricloroacetico 25%; ácido clorhidrico 3N y cloruro férrico 5% en ClH c 1N. El succinil hidroxamato formado se determinó en el sobrenadante leyendo absorbancia de la solución a 540 nm.(162) . La cantidad de succinil-hidroxamato se obtuvo de una curva de calibración realizada previamente (161).

Unidad enzimática: Se definió una unidad enzimática de succinil-CoA-S como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un micromol de Succinil-CoA en 60 minutos en las condiciones standard descriptas. La actividad específica se expresa como el número de unidades de enzima/mg de proteína.

II.7.3. ALA-dehidrasa

El extracto enzimático se incubó en presencia de ALA 2,5 mM, buffer Tris-ClH 50 mM pH 7,4, cisteina 2,5 mM, en un volumen final de 2ml, durante 60 minutos. Se detuvo la reacción por agregado de 0,1 ml de solución saturada de SO_4Cu. Se descartó el precipitado por centrifugación y se determinó el PBG formado (589).

Unidad enzimática: Fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un nmol de PBG en 60 minutos en las condiciones standard de incubación. La actividad específica se expresa como el número de unidades de enzima/mg de proteína.

II.8 . Determinación de pesos moleculares mediante filtración por geles.

Con este fin se recurrió al método de Andrews (590) usándose Sephadex G-100. El producto se suspendió en agua y se dejó hinchar por 3 días; luego las partículas más pequeñas se eliminaron por decantación; luego se desaereó la suspensión del gel por aplicación de vacío. Con el gel una vez así preparado se armó una columna de 2,5 cm de diámetro interno mediante un sistema llenador. El volumen de la columna de gel

fué de 150 ml. Finalmente se la equilibrió con el buffer de corrida Tris-ClH 0,05 M pH 7,5. Las muestras, adicionadas de sacarosa a fin de aumentar su densidad, se aplicaron cuidadosamente sobre el tope de la columna y éstas se corrieron con buffer recogiéndose fracciones de 2,5-3,0 ml. Todas las operaciones se realizaron a 4°C.

A fin de calibrar la columna se corrieron: blue-dextrano,, para determinar el volumen muerto (V_o), citocromo c, (PM 12.400), ovealbúmina (PM 45.000, su dímero PM 90.000 también se detectó) y seroalbúmina (PM 67.000, su dímero PM 134.000 puedo detectarse). Se obtuvieron los gráficos; V_e/V_o vs. log PM(V_e: volumen de elución de la proteína) y $(K_d)^{1/2}$ vs $(PM)^{1/2}$.

K_d es el coeficiente de distribución, cuyo concepto físico correspondería a la fracción de volumen del agua absorbida accecible al soluto (591).

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

V_i es el volumen de agua dentro de los gránulos del gel, y se calcula por la fórmula:

$$V_i = \frac{W_r \cdot d}{W_r + 1} (V_t - V_o)$$

W_r es la cantidad de agua absorbida por gramo de gel seco d es la densidad del gel hinchado.

Los valores de estos parámetros son conocidos por publicaciones del fabricante (592).La concordancia entre los valores obtenidos y los de Andrews (590) es muy buena.

II.9. Determinación de bacteriocloroflla

Se realizó por extracción con metanol, de acuerdo ca las indicaciones de Schon (592) utilizándose como coeficiente de extinción el valor corregido de Cohen-Bazire et.al. (64) de $60 nM^{-1} cm^{-1}$.

II.10. Determinación de proteinas

Se realizó por el método de Lowry et al. (594); alternativamente se estimaron midiendo las absorbancias a 260 y 280 nm y empleando la fórmula (595):

Concentración proteica (mg/ml) =

$$1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260}$$

R E S U L T A D O S

CARACTERES MORFOLOGICOS GENERALES

Las células de Rps. palustris provenientes de cultivos jóvenes crecidos en medio de Cohen-Bazire et al. adicionado de peptona de carne y extracto de levadura, se presentaron como bastones Gram negativos, ligeramente curvados, de 1,5 a 2,0 μ de longitud con extremos dilatados. Observadas mediante el microscopio de contraste de fases, las células aparecían con opacidades en los extremos. En estos cultivos llegaban a predominar organismos con forma de clavas. Esta típica apariencia es debida a la reproducción por brotación, característica de la especie. Se han comunicado observaciones similares para otras cepas de Rps. palustris (48,49) y para Rps.viridis (48).

En los cultivos jóvenes de Rps. palustris la mayoría de las células eran móviles, mientras que por el contrario, en cultivos envejecidos predominaban células inmóviles, las que presentaban una morfología de bastones alargados curvos.

En la Figura 19 se muestran una fotografía de células de Rps. palustris crecidas en medio de Cohen-Bazire et al. adicionado de peptona de carne y extracto de levadura, provenientes de un cultivo crecido hasta el final de la fase logarítmica en condiciones anaeróbicas y a la luz, tomada a través del microscopio de contraste de fases. En ella se destaca nítidamente la formación de rosetas y racimos, lo que es otra característica de la especie, como así también organismos con la típica forma de clavas.

Las células crecidas quimioheterotróficamente, en aerobiosis y oscuridad, presentaban las mismas características morfológicas que las crecidas fotoherotróficamente en anaerobiosis.

Las células de Rps. palustris de la cepa usada a lo largo de este trabajo, crecidas en condiciones que realicen fotosíntesis, esto es, en anaerobiosis y a la luz, poseían una ultraestructura característica consistente en un sistema de lamelas paralelas, adyacentes, continuas con la membrana citoplamática, lo que está en un todo de acuerdo con las observaciones realizadas por otros autores (49,50,596).

En las figuras 20 y 21 se muestran cortes ultrafinos de células Rps.palustris crecidas fotoheterotroficamente, fijados, incluídos y teñidos tal como se ha descripto en Métodos.

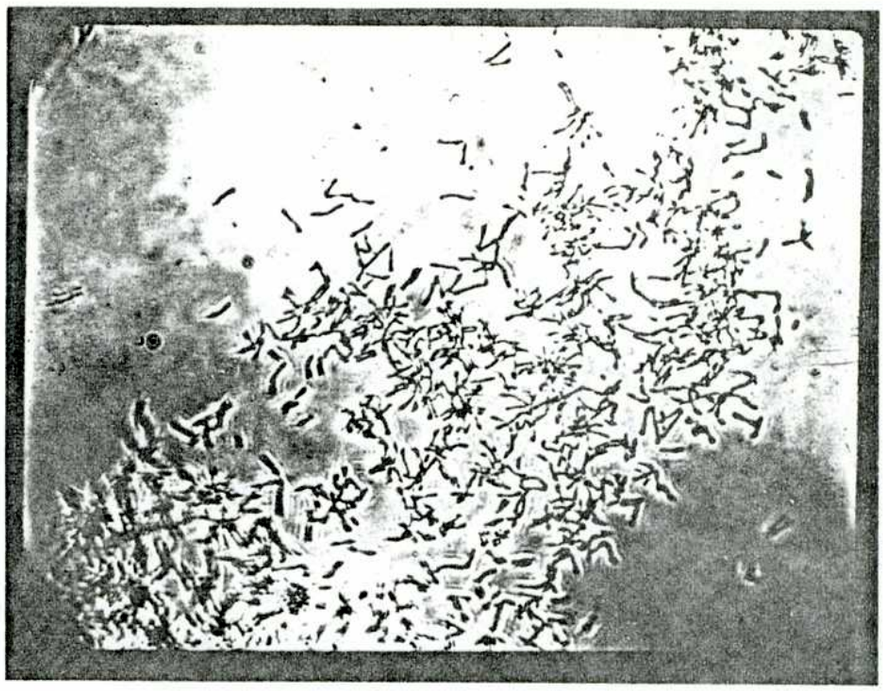


Figura 19: Rhodopseudomonas palustris crecida en medio de Cohen-Bazire et al. (contraste de fases).

Figura 20: Corte ultrafino de Rps.palustris crecida fotosintéticamente (25.000 x ampliado)

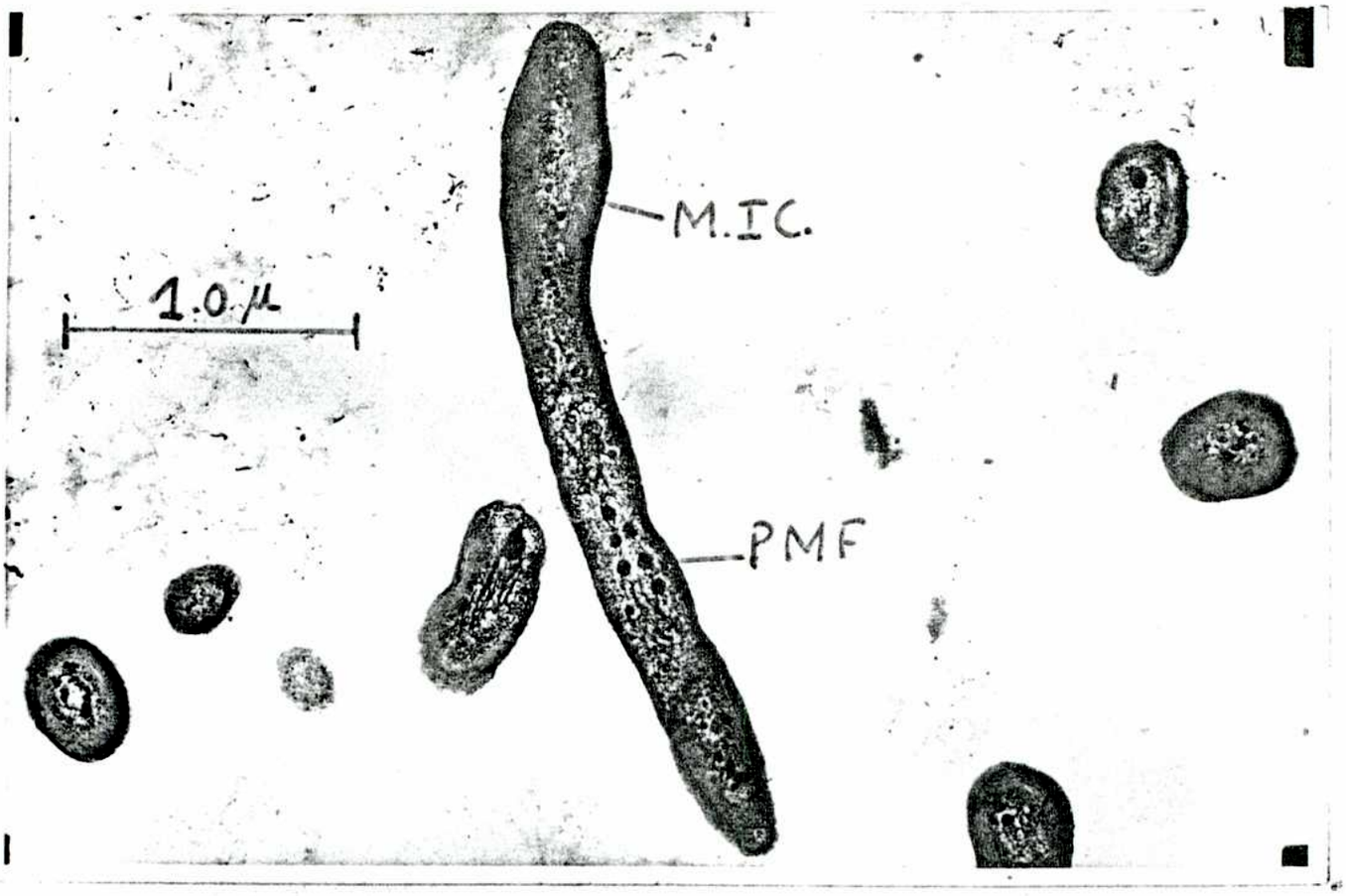


Figura 21: Corte ultrafino de Rps. palustris crecida fotosintéticamente (15.000 x ampliado)
MIC : membrana intracitoplasmática
PMF : polimetafosfato

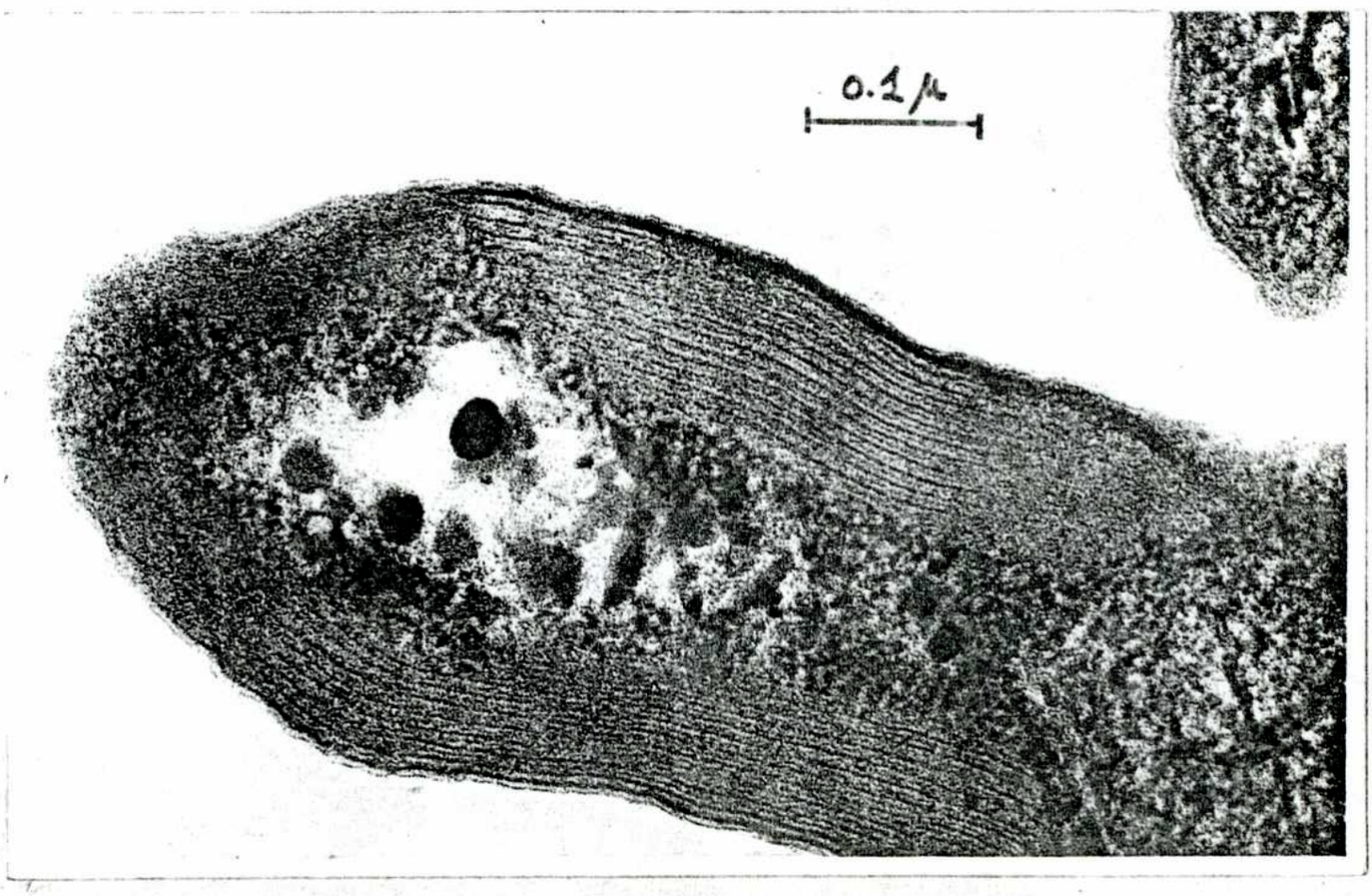


Figura 22: Corte ultrafino de Rps. palustris crecida fotosintéticamente (80.000 x ampliado).

Se destaca el típico sistema de membranas intracitoplasmáticas lamelar, el cual se halla localizado en uno de los extremos de las células, pudiéndose observar también que en el polo de las mismas no se encuentran lamelas. Puede apreciarse asimismo, la presencia de gránulos de polimetafosfato (78).

En las Figuras 22,23 y 24 es posible observar cortes ultrafinos de Rps. palustris con mayor aumento, con el objeto de hacer resaltar el sistema de membranas intracitoplásmáticas lamelas. En la figura 24 se han recuadrado sitios donde se pueden observar puntos de interconexión de las lamelas, lo que indica que entre ellas existe una continuidad.

El sistema membranoso intracitoplasmático no circunda completamente a las células, tal como se deduce de las fotografías de cortes ultrafinos mostrados en las Figuras 26,25 y 27 En estas figuras es posible observar secciones de Rps. palustris mostrando los apilamientos de lamelas desde diferentes ángulos. En las células cortadas longitudinalmente, el plano de sección es tangencial al apilamiento membranoso (Figuras 25 y 26). En la Figura 27 puede observarse un corte transversal de la célula donde se destacan las discontinuidades mencionadas, como así también en el sector recuadrado interconexiones a lo largo del apilamiento,lo mismo que gránulos de polihidroxibutirato (49).

En las Figuras 28 y 29 se muestran fotografías de cortes ultrafinos de ;células de Rps. palustris crecidas aeróbicamente en oscuridad. Se destaca la presencia de gránulos de polimetafosfato, y , principalmente, la absoluta carencia del sistema de membranas intracitoplasmáticas. Esto último se confirmó por observaciones de los cortes de este tipo células a grandes aumentos (hasta 300.000x) con los que no pudo verse ninguna clase de repliegues de la membrana citoplasmática

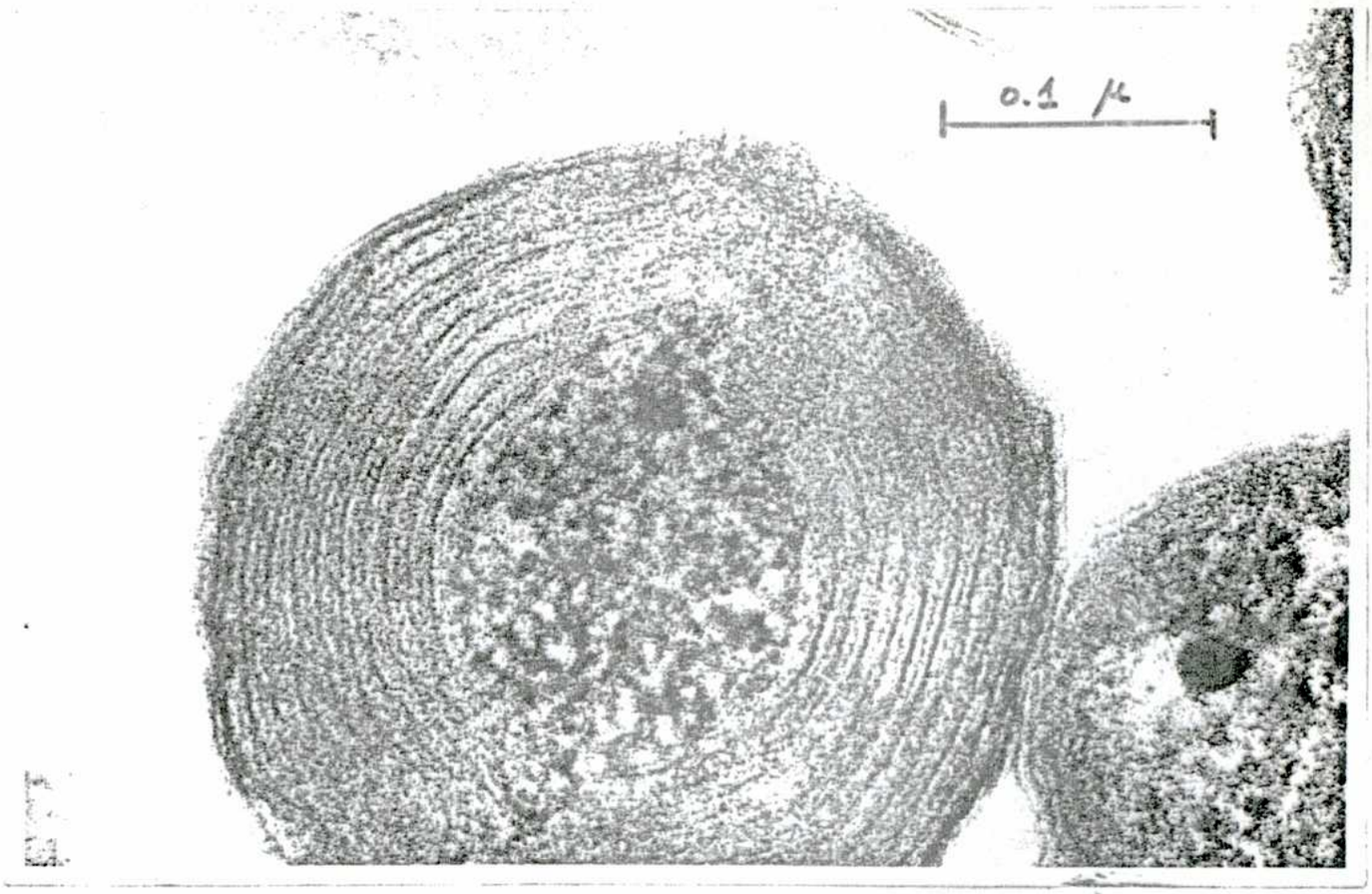


Figura 23: Corte ultrafino de Rps. palustris crecida fotosintéticamente (150.000 x ampliado)

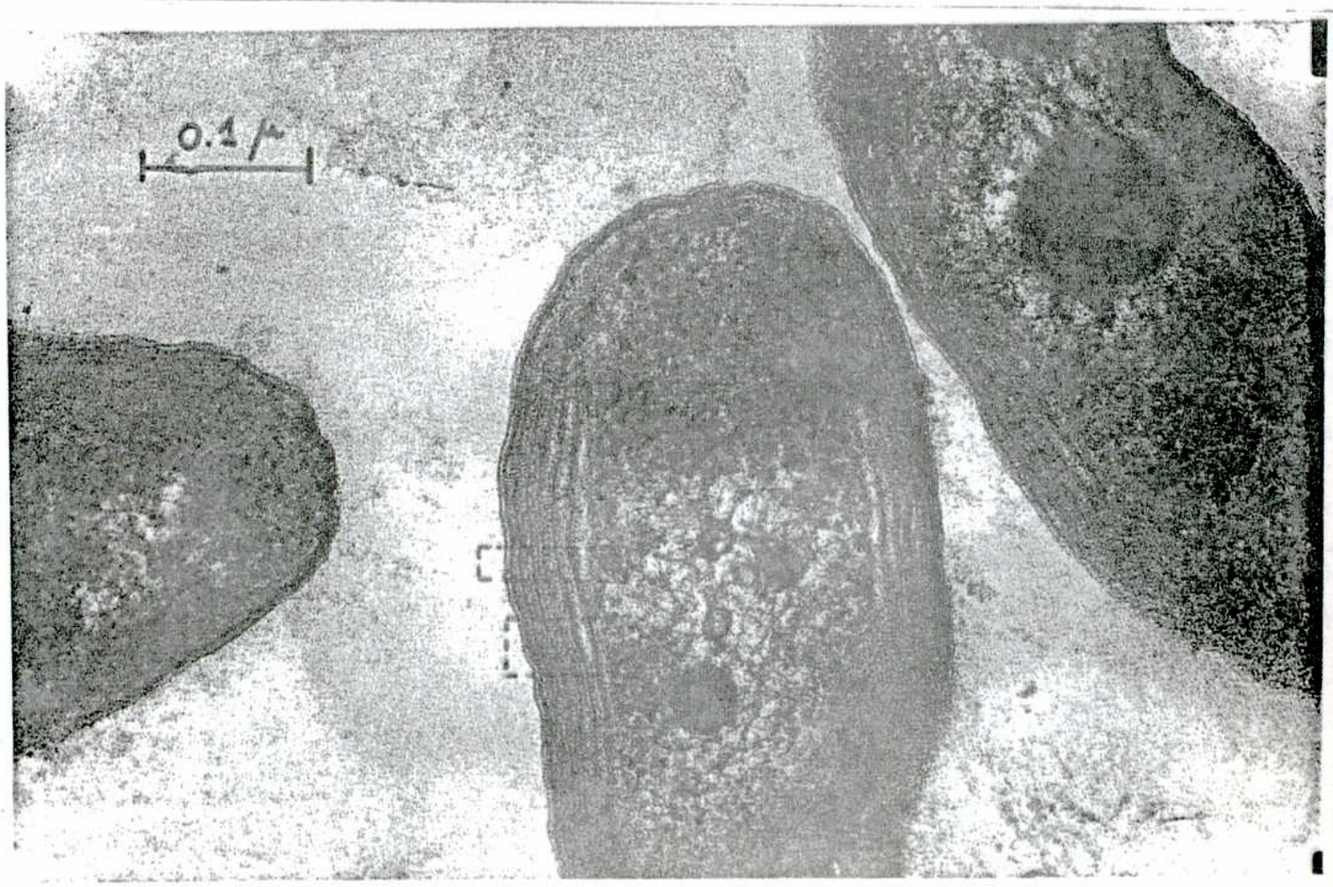


Figura 24 : Corte ultrafino de Rps.palustris crecida fotosintéticamente (80.000 x ampliado) . En los recuadros pueden distinguirse conexiones entre los apilamientos membranosos.

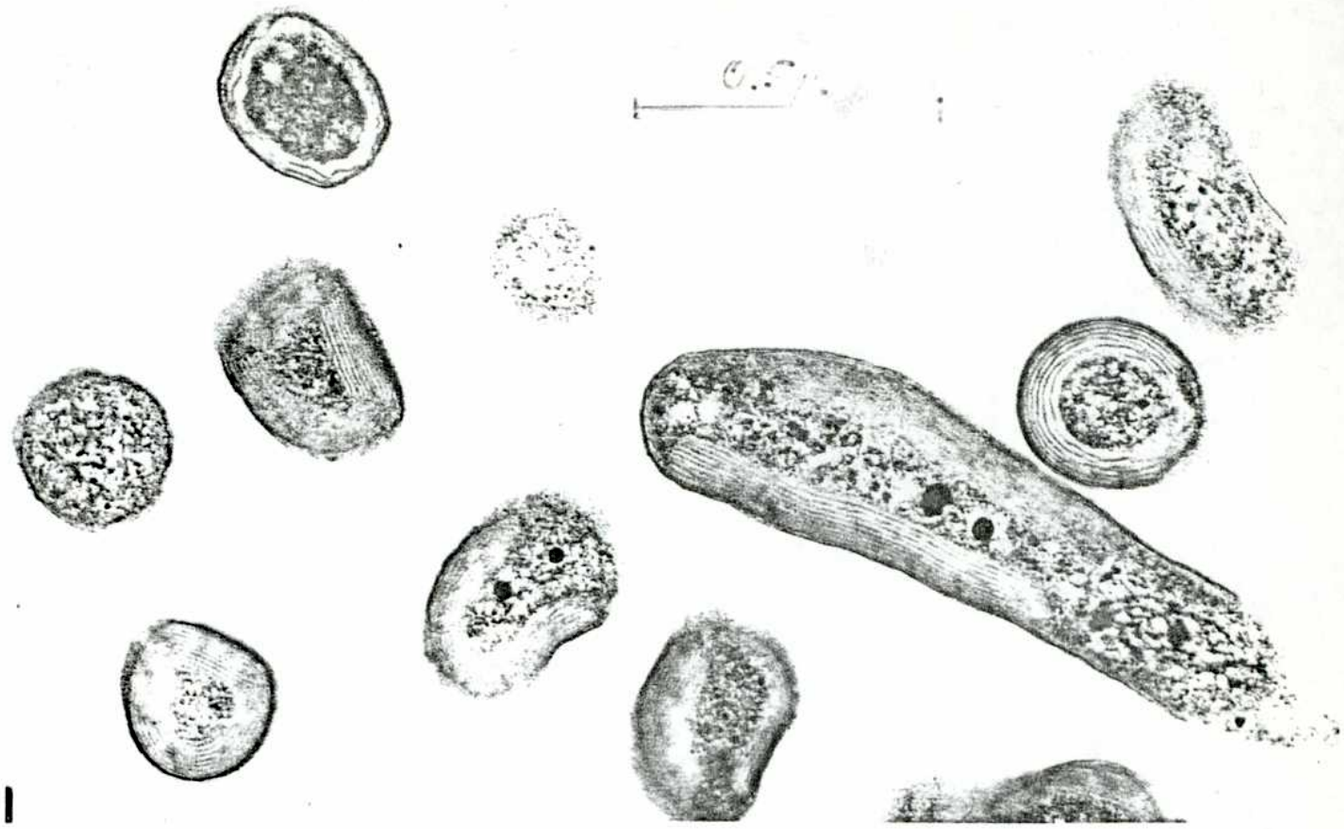


Figura 25: Corte ultrafino tangencial al apilamiento membranoso de Rps. palustris crecida fotosintéticamente (30.000 x ampliado)

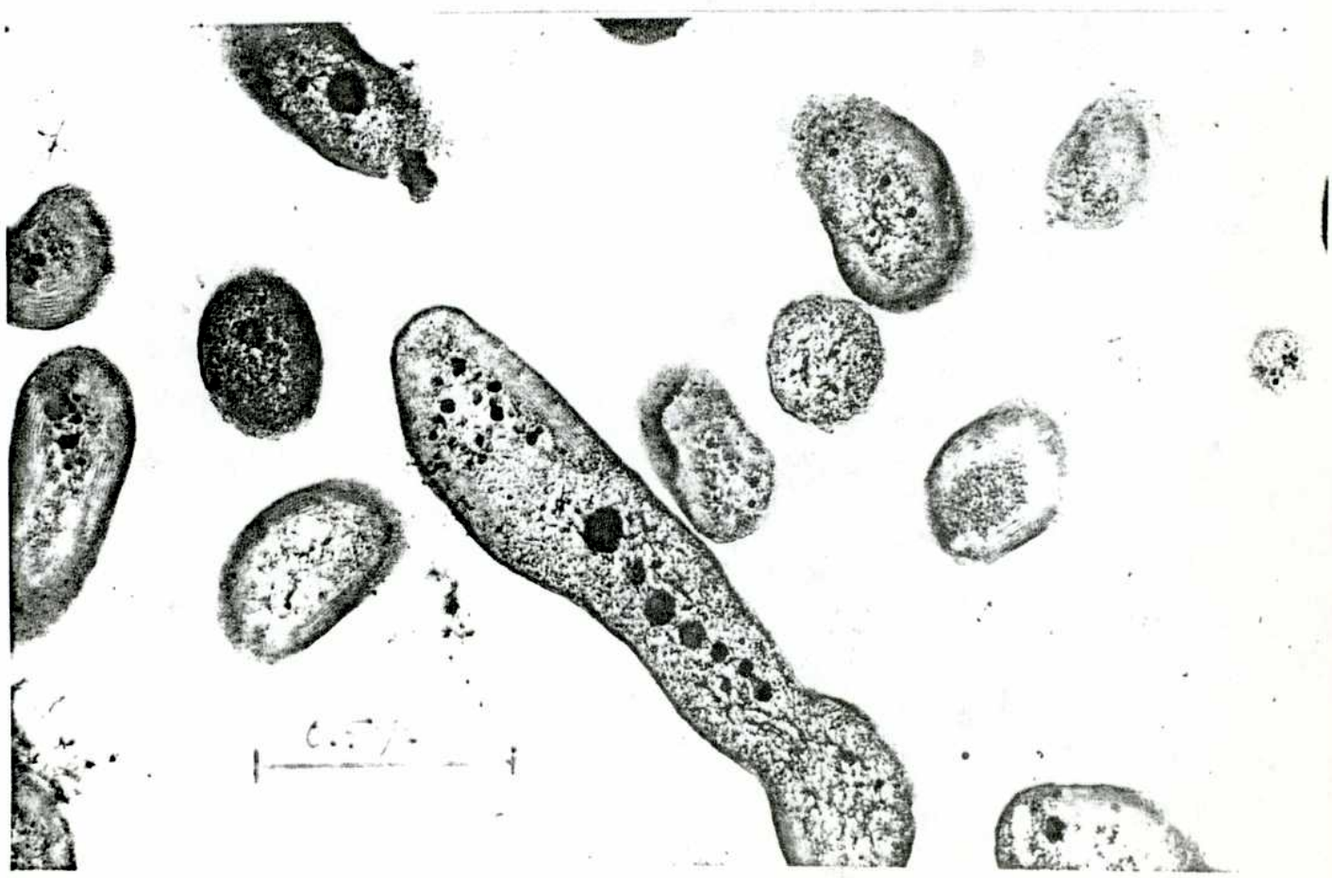


Figura 26: Corte ultrafino tangencial al apilamiento membranoso de Rps.palustris crecida fotosintéticamente(25.000 x ampliado)

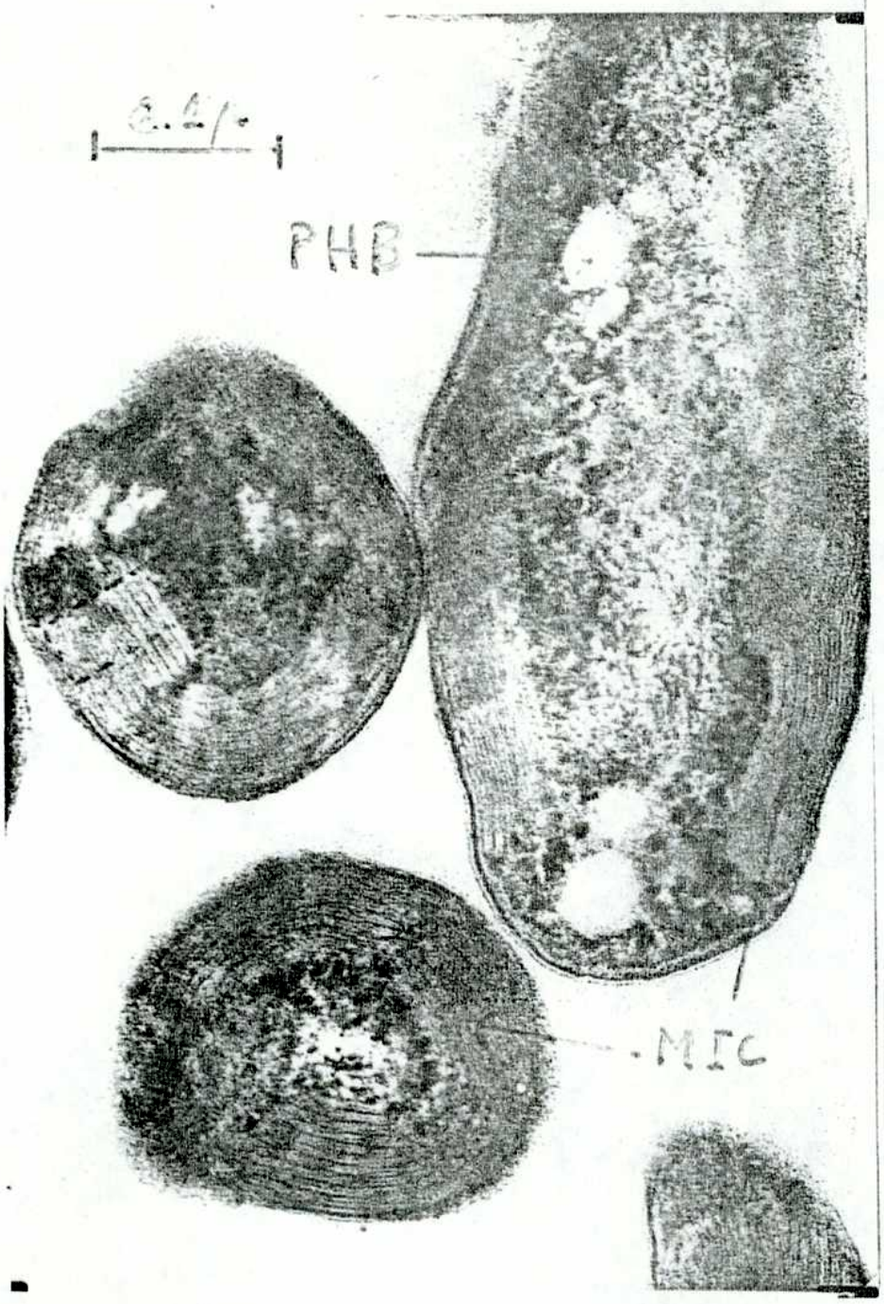
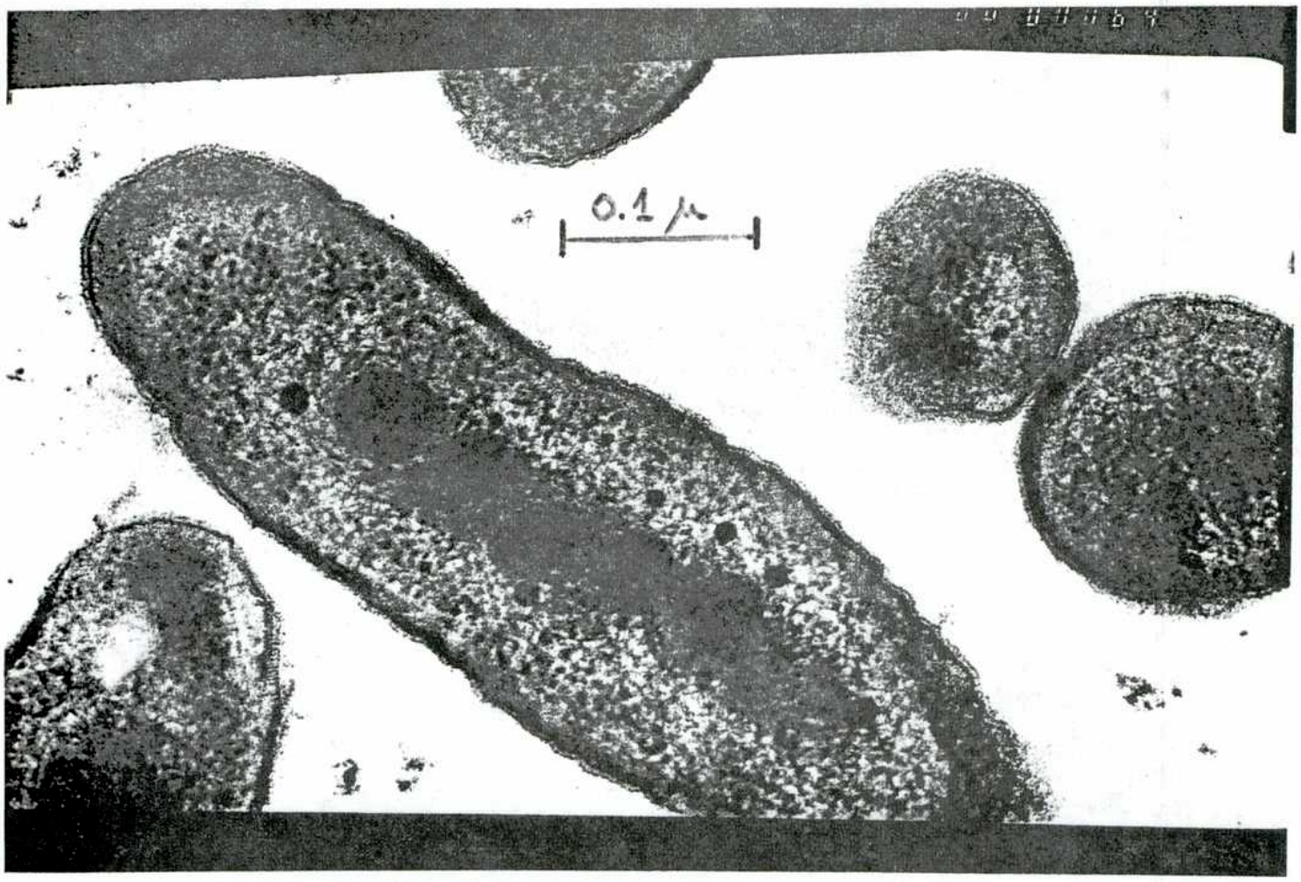
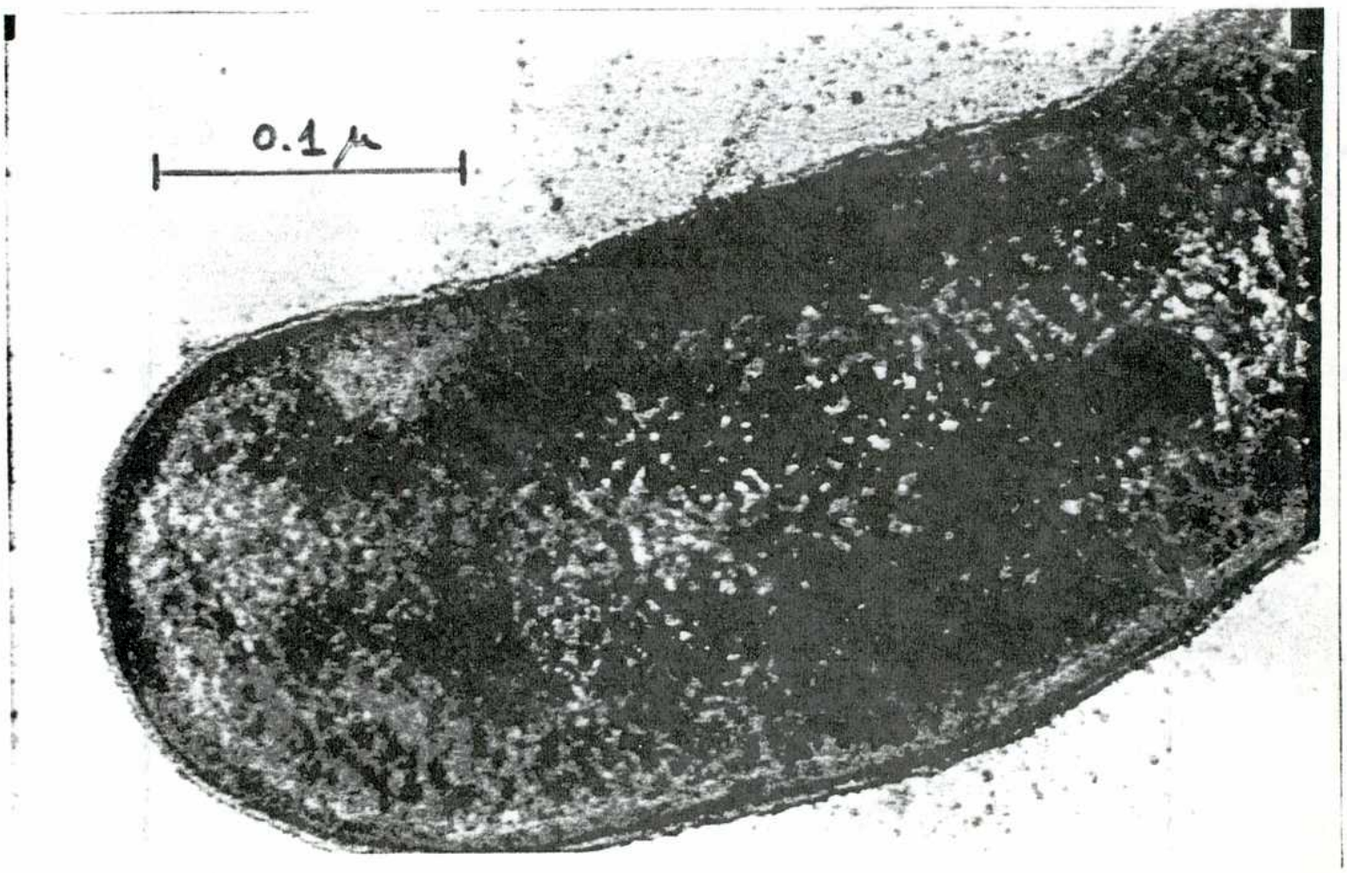


Figura 27: Corte ultrafino de Rps. palustris crecida fotosintéticamente Se destacan discontinuidades en los apilamientos membranosos, interconexiones dentro de los mismos (en el recuadro) y gánulos de polihidroxibutirato (PHB) (60.000 x ampliado).



igura 28: Corte ultrafino de Rps. palustris crecida aeróbicamente en oscuridad (60.000 x ampliado)



igura 29 : Corte ultrafino de Rps. palustris crecida aeróbicamente en oscuridad (100.000 x ampliado).

ACIDO DELTA AMINOLEVULICO SINTETASA DE *Rhodopseudomonas palustris* CRECIDA FOTOHETEROTROFICAMENTE

I. Condiciones de ruptura de las células bacterianas.

Con el objeto de estandarizar las condiciones de trabajo, a fin de poder medir los niveles de ALA-S, ha sido necesario tener en cuenta dos factores en el tratamiento sónico de las suspensiones bacterianas: por una parte, el tiempo al que dichas suspensiones han sido sometidas al tratamiento sónico, y por otro lado, la concentración de células en la misma.

En base a los resultados obtenidos por otros autores en diferentes microorganismos, se supuso que el ALA-S debía ser también una enzima localizada en el citoplasma celular, y esto hizo necesario conocer cual era el menor tiempo de sonicación que aseguraba una ruptura total o casi total de las células bacterianas, y una extracción de proteínas, en particular las asociadas a material cromatofórico, no demasiado alta, a fin de evitar inconvenientes provocados por exceso de proteínas. Además al tratarse el ALA-S de una enzima sumamente sensible y que fácilmente pierde su actividad, el conocimiento de este límite inferior de tiempo de tratamiento es imprescindible para evitar pérdidas de actividad si la enzima fuera también sensible al tratamiento sónico.

Una vez fijado este mínimo tiempo de sonicación que asegurara una buena extracción de actividad enzimática, fué necesario conocer si existía o no variaciones de la actividad específica de la enzima en función de la concentración de células en la suspensión que se sometía a sonicación, y si la hubiere, fijar una concentración óptima de trabajo a la cual siempre deberíamos referirnos.

I.1. Tiempo de sonicación

Se resuspendieron células lavadas de *Rps. palustris* crecidas fotoheterotróficamente en medio de Cohen-Bazire et al. en buffer fosfato de sodio y potasio 0,05 M pH 7,5 , hasta aproximadamente una concentración de 30mg de peso seco/ml de suspensión . La suspensión así preparada se sonicó a diferentes tiempos en un aparato Sonifer Cell Disrupter Model w185D, Heat System, Ultrasonic Inc.,Plainview L.I.NY a 100 vatios de potencia.

Para evitar el calentamiento de las suspensiones durante esta operación, se colocó el recipiente que la contenía en un baño de hielo y sal, con el objeto de mantener la temperatura entre -4°C y 0°C. Además, la sonicación se realizó en varias etapas , de no más de 15 segundos cada una, con intervalos de 30 segundos.

Se tomaron muestras a los tiempos deseados, las que fueron centrifugadas a 15.000 xg durante 15 minutos para eliminar células no rotas y restos de paredes microbianas. El sobrenadante era de un vivo color rojo, debido a los fragmentos de membranas intracitoplasmáticas que no sedimentaban en esas condiciones.

En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos en una experiencia típica.

Hasta los 2 minutos de tratamiento sónico aumenta la actividad enzimática total extraída, la que decae ligeramente entre los 2 y 4 minutos de sonicación. Por otra parte, se comprobó un incremento constante de las proteínas extraídas por sonicación, hasta los dos minutos de tratamiento, llegándose a un plateau luego de dicho tiempo. La actividad específica decae en el sobrenadante de 15.000 xg a medida que aumenta el tiempo de sonicación, debido tanto al incremento de la proteína extraída como el decaimiento de actividad a tiempos prolongados de tratamiento sónico.

Se ha comprobado que entre 1 y 2 minutos de sonicación se incrementaba la actividad de ALA-S extraída en un 20%, mientras que las proteínas extraídas incrementan un 65%, de lo que se dedujo que no es necesario prolongar el tratamiento sónico.

Además, al minuto de sonicación casi no se observaban células intactas, debiendo atribuírse el incremento de proteínas a material cromatofórico que era separado del resto celular por el tratamiento.

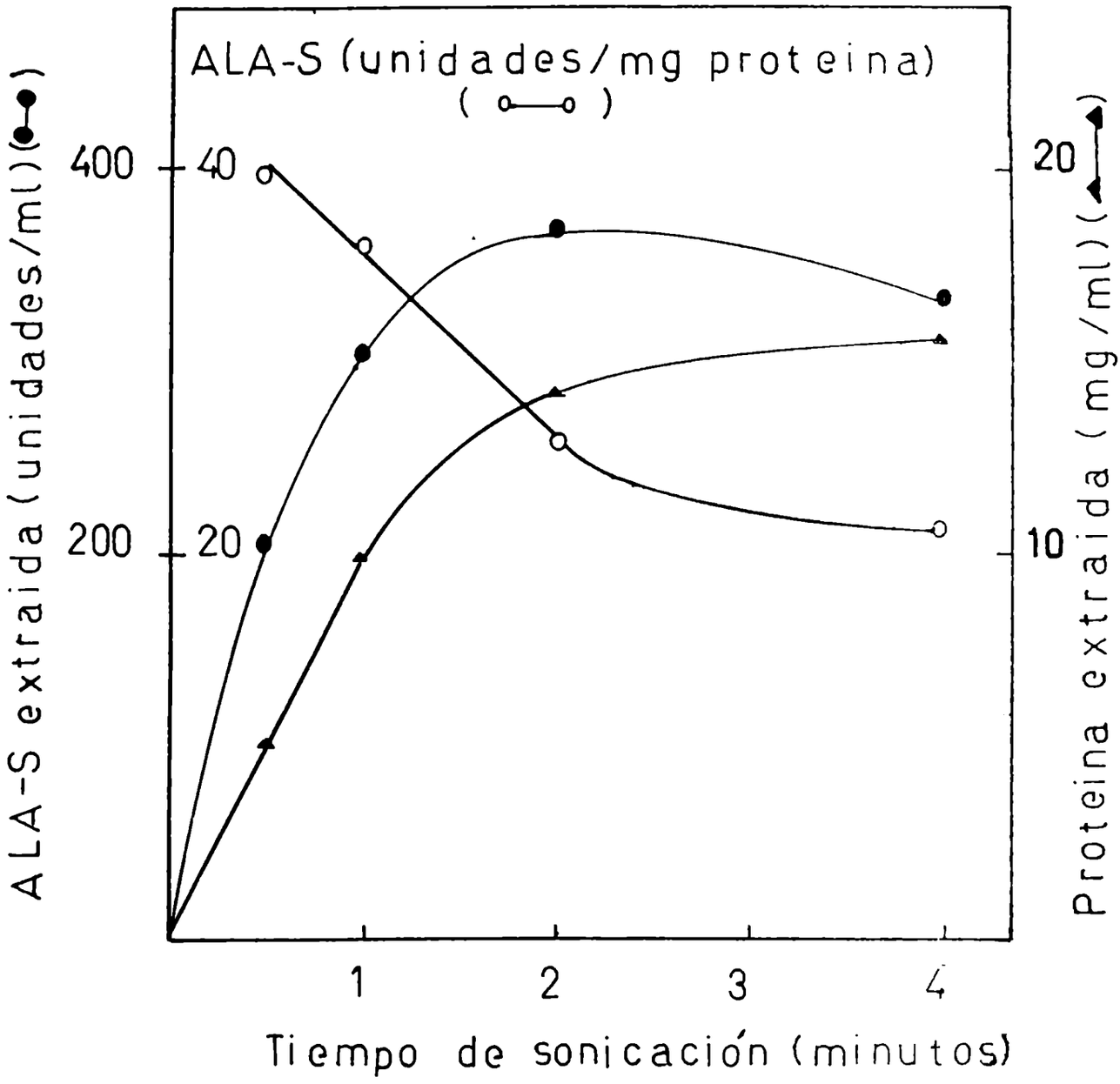


Figura 30: Determinación de ALA-S y proteínas en sobrenadantes de 15.000xg de sonicados de una suspensión de *Rps. palustris*. La suspensión (28 mg de peso seco/ml) en buffer fosfato de sodio y potasio 0,05M pH 7,5 se sonicó los tiempos indicados. Las determinaciones de actividad enzimática y proteínas se realizaron como se describe en Métodos.

I.2. Concentración de la suspensión bacteriana que se sonica

A fin de determinar si existía o no una concentración óptima de células de Rps. palustris en la suspensión que va a ser sometida a tratamiento sónico, se prepararon suspensiones de la bacteria de diferentes concentraciones, las cuales fueron sonicadas en total por un minuto, siguiéndose las indicaciones y cuidados mencionados en el item anterior. Luego del tratamiento, se centrifugaron los extractos a 15.000xg durante 15 minutos, y en los sobrenadantes se determinó actividad de ALA-S y proteínas.

En la Tabla I se muestran los resultados obtenidos. Observando dichos resultados resulta claro que en un rango bastante amplio de concentraciones de células en las suspensiones, la actividad específica de ALA-S permanece constante. En base a consideraciones prácticas, como ser la viscosidad de las suspensiones que se sometían a sonicación, se decidió emplear, dentro de lo posible, una concentración de aproximadamente 30 mg peso seco/ml.

II. Localización intracelular de la enzima

Se ha mencionado en el punto I que se había supuesto para las experiencias anteriores, que la enzima ALA-S de Rps.palustris estaba localizada en la fracción soluble.

A fin de verificar esta suposición se procedió a efectuar una centrifugación diferencial de extractos crudos sonicados de células de Rps. palustris, y a determinar en las diversas fracciones actividad enzimática. En las determinaciones de ALA-S en el precipitado de 15.000xG de 140.000 xg se agregó el sistema de incubación 0,9 unidades de Succinil-CoA-S Se muestran en la Tabla II los resultados obtenidos en varias determinaciones.

Mediante los valores obtenidos queda demostrado que la actividad de ALA-S se encontraba en la fracción sobrenadante de 140.000xg, y que no estaba asociada a la fracción cromatofórica. Además, se demostró que es posible trabajar directamente con los sobrenadantes de 15.000xg, ya que la presencia de fragmentos de membrana intracitoplasmática no afectó a la

TABLA I

Concentración de la suspensión bacteriana (mg peso seco/ml)	Proteína extraída (mg / ml sobrenadante 15.000xg)	ALA-S actividad específica (unidades/mg proteínas)
56,1	19,33	23,75
31,7	15,53	26,37
21,1	8,26	27,31

Se sonicaron diversas suspensiones de Rps. palustris en buffer fosfato de sodio y potasio 0,05 M pH 7,5. El tiempo total de sonicación fué en todos los casos 1 minuto(15 segundos cada vez), y la operación se realizó en baño de hielo y sal .Los extractos sonicados se centrifugaron a 15.000xg durante 15 minutos. Se determinaron actividad de ALA-S y proteínas, tal como se describe en Métodos.

TABLA II

FRACCION	ALA-S (unidades/ml de extracto)		
	Exp. 1	Exp.2	Exp.3
sobrenadante de 15.000 xg	461,2	430,6	429,4
precipitado de 15.000 xg	14,1	ND	-
sobrenadante de 140.000 xg	-	437,6	431,7
precipitado de 140.000 xg	-	8,2	ND

Determinación de actividad de ALA-S en diversas fracciones de Rps.palustris. Se prepararon diversas suspensiones,las cuales se sonicaron durante 1 minuto en la forma ya descripta.Los extractos resultantes se centrifugaron 15'a 15.000 xg y por 2 horas a 140.000 xg. El precipitado resultante se resuspendió en el mismo buffer al volumen original. Se determinó actividad de ALA-S en todas las fracciones en la forma descripta en Métodos. Las incubaciones de las fracciones precipitadas se hicieron en presencia de 0,9 unidades de Succinil-CoA-S. ND no detectable.

actividad total. Los pequeños valores de actividad que se detectaron en algunos casos en los precipitados no se consideraron significativas.

III. Condiciones de incubación

III.1. Efecto de los componentes del sistema de reacción.

Se estudió el efecto de cada uno delos componentes del sistema standard de incubación, ya descripto en Métodos. Los resultados son, de alguna manera, una medida del nivel de los sustratos endógenos en los extractos bacterianos.

Para tal efecto se realizaron incubaciones de los extractos en presencia del sistema completo y omitiendo cada vez uno de los componentes del sistema de incubación. En la Tabla III se muestran los resultados obtenidos.

Es de destacar que en ausencia de glicina no se detectó actividad de ALA-S, mientras que en ausencia de otros sustratos la reacción transcurre con buena eficiencia, quizá debido al contenido endógeno del extracto bacteriano. Debe destacarse además, el mayor valor de actividad en ausencia de cloruro de magnesio, lo cual ha sido comprobado también en R. rubrum (445). Esto podría atribuirse a una posible inhibición por exceso de ión Mg^{2+} aunque no se investigó con más detalle. De todas formas, a fin de estandarizar el sistema de incubación para todas las determinaciones, y dado que no existen razones para suponer que este catión no sea necesario para la actividad del sistema generador del Succinil-CoA, y como además la diferencia de actividades no es muy marcada, se consideró conveniente no eliminarlo de la mezcla de incubación.

El buffer fosfato demostró ser un inhibidor de la actividad de ALA-S, por lo cual se mantuvo al buffer Tris-ClH como buffer de incubación. La cantidad de buffer fosfato agregada con el extracto enzimático se la considera despreciable.

III.2. pH de incubación

Se determinó el pH óptimo para la reacción del ALA-S de Rps. palustris, presente en extractos sobrenadantes de 15.000xg

TABLA III

Mezcla de incubación	% de actividad
Sistema completo	100
- succinato	35
- glicina	0
- CoA	66
- ATP	50
- Cl_2Mg	115
- fosfato de piridoxal	49
- Tris + buffer fosfato	72

Dependencia de la actividad de ALA-S de cada uno de los componentes del sistema standard de incubación. El sistema completo consiste de succinato de sodio 50mM, glicina 50mM, CoA 60 μM, fosfato de piridoxal 40 μM, ATP 5mM, cloruro de magnesio 6mM, en buffer Tris-ClH 25mM pH 7,5 . Cuando se reemplazó el buffer Tris-ClH se usó buffer fosfato de sodio y potasio 25 mM pH 7,5. Como fuente de enzima se usó sobrenadante de 15.000xg proveniente de una suspensión de Rps. palustris (39 mg peso seco/ml) la que se sonicó 1 minuto con las precauciones ya mencionadas en I. Se incubaron 0,96 mg de proteína durante 30 minutos y se determinó ALA según se describe en Métodos.

proveniente de ruptura sónica de una suspensión bacteriana. El conocimiento de este valor es además fundamental, no sólo por el efecto en sí del pH sobre la enzima, sino porque el ALA a pH altos es inestable (588).

Para ello se incubaron alícuotas de dichos extractos en presencia de buffer Tris-ClH 25mM a diferentes pH, manteniendo constante la composición del resto de los componentes del sistema standard de incubación.

En la Figura 31 se muestran los resultados obtenidos. Examinando el gráfico queda demostrado que el pH óptimo para la actividad de ALA-S en esta bacteria resultó ser 7,5 cuando las incubaciones se realizan en presencia de buffer Tris-ClH.

Con buffer fosfato la actividad enzimática se inhibe parcialmente, tal como se demostró en la Tabla III. Realizando incubaciones en presencia de este buffer a diferentes pH se comprobó la existencia de un plateau entre pH 7,1 y 7,5 pero las actividades eran siempre menores que en Tris-ClH.

En base a estos resultados se decidió emplear siempre buffer Tris-ClH en las incubaciones para la determinación de niveles de ALA-S. La adición de hasta 5nm/µl de buffer fosfato se consideró como parte del sistema standard de incubación. Si la adición al mismo fuera mayor que dicha cantidad, se efectuaron las correspondientes correcciones por la menor actividad que experimenta la enzima.

En la Tabla IV se comparan las actividades de ALA-S en presencia de cantidades crecientes de buffer fosfato de sodio y potasio pH 7,5, respecto de la actividad en presencia de este buffer 5mM.

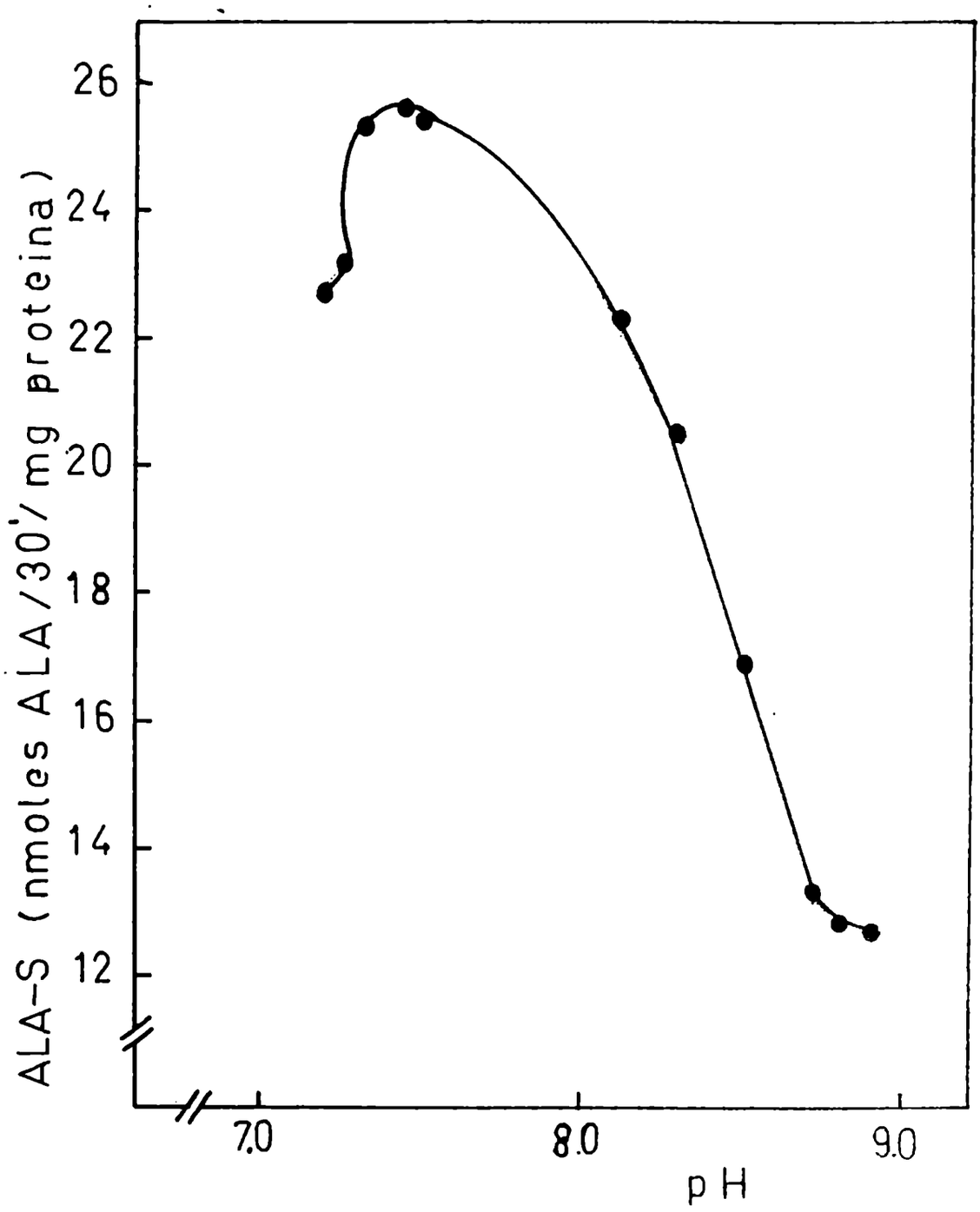


Figura 31: Síntesis de ALA a diferentes pH en el sistema standard de incubación, por extractos de Rps. palustris. Se incubaron 0,79 mg de proteína de extracto sobrenadante de 15.000xg, proveniente de ruptura sónica de una suspensión bacteriana, en el sistema standard en presencia de buffer Tris-ClH 25 mM a diferentes pH. La incubación se realizó durante 30 minutos, luego de lo cual se determinó ALA tal como se describe en Métodos.

TABLA IV

Buffer fosfato de sodio y potasio pH 7,5(mM)	% de actividad
5	100
10	89
15	80
20	72

Actividad de ALA-S en presencia de cantidades crecientes de buffer fosfato de sodio y potasio pH 7,5. Los extractos bacterianos se incubaron con el sistema standard, incluído el correspondiente buffer Tris-ClH 25 mM pH 7,5, adicionados de las cantidades mencionadas de buffer fosfato. Los resultados aquí mostrados son promedios de dos experiencias diferentes.

III.3 Temperatura de incubación

Se determinó también el efecto de la variación de la temperatura de incubación sobre la actividad de ALA-S en extractos de Rps.palustris. En la Figura 32 pueden verse los resultados obtenidos. La temperatura óptima para la reacción resultó ser de 37°C.

En base a la ecuación de Arrhenius

$$v = K.\ e^{-(E/RT)}$$

con E energía de activación de la reacción, R la constante de los gases (1,98647 ± 0,00021 cal $°K^{-1}$ mol^{-1}),puede deducirse en base a los datos mostrados en la Figura 32 el valor de la energía de activación para la reacción de ALA-S cuando la reacción transcurre desde succinato y glicina como sustratos, es decir, involucrando también la reacción de la Succinil-CoA-S de Rps. palustris.

En la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos en base a los datos presentados en la Figura 32. De la pendiente de la recta se estableció que el valor de E para el conjunto de ambas reacciones es 5621,9 cal mol^{-1}.

III.4 Cantidad de proteína agregada al sistema de incubación

Se procedió a determinar la actividad de ALA-S en presencia de cantidades variables de proteína agregada al sistema de incubación standard, con el objeto de establecer el máximo de cantidad de proteína que asegura una reacción lineal. Para ello se preparó un extracto sobrenadante de 15.000xg de Rps. palustris de la forma habitual, y cantidades variables del mismo se incubaron en presencia del sistema standard de incubación . Cuando se agregaron volúmenes de extracto que lleven la concentración de buffer fosfato a una concentración mayor de 5mM se procedió a efectuar la correción de actividad correspondiente por la inhibición ocasionada por el mismo, en base a los datos presentados en la Tabla IV.

Los resultados pueden verse en la Figura 34 .

Observando la figura se comprueba que la actividad enzimática resultó lineal con la cantidad de proteína hasta 2 mg de proteína de extracto sobrenadante de 15.000xg. Mayor cantidad de proteína resultó ser inhibitoria de la actividad del ALA-S,

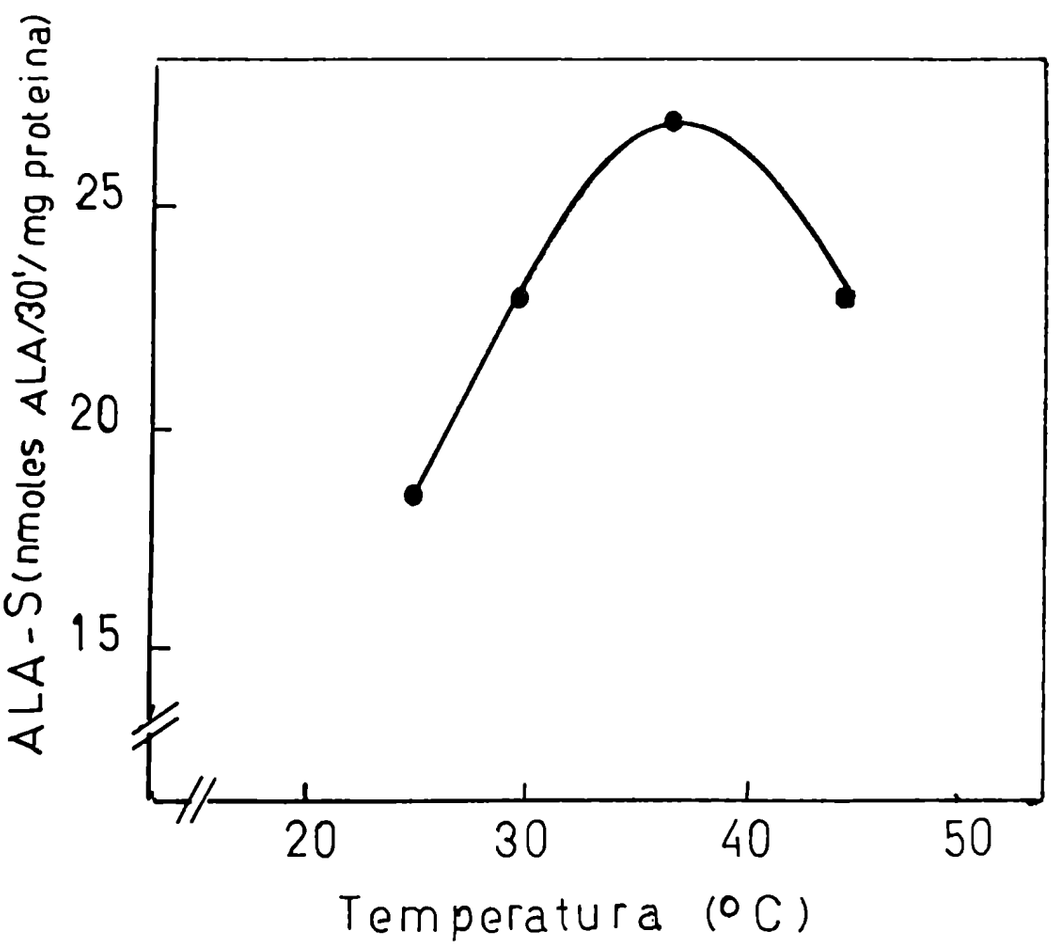


Figura 32: Síntesis de ALA a diferentes temperaturas por extractos sobrenadantes de 15.000xg de Rps.palustris. Se incubaron 0,73 mg de proteína en presencia del sistema standard a las temperaturas indicadas por 30 minutos. ALA y proteínas se determinaron como se indica en Métodos.

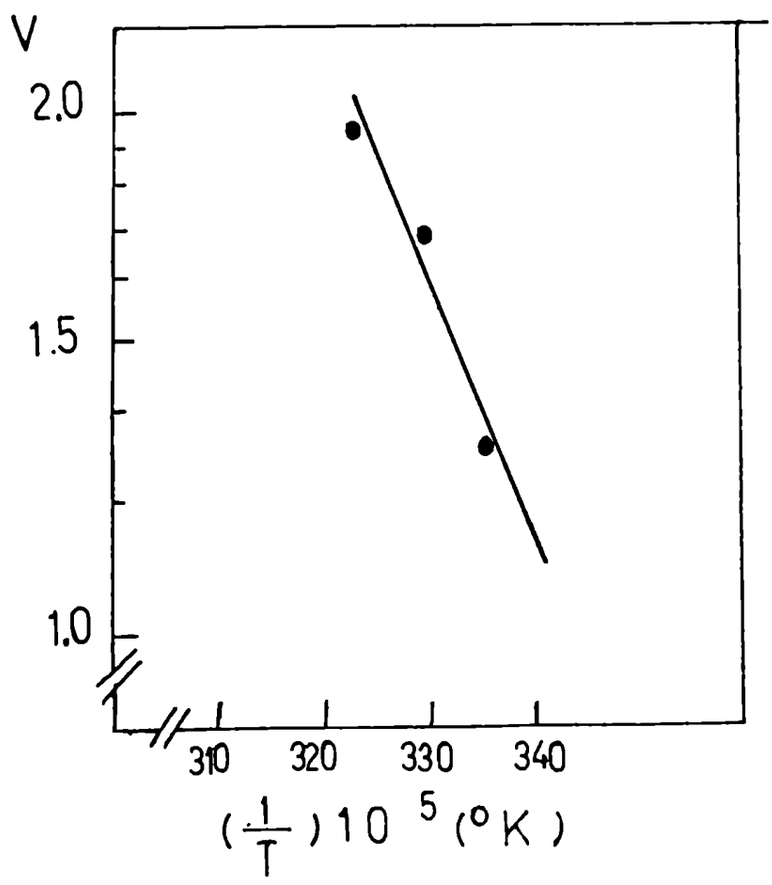


Figura 33: Gráfico de Arrhenius para el cálculo de la energía de activación del sistema de reacciones Succinil-CoA-S y ALA-S. Los datos se obtuvieron recalculando los valores de la Figura 32.

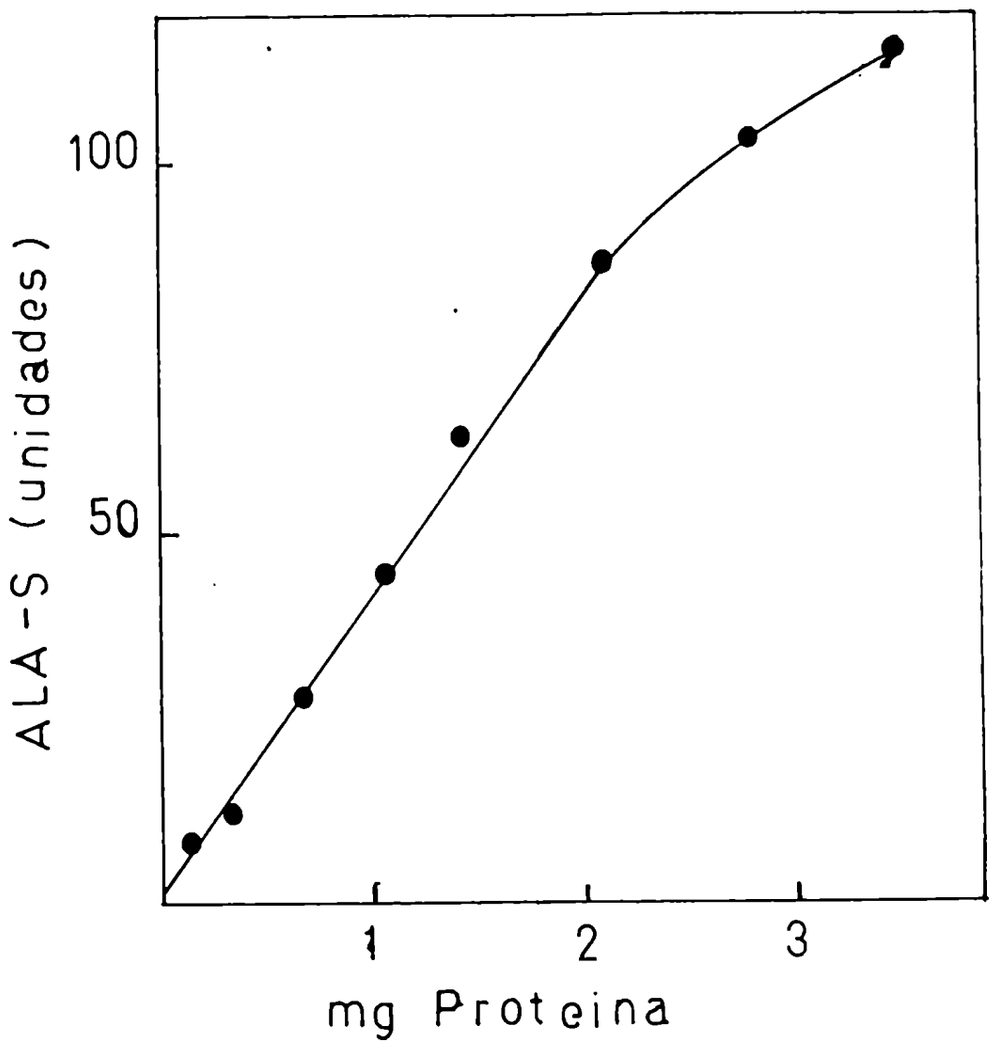


Figura 34: Dependencia de la velocidad de reacción del ALA-S de la cantidad de proteína agregada al sistema standard de incubación. Se incubaron cantidades variables de extracto sobrenadante de 15.000xg en presencia del sistema standardm por una hora a 37°C. Se determinaron ALA y proteínas tal como se indica en Métodos. En los casos que fué necesario se calculó la actividad en base a los porcentajes de inhibición producidos por el agregado de fosfato mostrados en la Tabla IV.

quizá debido a una inhibición por producto (ver III.6).

III.5 Tiempo de incubación

Para determinar la influencia del tiempo de incubación sobre la formación de ALA por extractos de R. s. palustris, se procedió a incubar distintas cantidades de extracto sobrenadante de 15.000xg, obtenido de la manera usual en presencia del sistema standard, durante diferentes períodos de tiempo. En la Figura 35 pueden verse los resultados obtenidos en una experiencia típica.

Queda demostrado que el curso no resultó lineal en función del tiempo.

En base a estos resultados ha sido posible calcular la velocidad inicial de la reacción enzimática mediante un método de interpolación que utiliza la fórmula de Gregory- Newton (602). Los valores así calculados se han representado en la Figura 36, en la cual puede constatarse también que hasta la cantidad máxima de proteína agregada, la velocidad inicial resultó ser una función lineal de cantidad de proteína incubada.

El curso de la reacción demostró ser también no lineal aún para tiempos más cortos de incubación, tal como puede verse en la Figura 37.

Promediando los valores de velocidad inicial obtenidos en varias experiencias en las que se incubaron extractos provenientes de distintas partidas de bacterias, se obtuvo como valor de la velocidad inicial :1,29 nmoles ALA min^{-1}.(mg proteína)$^{-1}$.

Sin embargo, por razones de practicidad se estableció como tiempo normal para realizar las incubaciones el de una hora. En algunos casos las incubaciones se realizaron por 30 minutos. En estos casos se tomaron los valores a título comparativo dentro de la misma experiencia.

III.6. Inhibición de la reacción por producto

Con el objeto de establecer la causa de la no linealidad del curso de la reacción del ALA-S de Rps. palustris crecida fotoheterotróficamente, se investigó la posibilidad de que el producto inhibiera el sistema enzimático, o bien que este fuera transformado a PBG o bien que él fuera inestable.

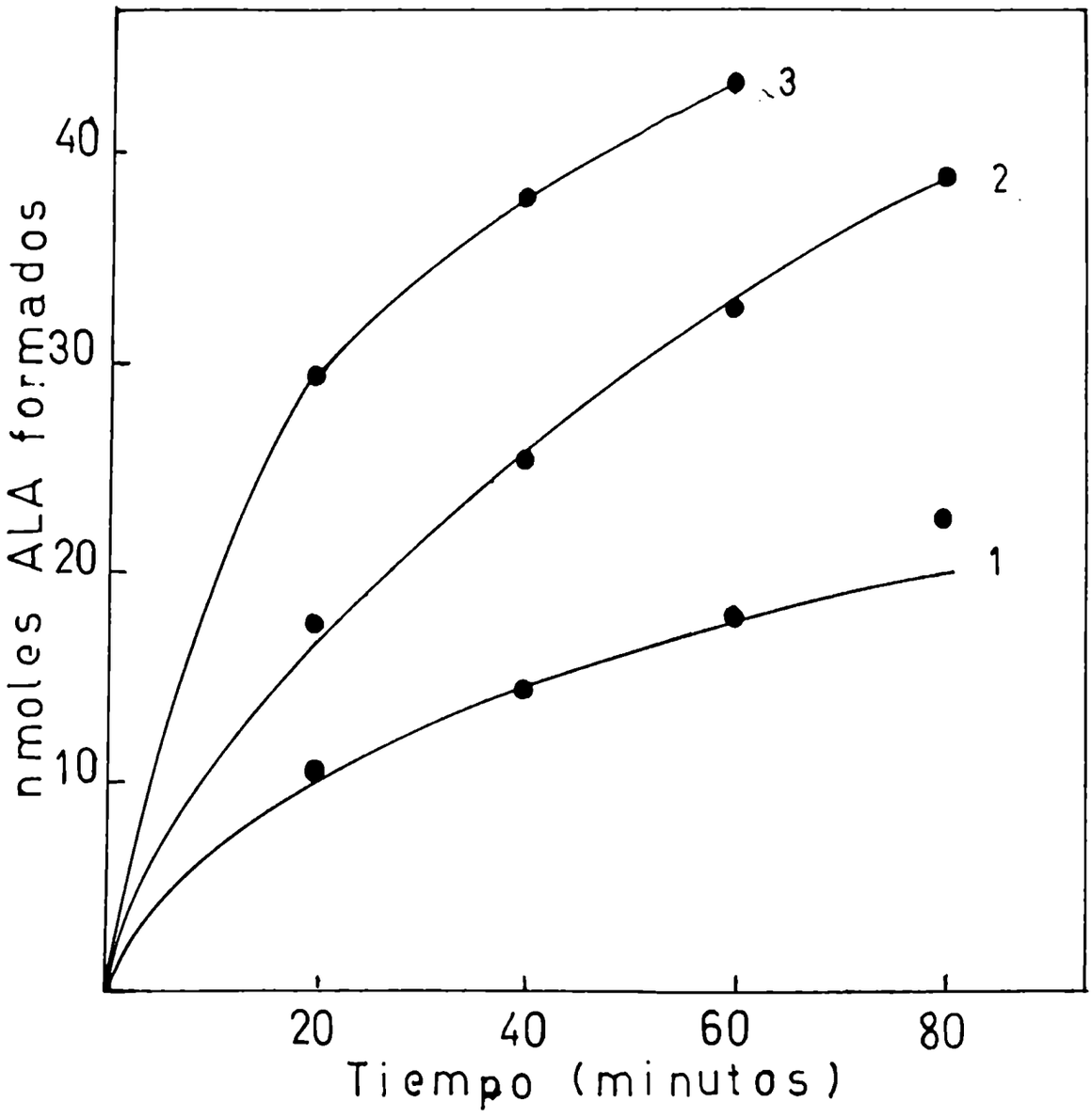


Figura 35: Síntesis de ALA por diferentes cantidades de extracto sobrenadante de 15.000xg. Se incubaron distintas cantidades de extracto enzimático en 1: 0,42 mg; en 2: 0,84 mg y en 3: 1,26 mg de proteínas), a los tiempos indicados en presencia del sistema standard de incubación. Se determinó ALA y proteínas tal como se describe en Métodos.

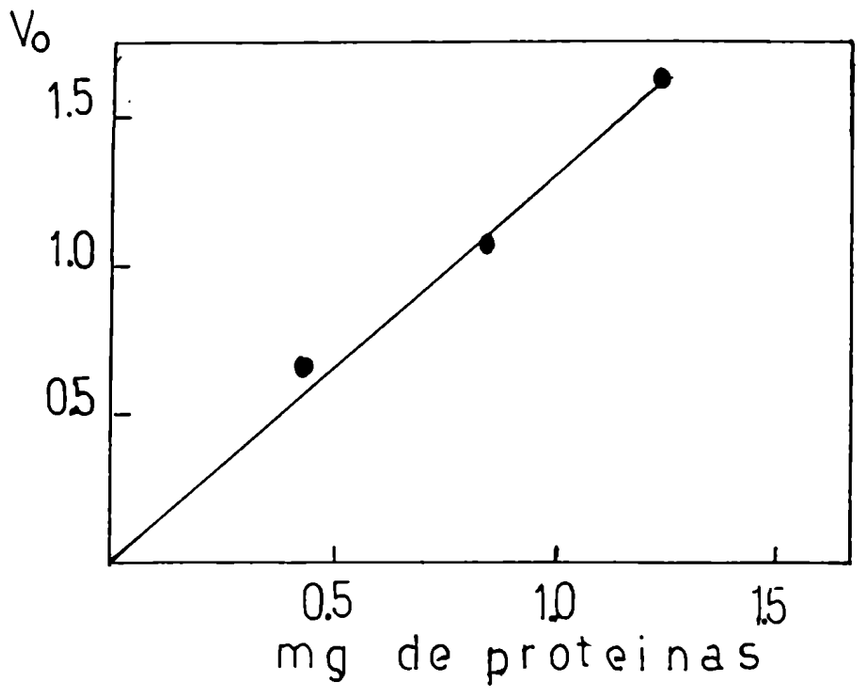


Figura 36: Dependencia de la velocidad inicial de la reacción del ALA-S de la cantidad de proteína incubada. Los valores se han determinado a partir de los datos presentados en la Figura 35 por el método de Algranati (602).

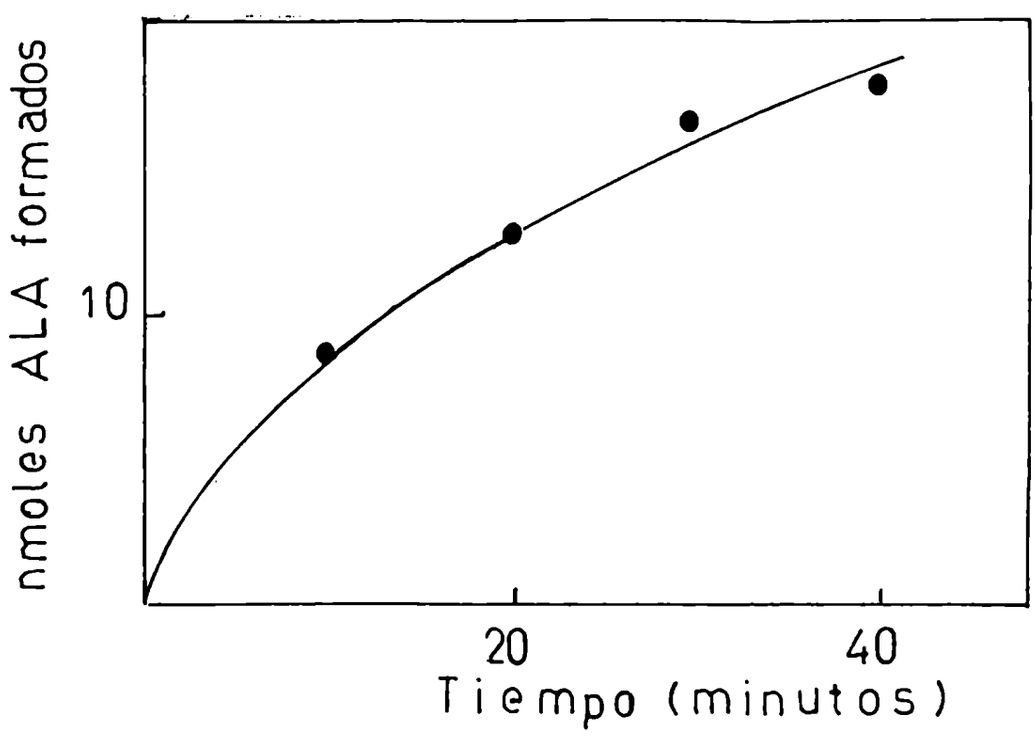


Figura 37: Síntesis de ALA en función del tiempo de incubación. Se incubaron 0,99 mg de proteína de sobrenadante de 15.000xg durante los períodos indicados, en el sistema de incubación standard, luego de lo cual se determinó ALA según se describe en Métodos.

Para ello se incubó extracto sobrenadante de 15.000xg en el sistema standard, adicionado de cantidades crecientes de ALA, por una hora a 37°C. Se determinó ALA como siempre y se restó al valor hallado la cantidad de ALA añadida. En la Tabla V se muestran los resultados obtenidos. En ella se demuestra que existía una inhibición de la reacción enzimática por el producto formado.

Paralelamente se incubó extracto enzimático en presencia de ALA y buffer Tris-ClH en la concentración usada en el sistema standard de incubación, sin la adición del resto de los sustratos y cofactores, a fin de detectar la posible formación de PBG en estas condiciones. Esta sustancia no se formó en absoluto, con lo que se descartó la posibilidad de que el producto del ALA-S sea transformado en PBG en las condiciones en que se determinaba ALA-S.

Como toda aminocetona, el ALA puede condensarse rápidamente dando cetoiminas y dihidropirazin[illegible] que puede autooxidarse al aire a una pirazina aromática estable (588). La velocidad de la condensación aumenta en medios alcalinos, siendo notable a pH 8, apareciendo una coloración naranja característica. A pH 6.8 y 40°C durante 2 horas solo un 10% del ALA se transforma en dihidropirazina (225).

Dado que se trabajó a pH 7.4 se investigó el ALA remanente luego de incubar distintas cantidades de dicha sustancia en buffer Tris ClH pH 7.4 por una hora a 37°C. Hubo un decaimiento del contenido de ALA de alrededor del [illegible]%.

En vista de que el producto de la reacción es de por sí inhibitorio de la reacción se decidió trabajar en condiciones de concentración proteica que aseguren una formación ede ALA de alrededor de 40 a 60 nmoles. Esta estandardización de condiciones nos permite hacer comparativos los resultados.

Logrando formar mayores cantidades de ALA tendríamos no sólo la inhibición sino la pérdida del producto por su inestabilidad, que lógicamente se acentuaría al aumentar la cantidad.

TABLA V

Contenido inicial de ALA (μM)	% actividad remanente
0	100
9	93
22	83
45	66
90	27

Efecto de la adición de ALA a las incubaciones de extractos de Rps.palustris crecida fotoheterotróficamente sobrenadantes de 15.000xg. Las incubaciones se realizaron en presencia de 0,82 mg de proteínas en el sistema standard, a 37°C y por una hora. Se determinó ALA y proteínas tal como se describe en Métodos.

IV. Identifación del producto formado en las incubaciones

La condensación de Succinil-CoA con glicina a través de la reacción de ALA-S produce el ALA, intermediario de la síntesis de tetrapirroles, mientras que la condensación de acetil-CoA con la glicina origina aminoacetona. Ambos productos pueden condensarse con la acetilacetona en las condiciones en que se efectúa la condensación de Knorr descripta en Métodos. Además, los dos productos, ALA-pirrol y aminoacetona-pirrol, reaccionan con el reactivo de Ehrlich dando compuestos de condensación que tienen similar color.

Se hizo pues, imprescindible, caracterizar el producto formado en la reacción con el sistema standard de incubación en presencia de extractos de Rps. palustris,. Para ello se procedió por un lado, a determinar el espectro de absorción del producto de reacción del reactivo de Ehrlich con el compuesto formado en la condensación de Knorr, y por otra parte, se procedió a aislar el producto de la reacción enzimática y a caracterizarlo por cromatografía del mismo y su derivado pirrólico.

IV.1. Espectro de absorción de la reacción de Ehrlich

A lo largo de varias experiencias, enn las que se incubaron extractos sobrenadantes de 15.000xg, obtenidos de diversos barches de células de Rps. palustris , se procedió a determinar el espectro de absorción del producto de la reacción del reactivo de Ehrlich con el supuesto ALA-pirrol formado en la condensación de Knorr con la acetilacetona. En la Figura 38 se muestra el espectro típico obtenido.

La reacción entre las absorbancias a 525 y 553 nm resultó ser siempre de 0,69, valor idéntico al que se obtiene cuando la reacción de Ehrlich se realiza con ALA-pirrol sintético (585).

IV.2. Aislamiento del ALA formado en las incubaciones

Para lograr la separación del ALA formado en las

incubaciones de extractos de Rps. palustris con el sistema standard, se aplicó un método que utiliza resinas intercambiadoras (586)

Se empleó resina Dowex 50 W x 8 en la forma sódica, la que se preparó a partir del producto comercial que se obtuvo en forma ácida, calentándola 3 veces con NaOH 2 M a 50°C por espacio de aproximadamente 1,5- 2 horas. La resina en forma sódica así preparada se lavó profusamente con agua destilada y se la equilibró con buffer acetato 0,1 M pH 4,0 . Posteriormente se armaron columnas de 2-3 cm de altura por 1 cm de diámetro con la resina así tratada. A la columna se le agregó una porción de desproteinizado proveniente de incubaciones de extractos de Rps. palustris llevada a pH 4,0 y luego se la lavó con 20 ml de buffer acetato 0,1 M pH 4,0, luego con 20 ml de la mezcla metanol-buffer acetato 0,1M pH 4,0 (2:1, v/v), luego con 10 ml de ClH 0,01 M y finalmente con 3ml de NH_4OH 1 M. En esta última fracción se eluyó el ALA, y si hubiera habido, la aminoacetona. La columna se lavó, por último, con agua y se reequilibró con buffer acetato 0,1 M pH 4,0. La fracción amoniacal se neutralizó inmediatamente con ClH y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio a presión reducida. El residuo se tomó con etanol absoluto para evitar disolver parte del copioso residuo de cloruro de amonio que se obtuvo, y una alícuota se aplicó sobre papel Whatman N°1 y se corrió en forma ascendente con etanol-ácido acético 1 M-piridina-agua (95:10:3:3, v/v) paralelamente a un testigo de ALA comercial, obtenido de Sigma Chemical Co. En el mencionado sistema cromatográfico el ALA tiene un R_f de 0,15 y la aminoacetona uno de 0,30 (587). El producto aislado de las incubaciones por el método de Ebert et al. corrió como el ALA comercial, con un R_f de 0.15. El producto comercial demostró tener una impureza revelable por ninhidrina que en este sistema corre con un R_f de 0,30 similar al de la aminoacetona, aunque esto no se estudió con más detalle. En la Figura 10 a puede verse un esquema de los resultados obtenidos con este sistema cromatográfico.

El producto aislado tiene en butanol-ácido acético- agua (4:1:5 v/v fase superior) un R_f 0,32 similar al del ALA comercial (588).

Otra alícuota etanólica se llevó a sequedad en evaporador rotatorio bajo presión reducida y el residuo se tomó con buffer

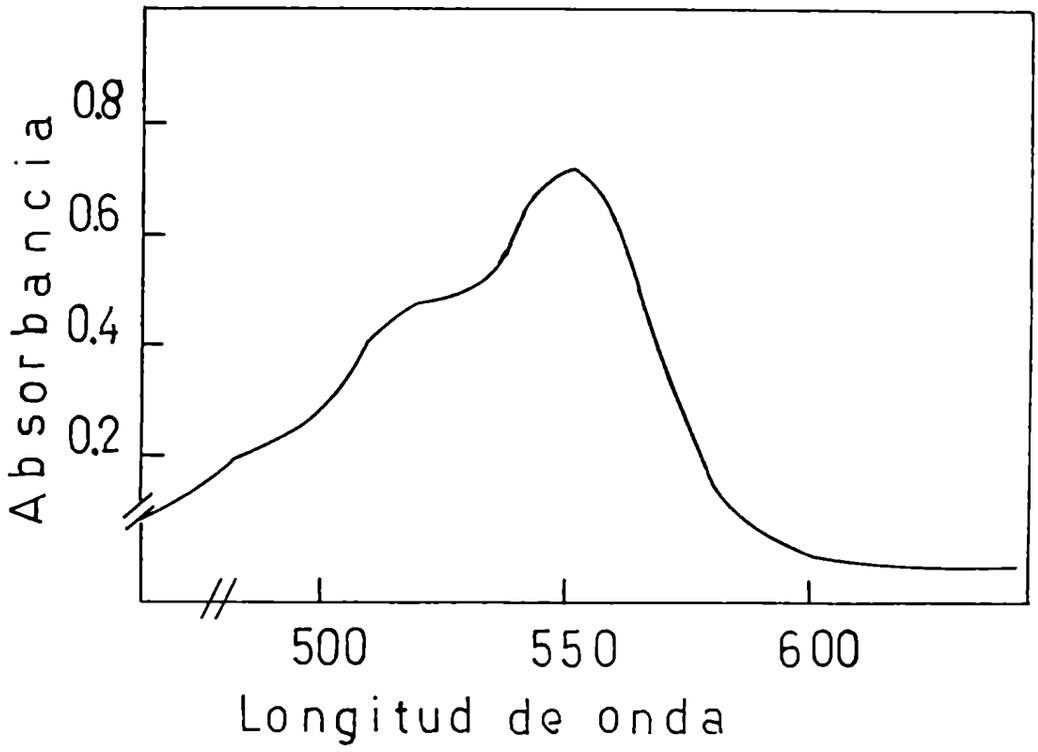


Figura 38: Espectro de absorción del producto de la reacción del reactivo de Ehrlich (p-dimetilamino-benzaldehido en ClO_4H 2 N) y el pirrol obtenido por condensación de Knorr entre acetil-acetona y el producto formado enzimáticamente por extractos de Rps. palustris.

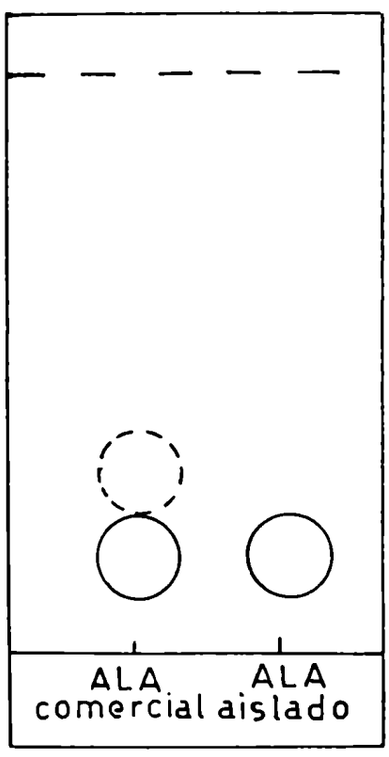


Figura 39.a): Cromatografía por método de Elliot (587) de ALA comercial y del producto aislado de las incubaciones de extractos de Rps. palustris con el sistema standard, mediante el método de Ebert et al.(586).Revelado con ninhidrina.

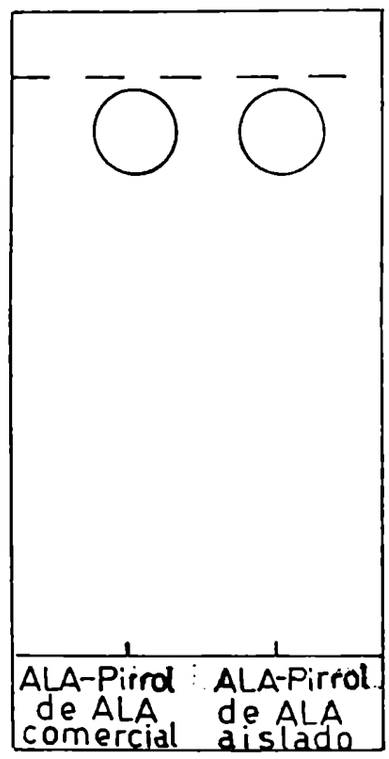


Figura 39.b): Cromatografía de ALA-pirrol obtenido del producto de las incubaciones de extractos de Rps. palustris, aislado por el método de Ebert et al. (586). La corrida se efectuó en butanol-ácido,acético-agua (4:1:5, v/v fase superior).Revelado con reactivo de Ehrlich.

acetato 0,5 M y se efectuó una condensación de Knorr con acetilacetona en las condiciones que se han descripto en Métodos. Se preparó además ALA-pirrol a partir de ALA comercial de idéntica manera. Se sembraron alícuotas sobre papel Whatman n°1 y se corrieron en butanol- ácido acético-agua (4:1:5, v/v fase superior) (588). El cromatograma se reveló con reactivo de Ehrilich. El standard de ALA-pirrol y el pirrol del compuesto aislado corrieron igual con un R_f de 0,90, lo que indica que se trataba de compuestos similares. En la Figura 10 b puede verse lo obtenido en este sistema cromatográfico. El espectro de absorción de la reacción de Ehrlich del ALA-pirrol obtenido con ALA aislado es similar al mostrado en la Figura 9 la relación de absorbancias a 525 y 553 nm resultó igual a 0,69.

De todos estos resultados puede inferirse que los extractos de *Rps. palustris*, incubados con el sistema standard de incubación, producen ALA, intermediario de la síntesis de tetrapirroles, y que no se forma aminoacetona.

V. Estabilidad de la actividad enzimática

Se estableció la estabilidad del ALA-S en extractos de *Rps. palustris* almacenados a baja temperatura (-15°C), a 0- 4°C y a 37°C por diversos períodos de tiempo.

V.1. Estabilidad a -15°C de extractos sobrenadantes de 15.000 xg

Diversos extractos sobrenadantes de 15.000 xg, obtenidos de diferentes batches de células de *Rps.palustris* crecida fotoheterotróficamente se almacenaron a -15°C por períodos de tiempo variables, y se determinó en ellos actividad de ALA-S. En la Figura 40, se muestra el comportamiento de varias de las muestras de extactos ensayadas.

En la mayoría de los extractos almacenados a baja temperatura la actividad enzimática decayó entre 40-50% entre 10 y 15 días de almacenamiento, permaneciendo posteriormente casi constante.

Es de destacar que en algunas muestras la actividad decayó muy poco o casi nada, aún con 20 ó 40 días de almacenamiento a -15°C. Este comportamiento es, sin embargo anormal . No puede ofrecerse por el momento ninguna explicación a este comportamiento diferente , ya que aparentemente ello no dependería de la concentración proteica del extracto.

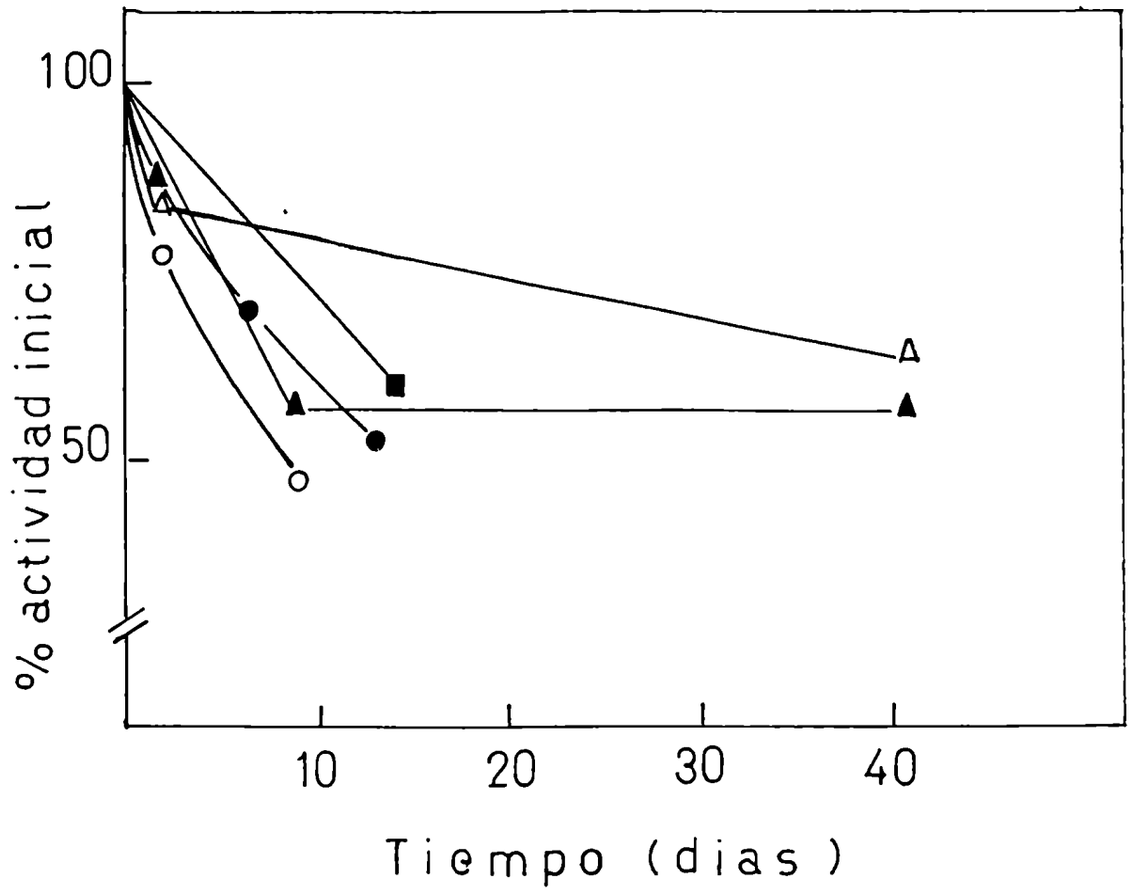


Figura 40: Estabilidad del ALA-S en extractos sobrenadantes de 15.000xg de Rps. palustris. Diferentes extractos provenientes de varios batches de células se almacenaron a -15°C por deversos períodos de tiempo, luego de los cuales se ensayó actividad de ALA-S de la forma habitual, según se describe en Métodos.

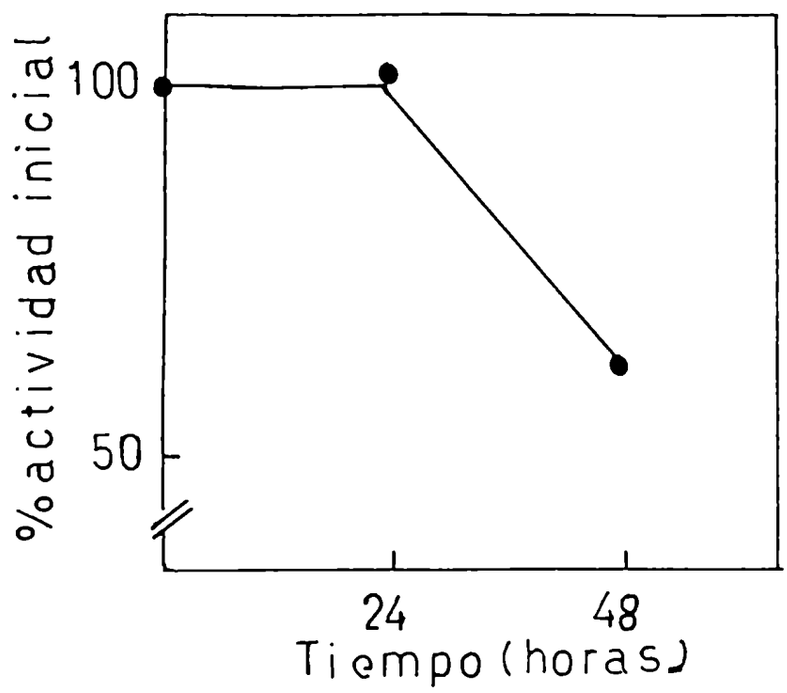


Figura 41: Efecto de almacenar un extracto sobrenadante de 140.000xg de Rps.palustris sobre la actividad de ALA-S. A los tiempos indicados alícuotas de 0,47 mg de proteína se incubaron en el sistema standard. ALA y proteínas se determinaron como se indica en Métodos.

V.2. Estabilidad a-15°C de extractos sobrenadantes de 140.000 xg

Se almacenó un extracto de Rps. palustris obtenido por centrifugación del extracto crudo a 140.000 xg. El sobrenadante de 140.000 xg se almacenó a esa temperatura y a diversos tiempos se determinó su actividad .

En la Figura 41 pueden verse los resultados obtenidos.

Se compnueba que la actividad decayó un 38% en 48 horas de almacenamiento a dicha temperatura.

V.3. Estabilidad a 0-4°C

Está demostrado que en extractos crudos de Rps. sphaeroides (565) y extractos de callos de semilla de soya (350) se incrementa espontáneamente la actividad del ALA-S por almacenamiento de los mismos a 0-4°C.

Para saber si este fenómeno ocurría también con el ALA-S presenta en los extractos crudos de Rps. palustris se procedió a sonicar una suspensión bacteriana de la forma habitual. Una alícuota de la suspensión sonicada se almacenó a 0-4°C a la luz, y otra se centrifugó a 15.000 xg y posteriormente el sobrenadante de esta centrifugación se almacenó a 0-4°C a luz. De ambas fracciones se tomaron muestras a diferentes tiempos y se determinó la actividad del ALA-S incubándolas con el sistema standard.

En la Figura 42 pueden verse los resultados obtenidos cuando se almacenaron los extractos sonicados no centrifugados a 0-4°C y en la Figura 48 se pueden ver los obtenidos cuando a dicha temperatura se almacenó un extracto sobrenadante de 15.000xg.

Resulta evidente del análisis de ambas figuras que, para las condiciones en que Rps. palustris fué crecida y para las condiciones en que las células son sonicadas y los extractos posteriormente almacenados, condiciones que se han usado a lo largo de todo el trabajo, la actividad del ALA-S no varía por estacionamiento a 0-4°C. En una experiencia que se mostrará posteriormente se demostró que la actividad no variaba aunque el extracto permaneciera almacenado a esa temperatura por espacio de 18 horas. Este hecho establece una diferencia en las propiedades de la enzima de Rps. palustris y a las de Rps. sphaeroides y callos e semilla de soya, por lo menos en extractos crudos.

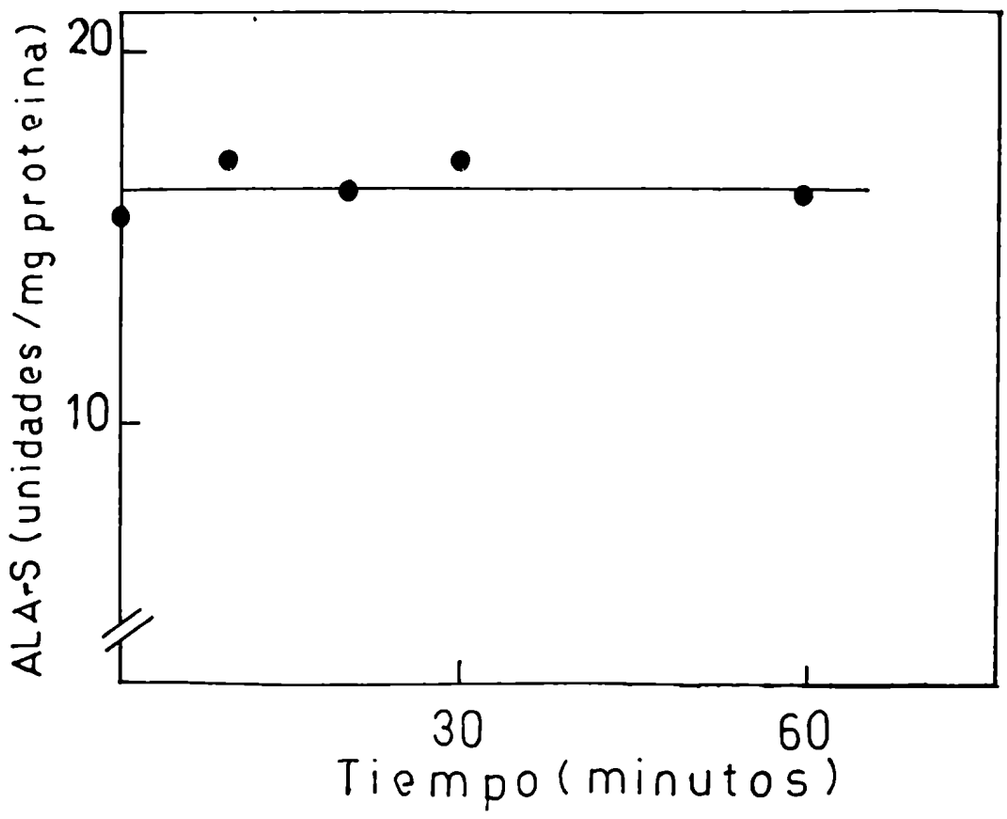


Figura 42: Efecto de almacenar un extracto sonicado no centrifugado de Rps. palustris a 0-4°C y a la luz sobre la actividad de ALA-S. Una suspensión de bacterias (31 mg de peso seco/ml) se sonicó 1 minuto y se almacenó a 0-4°C. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas (correspondientes a 1,1 mg de proteína) las que se incubaron en el sistema standard por una hora a 37°C . Se determinó ALA y proteínas tal como se describe en Métodos.

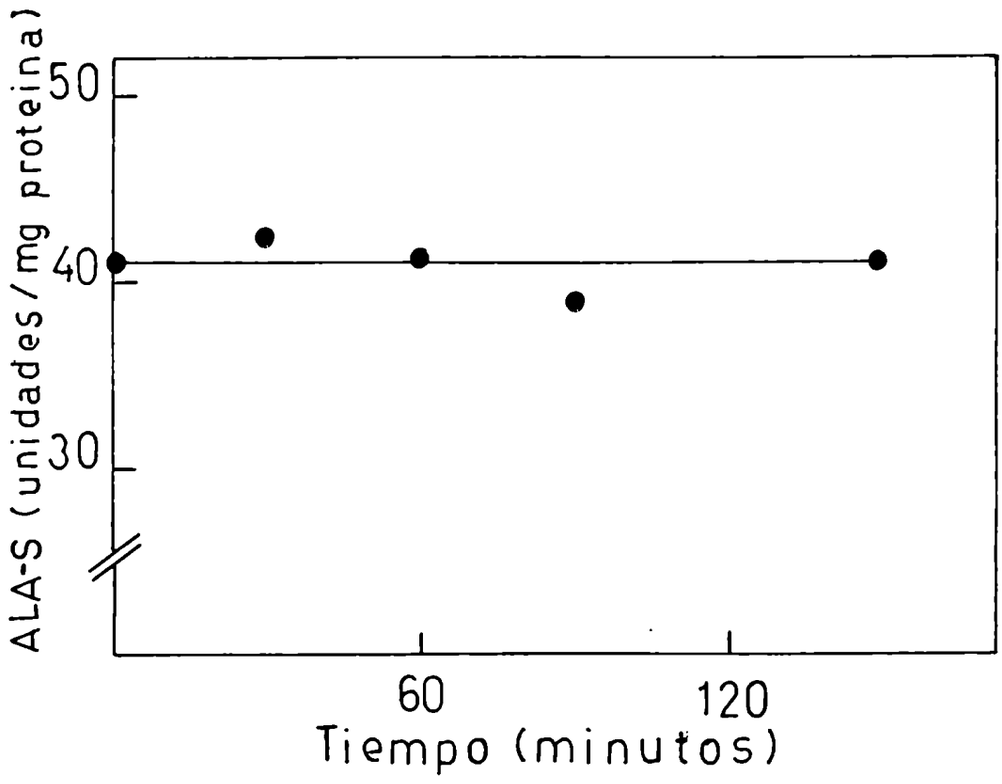


Figura 43: Efecto de almacenar un extracto de Rps. palustris, sobrenadante de 15.000xg, a 0-4°C a la luz, sobre la actividad de ALA-S. Se sonicó una suspensión de células y se centrifugó a 15.000 xg. El sobrenadante resultante se almacenó a 0-4°C y a los tiempos indicados se tomaron alícuotas (correspondientes a 0,42 mg de proteína) las que se incubaron con el sistema standard por una hora. El valor de actividad específica a t=0 se estableció midiendo la actividad en el extracto recién sonicado, sin centrifugar, pero considerando sólo las proteínas presentes en el sobrenadante de 15.000xg. Se determinó ALA y proteínas tal como se describe en Métodos.

Si el extracto enzimático, sobrenadante de 15.000xg se lo almacenaba a 0-4°C pero con una ligera agitación(suministrada a través de un agitador magnético), la actividad del ALA-S decaía un 35 % en 2 horas, tal como puede verse en la Figura 44.

Estos últimos resultados sugieren que la actividad enzimática era afectada por el oxígeno que se disolvía al agitarse el extracto. En condiciones en que esto no ocurría, la actividad permanecía constante. Por esto se consideró necesario extremar el cuidado en el manipuleo de los extractos para evitar toda posible forma de aereación de los mismos, ya que ello traería aparejado alteraciones de los valores de ALA-S.

V.3.1. Estabilidad a 0-4°C de extractos sobrenadantes de 140.000 xg

Se almacenó un extracto sobrenadante de 140.000 xg de Rps.palustris en baño de hielo por espacio de 2 horas, comprobándose que la actividad había decaído un 20%. Para ello se incubó una alícuota de extracto inmediatamente de retirada de la ultracentrífuga y otra luego de 2 hs. de almacenamiento en baño de hielo.

En algunas experiencias pudo comprobarse que durante las 2 horas que transcurre la ultracentrifugación se perdía alrededor de 20% de actividad.

Todo este demuestra que el ALA-S en extractos sobrenadantes de 140.000 xg resultó ser más sensible que en los extractos sobrenadantes de 15.000 xg.

V.4. Estabilidad a 37°C

Se procedió a estudiar el efecto del almacenamiento de los extractos enzimáticos sobrenadantes de 15.000xg a 37°C sobre la actividad del ALA-S a fin de vincular estos resultados con los obtenidos al estudiar el curso de la reacción.

Para ello se preparó un extracto sobrenadante de 15.000xg y se almacenó a 37°C a la luz y sin agitación y a diversos tiempos se retiraron alícuotas las que fueron incubadas en el sistema standard. En la Figura 45 se muestran los resultados obtenidos.

Se ve que hubo un decaimiento de la actividad enzimática almacenando el extracto a este temperatura, lo que permitiría suponer que la no linealidad del curso de la reacción podría deberse

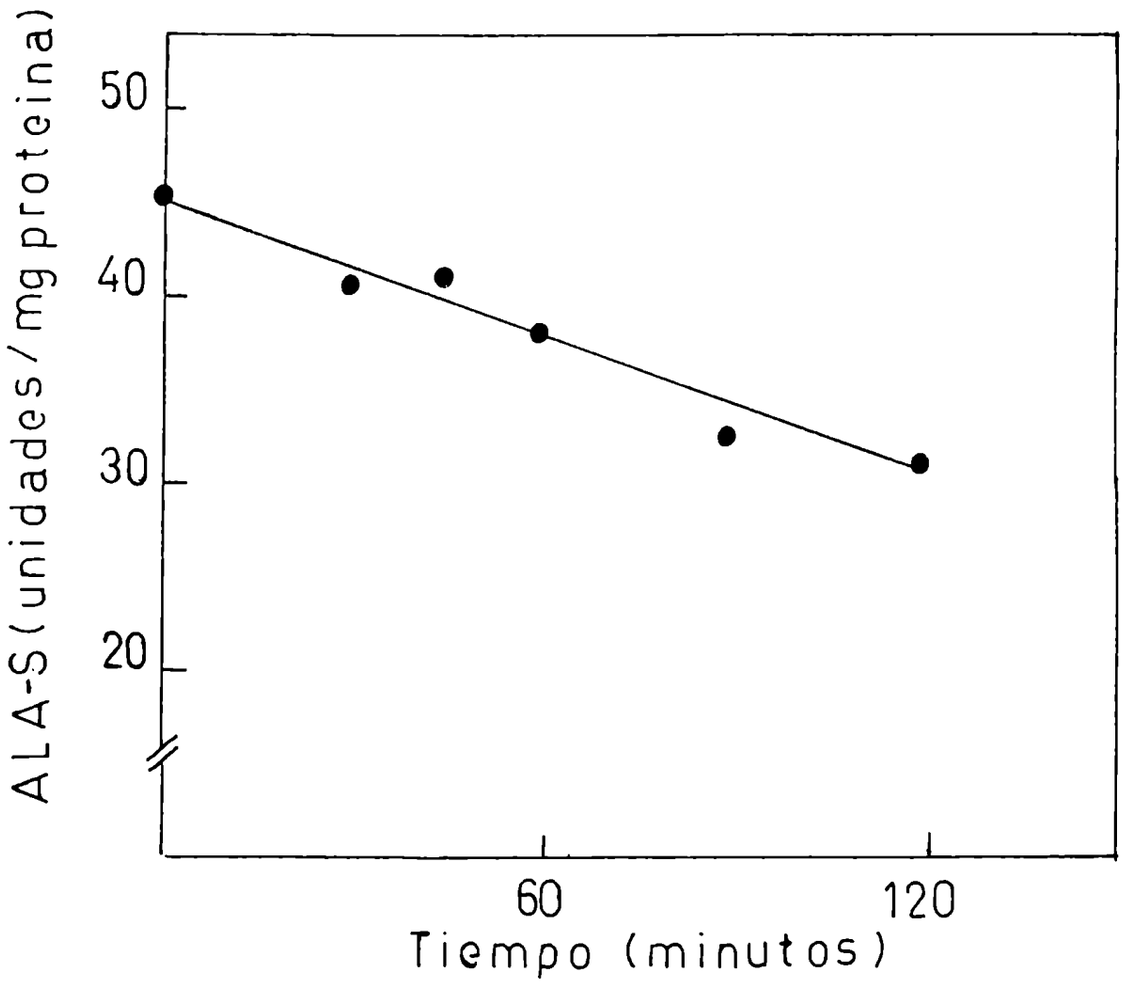


Figura 44: Efecto de almacenar un extracto sobrenadante de 15.000xg de Rps. palustris a 0-4°C y a la luz, con una ligera agitación mecánica. Las indicaciones de la experiencia son similares a las de la Figura 43. Se incubaron 0,43 mg de proteínas con el sistema standard por una hora. ALA y proteínas se determinaron tal como se describe en Métodos.

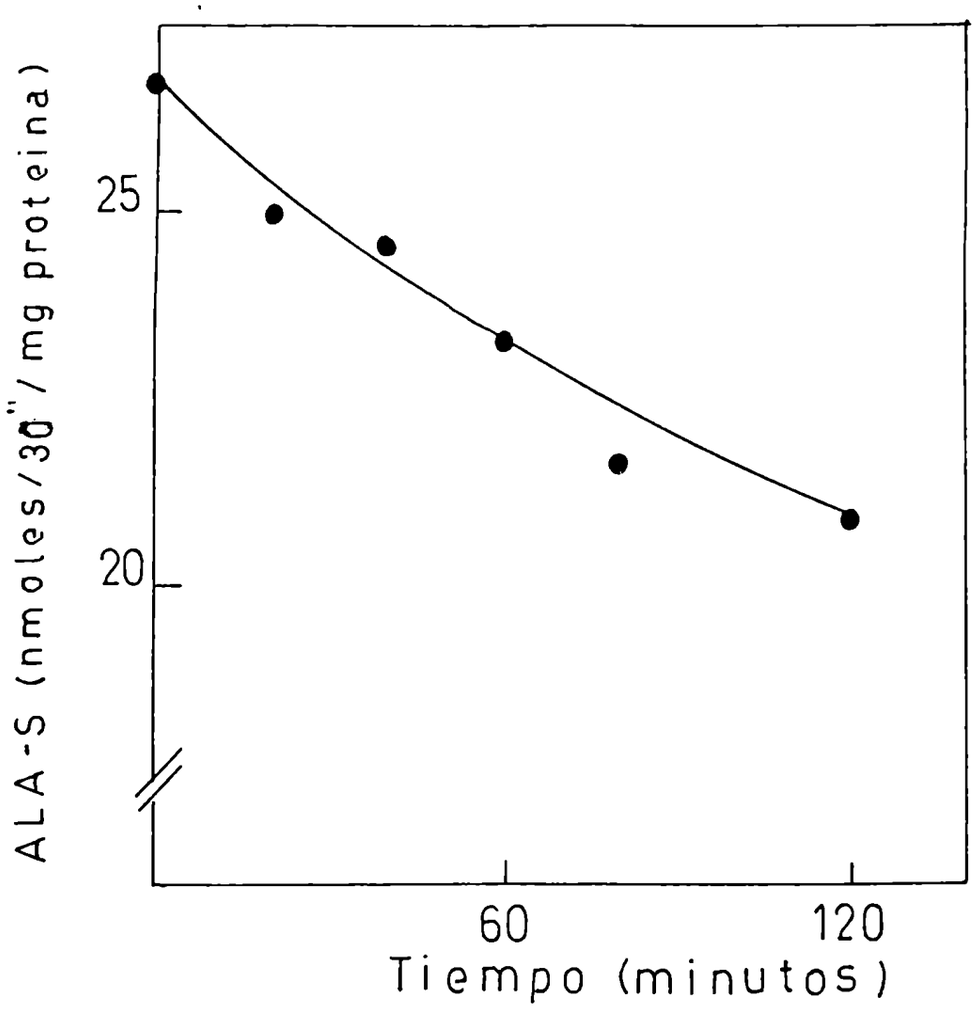


Figura 45: Efecto del almacenamiento de extractos a 37°C sobre la actividad del ALA-S. Se preparó extracto de Rps. palustris centrifugado a 15.000 x g y se almacenó a 37°C por los períodos indicados, luego de lo cual se retiraron alícuotas (equivalentes a 0,73 mg de proteina) que se incubaron en el sistema standard por 30 minutos a 37°C. Se determinó ALA y proteínas tal como se indica en Métodos.

también a inestabilidad de la enzima a la temperatura de incubación además de una inhibición por producto.

VI. Efecto de compuestos sulfhidrílicos y de disulfuros sobre la actividad del ALA-S.

Dado que algunos autores han ensayado la actividad del ALA-S en presencia de compuestos sulfhidrílicos, tales como glutation (603) 2-mercaptoetanol (214), y que existen reportes de activaciones de formas de ALA-S de Rps. sphaeroides producidas por L-cistina (570) se consideró necesario investigar el efecto de sustancias tales como L-cisteina, glutation, y 2-mercaptaetanol y L-cistina sobre la actividad del ALA-S de Rps.palustris .

En una experiencia previa se investigó el efecto de estos.compuestos sobre la determinación colorimétrica del ALA mediante la reacción de Ehrlich. Pudo comprobarse que la reacción fue afectada tanto por la L-cisteína como la L-cistina, mientras que el glutation y el 2-mercaptoetanol no tuvieron efecto sobre la misma, por lo que se fué necesario hacer los controles correspondientes.

VI.1. Efecto de compuestos sulfhidrílicos

Se hicieron una serie de experiencias en las cuales se incubaron extractos, de Rps. palustris sobrenadantes de 15.000xg en presencia de diversas concentraciones de L-cisteina, glutation y 2-mercaptoetanol. En este último caso, y dado que es una sustancia ampliamente usada por otros autores a fin de estabilizar la enzima en las purificaciones, se ensayó el efecto de almacenar los extractos en presencia de dicho compuesto sulfhidrílicos.

En la Tabla VI se encuentran los resultados obtenidos en las experiencias en las cuales se ha usado extractos provenientes de dos cultivos diferentes de Rps. palustris, incubadas con distintas concentraciones de L-cisteina.

Se comprueba que la L-cisteina no activó a la enzima, sino que ella fue inhibida a las más altas concentraciones ensayadas.

En la Tabla VII se muestran los resultados de dos experiencias en las cuales, los extractos de Rps. palustris se incubaron con diferentes concentraciones de glutation.

TABLA VI

L-cisteina mM	% de actividad	
	Experiencia 1	Experiencia 2
0	100	100
0,5	98	92
1,0	85	-
4,0	69	64

Efecto de concentraciones variables de L-cistina en el medio de incubación sobre la actividad de ALA-S. Se prepararon extractos sobrenadantes de 15.000xg de Pps.palustris, los que se incubaron en presencia del sistema standard de incubación por espacio de 30 minutos a 37°C. Se determinó ALA y proteínas tal como se describe en Métodos.En todos los casos se hicieron los controles adecuados por el efecto de la L-cisteina sobre la colorimetría. Experiencia 1 se incubaron 0,99 mg de proteína; en experiencia 2 se incubaron 0,73 mg de proteína. Volumen final 1ml.

TABLA VII

Glutation mM	Experiencia 1	Experiencia 2
0	100	100
0,5	118	115
1,0	121	-
4,0	77	88

Efecto de concentraciones variables de glutation en el medio de incubación sobre la actividad de ALA-S. Se prepararon extractos sobrenadantes de 15.000xg de Pps. palustris las que fueron incubadas en presencia del sistema standard por espacio de 30 minutos, a 37°C. Experiencia 1 se incubaron 0,99 mg de proteína y en la experiencia 2, 0,73 mg de proteína en un volumen final de 1ml. Se determinó ALA y proteínas según se describe en métodos.

A bajas concentraciones el glutation tuvo un ligero efecto estimulatorio , el que no se consideró lo suficientemente importante como para incluirlo siempre en el sistema de incubación. A mayores concentraciones se volvió inhibitorio.

El efecto del 2-mercaptoetanol, sobre la actividad del ALA-S pipuede verse en la Tabla VIII.

Dicha concentración fué usada posteriormente en los intentos de purificación en los que se usó 2-mercaptoetanol como posible estabilizante de la enzima. No tuvo efecto sobre la actividad enzimática.

En la Figura 46 puede verse el efecto de almacenar extracto sobrenadantes de 15.000 xg con 2-mercaptoetanol 2mM a 0-4°C a la luz . Se comprobó nuevamente que dichos extractos no sufrían activación espontánea y que eran bastantes estables por ese período de tiempo.

Por lo visto en Tabla VIII se dedujo que el agregado de 2-mercaptoetanol 0,2mM a los incubados tampoco tuvo ningún efecto.

De todos estos resultados puede concluirse que los compuestos sulfhidrílicos no estimularon al ALA-S de extractos crudos de Rps. palustris excepto el glutation que la estimuló un 20%. La cisteína resultó ser inhibitoria y el 2-mercaptoetanol no tuvo influencia,ni aún cuando los extractos se almacenaron a 0-4°C por espacio de hasta 4 horas.

VI.2. Efecto de L-cistina

Se ensayó el efecto de la L-cistina sobre la actividad de ALA-S de extractos crudos de Rps.palustris.

Para ello se incubó una alícuota de extracto bacteriano en presencia del sistema standard adicionado de cantidades variables de cistina. Fué necesario efectuar controles por la interferencia de color en la reacción de Ehrlich por la cistina y por el pH al cual se realizó la incubación, puesto que fué necesario disolver la cistina en álcali diluído, el que al ser añadido al medio de incubación alteró el pH del mismo, aunque si bien, ligeramente.

En la Tabla IX pueden verse los resultados obtenidos,los que demuestran que en estas condiciones la L-cistina no tuvo efecto sobre la actividad del ALA-S de Rps. palustris.

Este hecho, junto con la no activación espontánea a 0-4°C diferencia claramente a la enzima de esta bacteria de la de Rps. sphaeroides .

TABLA VIII

2-mercaptoetanol mM	% de actividad
0	100
0,2	104

Efecto de 2-mercaptoetanol sobre la actividad del ALA-S
Se incubó extracto sobrenadante de 15.000 xg de Rps. palustris en presencia del sistema standard de incubación adicionado o no del reactivo, durante 60 minutos a 37°C en un volumen final de 1 ml. Proteínas incubadas 0,82 mg. Se determinó ALA tal como se describe en Métodos.

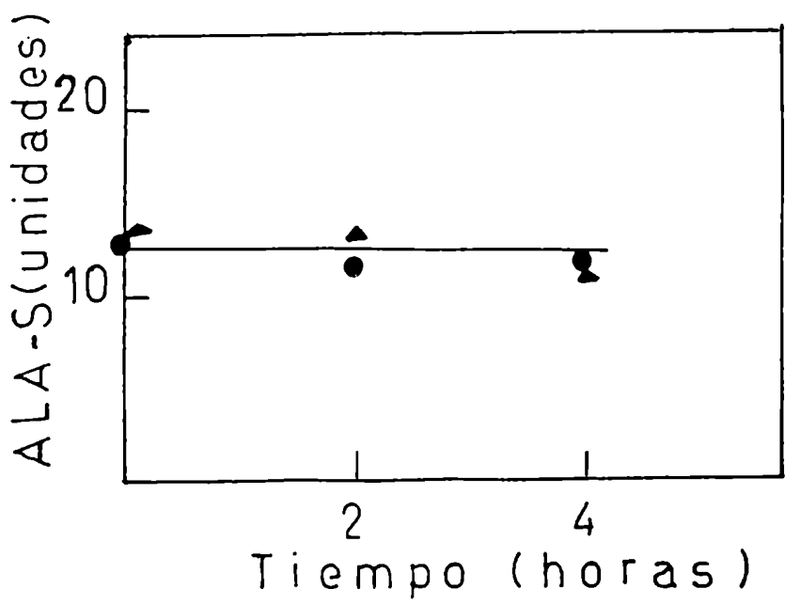


Figura 46: Efecto del estacionamiento de extractos sobrenadantes de 15.000xg de Rps.palustris en ausencia ( ) o en presencia de ( ) 2-mercaptoetanol. A los tiempos indicados se incubó una alícuota (0,82)mg en presencia del sistema standard durante 60' a 37°C. Se determinó ALA tal como se describe en Métodos.

TABLA IX

L- cistina mM	% de actividad
0	100
0,5	97
1,0	92
4,0	95
8,0	97

Efecto de concentraciones variables de L-cistina en el medio de incubación standard sobre la actividad de ALA-S de extractos crudos de Rps. palustris. Se incubaron alícuotas correspondientes a 0,96 mg de proteína, con el sistema standard adicionado de las concentraciones indicadas de L-cistina durante 30 minutos a 37°C en un volumen final de 1 ml. Se realizaron los controles adecuados por la variación de pH y la interferencia de color en la reacción de Ehrlich por la L-cistina. Se determinó ALA y proteínas tal como se describe en Métodos.

VII. Efecto de diálisis

Con el objeto de establecer si existen en los extractos crudos de Rps. palustris , sobrenadante de 15.000 xg, inhibidores o activadores endógenos del ALA-S, se procedió a dializar el extracto crudo durante 18 horas contra 100 volúmenes de buffer fosfato de sodio y potasio 0,05M pH 7,4 con cambios repetidos del mismo. Con el extracto sin dializar y con el dializado se procedió a estudiar el curso de la reacción incubando alícuotas de la misma.

En la Figura 47 pueden verse los resultados obtenidos.

El curso de la reacción no resultó lineal en ninguno de los dos casos. La actividad en el extracto dializado decayó un 45% indicando así la presencia de algún factor o bien esencial para la actividad o que estabiliza la enzima. Se calcularon además las velocidades iniciales por el método de Algranati resultando para el extracto no dializado 1,08 n moles ALA . min^{-1}. (mg proteína)$^{-1}$, y para el extracto dializado 0,86 n moles ALA. min^{-1}(mg de proteína)$^{-1}$, decayendo la actividad un 20% cuando se la midió de esta forma.

O bien la enzima del extracto dializado resultó más sensible a 37°C que la del extracto no dializado, o durante el proceso de diálisis se perdió algún cofactor esencial. El decaimiento de actividad en el extracto dializado no se debió a inestabilidad de la enzima a 0-4°C durante las 18 horas de diálisis ya que se almacenó extracto sin dializar durante dicho tiempo , y la actividad permaneció constante.

Con el objeto de establecer si la menor actividad en los extractos dializados era debido a la pérdida de fosfato de piridoxal, que pudiera estabilizar a la enzima, se realizaron diálisis de distintas alícuotas de extractos crudos de Rps. palustris contra buffer fosfato de sodio y potasio 0,05 pH 7,4 y contra el mismo buffer adicionado de fosfato de piridoxal a una concentración de 40μM, que es la usada en las incubaciones. Como control se almacenó a 0-4°C durante el tiempo de las diálisis (18 horas) una muestra de extractos y se determinó actividad en el sistema standard de incubación.

En la Tabla X pueden verse los resultados obtenidos.

El dializar contra el buffer adicionado de fosfato de piridoxal prácticamente no tuvo efecto.

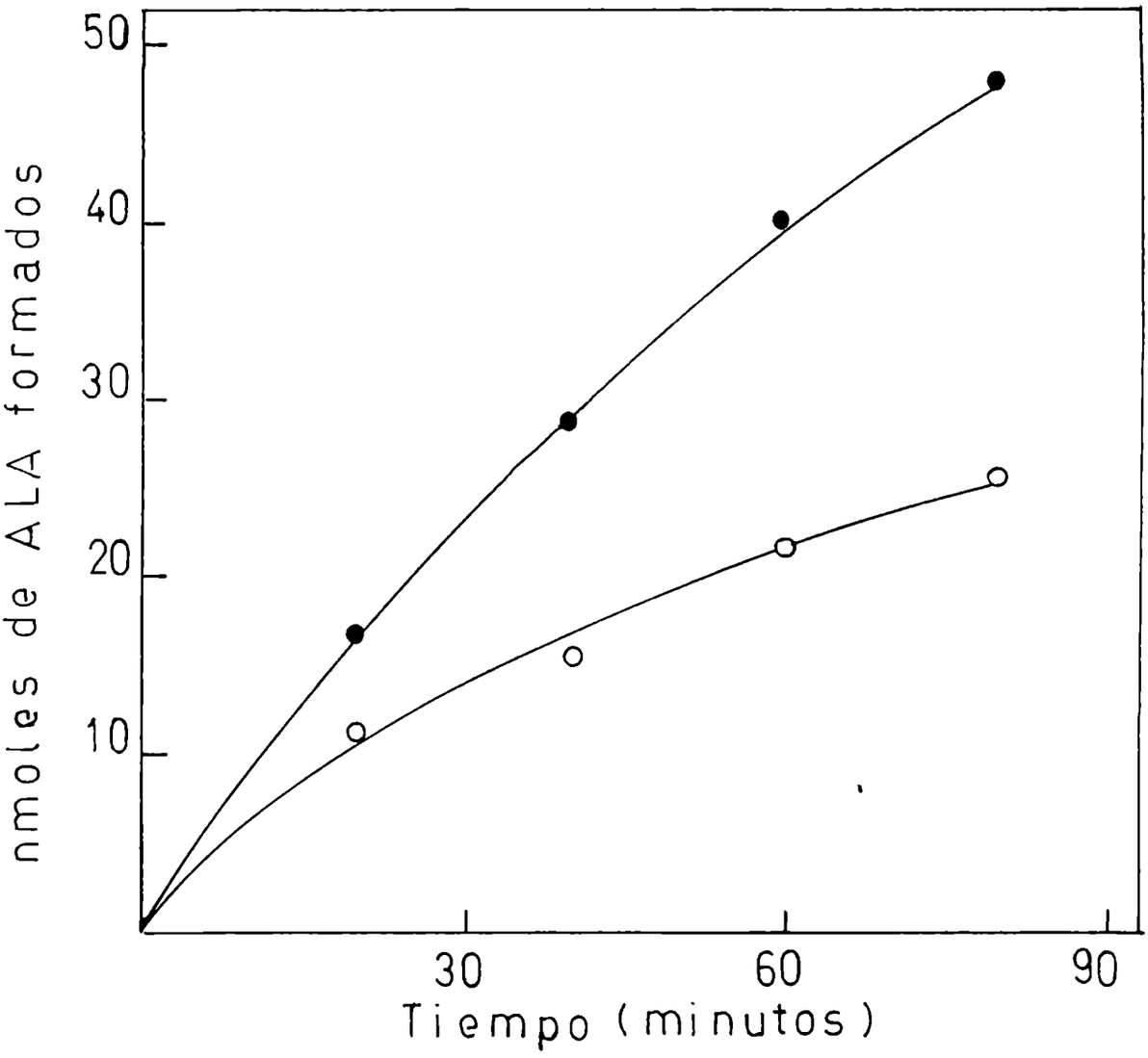


Figura 47: Síntesis de ALA por extractos crudos de Rps. palustris sobrenadantes de 15.000 xg. Se preparó un extracto de la forma habitual. Una alícuota del mismo se dializó contra 100 volúmenes de buffer de fosfato de sodio y potasio 0,05 M pH 7,4 por 18 horas. En ambos casos se estudió el curso de la reacción incubando los tiempos indicados, alícuotas de 0,89 mg de proteína en el sistema standard a 37°C. Volumen final 1 ml. Se determinó ALA y proteína tal como se describe en Métodos.

(●) No dializado (○) Dializado

TABLA X

Tratamiento de la muestra	% de actividad remanente
Ninguno	100
Almacenado 18 hs. a 0-4°C	94
Dializado contra buffer fosfato 0,05 M pH 7,4	35
Dializado contra buffer fosfato 0,05 M pH 7,4 40μM en fosfato de piridoxal	43

Efecto de la diálisis de un extracto crudo de Rps. palustris, sobrenadante de 15.000 xg contra buffer de fosfato de sodio y potasio y contra el mismo buffer adicionado de fosfato de piridoxal 40 μM. Alícuotas correspondientes a 0,80 mg de proteína se incubaron por una hora a 37°C en el sistema standard en un volumen final 1ml. Se determinó ALA y proteínas tal como se indica en Métodos.

VIII. Efecto del sulfato de amonio sobre la actividad del ALA-S.

Se investigó el efecto del sulfato de amonio sobre la actividad del ALA-S de extractos crudos de Rps. palustris. Para ello se incubaron distintas concentraciones de sulfato de amonio en el sistema standard de ensayo. El ion amonio interfiere en la reacción de Ehrlich por lo que aún con los controles adecuados los valores de ALA determinados en su presencia son más bajos que los reales. Sin embargo, hasta una concentración 0,1 M de ion NH_4^+ la interferencia no es muy notoria.

En la Tabla XI pueden verse los resultados obtenidos.

TABLA XI

Concentracion de $SO_4(NH_4)_2$ (M)	% de actividad
0	100
25	73
50	63

Efecto de concentraciones variables de sulfato de amonio en el medio de incubación standard, sobre la actifidad ALA- S de extractos crudos de Rps. palustris . Se incubaron alícuotas de extractos sobrenadantes de 15.000 xg (0,74mg) en el sistema standard durante 30 minutos a 37°C con las concentraciones indicadas de $SO_4(NH_4)_2$. vol final 1 ml. Se hicieron los controles correspondientes . Se determinó ALA y proteínas tal como se indica en Métodos.

IX. Efecto de la precipitación con sulfato de amonio

En repetidas oportunidades se intentó efectuar un fraccionamiento salino de extractos sobrenadantes de 140.000 xg de Rps.palustris, con el objeto de lograr una purificación del ALA-S.

Se ensayó efectuarlo en diferentes medios con buffer fosfato de sodio y potasio 0,05 pH 7,4, sólo ó bien adicionado

ya sea de 2-mercaptoetanol 2mM, o bien de 2-mercaptoetanol 2mM + glicerol 10%, ó 2-mercaptoetanol 2mM + fosfato de piridoxal 40 μM + glicina 10 mM, ó fosfato de piridoxal 40 μM + glicina 10mM. Las precipitaciones se efectuaron con sulfato de amonio pro-análisis (Merck) o bien con un producto para fines enzimológicos a 0-4°C. Es de destacar que al sonicar las suspensiones bacterianas en estos buffers modificados no tuvo influencia sobre la actividad del ALA-S.

En los ensayos de las diversas fracciones obtenidas, se añadió al sistema standard de incubación 0,9 - 1,0 unidad de Succinil-CoA-S. A las diversas fracciones se las ensayó directamente o bien luego de pasarlas por una column de Sephadex G-25 a fin de eliminar posibles restos de sulfato de amonio que quedaran en los precipitados. Esta última operación demostró qno ser necesaria puesto que no hubo variaciones en las actividad específica lograda en cada fracción ensayada previo pasaje o no por la columna de Sephadex G-25.

En casi todos los casos hubo una notable pérdida de actividad enzimática, no habiéndose podido de esta manera lograr una purificación de la enzima.

De todas formas, en todos los casos se encontró que la actividad de ALA-S precipitaba entre 30-50% de saturación de sulfato de amonio, aunque por supuesto, su actividad específica estaba muy disminuída respecto a la del extracto original. Si se efectuaba una precipitación del total de proteínas (0-100% de saturación de sulfato de amonio) a fin de verificar si era necesaria la presencia de algún factor proteico para la actividad enzimática, tal como se demostró en mitocondria de hígado de rata (604) también se perdía actividad respecto del extracto original, siendo irrelevante en la determinación el pasaje de la fracción proteica por Sephadex G-25.

El espectro de la reacción de Ehrlich obtenido al determinar el producto de las incubaciones con fracciones obtenidas precipitando entre 30-50% y 0-100 % de saturación de sulfato de amonio mostró una relación de absorbancias a 525 y 553 nm de 0,70-0,72, valor muy similar al obtenido con ALA puro.

Los precipitados de 30-50% de saturación de sulfato de amonio almacenados a -15°C no perdían actividad hasta las 48 hs, aunque almacenados 15 días a esa temperatura perdían un 50% de la misma. A 0-4°C perdían actividad rápidamente.

Es probable que la enzima fuera sensible al tratamiento con sulfato de amonio, o bien, si se vincula estos hechos con lo que

sucedía al dializar los extractos enzimáticos, puede pensarse en que se perdía en las precipitaciones algún cofactor, aún desconocido, esencial para la actividad. Sin embargo, por lo que se mostrará en el próximo punto, la hipótesis más acertada parece ser la primera.

En raras oportunidades la fracción de 30-50% de saturación con sulfato de amonio no perdió actividad, lográndose así una ligera purificación de hasta dos veces. De todas formas, los resultados negativos en la mayoría de los casos, aunque algunos resultados aleatorios hayan sido positivos, desalentaron continuar los intentos de purificación de la enzima mediante este método.

X. Efecto de la filtración por Sephadex G-25

En varios ensayos se había comprobado que al pasar por Sephadex G-25 extracto de *Rps. palustris* , sobrenadante de 140.000 xg , en varios de los buffers mencionados en punto IX,se perdía actividad enzimática.

Con el objeto de investigar si en los extractos bacterianos había algún metabolito que protegiera la actividad del ALA-S, se pasó por una columna de Sephadex G-25 equilibrada con buffer fosfato de sodio y potasio 0,05 M pH 7,4, un extracto sobrenadante de 140.000 xg y se recogieron posteriormente diversas fracciones correspondientes a los eluídos de bajo peso molecular.

Se ensayaron las actividades enzimáticas en los extractos tal cual, en el filtrado por geles, y en este último adicionado de alícuotas de las fracciones de bajo peso molecular. Se tuvo en cuenta naturalmente la inhibición producida por el buffer de fosfato en exceso.

En una típica experiencia se pasó por una columna de Sephadex G-25 de 20 cm de alto por 1 cm de diámetro 2ml de extracto de *Rps. palustris*, equivalentes a 16 mg de proteína y se eluyeron con buffer fosfato de sodio y potasio 0.05 M pH 7,4. Una vez que fueron eluidas las proteínas se recogieron fracciones de 2ml cada una. La actividad específica del extracto original cayó de 66,01 unidades (mg de proteína)$^{-1}$ a 37,86 unidades (mg de proteína)$^{-1}$ esto es, un 45% , por pasar por la columna de gel.

El extracto filtrado se incubó con alícuotas (0,2 ml) de las fracciones que contienen sustancias de peso molecular bajo para determinar actividad de ALA-S. Las incubaciones se realizaron

con 0,2 ml del extracto proteico pasado por la column de Sephadex G-25 adicionadas de 0,2 ml de cada fracción de bajo peso molecular. Como en la columna ocurría una dilución de 2-4 3 veces , esta relación de volúmenes simulaba las condiciones del extracto no tratado.

En la Figura 48 se muestran los resultados obtenidos.

Se comprueba que la fracción de bajo peso molecular obtenida por filtración por geles activó al ALA-S, hasta niveles comparables a las medidas en el extracto sin filtrar.

Esta sustancia activadora, de estructura por el momento desconocida no es ni fosfato de piridoxal ni glicina, que no protegieron la actividad enzimática tanto al ser precipitada la enzima por sulfato de amonio o por filtración por Sephadex G-25. Tampoco resultó algún otro sustrato de la enzima, como se verá más adelante.

Es de destacar muy especialmente que el activiador de la enzima filtrada por geles no tuvo acción sobre la enzima precipitada con sulfato de amonio, lo que confirmó la suposición de que el sulfato de amonio alteraba irreversiblemente la actividad del ALA-S.

XI. Constante de Michaelis para glicina

Se determinó la constante de Michaelis para glicina del ALA-S de Rps. palustris crecida fotoheterotróficamente.

En la Figura 49 puede verse el gráfico de Lineweaver-Burk de los resultados obtenidos de las actividades de ALA-S en función de la concentración de glicina, manteniendo constante los demás integrantes del sistema de incubación.

Puede verse que el valor de Km para glicina resultó ser 15,38 mM.

XI. Peso molecular del ALA-S de Rps. palustris crecida fotoheterotróficamente

Para obtener este valor se preparó un extracto bacteriano sobrenadante de 140.000 xg el que se precipitó con sulfato de amonio entre 30 y 50% de saturación. Esta fracción se cromatografió en una columna de Sephadex G-100 previamente

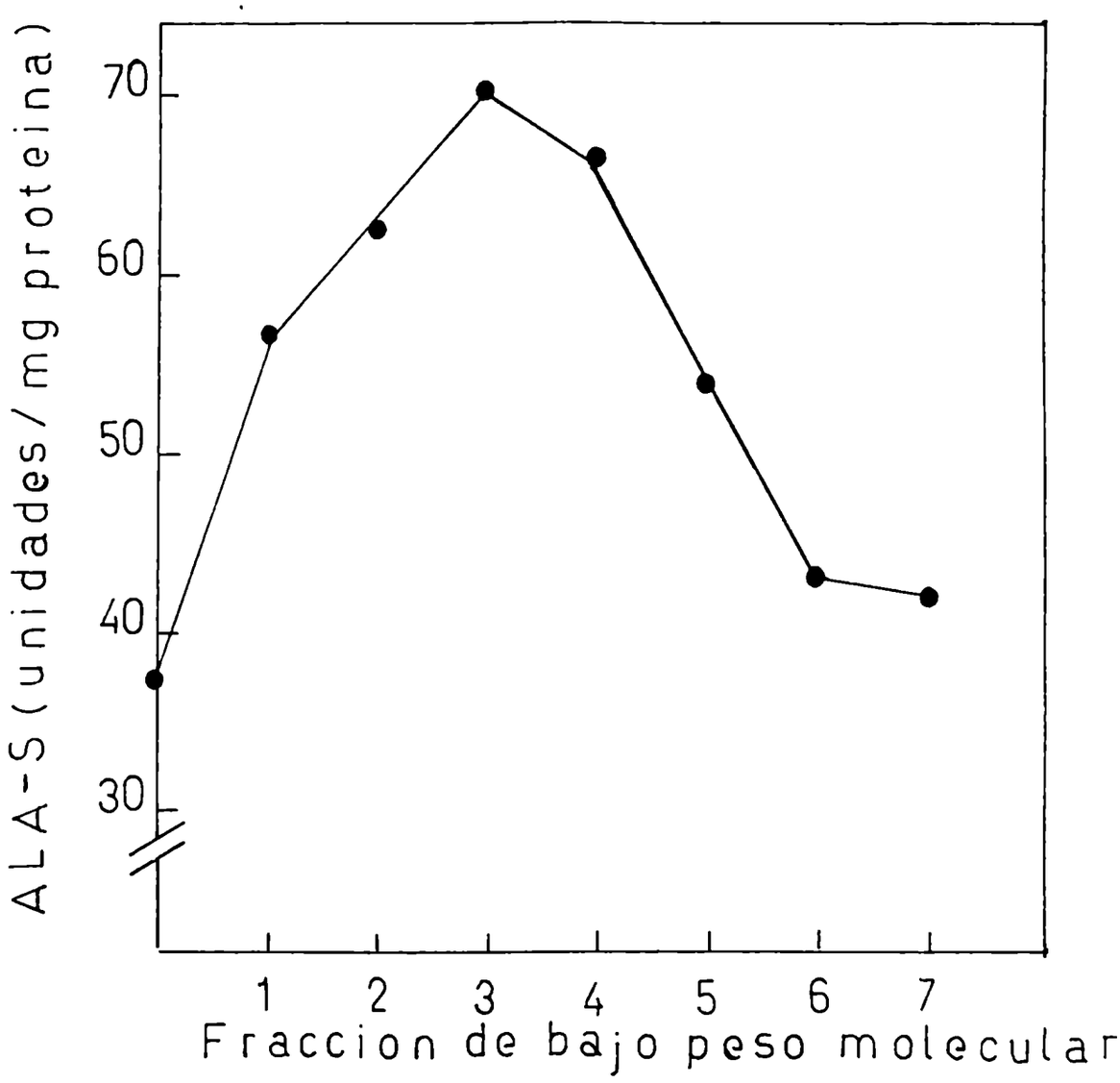


Figura 48: Efecto de adicionar eluído de bajo peso molecular de un extracto de Rps.palustris pasado por Sephadex G-25. Por una columna de 1 cm de diámetro por 20 cm de altura se pasó 2ml de extracto (equivalentes a 16 mg de proteína) se eluyeron y se recogieron posteriormente fracciones de 2ml. Se ensayó la actividad de ALA-S en presencia de alícuotas de estas fracciones. Se midió ALA y proteínas tal como se indica en métodos. Las fracciones de bajo peso molecular no tenían actividad de ALA-S.

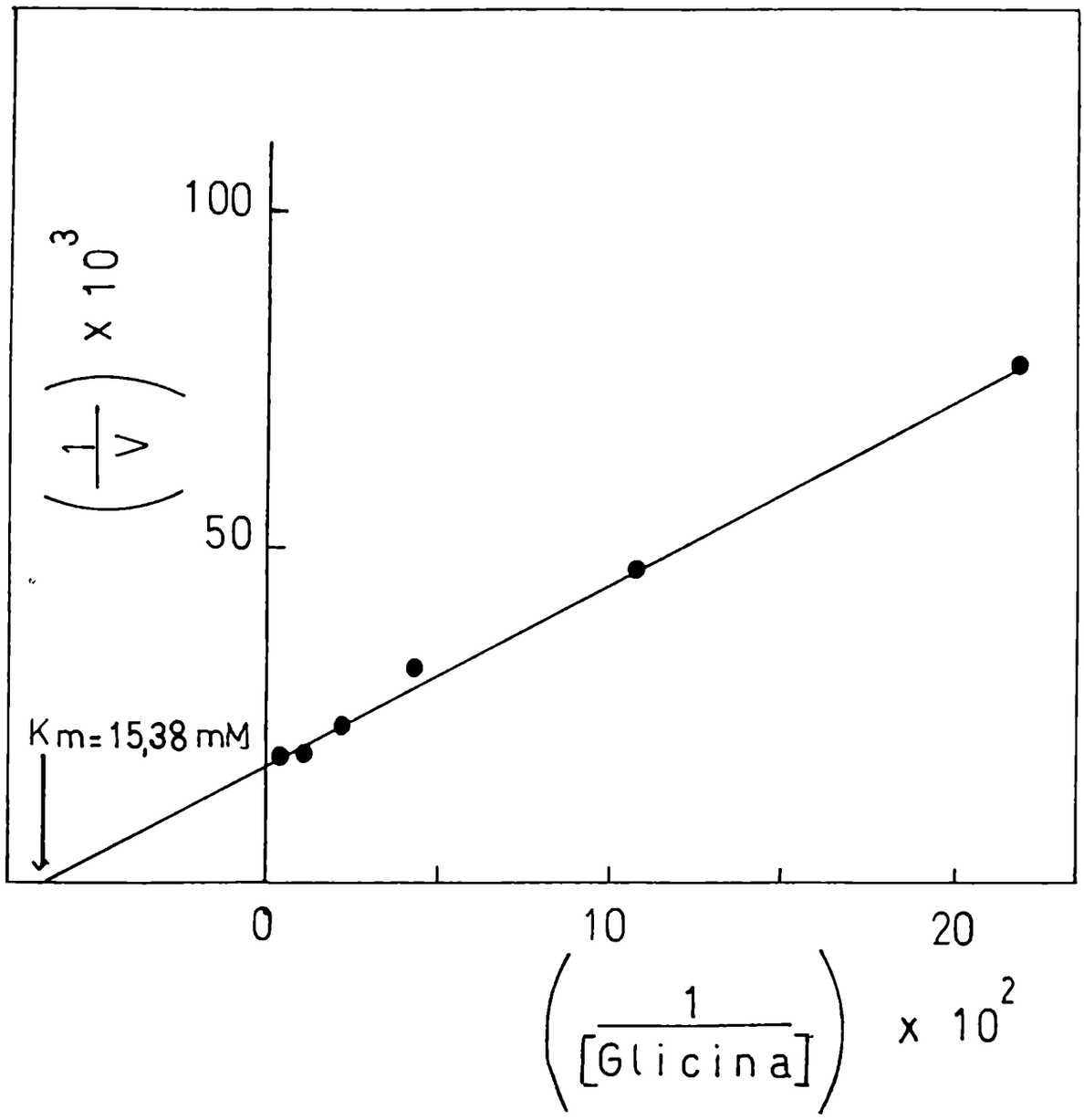


Figura 49: Representación de Lineweaver-Burk para la determinación del Km de glicina de ALA-S de extracto de Rps.palustris sobrenadante de 140.000 xg.
Se incubó 0,47 mg de proteína en presencia de cantidades variables de glicina, manteniendo el resto del sistema de incubación constante. Se determinó ALA tal como se indica en Métodos.

calibrada como se indica en Métodos. Se eluyeron fracciones sobre las que se ensayó actividad de ALA-S . A los ensayos se adicionó 0,9 unidades de Succinil-CoA-S.

Se preparó un extracto de Rps.palustris sobrenadante de 15.000 x g de la manera habitual.Resultó tener una actividad de ALA-S de 89,15 unidades . (mg de proteína)$^{-1}$. Este extracto se centrifugó por dos horas a 140.000 xg, y en el sobrenadante la actividad de ALA- S fue de 134,11 unidades . (mg de proteína)$^{-1}$. Este extracto, unos 35 ml, se precipitó con sulfato de amonio y se utilizó la fracción que precipitó entre 30-50% de saturación, la que se disolvió en un pequeño volumen (aproximadamente 3 ml) de buffer fosfato de sodio y potasio 0,05 M pH 7,4. La actividad específica de esta fracción resultó ser de 213,54 unidades. (mg de proteína)$^{-1}$ siendo esta una de las raras veces que la actividad enzimática no decayó. Sin embargo, almacenando una alícuota de esta fracción durante el tiempo de corrida en la columna de G-100 (alrededor de 4 horas) la actividad decayó a 34,05 unidades . (mg de proteína)$^{-1}$, o sea un 85% lo que muestra la inestabilidad de esta fracción.

En la columna de Sephadex-G-100 previamente equilibrada con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 7,5 y calibrada, se sembraron aproximadamente 22 mg de proteína. Se procedió a eluir la columna con el mismo buffer en que estaba equilibrada y se recogieron fracciones de 2,5-3,0 ml. En ellas se determinó actividad de ALA-S, adicionando naturalmente 0,9-1,0 unidad de Succinil-CoA-S (libre de actividad de ALA-S) obtenida de Rps. sphaeroides tal como se describe en Métodos.

Las proteinas se determinaron mediante la relación de absorbancia a 260 y 280 nm, de la forma descripta en Métodos.

En la Figura 50 puede verse el perfil de elución de proteínas y de elución de la actividad del ALA-S.

En la fracción de mayor actividad, la actifidad específica resultó ser 69,68 unidades (mg de proteína)$^{-1}$, valor atribuible a la inestabilidad de la enzima.

En la Figura 51 y en la Figura 52 pueden verse los resultados obtenidos de la determinación del peso molecular.

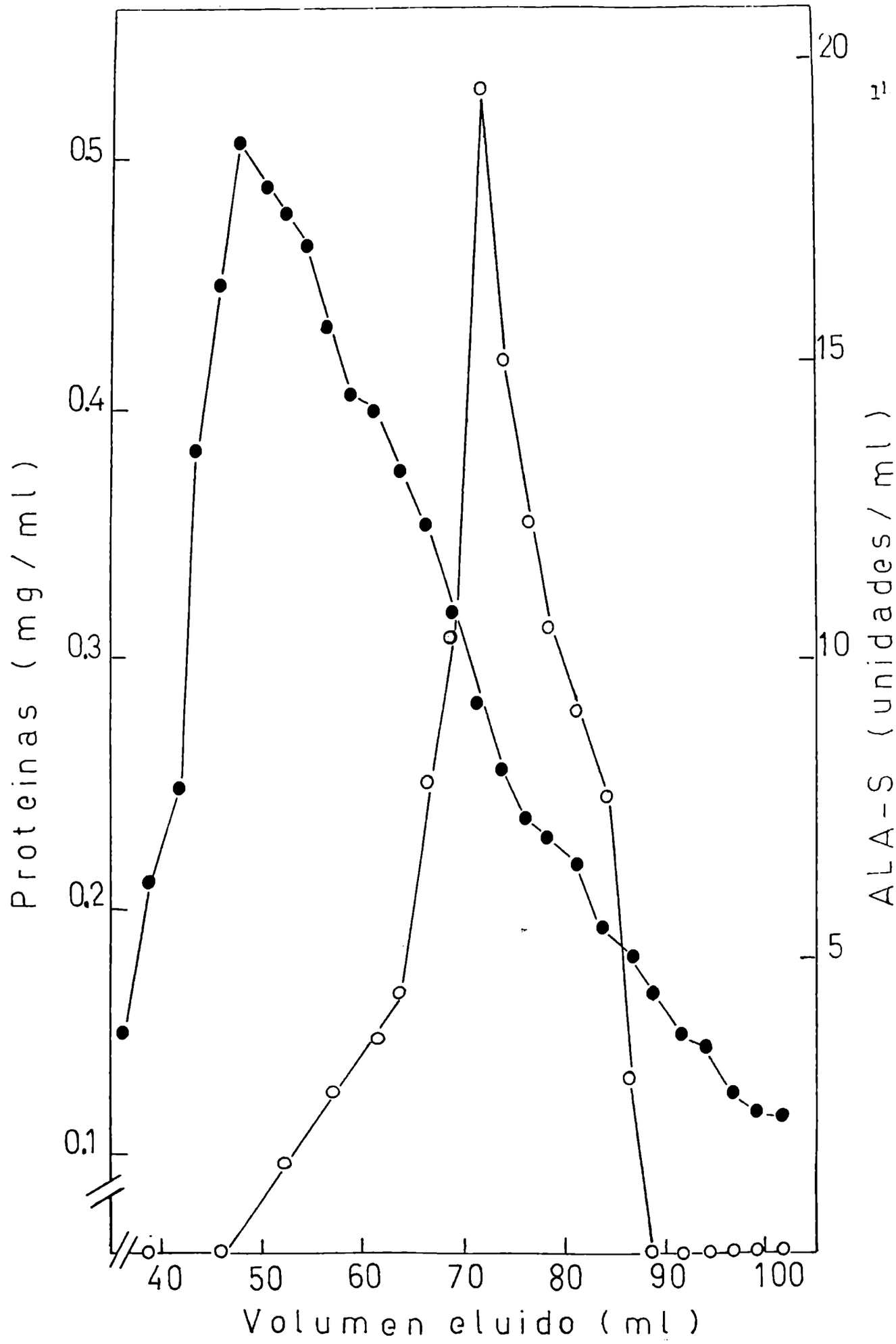


Figura 50: Cromatografía en Sephadex G-100 de una fracción precipitada por $SO_4(NH_4)_2$ (30-50% de saturación) de un extracto sobrenadante de 140.000xg de Rps. palustris. Se sembraron 22 mg de proteínas, se eluyó con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 7,5. Se determinó actividad de ALA-S y proteínas por relación de absorbancias a 260 y 280 nm, tal como se describe en Métodos.

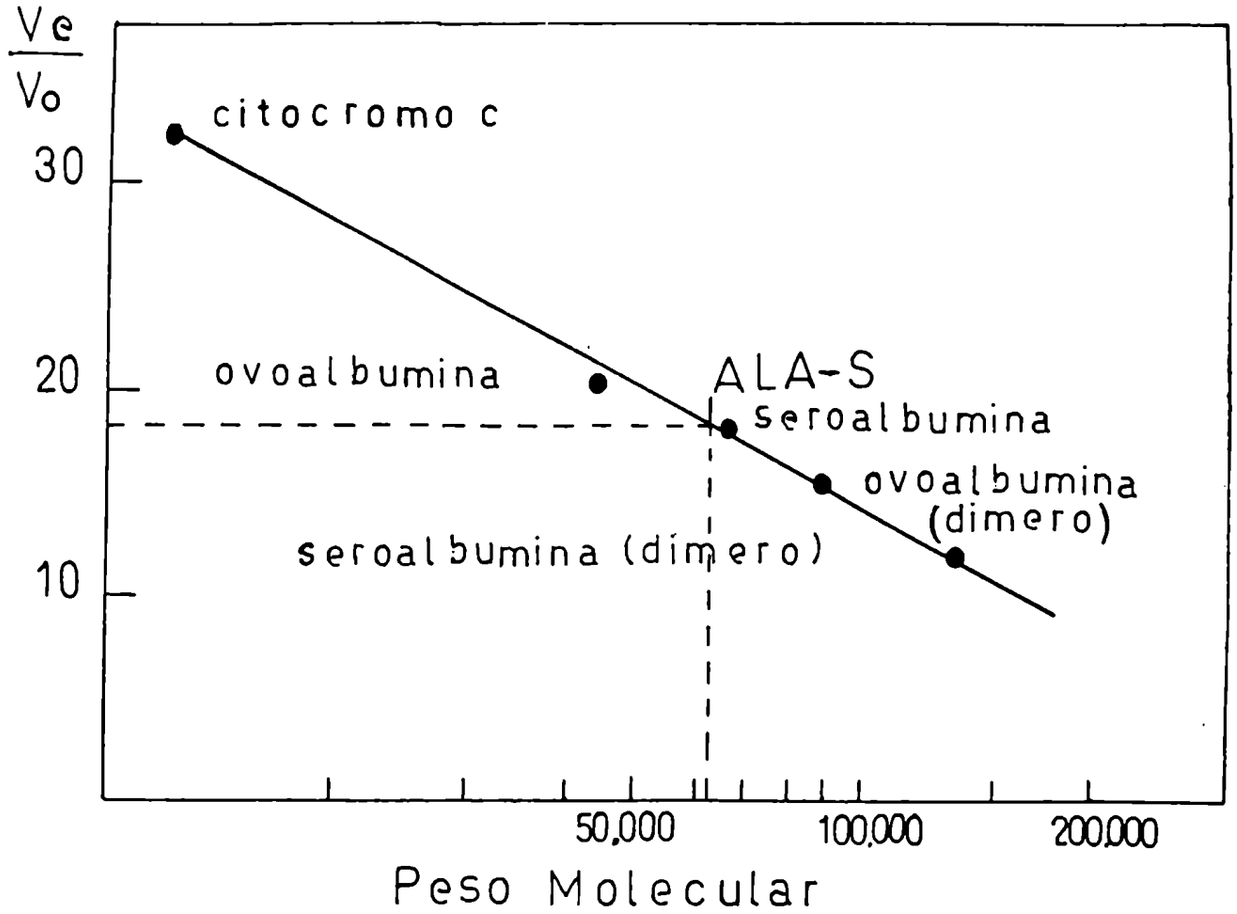


Figura 51: Determinación del peso molecular del ALA-S. La calibración de la columna de Sephadex G-100 se describe en Métodos.

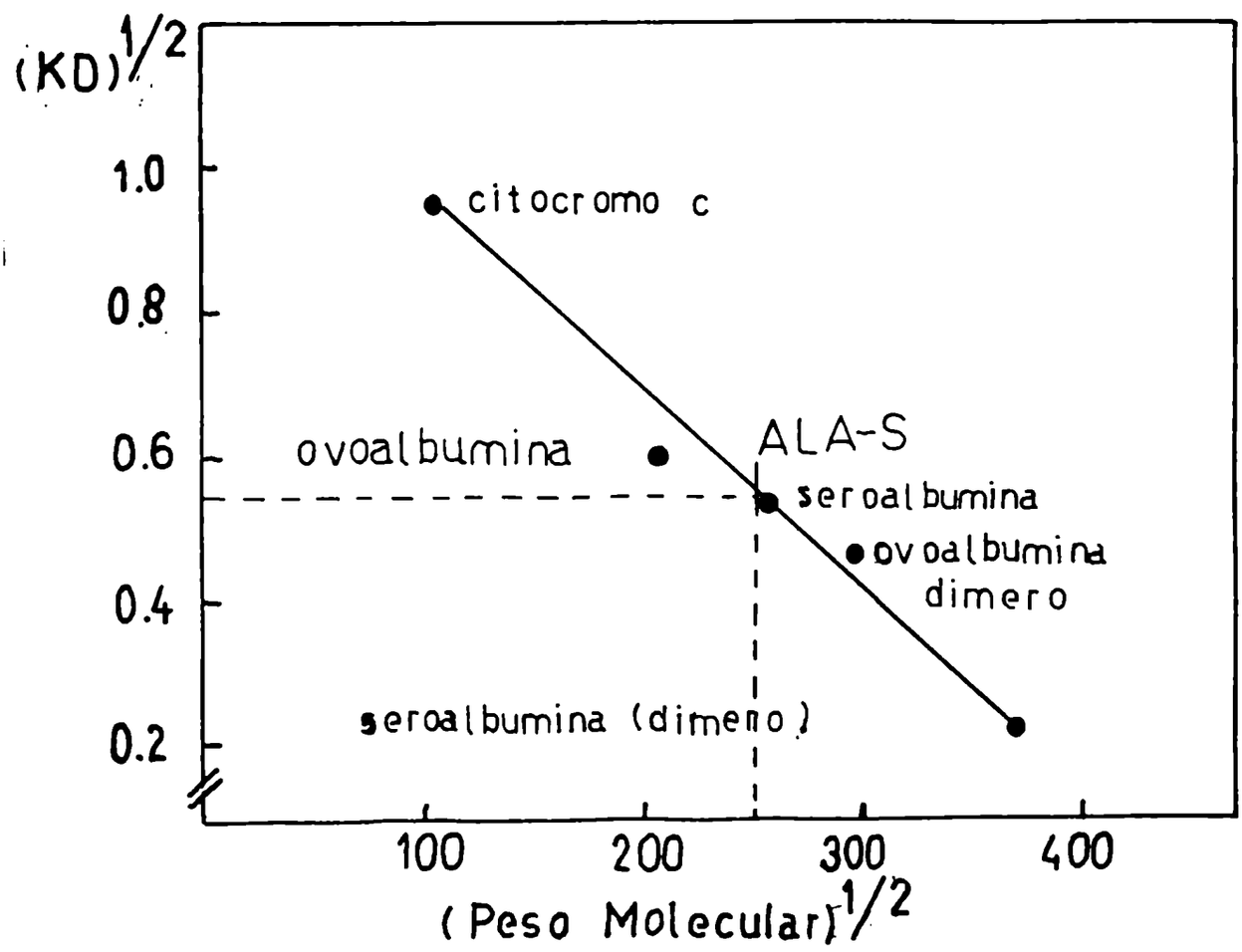


Figura 52: Determinación del peso molecular del ALA-S según representación de Andrews (590). La calibración de la columna de Sephadex G-100 se describe en Métodos.

En el gráfico de Ve/Vo vs log. PM se obtuvo como peso molecular del ALA-S de Rps. palustris el valor de 61.000.

Cuando se grafica $(Kd)^{1/2}$ vs $(PM)^{1/2}$ (590) el valor obtenido fue de 65,000 lo que dado la aproximación del método es una buena concordancia.

La cromatografía en Sephadex G-100 no reveló la presencia de algúna subunidad activa de la enzima.

ACIDO DELTA-AMINOLEVULICO SINTETASA DE *Rhodopseudomonas palustris* CRECIDA QUIMIOHETEROTROFICAMENTE

Para medir los niveles de la enzima ALA-S de Rps.palustris crecida quimioheterotroficamente, esto es, en aerobiosis y a la oscuridad, se usaron las mismas condiciones de ruptura, centrifugación y sistema standard de incubación que los usados para medir los niveles de ALA-S de Rps.palustris crecida en condiciones fotosintéticas, de forma tal de poder comparar los valores.

La actividad demostró ser siempre menor que la de células crecidas fotosintéticamente.

I. Localización intracelular de la enzima

Con el objeto de establecer si el ALA-S de Rps. palustris crecida aerobicamente estaba también localizada en la fracción soluble, tal como ocurría con la de células crecidas en condiciones fotosintéticas se obtuvieron extractos crudos los que se sometieron a una centrifugación diferencial. Se determinó actividad de ALA-S en las diversas fracciones. En la determinación efectuada sobre el precipitado de 140.000xg se agregó al sistema de incubación, 1 Unidad de Succinil CoA-S.

En la Tabla XII pueden verse los resultados obtenidos.

II. Curso de la reacción

Se procedió a determinar la influencia del tiempo de incubación sobre la formación de ALA por extractos de Rps. palustris crecida fotoheterotróficamente en la oscuridad. Para ello se sonicaron suspensiones bacterianas de 38 mg de peso seco/ ml en buffer de fosfato de sodio y potasio 0,05 M pH 7,4 y se obtuvo un sobrenadante de 15.000 xg . Alícuotas de las mismas se incubaron a diversos tiempos a 37°C en el sistema standard.

En la Figura 53 pueden verse los resultados obtenidos en dos experiencias típicas.

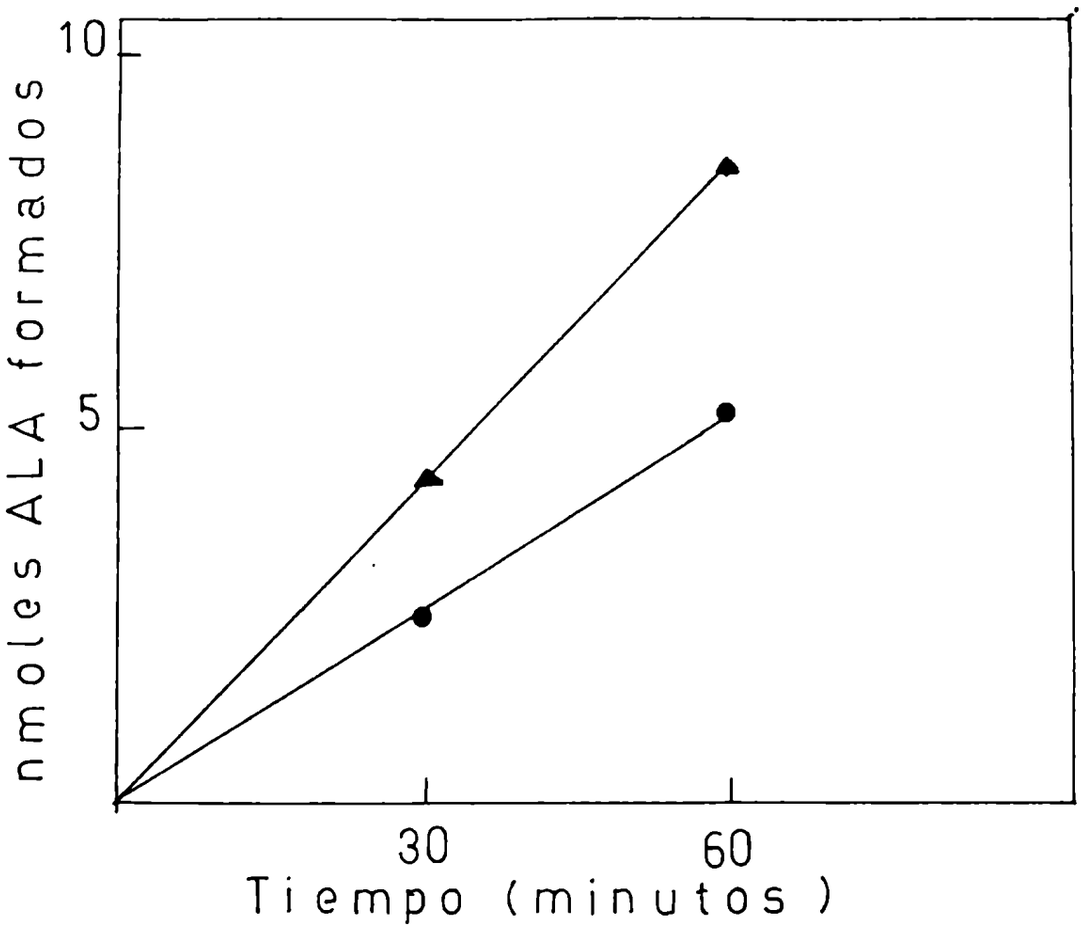


Figura 53: Síntesis de ALA por diferentes extractos de Rps. palustris crecida en oscuridad. Se incubaron 1,65 mg (●) y 1,71 mg (▲) de proteínas en presencia del sistema standard de incubación a 37ºC. Se determinó ALA y proteínas tal como se describe en Métodos.

TABLA XII

Fracción	ALA-S (nmoles ALA/h/ml de extractos)	
	Experiencia 1	Experiencia 2
Sobrenadante de 15.000 xg	260	312
sobrenadante de 140.000 xg	300	306
precipitado de 140.000 xg	5	ND

Determinación de actividad de ALA-S en difersas fracciones de Rps.palustris crecida quimioheterotróficamente. Se prepararon suspensiones bacterianas, las cuales se sonicaron durante 1 minuto de la forma habitual. Los extractos resultantes se centrifugaron a 15.000 xg durante 15 ,minutos; el sobrenadante de esta centrifugación se centrifugó por 2 horas a 140.000 xg. El precipitado resultante se resuspendió en el mismo buffer al volumen original. Se determinó ALA-S ent todas las fracciones enlla forma descripta en Métodos. ND no detectable.

TABLA XIII

Concentración inicial de ALA(μM)	% actividad remanente
0	100
9	99
22	80
45	45
90	11

Efecto de la adición de ALA a las incubaciones de extracto de Rps.palustris crecida quimioheterotróficamente, sobrenadentres de 15.000 xg. Las incubaciones se realizaron en presencia de 1,8 mg de proteína en el sistema standard de incubación a 37°C y por una hora. Se determinó ALA y proteínas tal como se describe en Métodos.

El curso de la reacción resultó en este caso lineal, a diferencia de lo que ocurría con la enzima de los extremos de Rps.palustris crecida fotosintéticamente.

III. Inhibición de la reacción por producto

En la Figura 53 se mostró que el curso de la reacción del ALA-S de Rps. palustris crecida quimioheterótroficamente era lineal. Para determinar si ello era una diferencia con lo observado para la enzima de células crecidas anaeróbicamente o bien que en ambas el comportamiento era similar y que en este caso la inhibición no se manifestaba por los bajos niveles de ALA formados, se procedió a incubar extracto sobrenadante de 15.000xg de células crecidas aeróbicamente en el sistema standard adicionado de cantidades variables de ALA, por una hora a 37°C. Se determinó ALA como siempre y se restó al valor hallado la cantidad de ALA agregada. En la Tabla XIII pueden verse los resultados obtenidos.

El ALA-S de las células crecidas aeróbicamente es también inhibido por su producto , pero en el caso de la Figura 53 ello no se observó por los bajos niveles de producto formado.

IV. Espectro de abosrción de la reacción de Ehrlich.

En varias experiencias, en las que se incubaron extractos sobrenadantes de 15.000xg, obtenidos de diversas batches de células de Rps. palustris crecida aeróbicamente se procedió a determinar el espectro de absorción del compuesto coloreado formado en la reacción de Ehrlich con el pirrol formado por condensación de Knorr con la acetil-acetona.

Siempre se obtuvo un espectro idéntico al mostrado en la Figura 38 con una relación de absorbancias a 525 y 553 nm de 0,69, valor correspondiente al de ALA-pirrol.

Dado esta semejanza con lo obtenido anteriormente no se consideró necesario caracterizar más el producto formado en las incubaciones.

V. Estabilidad de la actividad enzimática

Se estableció la estabilidad del ALA-S en extractos de Rps.palustris almacenados a baja temperatura (-15°C), a 0-4°C y a 37°C para diversos períodos de tiempo.

V.1. Estabilidad a -15°C

Se almacenaron extractos sobrenadantes de 15.000xg y de 140.000 xg obtenidos de células de Rps.palustris crecida quimioheterótroficamente a -15°C y a diferentes períodos de tiempo se determinó en ellas ALA-S.

En la Tabla XIV se muestran los resultados obtenidos

Se comprueba que en ambos casos la actividad decayó un 45% almacenando 48 hs. a -15°C.

V.2. Estabilidad a 0-4°C

Con el objeto de establecer si en los extractos sonicados de Rps.palustris crecida aeróbicamente existía o no una activación espontánea a 0-4°C del ALA-S, y además conocer su estabilidad a dicha temperatura, se procedió a sonicar una suspensión bacteriana (27 mg de peso/seco ml) y se la almacenó a 0-4°C a la luz. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se determinó la actividad del ALA-S incubando las alícuotas en el sistema standard.

En la Figura 54 pueden verse los resultados obtenidos.

La enzima resultó ser estable a esta temperatura hasta 4 horas de almacenamiento. Además se comprobó que tampoco existía activación espontánea de la misma.

Se investigó también la estabilidad del ALA-S en extractos sobrenadantes de 15.000 xg , almacenados a 0-4°C y a la luz. En la Tabla XIV se muestran los resultados de una experiencia típica. Resulta evidente que la enzima en extractos crudos, centrifugados o no, era estable a esta temperatura.

Para las condiciones en que se creció aeróbicamente Rps. palustris y para las condiciones en que las células son sonicadas y los extractos posteriormente almacenados, condiciones que se han usado siempre en el trabajo con estos extractos, la actividad de ALA-S no se altera a 0-4°C.

TABLA XIV

Horas de almacenamiento a-15°C	ALA-S(n moles ALA/h/mg de proteína	
	Extracto sobrenadante de 15.000 xg	Extracto sobrenadante de 140.000xg
0	18,09	45,58
24	12,50	38,18
48	10,26	25,50

Estabilidad del ALA-S en extractos sobrenadantes de 15.000xg y 140.000 xg de Rps.palustris crecida aeróbicamente, Los extractos se almacenaron a -15°C y a los tiempos indicados se ensayó la actividad de ALA-S de la forma habitual, tal como se describe en Métodos.

TABLA XV

Tiempo de almacenamiento (min)	% de actividad
0	100
30	105
120	104

Efecto de almacenar a 0-4°C y a la luz un extracto sobrenadante de 15.000xg de Rps. palustris crecida aeróbicamente, sobre la actividad del ALA-S. La actividad específica a tiempo cero se estableció midiendo la actividad en el extracto recién sonicado, sin centrifugar, pero considerando sólo las proteínas presentes en el sobrenadante de 15.000xg. Se determinó ALA y proteínas tal como se describe en Métodos.

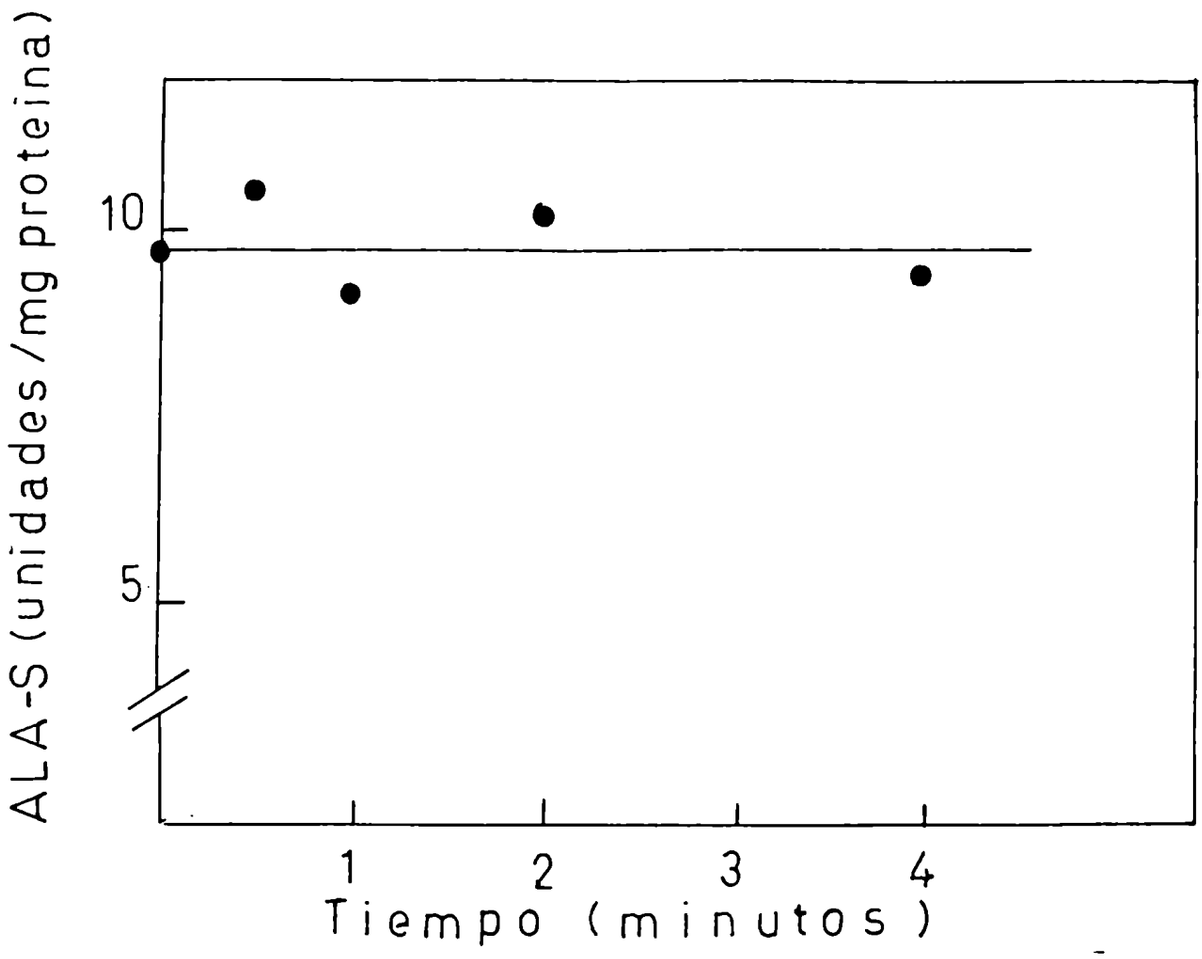


Figura 54: Efecto de almacenar un extracto sonicado no centrifugado de Rps.palustris crecida aeróbicamente a 0-4°C y a la luz sobre la actividad del ALA-S. Se sonicó una suspensión bacteriana (27 mg de peso seco/ml) durante 1 minuto de la forma habitual, y este extracto se almacenó a 0-4°C a la luz. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas (correspondientes a 1,9 mg de proteína) y se incubaron en el sistema standard a 37°C por una hora. Se determinó ALA y proteínas tal como se describe en Métodos.

V.3. Estabilidad a 37°C

Se procedió a estudiar el efecto del almacenamiento de un extracto sonicado de células de Rps. palustris crecida aerobicamente sobre la actividad del ALA-S.

Para ello se sonicó una suspensión bacteriana (27 mg de peso seco/ml) un minuto en la forma habitual y se almacenó a 37°C A diferentes tiempos se retiraron alícuotas las que fueron incubadas en el sistema standard.

En la Figura 55 se muestran los resultados obtenidos.

La actividad enzimática decayó un 60% en 2 horas de almacenamiento a 37°C.

VI. Efecto de la filtración por Sephadex G-25

Similarmente a lo que ocurría en los extractos sobrenadantes de 140.000 xg de Rps. palustris crecida fotosintéticamente cuando los mencionados extractos obtenidos de células crecidas aeróbicamente se pasaron por una columna de Sephadex G-25 se perdía actividad de ALA-S. El decaimiento de actividad observada fue de un 50-60% en todos los casos.

Con el objeto de investigar si en los extractos existía algún metabolito protector de la actividad del ALA-S se pasó por una columna de Sephadex G-25 de 20 cm de alto por 1 cm de diámetro, equilibradas con buffer fosfato de sodio y potasio 0.05 M pH 7,4 2,2 ml de extracto sobrenadante de 140.000 xg de Rps. palustris crecida aeróbicamente, equivalentes a 18 mg de proteína. Una vez eluída las proteínas se recogieron fracciones de 2ml cada una. La actividad específica del extracto original cayó de 33,91 unidades (mg de proteína)$^{-1}$ a 17,92 unidades (mg de proteína)$^{-1}$.

El extracto filtrado se incubó con alícuotas (0,2 ml) de las fracciones que contiene sustancias de bajo peso molecular y se determinó actividad de ALA-S. Se efectuaron las correcciones necesarias por el exceso de buffer fosfato agregado. Valen las mismas consideraciones de las relaciones que para el item X del capítulo anterior.

En la Figura 56 pueden verse los resultados obtenidos.

Se comprueba que la fracción de bajo peso molecular obtenida por filtración por geles activó al ALA-S de Rps. palustris crecida en forma aerobia, similar a lo que ocurre en los

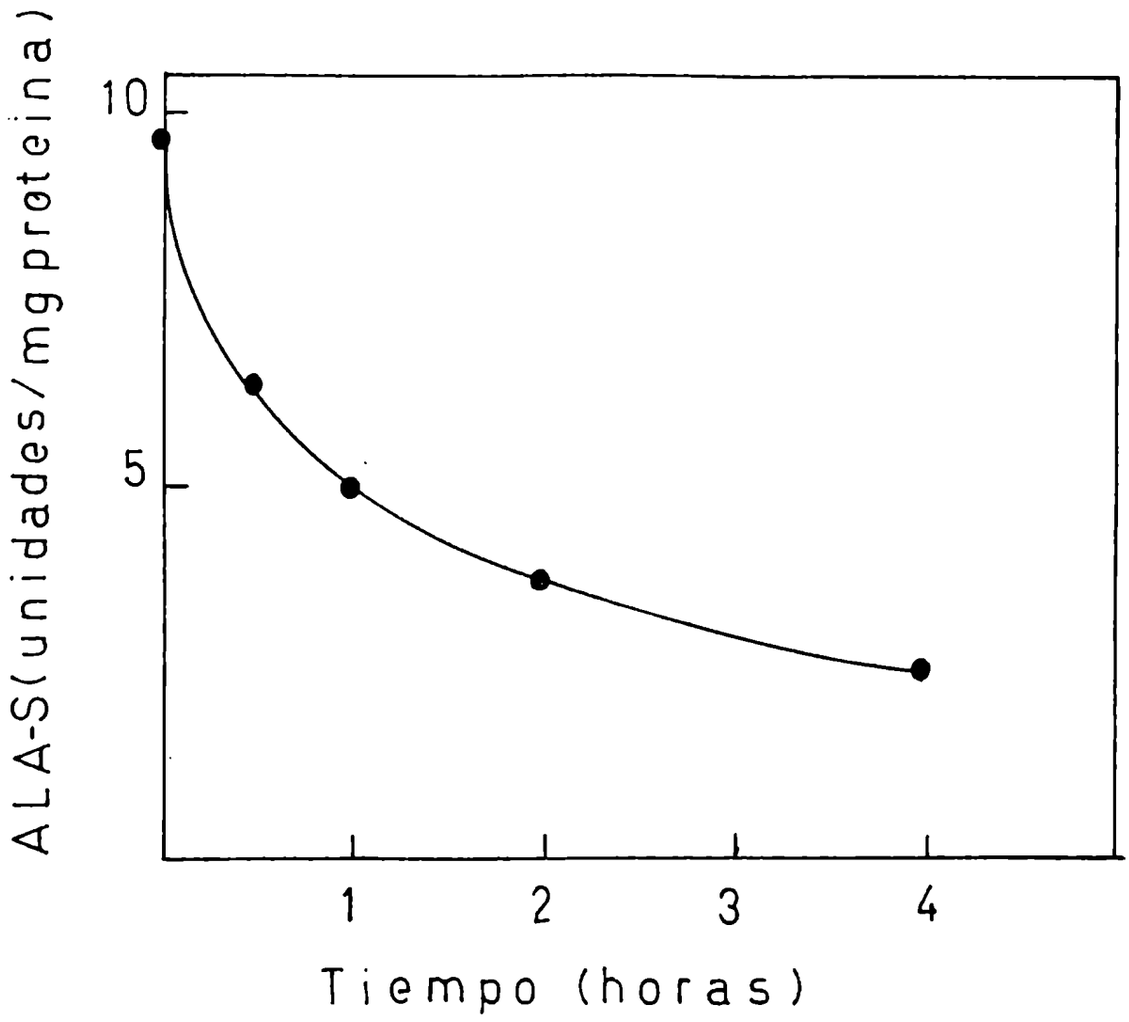


Figura 55: Efecto del almacenamiento a 37°C sobre la actidad del ALA-S en extractos crudos de Rps.palustris crecida aeróbicamente. Una suspensión bacteriana (27 mg de peso seco/ml) se sonicó de la forma habitual y se almacanó a 37°C. A los tiempos indicados se incubaron alícuotas (1,9 mg de proteína) en el sistema standard. Se determinó ALA y proteínas tal como se describe en Métodos.

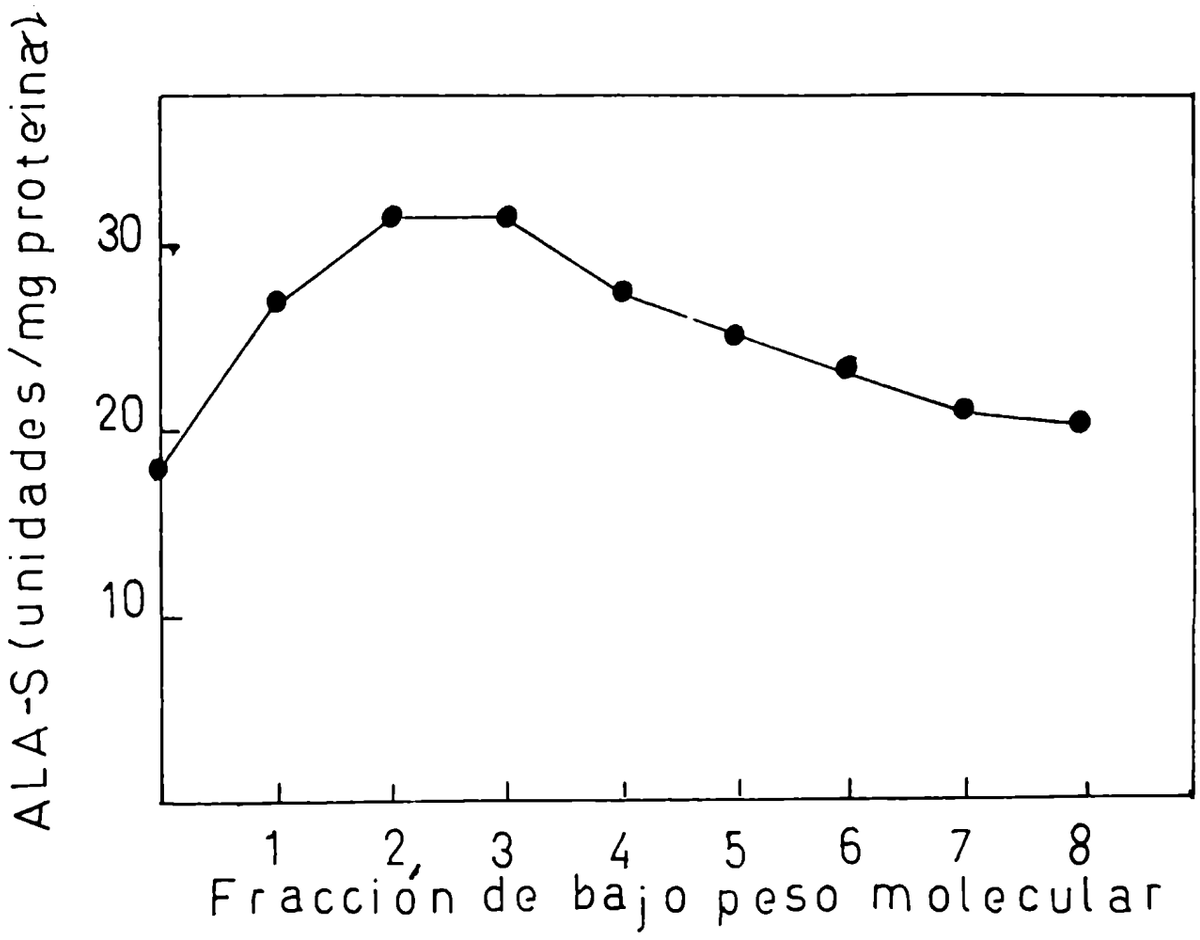


Figura 56: Efecto de adicionar eluido de bajo peso molecular de un extracto de Rps.palustris , crecido aeróbicamente, pasado por Sephadex G-25. Se sembraron 2,2 ml de extractos sobrenadante de Rps. palustris crecida aeróbicamente, equivalentes a 18 mg de proteina. Se eluyó la fracción proteica y se recogieron posteriormente fracciones de 2ml. Se ensayó la actividad de ALA-S con 0,65 mg de proteina, en presencia de alícuotas de estas fracciones. Se midió ALA y proteínas tal como se describe en Métodos. Las fracciones de bajo peso molecular no tenían actividad de ALA-S.

extractos de células crecidas anaeróbicamente. La activación producida llevó los niveles enzimáticos a valores comparables a las medidas en el extracto sin filtrar.

No se dispone, por el momento, de ninguna evidencia sobre la estructura de este compuesto activador.

VI. Constante de Michaelis para glicina

Se determinó la constante de Michaelis del ALA-S de Rps.palustris crecida aeróbicamente en oscuridad, para glicina, con el objeto de comparar el valor obtenido para la enzima de células crecidas fotosintéticamente.

En la Figura 57 pueden verse el gráfico de Lineweaver-Burk de los resultados obtenidos, de las actividades del ALA-S en función de la concentración de glicina, manteniendo constante la concentración del resto de los componentes del sistema de incubación.

El valor de Km para glicina resultó ser 15,38 mM, idéntico al valor obtenido para el ALA-S de células crecidas fotosintéticamente.

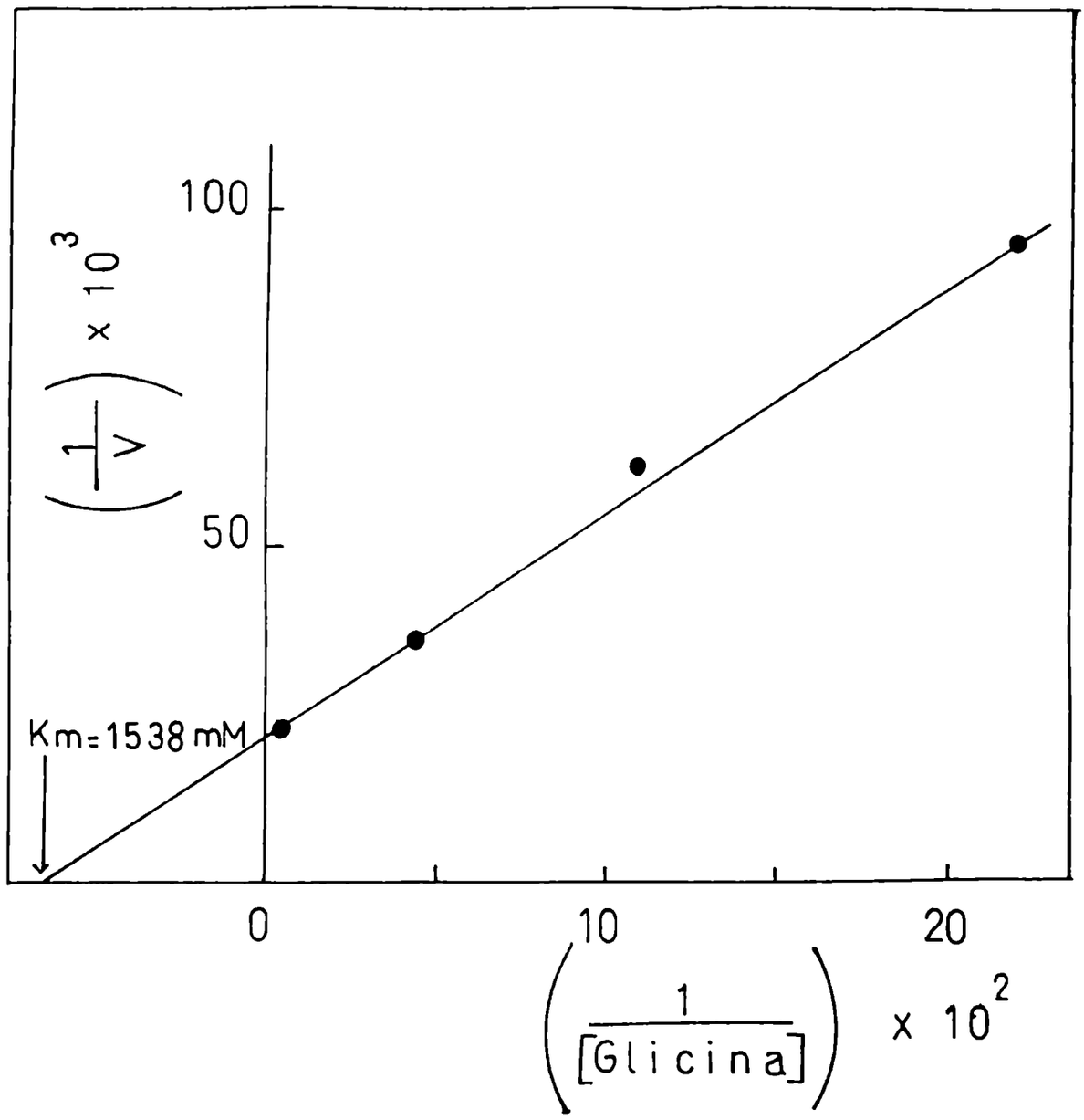


Figura 57: Representación de Lineweaver-Burk para la determinación del Km de glicina del ALA-S de Rps. palustris crecida aeróbicamente. Se incubaron 0,95 mg de proteínas, alícuotas de un sobrenadante de 140.000 xg, en presencia de cantidades variables de glicina, manteniendo constante el resto del sistema de incubación. Se determinó ALA tal como se indica en Métodos.

DETECCION EN CELULAS DE *Rhodopseudomonas palustris* CRECIDAS AEROBICAMENTE EN OSCURIDAD DE UN ACTIVADOR DEL ALA-S DE CELULAS CRECIDAS FOTOSINTETICAMENTE

Dado que la actividad específica del ALA-S de Rps. palustris crecida aeróbicamente en oscuridad es menor que la de células crecidas fotosintéticamente, se investigó la posibilidad de que en el primer tipo de células existiera un inhibidor de la misma. Para ello se efectuaron incubaciones de mezclas de extractos, sobrenadantes de 15.000xg y de 140.000xg, provenientes de ambos tipos de células, y de diversas cosechas de las mismas.

En la Tabla XVI se muestran los resultados obtenidos en varias experiencias al incubar diferentes mezclas de distintos extractos.

Se comprobó que el buffer fosfato afecta al ALA-S de células crecidas aeróbicamente de la misma forma que al de células fotosintéticas, por lo que en todos los casos se corrigió la actividad por el exceso de buffer fosfato agregado. Las mezclas de extractos se hicieron manteniendo una relación 1:1,5 de proteínas de células crecida. fotosintéticamente a proteínas de células aerobias. Las incubaciones se realizaron en el sistema standard y se determinó ALA tal como se describe en Métodos. El total de proteínas incubadas osciló entre 1,5 y 2,0 mg.

Se comprobó que la actividad fue estimulada al incubar mezclas de extractos, descartando esto la posibilidad de la existencia de un inhibidor del ALA-S en células de Rps.palustris crecida quimioheterotróficamente.

A fin de compro ar si existía una activación espontánea del ALA-S a 0-4°C ya la luz en mezclas de extractos crudos de células de Rps. palustris crecida tanto fototrófica como quimitróficamente se hicieron mezclas de extractos sonicados de ambos tipos de células y de extractos sobrenadantes de 15.000xg, las que se almacenaron a dicha temperatura y condiciones.

En la Figura 58 se muestran los resultados obtenidos de almacenar una mezcla de extractos no centrifugados. Es de destacar que la mezcla de extractos no centrifugados no mostraba activación de la enzima. El extracto proveniente de células crecidas fototróficamente formaba 32,94 nmoles ALA/h en el sistema standard de incubación; el proveniente de células crecidas aeróbicamente formaba 23,26 nmoles/h. La mezcla de ambos extractos produjo 58,74 nmoles ALA/h, contra 56,20

TABLA XVI

Mezcla de extractos	% de actividad sobre el valor teórico(suma)		
	Experiencia 1	Experiencia 2	Experiencia 3
15F + 15A	24	28	22
15F + 140A	38	31	16
140F + 15A	25	42	39
140F + 140A	27	50	47

Activación obtenida al incubar mezclas de distintas extractos provenientes de células de Rps. palustris crecida aeróbica y anaeróbicamente.

Siglas: 15 F : sobrenadante de 15.000xg de dcélulas crecidas fotosintéticamente.

140 F : Sobrenadante de 140.000xg de células crecidas fotosintéticamente.

15 A : Sobrenadante de 15.000xg de células crecidas aeróbieamente en oscuridad.

140 A : Sobrenadante de 140.000xg de células crecidas aeróbicamente en oscuridad.

Se incubaron en conjunto 1,5 - 2,0 mg de proteínas, según la experinecia, en el sistema standard. Se determinó ALA según se describe en Métodos.

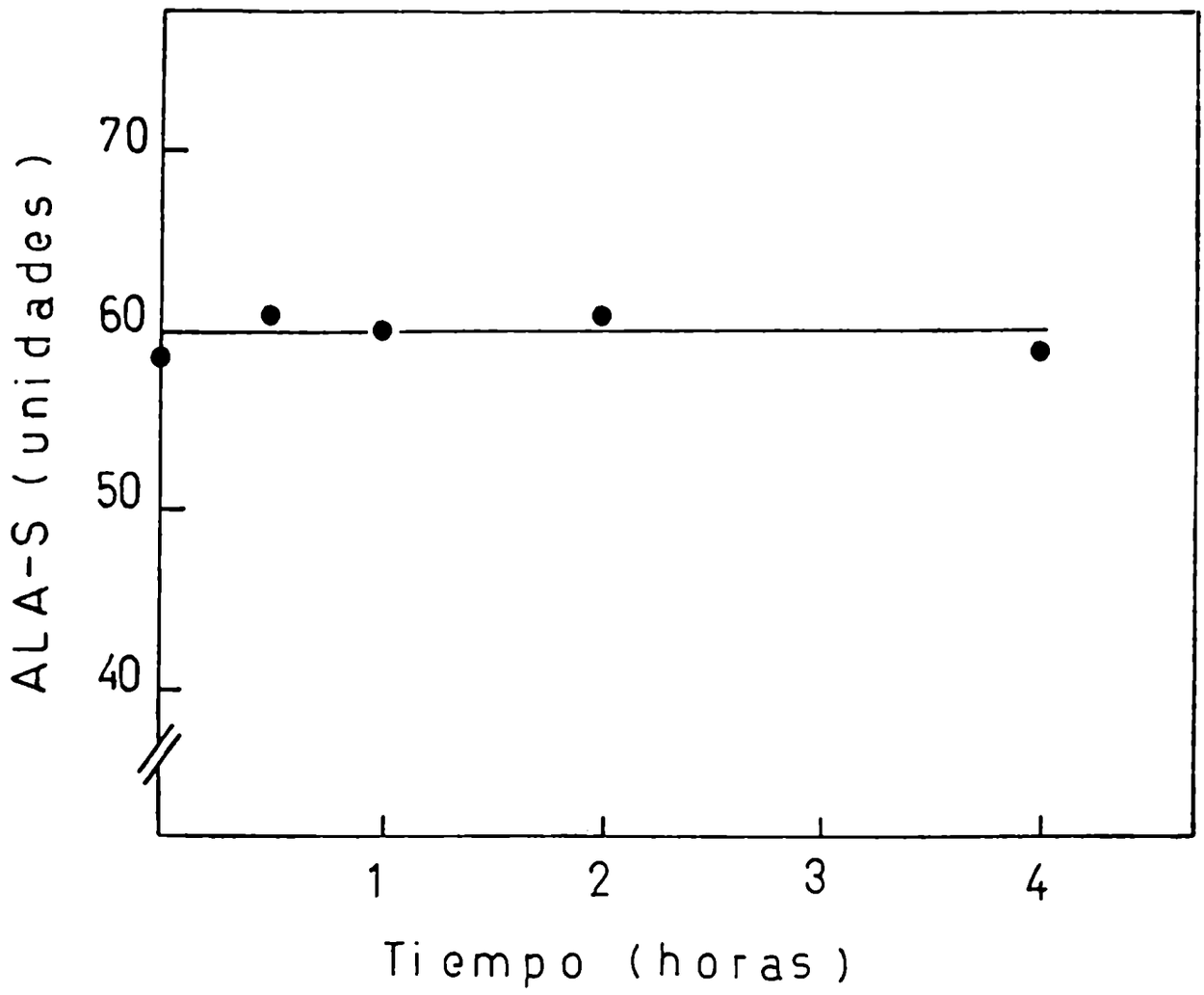


Figura 58: Efecto de almacenar a 0-4°C y a la luz una mezcla de partes iguales de extractos sonicados de células de Rps.palustris crecidas en condiciones fotosintéticas y en aerobiosis. A los tiempos indicados se tomar alícuotas(4,0 mg de proteína) las que se incubaron en presencia del sistema standard. Se determinó ALA según se describe en Métodos.

n moles ALA/h que sería el valor teórico, suma de las actividades de ambos extractos por separado.

Dada la falta de activación del ALA-S en la mezcla de extractos no centrifugados, se decidió investigar si existía variación en función del tiempo de la actividad del ALA-S en mezclas de extractos sobrenadantes de 15.000xg. En este caso, al mezclar los extractos se encontró una activación del 29% (similar a lo mostrado en la Tabla XVI para mezclar 15F + 15A). El extracto sobrenadante de 15.000xg de Rps. palustris crecida fotosintéticamente produjo 22,35 n moles ALA/h en el sistema standard, mientras que el proveniente de células aerobias produjo 21,76 n moles ALA/h. La mezcla produjo 57,09 n moles ALA/h contra los 44,11 n moles/h esperados de la suma de actividades de ambos extractos. Esto significó el aumento del 29%, similar a los métodos en la Tabla XVI. En la Figura 59 puede verse los resultados obtenidos por almacenamiento de la mezcla de partes iguales en volumen de extractos centrifugados a 15.000xg. Luego de la activación inicial provocada por la mezcla de extractos, la actividad del ALA-S permaneció constante.

Como ya se demostró, en ambos tipos de células existen activadores de bajo peso molecular, separables de las fracciones proteica mediante Sephadex G-25. Es entonces, posible suponer que el efecto estimulativo de la actividad enzimática obtenido en las mezclas de extractos fuera debido a que en las incubaciones existía una mayor concentración del activadores , por lo que se decidió hacer las siguientes experiencias. Se efectuaron incubaciones de diferentes extractos, adicionados de otros extractos calentados 5 minutos a 70°C . En este caso, de ser termoestables los activadores, su mayor concentración produciría el mismo efecto que el mostrado en la Tabla XVI .

En la Tabla XVII pueden verse los resultados obtenidos. En las experiencias en las cuales se incubaron extractos enzimáticos provenientes de células crecidas en condiciones fotosintéticas con extractos calentados de células crecidas aeróbicamente hubo en promedio un 50% de estimulación de la activadad del ALA-S. En camio, al incubar extractos de células crecidas quimioheterótroficamente con extractos calentados de células crecidas fotosintéticamente no hubo, en promedio,

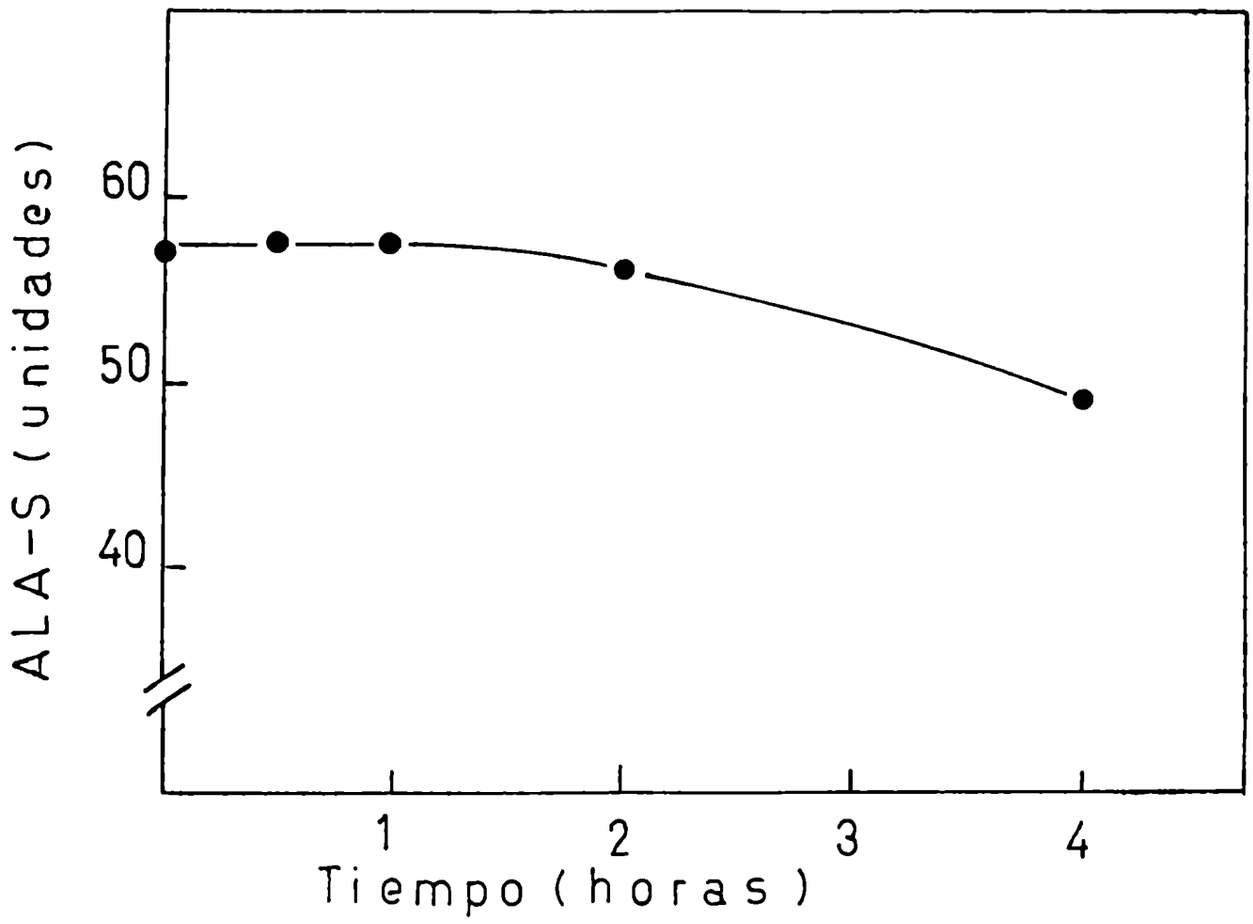


Figura 59: Efecto de almacenar a 0° 4°C y a la luz una mezcla de extractos sobrenadantes de 15.000xg de células de Rps. palustris crecidas tanto fotosintéticamente como aeróbicamente. La mezcla se hizo en una relación de 8 mg de proteínas de extractos de células fotosintéticas por 14 mg de proteinas de extractos de células aerobias. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas (2,2 mg de proteínas) que se incubaron en el sistema standard por una hora a 37°C. Se determinó ALA y proteínas según se describe en Métodos.

TABLA XVII

Mezcla de extractos	% de actividad sobre el valor teórico		
	Experiencia 1	Experiencia 2	Experiencia 3
15 F + 15 AØ	68	45	35
15 F + 140AØ	36	43	35
140 F + 15 AØ	56	51	48
140 F + 140AØ	60	49	56
15 A + 15 FØ	1	2	-3
15 A + 140FØ	1	6	2
140 A + 15 FØ	-5	-2	-1
140 A + 140FØ	-4	8	0

Activaciones bobtenidas al incubar distintos extractos provenientes de células de Rps. palustris

, mezclados con diferentes extractos calentados 5 minutos a 70°C. La siglas como en el Tabla XVI .

El símbolo Ø indica que el extracto había sido calentado. Los extractos calentados no tenían actividad de ALA-S .

Se incubaron de los extractos denominados 15 F,entre 0,64 y 0,90 mg de proteína según la experiencia; para los llamados 140 F entre 0,4 mg- 0,8 mg de proteína. En los denominados 15A se incubaron [illegible] -1,3 mg de proteína ; en los llamados 140 A se incubaron entre 0.75 y 1,0 mg de ptoteínas.

estimulación de la actividad enzimática.

Esto demuestra que en los extractos de células crecidas aeróbicamente existía un activador del ALA-S que era termoestable. En los de células crecidas fototróficamente, o bien este activador no tenía acción sobre la enzima de células aerobias o bien no resistía el tratamiento térmico.

Dada esta falta de activación del ALA-S de células de Rps. palustris crecidas aeróbicamente por extractos calentados de células crecidas fotosintéticamente, se hizo necesario decidir si existía en estos extractos un activador sensible al tratamiento térmico o bien que simplemente no existía ninguno.

Para ello se obtuvo mediante filtración por sephadex G-25 fracciones de bajo peso molecular sin proteínas y se las incubó con extractos enzimáticos no filtrados por Sephadex.

Se armó una columna de Sephadez G-25de 1cm de diámetro por 20 cm. de alto, equilibrada con buffer fosfato de sodio y potasio 0,05 M pH 7,4. Por ella se filtraron 8,5 mg de proteína de extracto sobrenadante de 140.000xg de Rps. palustris crecido fotoheterotróficamente en un volumen de 2,15 ml y 19 mg de proteína de extracto sobrenadante de 140.000 xg de células crecidas en aerobiosis y oscuridad. Una vez eluídas las fracciones proteicas se recogieron fracciones de 2ml. Estas demostraron no tener actividad de ALA-S. El extracto proveniente de células crecidas fotoheterotróficamente se incubó con las diversas fracciones de bajo peso molecular provenientes del filtrado del extracto de células crecidas aeróbicamente, mientras que el extracto de las células aerobias se ensayó en presencia de las diversas fracciones de bajo peso mlmolecular obtenidas del filtrado del otro extracto. Las incubaciones se hicieron en el sistema standard, con la adición de 0,2 ml de fracción de bajo peso molecular, y las actividades fueron corregidas por el exceso de buffer fosfato. En la Figura 60 pueden verse los resultados obtenidos.

Las fracciones de bajo peso molecular de células aerobias estimulan al ALA-S de células crecidas fotosintéticamente hasta un 45% en algunos casos, mientras que las mismas fracciones pero aisladas de células crecidas fotosintéticamente no estimulan al ALA-S de extractos de células aerobias. Esto está

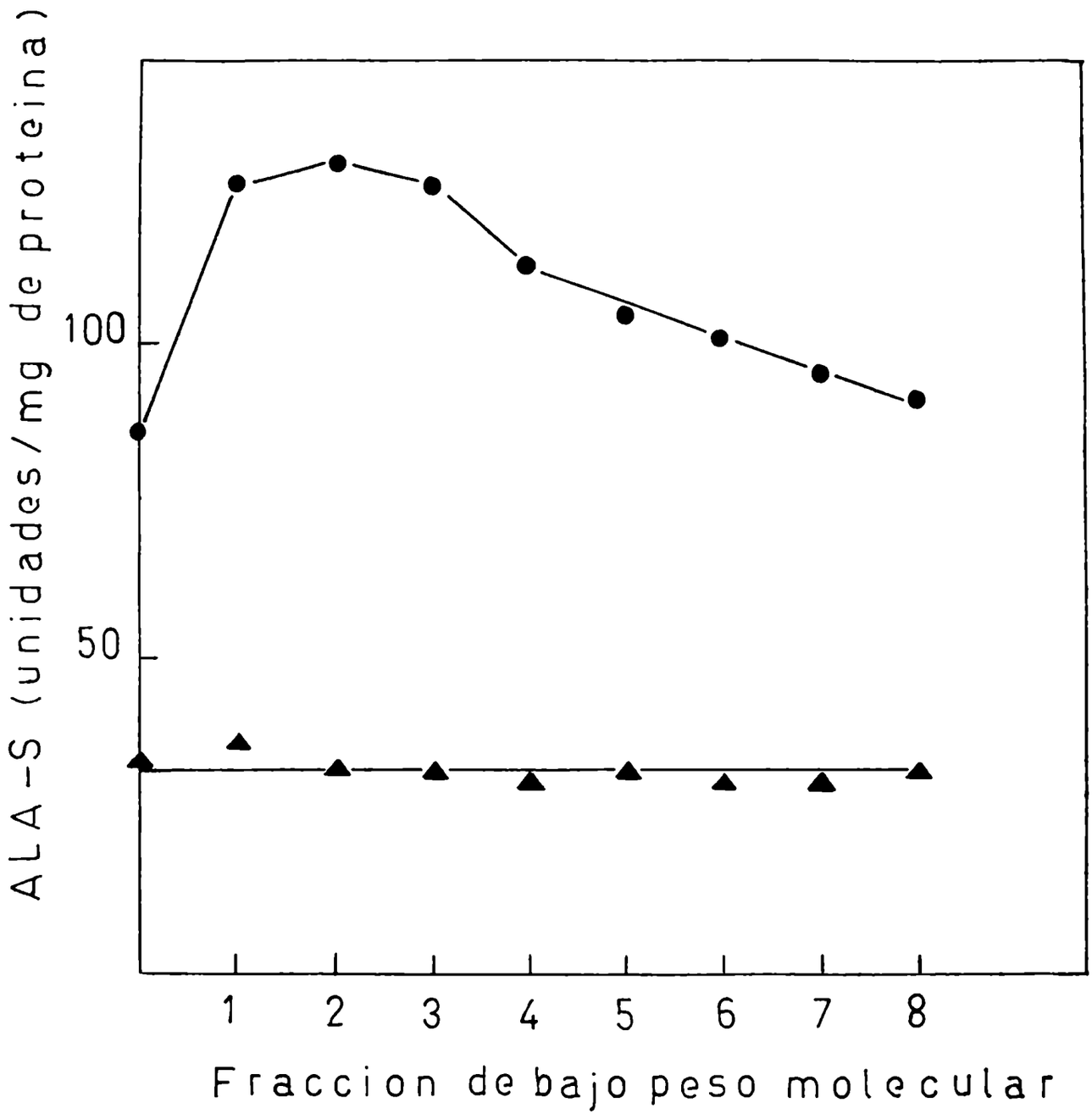


Figura 60: Acción sobre el ALA-S en extractos sobrenadantes de 140.000xg de fracciones de bajo peso molecular obtenidas por filtración por Sephadex G-25. Sobrenadante de 140.000xg' de células de Rps. palustris crecidas fotosintéticamente adicionadas de alícuotas de fracciones de bajo peso molecular provenientes de células crecidas aeróbicamente.(●)
Sobrenadante de 140.000 xg de células crecidas aerobicamente adicionadas de alícuotas de fracciones de bajo peso molecular provenientes de células crecidas fotosintéticamente.(▲)

de acuerdo con los resultados vistos ya en la Tabla XVII.

Debe concluirse de todos los resultados presentados que en ambos tipos de células hay activadores del ALA-S pero que el de células fotosintéticas no actúa sobre la enzima de células aerobias.

ADAPTACION DE *Rhodopseudomonas palustris*

A CONDICIONES AEROBIAS

Rps.palustris es una es una bacteria anaerobia facultativa, que al crecer en condiciones fotosintéticas, o sea, anaerobiosis y a la luz forma un sistema membranoso intracitoplasmático y junto con él, grandes cantidades de bacterioclorofila a. Al crecer aeróbicamente y oscuridad este sistema membranoso no se forma tal como ya se demostró en los cortes ultrafinos mostrados en las Figuras 28 y 29.

Por otra parte cuando la bacteria crece en condiciones aeróbicas, y oscuridad, el nivel del ALA-S es aproximadamente un 50% del detectado en bacterias crecidas fotosintéticamente.

Rps.palustris es posiblemente el miembro más cosmopolita de la familia Rhodospirillacea. pudiéndola encontrar en zonas anaerobias de lagos estratificados o en corrientes de agua que están oxigenadas, siempre que en ellos exista materia orgánica, y una concentración de $S^{=}$ lo suficientemente baja como para no inhibir su desarrollo. Resulta por todo esto, interesante contar con alguna experiencia que muestra la capacidad de adaptación de la bacteria de condiciones anaerobias a aerobias y viceversa. Por otra parte, desde el punto de vista biosíntesis de la BChl sería importante decidir en que punto de la biosíntesis afecta la presión de oxígeno y en cual la luz.

Con estas ideas se investigó el efecto del oxígeno sobre los niveles de ALA-S y BChl en cultivos de Rps. palustris crecidas fotosintéticamente.

I. Efecto del origen sobre el cultivo bacteriocloro-fila y niveles enzimáticos

En estas experiencias se cultivó Rps. palustris en condiciones fotosintéticas en un frasco Erlenmeyer sin agitación , lleno hasta casi el tope y tapado con tapón esmerilado, lo que aseguraba condiciones de anaerobiosis, que si bien no eran estrictas, no afectaban significativamente los niveles de ALA-S y contenido específico de BChl.

En la primer experiencia al cultivo así obtenido (5 litros) se le burbujeó aire a un flujo de 3 litros/min, y a la luz (50 bujías -pie). En la Figura 61 puede verse la

evolución del cultivo durante el burbujeo de aire. Se determinó el crecimiento por medida de la absorbancia a 680nm, ALA-S y BChl.

Para la medición del ALA-S se tomaron muestras a diversos tiempos; se centrifugaron las células, se lavaron rápidamente e inmediatamente se sonicaron de la forma habitual y se incubaron sin centrifugar. Esto se hizo para reducir al mínimo toda posible alteración de la actividad enzimática en caso de formarse compuestos que pudieran afectarla. Para calcular la actividad específica del ALA-S se consideraron las proteínas del extracto sobrenadante de 15.000xg, a fin de hacer los valores comparables a otras experiencias. Esto está justificado en base a los resultados de la Tabla II donde se demostró que casi no existe actividad medible de ALA-S en el precipitado de 15.000xg. Se mantuvo siempre la concentración de célula a sonicar entre 30-40 mg de peso seco/ ml de suspensión.

De la Figura 61 se deduce que el burbujeo de aire al cultivo de *Rps. palustris* ocasionó un inmediato cese de la síntesis de BChl, lo que, al crecer el cultivo, provocó una disminución del contenido específico de la misma. Por otra parte la actividad de ALA-S decayó un 50% en 4 horas de burbujeo de aire. Esto puede interpretarse como una inhibición de la enzima por el oxígeno o bien como una inmediata una inhibición de la síntesis de nueva enzima y degradación de parte de la existente. El decaimiento de la actividad del ALA-S fué paralelo al del contenido específico de BChl.

A fin de investigar el efecto de una mayor concentración de oxígeno en el burbujeo que la presente en el aire se preparó un cultivo de la misma forma que la anteriormente descripta y se burbujeó con una mezcla de O_2 95% N_2 5% a razón de 3 litros /min. A diferentes tiempos se hicieron determinaciones de absorbancia del cultivo, BChl y ALA-S. Nuevamente se prepararon rápidamente las células lavadas obtenidas en la muestra las que se sonicaron de la forma habitual y se incubaron alícuotas, como en la experiencia anterior. En la Figura 62 pueden verse los resultados obtenidos.

Nuevamente la síntesis de BChl cesó inmediatamente de iniciado el burbujeo; el contenido específico de BChl decayó también debido al crecimiento del cultivo. El ALA-S decayó también un 50% en forma casi paralela al decaimiento del contenido específico de BChl.

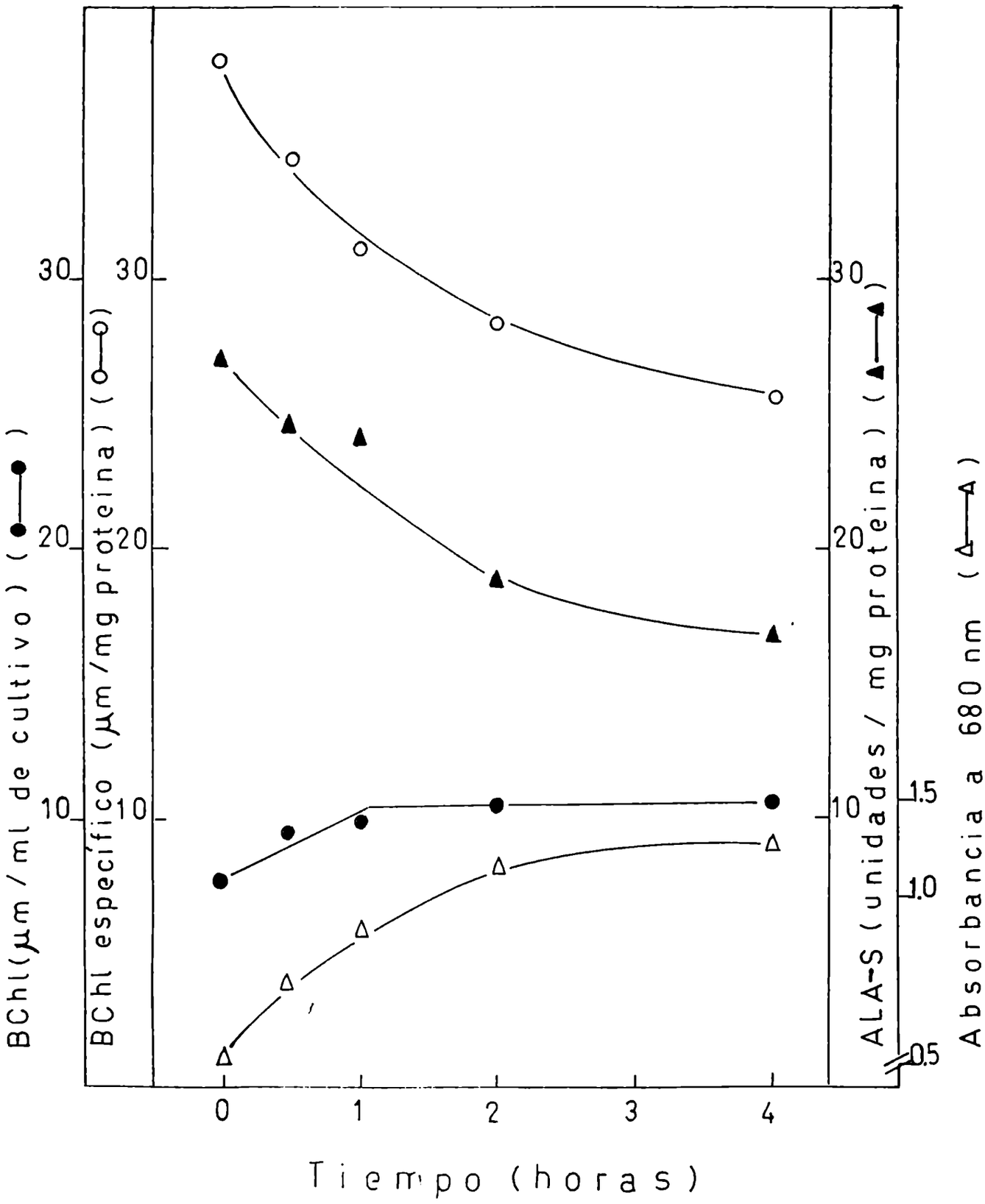


Figura 61: Evolución de un cultivo de Rps. palustris crecido fotosintéticamente y sometido a una aereación de 3 litros/minuto. A los tiempos indicados se tomaron muestras que se centrifugaron, lavaron y sonicaron de la forma habitual. Inmediatamente se incubaron alícuotas de los extractos sonicados en el sistema standard por 60 minutos a 37ºC. Se determinó ALA, proteínas y BChl tal como se indica en Métodos.

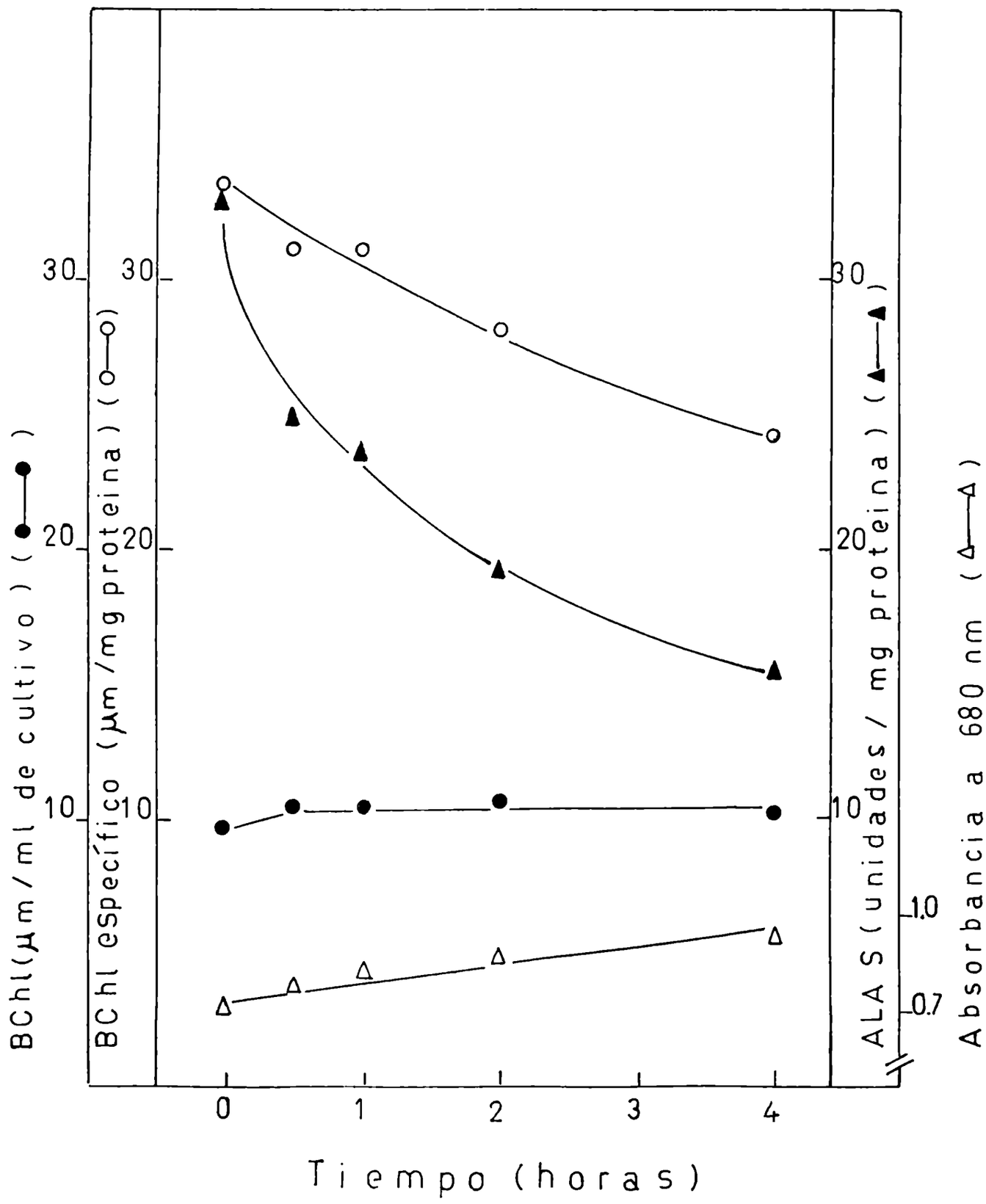


Figura 62: Evolución de un cultivo de Rps. palustris crecido fotosintéticamente y sometido a un burbujeo de O_2 95% - N_2 5% a razón de 3 litros/min. A los tiempos indicados se tomaron muestras, en las que se determinó ALA-S, BChl y proteínas. Las indicaciones son similares a las de la Figura 61.

Con el objeto de investigar el comportamiento del ALA-S y del nivel de BChl en células que están siendo oxigenadas a la luz, al suprimirse el burbujeo de oxígeno, se cortó el mismo a las 4 horas y se dejó el cultivo bacteriano sin agitación y bajo una iluminación de 50 bujías-pie. A determinados tiempos se cosecharon muestras, las que se trabajaron de forma ya descripta. Se midió ALA-S. BChl y la absorbancia del cultivo a 680 nm. En la Figura 63 pueden verse los resultados obtenidos.

Se puede ver que el ALA-S aumentó su actividad. Aunque no se produjo incremento del contenido total de BChl del cultivo se produjo un ligero incremento de su contenido específico.

Esta rápida adaptación de los niveles enzimáticos del ALA-S a los cambios ambientales sugieren un rol regulatorio importante para esta enzima. Los niveles específicos de BChl aumentan mucho más lentamente, aunque el cese del decaimiento es también una adaptación a la nueva condición.

El incremento de actividad del ALA-S luego de cortado el burbujeo de la mezcla de O_2- N_2 puede deberse, o bien, a un incremento de la cantidad de enzima, o bien a una activación por algún tipo de metabolito, de la enzima inhibida por el O_2 mediante algún mecanismo hasta ahora no conocido. En el primer caso el incremento de actividad sería afectado por la presencia de algún inhibidor de la síntesis proteica, mientras que en el segundo, él no se vería afectado.

Para decidir el tipo de proceso que interviene en la activación de la enzima se realizó una nueva experiencia similar a la anterior, donde se burbujeó $O_2$95% - N_2 5% a un flujo de 3 litros /min, tomando muestras a diferentes tiempos, en las que se determinó absorbancia a 680 nm, ALA-S BChl y contenido específico de BChl. Como siempre las muestras fueron ensayadas rápidamente a fin de evitar toda posible alteración de los niveles de los diversos parámetros, si es que hubiera sustancias que los afectaren formadas durante el tratamiento. La Figura 64 muestra la evoluación del cultivo durante la oxigenación.

Esta experiencia sólo confirmó los resultados anteriores: inmediatamente cesó la síntesis de BChl, comenzó a declinar la actividad específica de ALA-S y el contenido específico de

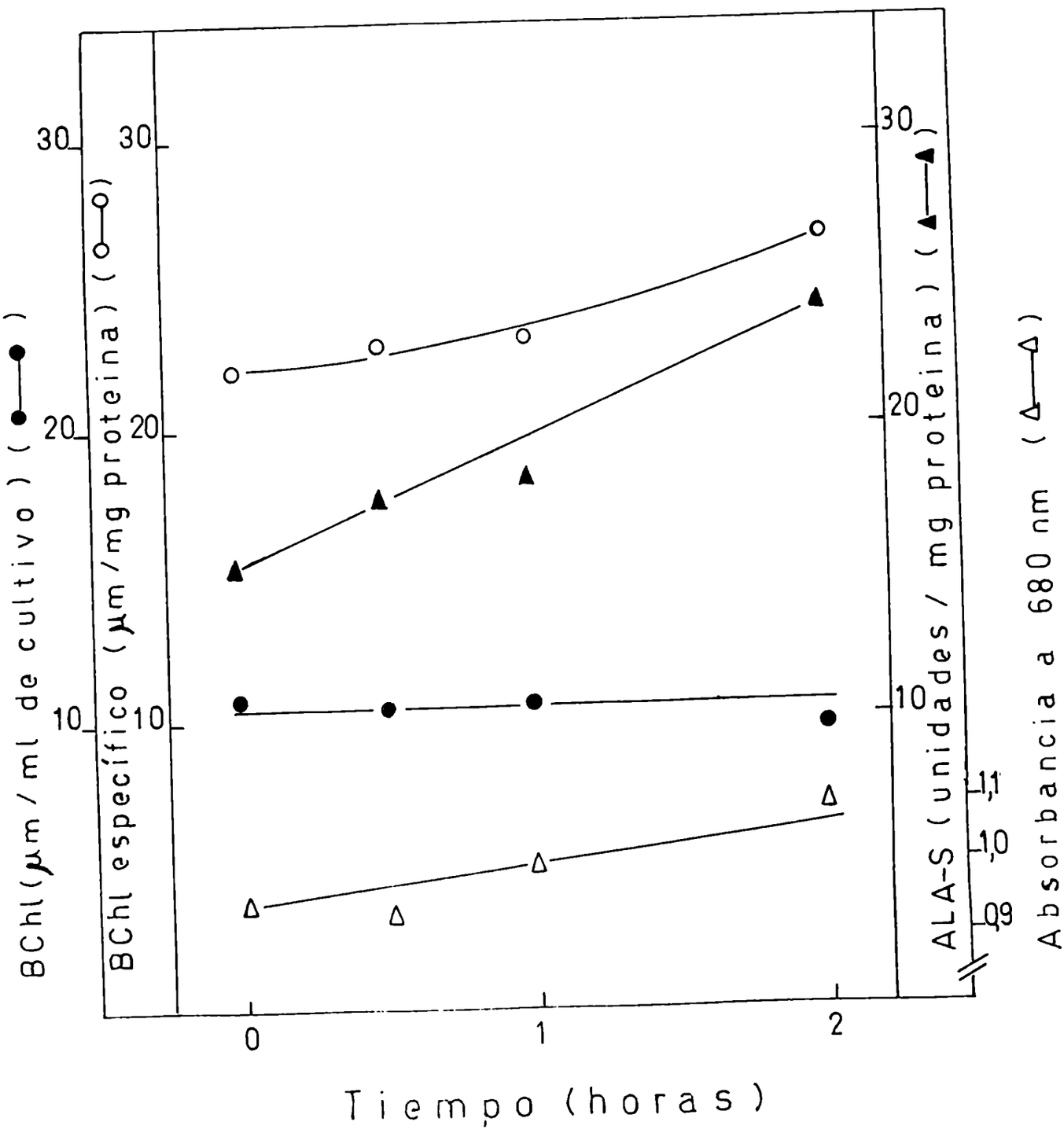


Figura 63: Efecto de la supresión del burbujeo de una mezcla de O_2 95% - N_2 5% sobre un cultivo de Rps. palustris a la luz. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas, las que se trabajaron como se indica en la Figura 61. Se determinó ALA-S, BChl, proteínas y absorbancia de las suspensiones, tal como se indica en Métodos.

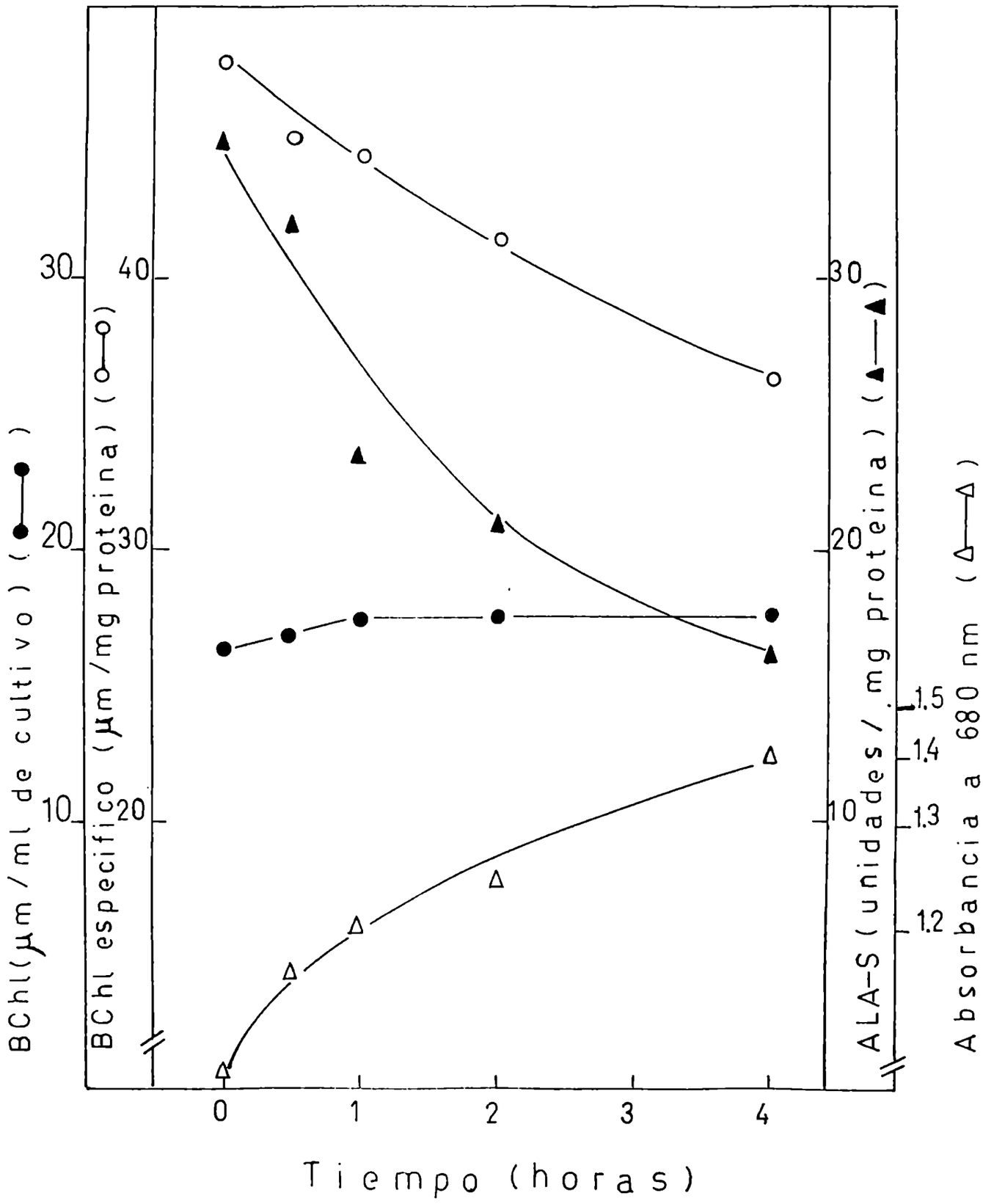


Figura 64: Evolución de un cultivo de Rps. palustris crecido fotosintéticamente y sometido a un burbujeo de O_2 95% - N_2 5% a razón de 3 l/minuto a la luz. A los tiempos indicados se tomaron muestras en las que se determinó absorbancia a 680 nm, ALA-S, BChl y proteínas tal como se indica en Métodos. Las indicaciones son similares a las de la Figura 61.

BChl declinó también en forma casi paralela a la caida del ALA-S, mientras que tanto el cultivo continuó su crecimiento.

Luego de ls cuatro horas de burbujeo de la mezcla de O_2-N_2, éste se cortó y se dividió al cultivo en dos partes, a una de las cuales se le agregó cloramfenicol a una concentración de 2mg/l y a la otra no. Los cultivos se dejaron a la luz y a determinados tiempos se tomaron muestras, las que se trabajaron de la forma habitual y se determinó en ellas absorbancia del cultivo a 880 nm.BChl, ALA-S y proteínas. En la Figura 65 puede verse los resultados obtenidos.

La presencia del cloramfenicol afectó al crecimiento del cultivo, pero no se afectó significativamente el contenido de BChl total. La actividad de ALA-S se incrementó hasta los valores normales tanto en presencia como ausencia del antibiótico. El contenido específico de BChl en las células luego de un corto lag, comenzó a crecer, aunque en forma mucho más lenta que el incremento de ALA-S.

La presencia de cloramfenicol no afectó los niveles enzimáticos del ALA-S cuando la enzima fue medida en extractos sonicados en el sistema standard adicionado o no de cloramgenicol 2 g/ml, que es la concentración usada en la experiencia, tal como puede verse en la Tabla XVIII .

Se midieron además los niveles de succinil-CoA-S y ALA-D en cultivos bacterianos sometidos a la oxigenación y posterior cese de la misma. En la Tabla XIX pueden verse los resultados obtenidos.

Los niveles de estas enzimas no se ven afectados por el tratamiento, lo que apoya la idea de que un punto regulatorio de la síntesis de BChl está a nivel del ALA-S.

Esta última experiencia demuestra que la recuperación de los niveles del ALA-S, en cultivos de Rps. palustris en la que se restablece la condición anaerobia, no implica síntesis de nuevas moléculas de enzima.

Cuando se oxigena un cultivo de Rps.sphaeroides en presencia de inhibidores de la síntesis proteica no decae la actividad del ALA-S (471). Para conocer el comportamiento de esta enzima de Rps. palustris en un cultivo bacteriano que se sometía a oxigenación en presencia de un inhibidor de la síntesis proteica, tal como cloramfenicol, se preparó un cultivo de la dorma habitual en estas experiencias, el cual se dividió en dos partes, a una de las cuales se le agregó cloramfenicol a una

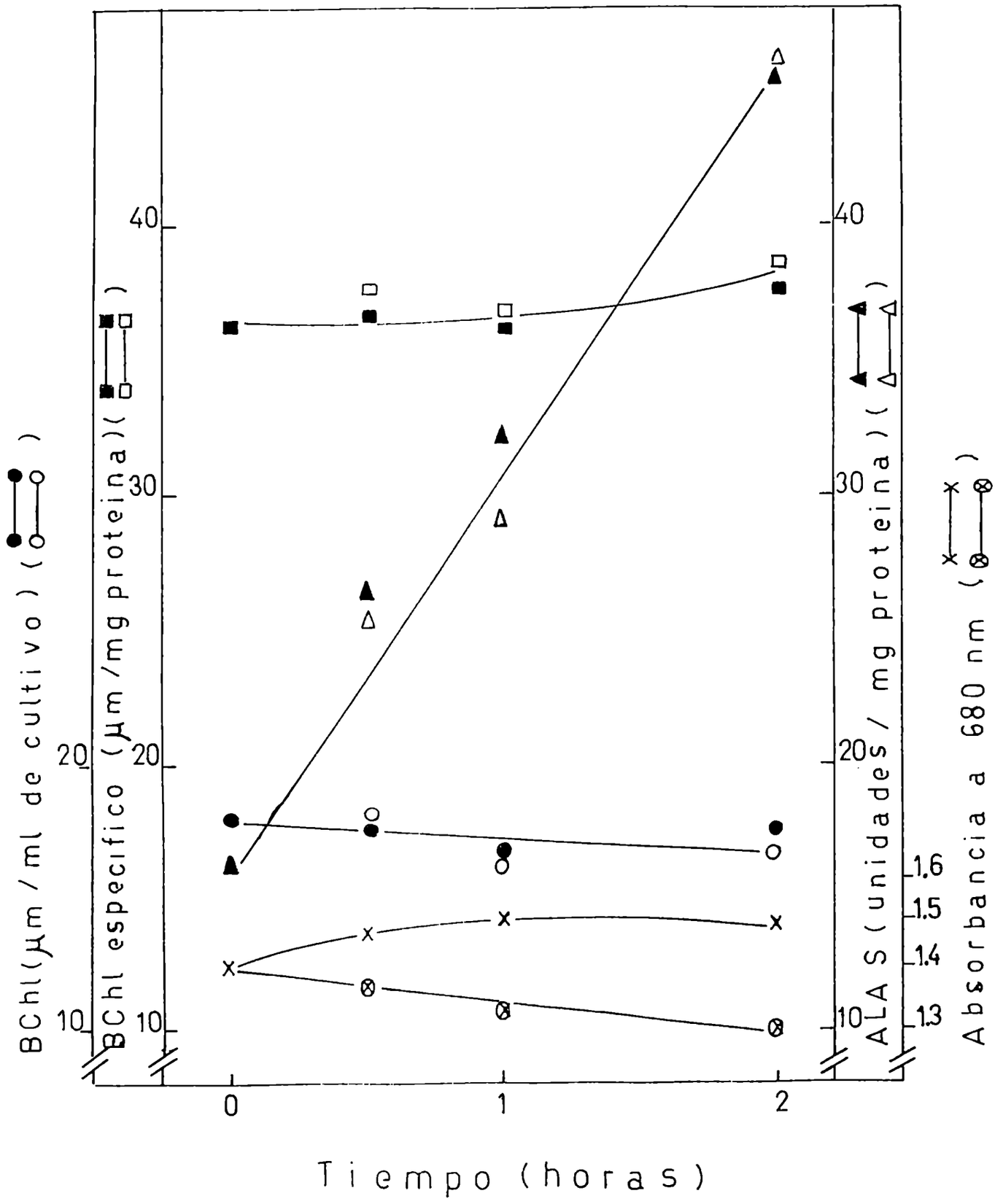


Figura 65: Efecto de la supresión del burbujeo de una mezcla de O_2 95% - N_2 5% sobre un cultivo de Rps. palustris a la luz, en ausencia (símbolos abiertos) y presencia (símbolos oscuros) de cloramfenicol 2 mg/l. A los tiempos indicados se tomaron muestras que se trabajaron según indicaciones de la Figura 61, y se determinó en ellas absorbancia a 680 nm, ALA-S, BChl y proteínas tal como se describe en Métodos.

TABLA XVIII

Tipo de células	cloranfenicol (2ug/ml)	ALA-S (unidades/mg de proteína)
Anaerobias	-	35,06
	+	36,19
Oxigenadas 4 hs	-	16,21
	+	15,30

Efecto de la adición de 2 ug de cloranfenicol al sistema standard de incubación, tanto en células crecidas fotoheterotróficamente como en las oxigenadas 4 hs. Se incubaron extractos recién sonicados de células de Rps. palustris (1,4 mg de proteínas en el caso de las células anaerobias y 1,6 mg en el de células oxigenadas) en el sistema standard con o sin el antibiótico, por una hora a 37ºC. La actividad específica está referida a las proteínas del sobrenadante de 15.000xg. Se determinó ALA y proteínas tal como se describe en Métodos.

TABLA XIX

Horas de tratamiento	Succinil-CoA-S (unidades/mg de proteína)	ALA-D (unidades/mg de proteína)
Oxigenación		
-	0,227	27,5
0,5	0,216	27,8
1	0,214	28,0
2	0,203	25,4
4	0,220	28,8
Cesa la oxigenación		
Sin cloramfenicol		
0,5	0,229	24,7
1	0,223	25,5
2	0,235	27,1
Con cloramfenicol		
0,5	0,212	19,9
1	0,220	23,5
2	0,237	23,4

Efecto de la oxigenación y posterior cese de la misma, en presencia o no de cloramfenicol 2 mg/l de cultivo, sobre los niveles de Succinil-CoA-S y ALA-D. Se determinó succinil-hidroxamato, PBG y proteínas tal como se describe en Métodos.

concentración de 2mg/ml; ambos cultivos se oxigenaron con una mezcla de O_2 95% - N_2 5% la razón de 3 a l/min.

En la Figura 66 puede verse la evolución de los vultivos y de los niveles de ALA-S en ambos casos. La presencia del antibiótico no afectó el decaimiento de la actividad enzimática producido por el oxígeno, aunque posteriormente, al cesar el burbujeo gaseoso, la recuperación de los niveles en cada uno fué muy diferente: en ausencia de cloramfenicol la actividad específica del ALA-S incrementó alrededor de 80% en 2 horas, mientras que en el cultivo oxigenado en presencia del inhibidor, la actividad incrementó sólo un 25% al cesar el burbujeo gaseoso. La presencia del cloramfenicol afectó al crecimiento del cultivo, pero en ambos casos al iniciarse la oxigenación cesó rápidamente la síntesis de BChl.

Esta experiencia demuestra que el antibiótico cloramfenicol no afectaba la inhibición del ALA-S por oxigenación de los cultivos de Rps. palustris, pero sí afectaba a la recuperación de los niveles enzimáticos al cesar el burbujeo gaseoso.

De estos resultados y de los mostrados en la Figura 65 puede concluirse que durante la oxigenación se forma un activador del ALA-S que actúa al cesar la mencionada oxigenación. Puede pensarse que en la oxigenación ocurre una inhibición de la enzima y, no un decaimiento del número total de moléculas.

II. Activación espontánea del ALA-S de células de Rps.palustris oxigenadas

El proceso de activación del ALA-S "in vivo" se debe a una activación de enzima preexistente y no a una formación de nueva enzima, tal como se deduce del tratamiento con cloramfenicol mostrado en la Figura 65.

Se trató de comprobar si en extractos de células de Rps. palustris oxigenadas por cuatro horas podría activarse espontáneamente el ALA-S.

En una experiencia previa se almacenaron por 2 horas extractos de células oxigenadas 4 hs, centrifugado a 15.000 xg

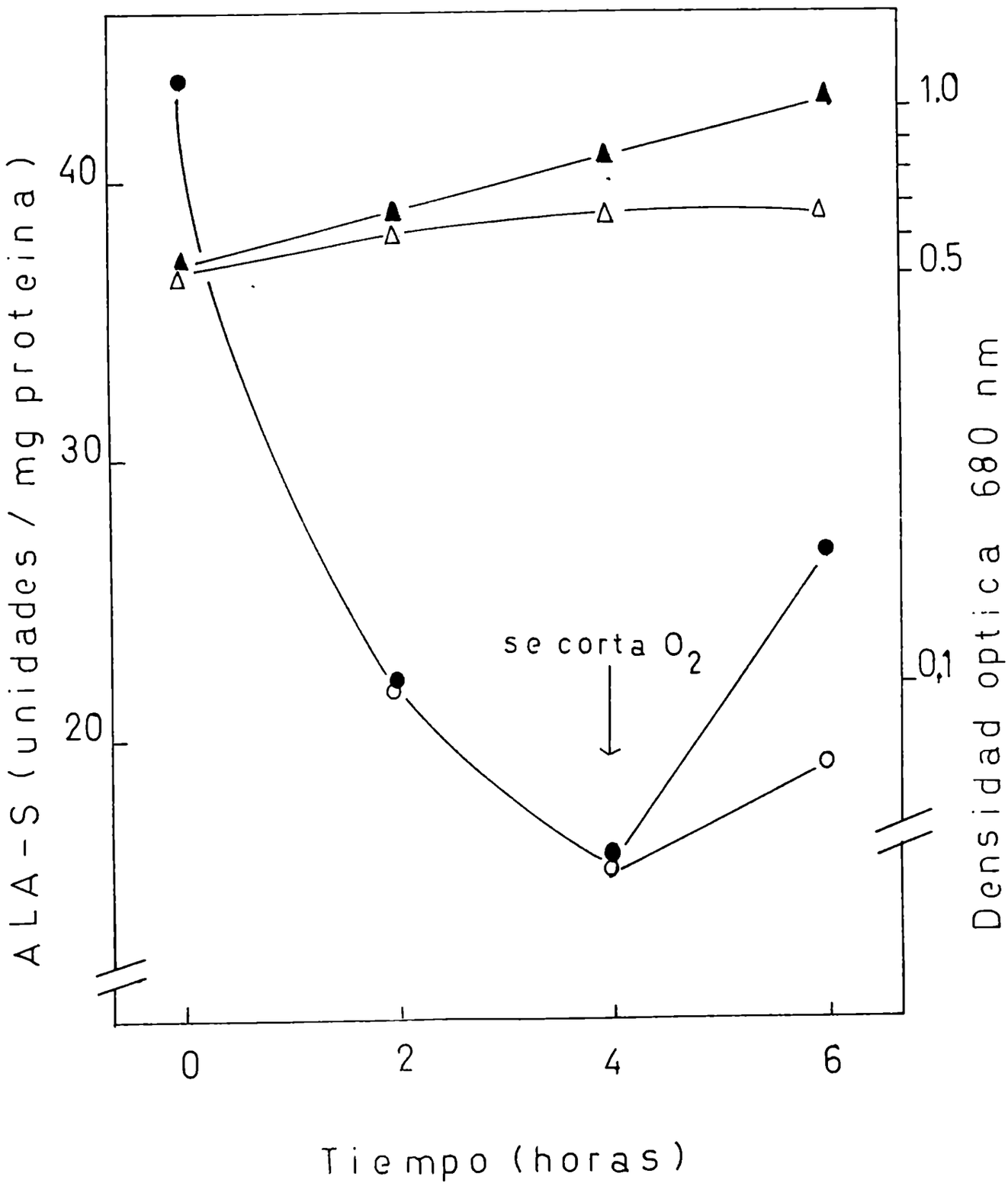


Figura 66: Efecto del burbujeo de una mezcla de O_2 95% - N_2 5% razón de 3 l/min. sobre un cultivo de Rps. pelustris crecido fotosintéticamente y posterior supresión del mismo, en presencia (símbolos abiertos) y ausencia (símbolos oscuros) de cloramfenicol 2 mg/l. A los tiempos indicados se tomaron muestras que se trabajaron según las indicaciones de la Figura 61. Se determinó absorbancia a 680 nm, ALA-S y proteínas tal como se describe en Métodos.

y no centrifugado. En el primer caso hubo un 40% de incremento de la actividad, mientras que en el extracto no centrifugado el incremento detectado fue del 10%.

En base a esto se decidió estudiar con algún detalle este proceso. Para ello se procedió a oxigenar un cultivo de Rps. palustris crecido según se han hecho las otras experiencias. A las 4 horas de burbujeo de oxígeno se cosechó una muestra que se lavó, resuspendió y sonicó rápidamente. Del sonicado una alícuota se diluyó a la mitad. Ambos extractos se incubaron inmediatamente en el sistema standard. Dado los resultados previos, el sonicado original y el diluido se centrifugaron a 15.000 xg y estos extractos centrifugados se almacé. dos horas a 0-4° C y a la luz, tomándose muestras para ensayar la actividad. En la Figura 67 se muestran los resultados obtenidos.

Pueden verse que el extracto no diluído se activó un 30% en dos horas, mientras que el diluído al medio casi no tuvo activación. Esto demuestra que es necesaria una concentración determinada del activador para producir el efecto.

Se midió además la posible formación de ALA en los extractos almacenados a 0-4° C comprobándose que no se había formado nada de dicho compuesto.

En estas condiciones el ALA-S se activa quizá por acción de una sustancia de bajo peso molecular formada durante la oxigenación.

Respecto del cultivo se repitieron todos los resultados mostrados en las Figuras 61,62, y 64. El ALA-S decayó un 40% en las 4 hs. de burbujeos de O_2 95% - N_2 5% , cesó la síntesis de BChl y la BChl específica decayó también un 30% lo que es similar a lo ya mostrado.

III. Modelos matemáticos del comportamiento del ALA-S.

El análisis de los datos delas experiencias anteriores permite comprobar que no hubo diferencias en burbujear aire o la mezcla de O_2 95% - N_2 5%, quizás debido a una rápida saturación de O_2 en el medio.

Por otra, parte, el decaimiento de la actividad específica siguió en todos los casos, y por un período de tiempo

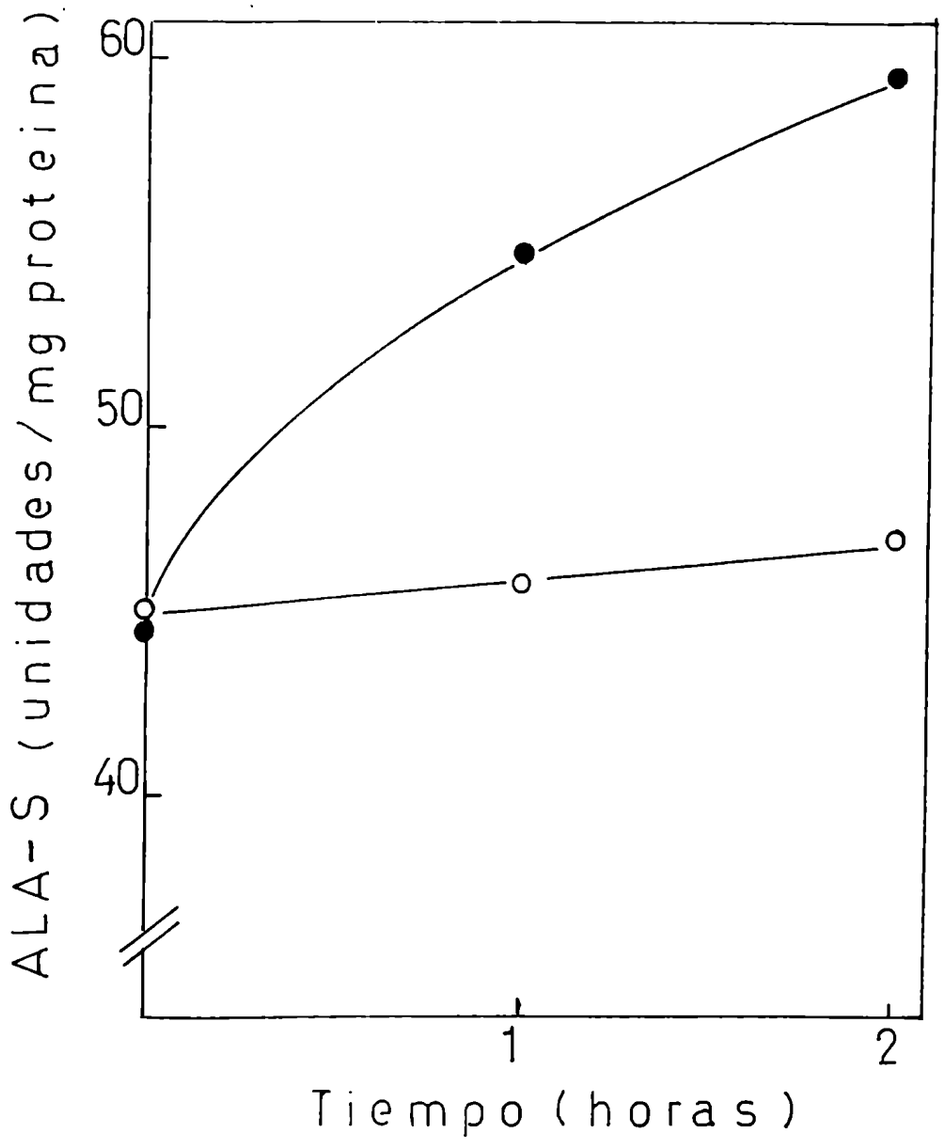


Figura 67: Efecto de almacenar extractos sobrenadantes de 15.000xg de mustras de Rps. palustris oxigenadas cuatro horas, no diluídos (●) ó diluídos al medio (o) enseguida de sonicar la suspensión (50 mg de peso seco/ml). Las actividades a tiempo cero se midieron en extractos sin centrifugar y la actividad específica se calculó en base a las proteínas de los extractos centrifugados. Las muestras tomadas a los tiempos indicados se incubaron 1 hora en el sistema standard a 37ºC. Se determinó ALA y proteínas tal como se describe en Métodos.

una ley exponencial.

Se estableció una ecuación empírica para calcular los valores de actividad de ALA-S en un determinado momentos, a partir del valor inicial. Tal ecuación es de la forma:

$$(ALA\text{-}S)_t = (ALA\text{-}S)_0 \, e^{-[\alpha t + (K - \beta t)^n]}$$

Con $(ALA\text{-}S)_t$ actividad específica del ALA-S a un tiempo t de burbujeo de oxígeno; $(ALA\text{-}S)_o$ actividad específica inicial; α, β, K y n son constantes que dependen de la especie bacteriana.

Para el caso de Rps.palustris los valores son $\alpha = 0{,}17\ h^{-1}$ $\beta = 0{,}25\ h^{-1}$ $K = 0$ $n=2$.

En la Tabla XX puede verse la concordancia entre los valores experimentales y los calculados mediante la ecuación empírica. Hasta las 2 horas hay concordancia entre los valores. A las 4 horas ya no existe. Este apartamiento del comportamiento real del previsto por el modelo implica que hubo una reducción de la velocidad de decaimiento de la actividad del ALA-S, ya sea porque se llegó a eliminar en 2hs. casi toda el ALA-S sensible al oxígeno o bien porque comenzó a aparecer algún factor que competía con el que provocaba el decaimiento, atenuando así la caída.

A título comparativo se analizaron los datos presentados por Marriot (471) de la oxigenación de un cultivo de Rps. sphaeroides y se compararon con el modelo matemático. En este caso los coeficientes son : $\alpha = 1{,}38\ h^{-1}$, $\beta = 0{,}50\ h^{-1}$, $K = 1$ y $n = 1$. En la Tabla XXI se comparan los valores experimentales con los calculados por la ecuación empírica.

Tampoco en este caso hay concordancia para los valores a 4 horas, pero en Rps. sphaeroides en 2horas de oxigenación se llega a los niveles enzimáticos presentes en células crecidas aeróbicamente, y por tanto ya no decae más.

Al cesar el burbujeo de oxígeno la actividad del ALA-S de Rps.palustris "in vivo" se incrementa en forma lineal según una ley

$$(ALA\text{-}S)_{t\text{-}ox} = (ALA\text{-}S)_{ox} + (0{,}87 + 75\ |\log A_{ox}|)_t$$

siendo $(ALA\text{-}S)_{t\text{-}ox}$ el valor de actividad específica del ALA-S a un tiempo t de cortado el burbujeo de oxígeno, $(ALA\text{-}S)_{ox}$ es el valor alcanzado por la actividad específica a las 4 horas

TABLA XX

Tiempo de aereación u oxigenación(hs)	ALA-S (unidades /mg proteina)					
	Experiencia 1 (aereación)		Experiencia 2 (oxigenación)		Experiencia 3 (oxigenación)	
	Observado	Calculado	Observado	Calculado	Observado	Calculado
0	27,2	-	33,1	-	35,1	-
0,5	24,9	24,7	25,1	29,7	32,0	31,5
1	24,5	21,8	23,8	23,5	23,5	27,7
2	19,0	18,5	19,2	18,3	21,1	19,3
4	15,9	5,1	15,4	6,7	16,2	6,5

Comparación de los valores de actividad específica de ALA-S medidos y calculados según la fórmula propuesta, para un cultivo de Rps.palustris que está siendo sometido a aereación u oxigenación.

TABLA XXI

Horas de oxigenación	ALA-S (unidades/mg proteina)	
	Observado	Calculado
0	580	-
0,5	125	130
1	80	88
2	35	37
4	30	6

Comparación de los valores de actividad específica del ALA-S medidos y calculados según la fórmula propuesta para un cultivo de Rps. sphaeorides que está siendo sometido a oxigenación. Datos experimentales de cita 47.

de oxigenación y A_{ox} es la absorbancia del cultivo oxigenado a 680 nm.

En la Tabla XXII se comparan los valores experimentales con los calculados.

Por supuesto que el modelo matemático vale sólo para las condiciones experimentales empleadas y no pretende generalizarse más allá. Es de destacar que una ecuación del tipo

$$X = a + b\,t$$

representa una reacción de orden cero.

El ALA-S de células oxigenadas de Rps. palustris se activa espontaneamente, como se demostró en la Figura 67 y esta activación es fuertemente dependiente de la concentración del extracto. En extractos de Rps. sphaeroides el ALA-S también sufre una activación espontánea aunque no es necesario oxigenar las células para que el proceso ocurra. Examinando las curvas de activación de ambas enzimas se llegó a la conclusión que siguen una ley exponencial, del tipo:

$$(ALA\text{-}S)_{ta} = (ALA\text{-}S)_i \; e^{[\alpha+\beta t]}$$

al menos durante el período en que se llega al valor máximo de actividad alcanzable por la activación espontáneas. $(ALA\text{-}S)_{ta}$ es la actividad específica del ALA-S a un determinado tiempo durante el proceso de activación. $(ALA\text{-}S)_i$ es la actividad enzimática específica inicial, tanto en extractos de células oxigenadas de Rps. palustris como el de células crecidas anaeróbicamente de Rps. sphaeroides.
α y β son constantes empíricas que dependen de las bacterias. En el caso de Rps. palustris son $\alpha = 0{,}18$ y $\beta = 0{,}1\ h^{-1}$; para Rps. sphaeroides los respectivos valores son $\alpha = 1{,}37$ y $\beta = 0{,}38\ h^{-1}$.

En la Tabla XXIII se muestra la concordancia entre los valores experimentales hallados para la activación espontánea del ALA-S de células de Rps. palustris oxigenadas y los valores calculados mediante la ecuación empírica.

A título comparativo se muestra en la Tabla XXIV los valores calculados mediante la fórmula propuesta y los

TABLA XXII

Tiempo de cortado el burbujeo de oxígeno (hs)	ALA-S (unidades / mg proteinas)					
	Experiencia 1		Experiencia 2		Experiencia 3	
	Observado	calculado	Observado	calculado	Observado	calculado
0	15,4	-	16,2	-	44,6	-
0,5	17,6	17,7	25,8	22,6	-	-
1	18,2	20,1	30,5	29,1	-	-
2	24,2	24,6	45,5	41,9	64,5	62,8

Comparación de los valores de actividad específica del ALA-S medidos y calculados según la formulación propuesta, para un cultivo de Rps. palustris oxigenado 4 hs. al cual se le suprimió el burbujeo gaseoso.

TABLA XXIII

Tiempo de almacenamiento (horas)	ALA-S(unidades /mg proteina)			
	Experiencia 1		Experiencia 2	
	Observado	calculado	Observado	calculado
0	44,1	--	40,1	--
1	57,6	58,0	54,1	54,8
2	65,3	64,1	59,8	59,5

Comparación de los valores de actividad específica medida durante la activaciôm espontánea del ALA-S de extractos de Rps.palustris oxigenadas durante 4 horas, con las calculadas mediante la fórmula propuesta. Los extractos se almacenaron a 4°C y ala luz.

TABLA XXIV

Tiempo de almacenamiento (hs)	ALA-S (unidades/ mg proteina)	
	Observado	calculado
0	90	--
0,25	350	390
0,50	435	430
0,75	450	471

Comparación de los valores de actividad específica medidas durante la activación espontánea del ALA-S de extractos de células de Rps.sphaeroides con las calculados mediante la fórmula propuesta. Los extractos se almacenaron a 4°C y a la luz.

valores experimentales mostrados por Marriot (471) para la activación espontánea del ALA-S de Rps. sphaeroides.

La similitud matemática de ambos procesos no autoriza a suponer que sus mecanismos químicos puedan ser similares, aunque el elucidar completamente esto exige otro tipo de experimentaciones.

INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LOS NIVELES DE ALA-S, SUCCINIL-CoA-S y ALA-D Y CONTENIDO DE BCHl EN *Rhodopseudomonas palustris*

I. Influencia del medio de cultivo sobre niveles enzimáticos y BChl

Rps.palustris es un fotoheterotrofo facultativo, capaz de crecer en una variedad de sustratos orgánicos usados como dadores de electrones. Una de las características fundamentales de Rps. palustris es su capacidad de crecer con tiosulfato como dador de electrones, en presencia de bicarbonato y a la luz, circunstancia única en la familia Rhodospirillaceae.. Además, es capaz de utilizar benzoato como dador de electrones , propiedad usada para hacer los medios de enriquecimiento de esta bacteria.

En base a estas circusntancias se estimó interesante conocer los niveles de ALA-S y BChl para Rps. palustris crecida en medio de van Niel adicionada de tiosulfato o benzoato y compararlos con los niveles medidos en las bacterias crecidas en el medio de Cohen-Bazire et al., usado a lo largo de este trabajo.

En la Tabla XXV se muestran los valores de los niveles del ALA-S para la bacteria crecida en los distintos medios como así también los valores de p obtenidos mediante el test de Student.

Los niveles enzimáticos para la bacteria crecida fotoheterotróficamente y quimiaheterotróficamente en medio de

TABLA XXV

Medio y condiciones	ALA-S (unidades/ mg proteína)	p
CB anaerobio	43,15 ± 14,92	-
CB aerobio	15,48 ± 6,13	< 0,0005
VN benzoato	39,56 ± 6,16	> 0,3
VN tiosulfato	27,49 ± 4,40	< 0,001 (*) < 0,01

Niveles de ALA-S en distintos medios y p calculadas según test de Student.
Abreviaturas: CB anaerobio: bacteria crecida anaerobicamente a la luz en medio de Cohen-Bazire et al.; CB aerobio; el mismo medio pero crecido aerobicamente en oscuridad; VN benzoato: bacteria crecida en medio de van Niel con benzoato como dador de electrones y a la luz ; VN tiosulfato, el mismo medio pero con tiosulfato como dador de electrones y a la luz.
(*) p respecto de CB anaerobio

TABLA XXVI

Medio	BChl (µm/mg de proteína)	p
CB	31,99 ± 6,87	-
VN benzoato	52,36 ± 3,08	< 0,0005
VN tiosulfato	28,32 ± 4,69	< 0,1

Niveles de BChl y p calculados por test de Student para Rps. palustris crecida anaeróbicamente a la luz en diferentes medios.

Las siglas como en la Tabla XXV.

TABLA XXVII

Medio y condiciones	Succinil CoA-S (unidades/mg proteína)	ALA-D (unidades/mg proteína)
CB anaerobio	0,322	30,6
CB aerobio	0,371	34,3
VN benzoato	0,455	22,7
VN tiosulfato	0,382	49,9

Niveles de Succinil Co-A-S y ALA-D en células de Rps. palustris crecida en diferentes medios. Las siglas son las mismas que las de Tabla XXV. Los valores son promedio de varias determinaciones.

Cohen-Bazire et al. son diferentes estadísticamente. En medio con benzoato el nivel es similar estadísticamente al de células crecidas en medio de Cohen-Bazire anaeróbicamente. En medio con tiosulfato el nivel enzimático muestra diferencias estadísticamente sifnificativas tanto con los de la bacteria crecida anaeróbicamente como aeróbicamente en medio de Cohen-Bazire et al.

En la Tabla XXVI se muestran los niveles de BChl para la bacteria crecida anaerobicamente a la luz en los diferentes medios.

Existe una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de BChl de células crecidas fototróficamente en medio de Cohen-Bazire et al. y las crecidas en medio con benzoato, mientras que si se las crecía en medio con tiosulfato dicha diferencia no es estadísticamente significativa.

En la Tabla XXVII se muestran los niveles de Succinil-CoA-S y ALA-D para la bacteria crecida en los diversos medios.

Se puede ver que no se han encontrado diferencias en los niveles de ambas enzimas para la bacteria crecida en medio de Cohen-Bazire et al. tanto aeróbica como anaeróbicamente.

El nivel de Succinil-CoA-S de la bacteria crecida en medio con tiosulfato era similar al de la crecida en Cohen-Bazire et al. Los niveles de ALA-D resultaron más variables para la bacteria crecida en los distintos medios.

II. Efecto de inhibidores del transporte de electrones y desacoplantes de la fotofosforilación sobre la síntesis de bacterioclorofila en Rhodopseudomonas palustris.

Dada la demostración de Sistrom (548) de que en Rps. sphaeroides el DNP inhibía la síntesis de BChl mientras que el amital la estimulaba, si bien ambos compuestos afectaban la velocidad de crecimiento de la bacteria, se decidió estudiar el efecto de inhibidores del transporte de electrones y desacoplantes de la fotofosforilación sobre el crecimiento y síntesis de BChl en Rps. palustris, con el objeto de establecer si fenómeno puesto en evidencia por Sistrom se repite en otros miembros de Rhodospirillaceae.

En la Tabla XXVIII se muestran los resultados obtenidos.

A diferencia de lo que ocurre en Rps. sphaeroides el amital no estimuló la síntesis de BChl.

A semejanza de lo que ocurría en Rps. sphaeroides, el DNP 10^{-4} inhibía inmediatamente de agregado la síntesis de BChl en Rps. palustris, pero esta recomenzaba luego de un intervalo de tiempo, tal como puede verse en la Figura 68.

La velocidad de crecimiento tambien se vió afectada aunque menos que la de síntesis de BChl.

El espectro de absorción de Rps. palustris en la zona del rojo muestra dos picos; uno en 800-805 , otro en 860nm y un hombro en 880nm.

En todos los casos en que hubo una menor síntesis específica de BChl el efecto se ejerció sobre la síntesis de esta molécula y no sobre su incorporación al aparato fotosintético. Ello puede verse por las relaciones entre la absorbancias a 800 , 860 y 880 nm respecto de la absorbancia a 680nm.

En la Tabla XXIX se muestran las relaciones obtenidas para bacterias crecidas en ausencia y presencia de los distintos inhibidores y desacoplantes usados.

La Figura 69 muestra la curva de crecimiento de Rps. palustris en ausencia y presencia de Amital 5,0 x 10^{-3}. Se vió un efecto inhibitorio sobre la biosíntesis de BChl total y del crecimiento del cultivo. Este efecto inhibitorio desapareció alrededor de las 30 horas de cultivo, acelerándose tanto el crecimiento como la síntesis de BChl, llegando esta finalmente a la relación normal respecto de proteínas.

TABLA XXVIII

Agregado	T_D(hs)	BChl/prot. (µm/mg proteína)
Ninguno	6,6	32
DNP 10^{-4}M	9,6	23
CCCP 5x 10^{-7}M	6,2	30
1x 10^{-6}M	15,3	20
Amital 1x 10^{-3}M	16	29
5x 10^{-3}M	47	25

Efecto de DNP, CCCP y amital sobre los tiempos de duplicación y contenido específico de BChl en Rps.palustris .

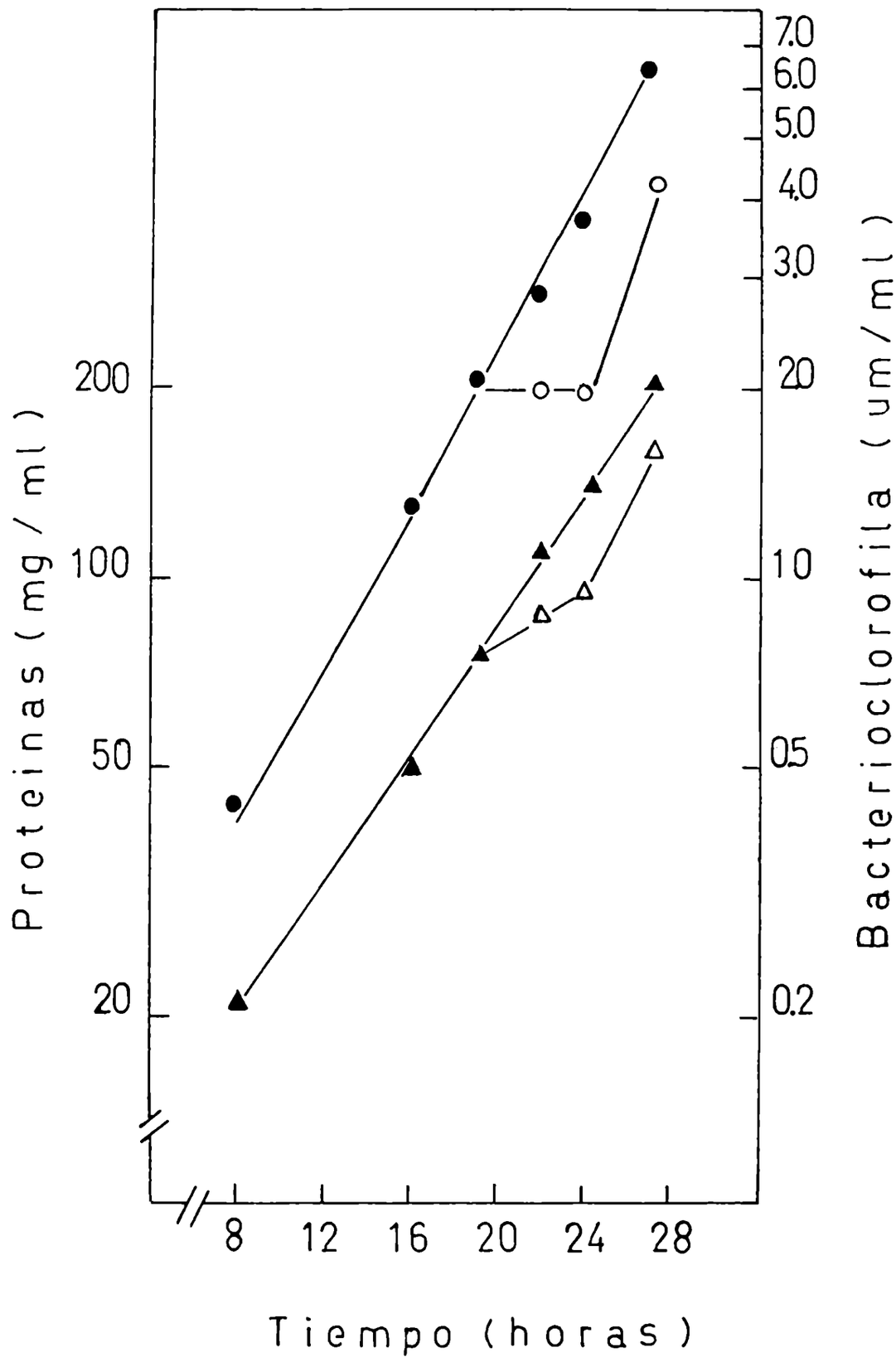


Figura 68: Efecto de la adición de DNP 10^{-4} M a un cultivo de Rps. palustris creciendo en medio de Cohen-Bazire et al. adicionado de peptona y extracto de levadura. Símbolos oscuros: sin DNP; símbolos abiertos: con DNP. Proteínas: círculos; BChl: triángulos. Las determinaciones se realizaron tal como se describe en Métodos.

TABLA XXIX

Agregado	805/680	860/680	880/680	860/805	880/805	880/860
Ninguno	1,61	1,92	1,72	1,19	1,13	0,94
DNP 10^{-4}	1,43	1,77	1,63	1,20	1,13	0,93
CCP 10^{-6} M	1,33	1,53	1,38	1,15	1,12	0,94
Amytal 1 x 10^{-3}M	1,51	1,75	1,67	1,15	1,10	0,96
" 5 x 10^{-3}M	1,42	1,65	1,62	1,16	1,14	0,95

Relaciones de absorbancia a diferentes longitudes de onda para células de Rps.palustris crecida en medio de Cohen-Bazire et al. sin o con el agregado de inhibidores o desacoplantes del transporte de electrones.

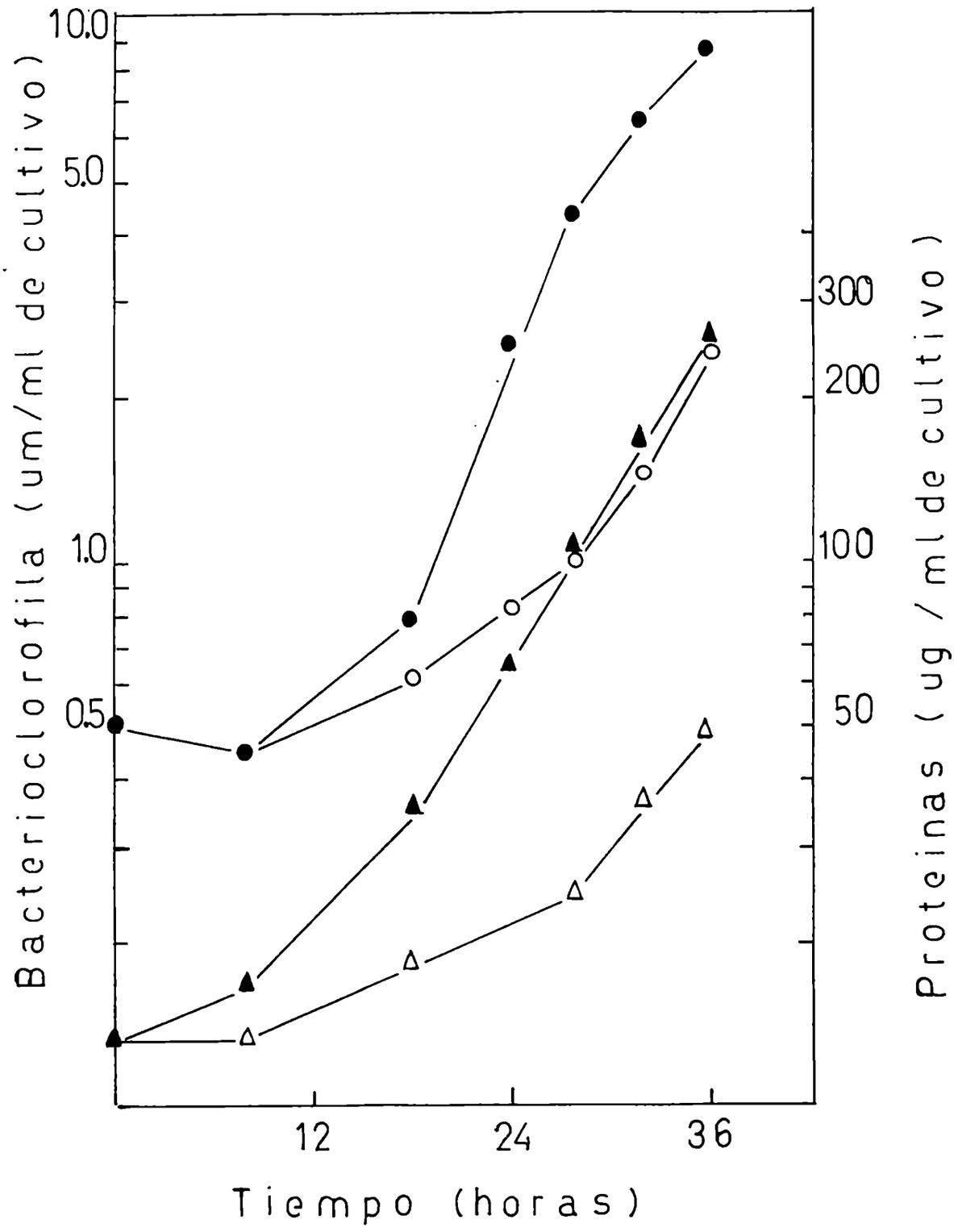


Figura 69: Curva de crecimiento de Rps. palustris a 30ºC y 50 bujías-pié en medio de Cohen-Bazire et al., en ausencia (símbolos oscuros) y presencia (símbolos abiertos) de Amital 5,0 mM. BChl (círculos) y proteínas (triángulos) se determinaron como se indica en Métodos.

Este efecto también pudo comprobarse en incubaciones prolongadas de Rps. palustris en presencia de CCCP 10^{-6}M.

El ALA-S de Rps.palustris crecida fotoheterotróficamente en presencia de DNP 10^{-4}M no era afectado, mientras que la bacterioclorofila específica estaba disminuída. La actividad específica del ALA-S resultó 42,74 unidades/mg de proteína para las células crecidas sin DNP mientras que fue de 39,92 unidades/mg de proteína para las crecidas en presencia del inhibidor. La BChl específica había sufrido por otra parte, una caída del 20%.

Pareciera que el efecto del DNP sobre la biosíntesis de BChl se ejerce en un punto distinto al ALA-S ..

CONCLUSIONES Y DISCUSION

Los cortes ultrafinos de Rps. palustris mostrados en las Figuras 19 a la 29 demustran que existe una dramática diferencia en la citología bacteriana cuando se crece al microorganismo en condiciones que pueda realizar fotosíntesis y aquellas en las cuales este proceso no ocurre.

Pareciera que el proceso de formación de las membranas fotosintéticas bacterianas comienza por la invaginación de la membrana citoplasmática. En un caso, esas membranas invaginadas se estrangularían formando vesículas separadas; en otros casos, la membrana fotosintética permanece unida a la membrana citoplasmática formándose invaginaciones vesiculares o tubulares, o bien, apilamientos plegados de membranas. En la familia Rhodospirillaceae se encuentran invaginaciones vesiculares en R. rubrum (59) y Rps. sphaeroides (71). En R. fulvum, R. molischianum y R. photemetricum, especies que se reproducen por fisión binaria, existen apilamientos de membrana intracitoplasmática distribuídos al azar hacia la periferia de las células (64,66). En cambio, los microorganismos fotosintéticos que se reproducen por brotación, tales como Rps. palustris, Rps.viridis y Rhodomicrobium vannielii , poseen un sistema de membranas intracitoplasmáticas lamelar, localizado hacia uno de los extremos de las células (48,597). Durante el proceso de brotación, las membranas intracitoplasmáticas permanenen en la célula madre, y la célula hija forma su propio sistema membranoso por invaginación de su membrana citoplasmática.

Dentro de la familia Chromatiaceae, los miembros de los géneros Thiospirillum, Thiocystis y Thiocapsa poseen un sistema de membrana intracitoplasmática vesiculares (71). En cambio, especies del género Thiococcus, poseen un sistema membranoso tubular (32,80). Se han podido observar dos tipos de membranas intracitoplasmáticas, vesiculares y lamelares, en algunas cepas de Thiocapsa

(71) y de Chromatium (64,77,78). En el único género de esta familia que se encuentra un sistema de apilamientos membranosos es en Ectothiorhodospira; se han publicado estudios detallados del sistema membranoso de Ectothiorhodospira mobilis.

Las micrografías electrónicas de cortes ultrafinos de Rps. palustris presentadas en las Figuras 19 a la 27 muestran que la cepa bacteriana usada a lo largo de este trabajo, posee un sistema de membranas intracitoplasmáticas lamelar, ubicado hacia la periferia y uno de los extremos de las células, con discontinuidades en los apilamientos, y muy probablemente continuó con la membrana citoplásmática, conclusión que puede inferirse por la presenciad de uniones entre los apilamientos de membranas (Figuras 24 y 27). Se han obtenido secciones tangenciales al sistema de apilamientos membranosos (Figuras 25 y 26), situación similar a lo ya observado en Ectothiorhodospira mobilis (85).

En diversas fotografías de las presentadas (Figuras 21 y 27) puede observarse el depósito intracelular de gránulos de polimetafosfato y de poli - β -hidroxibutirato. Estas sustancias de reserva han sido observadas en cortes ultrafinos de otras cepas de Rps.palustris (49,64), inclusive si ella es crecida en oscuridad (596). Gránulos de poli-β-hidroxibutirato se han podido observar también en los microorganismos fotosintéticos Chromatium okenii (78,598) y Rps. sphaeroides (71) , como así también en el género no fotosintético Hydrogenomonas (599). Se han observado depósitos de polimetafosfato en C. thiosulfatophilum (78), en Thiocapsa (71), en Ectothiorhodospira mobilis (85), Pelodictyon clathratiforme (600).

Los cortes ultrafinos de células de Rps. palustris

crecida aeróbicamente en oscuridad (Figuras 28 y 29) demuestran claramente que no existe membrana intracitoplasmática en ellas. La morfología general del microorganismo no se ve alterada por esta circunstancia . Los cultivos crecidos de esta manera no son coloreados, lo que significa que no se forman fotopigmentos, hecho corroborado por la determinación de BChl en este tipo de células, que arroja valores nulos para este compuesto. Hay pues una absoluta correlación entre la carencia de fotopigmentos, en especial BChl, y la carencia de membrana intracitoplásmática ; dicho de otro modo, es posible suponer que los procesos de formación de ambas entidades están estrechamente vinculados.

Muchas cepas de otras varias especies de bacterias púrpuras no sulfúreas pueden adaptarse al crecimiento en oscuridad (30,34), y también en ellas el contenido de pigmentos es nulo y las células incoloras en estas condiciones. Se ha demostrado que el oxígeno, aún a la luz, inhibe tanto la síntesis de BChl como la de carotenoides (546,547).

Las células e algunos miembros de la familia Rhodospirillaceae, crecidas en oscuridad o anaeróbicamente a muy alta intensidad luminosas, contienen un muy pequeño número de invaginaciones periféricas de la membrana citoplasmática (67,68,601). En condiciones semianaeróbicas, o bien aeróbicas bajo intensidades luminosas medias, se incrementa el número de invaginaciones, y paralelamente, se incrementa el contenido de fotopigmentos. En condiciones anaeróbicas y con bajas intensidades luminosas, se alcanza el máximo de contenido de invaginaciones y de fotopigmentos.

En nuestro caso, se ha elegido para el cultivo de la cepa de Rps.palustris usada en el presente trabajo, y en base a estudios previos de otros autores (64), una intensidad luminosa que asegura un contenido elevado de BChl y una razonable velocidad de crecimiento.

En la otra parte del trabajo se han logrado condiciones para la determinación de los niveles de las enzimas Succinil-CoA-S, ALA-S y ALA-D de la bacteria fotoheterótrofa facultativa Rps. palustris, en forma sencilla yreproducible,al menos en extractos bacterianos crudos. Los niveles enzimáticos han sido medidos en células crecidas en diversos medios y condiciones. En particular, el presente, es el primer reporte de un estudio de la enzima ALA-S de Rps.palustris.

En otros miembros de la familia Rhodospirillaceae también puede medirse la actividad del ALA-S mediante sistemas de incubación similares al usado a lo largo de este trabajo (445,446,452,454), si bien se ha reportado que en Chromatiaceae, en particular en especies de Chromatium , sólo se la puede detectar luego de un paso de purficación (454).

También se ha demostrado la presencia de esta enzima en algunas bacterias no fotosintéticas, tales como Micrococcus denitrificans (170), Propionibacterium shermanii (218) y Spirillum itersonii (455). Recientemente se la ha podido detectar en Propionibacterium acnes y Propionibacterium granulosum (603).

Rps. palustris es una bacteria fotosintética facultativa, capaz de crecer con una gran variedad de sustratos orgánicos como dadores de electrones.Es, sin embargo, un caso excepcional en la familia Rhodospirillaceae , ya que puede crecer con tiosulfato como dador de electrones a la luz y en presencia de bicarbonato. Es capaz también de usar benzoato como dador de electrones.

Para la mayoría de las experiencias se cultivó a la bacteria en el medio de Cohen-Bazire et al., con las modificaciones mostradas en Métodos. Este medio es de aplicación general para el cultivo de la mayoría de las bacterias de la familia.

Se han encontrado una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles enzimáticos del ALA-S de la bacteria

crecida en el medio de Cohen-Bazire et al. fotosintéticamente ó bien aeróbicamente en la oscuridad (Tabla XXV), pero en cambio no se han encontrado diferencias en los niveles de Succinil-CoA-S y ALA-D (Tabla XXVII). Estos resultados es interesante conectarlos con dos hechos:primero , la carencia de BChl en las células crecidas aeróbicamente, y segundo, con los resultados mostrados en las Figuras 19 a la 29. Dos cambios dramáticos de la bacteria, uno en su fisiología y otro en su citología, van asociados a cambios en los niveles de sólo una de las enzimas estudiadas del camino biosintético de los tetrapirroles, por lo cual podemos asignarle a dicha enzima, el ALA-S, un rol fundamental en la regulación de esta biosíntesis. Por supuesto que no se puede descartar la posibilidad de que también se ejerza un proceso regulatorio a nivel de otra enzima no estudiada hasta el memento. Se puede concluir que la modificación de condiciones de crecimiento, de aerobias a anaerobias a la luz, provoca una alteración en el metabolismo bacteriano, de oxidativo a fotosintética, y concomitantemente se induce una mayor actividad del ALA-S, que explicaría , al menos en parte, el incremento del contenido de BChl y además, se induce la formación del sistema de membranas intracitoplasmáticas. Todos estas alteraciones están estrechamente vinculadas.

Los sistemas de incubación para la determinación de Succinil-CoA-S y ALA-D son ampliamente conocidos y en el presente trabajo han sido usados casi modificaciones, por lo cual no corresponde hacer más comentarios.

En general, los sistemas de incubación usados por otros autores para medir la actividad del ALA-S en extractos de diferentes microorganismos son, en esencia, similares , difiriendo alguns en la concentración de succinato y glicina (454), o bien porque se adiciona al sistema SO_4Mn(170) ó glutation

reducido (603) ó bien 2-mercaptoetanol (218); en algunos casos se ha adicionado al sistema de incubación EDTA a fin de inhibir al ALA-D (496).

El sistema empleado en este trabajo para la medición de la actividad del ALA-S de Rps. palustris ha demostrado ser reproducible, y a los fines comparativos, suficientes. Se ha demostrado además, que ni la cisteína ni el 2-mercaptoetanol son necesarios para la actividad enzimática en extractos crudos (Tablas VI y VIII), y que el glutation reducido, a bajas concentraciones, activa ligeramente a la enzima, pero que a concentraciones mayores se vuelve inhibitorio (Tabla VII).

Es importante destacar que, en las incubaciones realizadas con extractos crudos tanto de células cultivadas fotosintéticamente como aeróbicamente, no se forma PBG en las condiciones empleadas para la medición del ALA-S, por lo que se consideró innecesario la adición de EDTA al sistema standard de incubación. La ligera inestabilidad del ALA hallada en las condiciones de la incubación, no se ha tenido en cuenta, puesto que todas las experiencias se han realizado en las miamas condiciones, lo que hace comparable a los resultados.

El tiempo óptimo de sonicación de la suspensión bacteriana resultó ser el de un minuto, con lo que se logra una adecuada extracción de la enzima. Tiempos mayores de tratamiento sónico ocasionan un notorio descenso de la actividad específico y finalmente, de la actividad total (Figura 30), lo que constituye una primera indicación de la inestabilidad de la enzima. Al minuto de sonicación no se observaron células intactas en la suspensión, por lo que la mayor extracción de proteínas se interpretó como extracción de material cromatofórico.

Ha resultado ser relativamente indiferente la concentración de la suspensión bacteriana que se somete a sonicación dentro de un rango bastante amplio, para la medición de la actividad del ALA-S (Tabla I). Dentro del rango ensayado(aproximadamente de 20 a 60 mg de peso seco/ml) los resultados de actividad específica son muy similares.

La localización celular de la enzima resultó ser citoplasmática, tanto en células crecidas fotosintéticamente (Tabla II) como en las crecidas aeróbicamente (Tabla XII). Si bien siempre se ha detectado a la actividad enzimática en el sobrenadante de 140.000 xg no puede descartarse que esté asociada a fracciones membranosas, tal como ocurre en Rps. sphaeroides , de donde se han podido purificar dos formas de ALA-S (562) que parecieran estar compartimentalizadas (563): una fracción está correlacionada con el metabolismo aerobio en oscuridad y es una enzima citoplasmática soluble, mientras que la otra forma es inducida por la luz y su actividad está correlacionada con el fotometabolismo, apareciendo localizada en cromatóforos. Este tipo de estudios exige la preparación de esferoplastos, para someterlos posteriormente a una suave lisis osmótica, no debiéndose usar un método de ruptura de las células uno tan violento como la sonicación. Aquí es de destacar que no ha sido posible lograr condiciones para la obtención de esferoplastos de Rps. palustris y pareciera que el grupo de bacterias fotosintéticas que se reproducen por brotación (Rps.palustris, Rps.viridis, Rps. acidophila y Rhodomicrobium van-niellii) no son sensibles a esta enzima (605).

La actividad del ALA-S de extractos crudos de Rps. palustris crecida fotosintéticamente es sumamente dependiente de glicina exógena (Tabla III) mientras que la omisión de alguno

de los otros sustratos o cofactores en el sistema de incubación provoca una caída de la actividad, pero aún así la reacción transcurre con buena eficiencia.

El Km para glicina de la enzima de los dos tipos de células es similar (Figuras 49 y 57), siendo el valor 1,538 x 10^{-2}M lo que es un valor relativamente alto. En Rps. sphaeroides se han determinado valores de Km para glicina de 4-5 x 10^{-2}M (497,519), valores relativamente superiores a los obtenidos en Rps. palustris. En Micrococcus denitrificans se ha determinado un valor de Km para glicina de 1,2 x 10^{-2} M(170). Cabe resaltar que los valores de Km de enzimas unidas a fosfato de piridoxal para su sustrato aminoácido son , en la mayoría de los casos, iguales a las constantes de disociación de los complejos fosfato de piridoxal-aminoácido,pero el tipo de reacción y la especificación del aminoácido está determinada por la porción proteica de la enzima (606); más aún, casi todas estas enzimas son altamente específicas para su sustrato aminoácido particular (607).

La ausencia de actividad enzimática sin glicina exógena indicaría niveles endógenos muy bajos o nulos en los extractos crudos, y un Km para este sustrato relativamente alto, o sea una baja afinidad, lleva a pensar que quizás los niveles endógenos de glicina en Rps.palustris sea un factor regulatorio de la síntesis de tetrapirroles. En este sentido se ha demostrado que la porfiria experimental inducida por 3,5-dicarbetoxi-1,4-dihidrocollidina es revertida por benzoato o p-amino benzoato, sustratos para la glicina acil transferasa; así se promueve la desviación de la glicina del camino biosintético del hemo a la biosíntesis de hipurato, alterándose de esta forma el modelo bioquímico asociado con el estado porfírico (608).

En la ausencia del Cl_2Mg la actividad enzimática se activa ligeramente en extractos crudos (Tabla III). Algo similar

ocurre en extractos crudos de Rps.sphaeroides pero no de R.rubrum (445). Quizás esto sea debido a que exista una ligera inhibición del sistema enzimático por exceso de ión Mg^{++}, ya que en extractos crudos dializados de Rps. sphaeroides la falta de ión Mg^{++} en el sistema de incubación se traduce en pérdida de la actividad enzimática, Sin embargo, y visto que no hay motivos para suponer que el ión Mg^{++} no sea fundamental para la actividad del sistema generador de Succinil-CoA, no se lo eliminó en ningún caso del sistema de incubación.

El buffer fosfato de sodio y potasio es un ligero inhibidor de la actividad enzimática total, esto es, desde succinato y glicina. Se considera que una concentración de 5mM de dicho buffer forma parte del sistema de incubación, y es el proveniente de la alícuota de extracto bacteriana que se incuba. Si hubiera sido necesario agregar una cantidad de extracto que elevara dicha concentración, la actividad se corrige por el exceso de buffer en el ensayo (Tabla IV). De esta forma todos los resultados se hace comparables.

El empleo sistemático del buffer fosfato en la preparación de las suspensiones bacterianas está justificado por el hecho de que además del presente estudio, son usados en un plan más amplio de biosíntesis de porfirinas en Rps. palustris , siendo algunas actividades enzimáticas inhibidas por el buffer Tris-Cl^{H}, tal como la corpogenasa anaerobia (296).

El p^{H} y temperatura óptimos para la reacción no difieren de los valores hallados en otras fuentes(445-214). La caída de actividad podría deberse, a pH alto, también a inestabilidad del ALA a dichos pH(588).

La cantidad de ALA formada en los ensayos es una función lineal de la cantidad de proteína incubada, hasta una concentración de 2mg/ml, cuando se usan extractos crudos (Figura 34).

La velocidad inicial también resultó una función lineal de la cantidad de proteínas de extracto crudo incubadas (Fig.36) hasta una concentración de 1,5 mg/ml.

La reacción de formación de ALA no es lineal con el tiempo de incubación (Figuras 35 y 37), excepto que en ensayo se formen pequeñas cantidades de producto (Figura 53). Este fenómeno, también observado en extractos de Rps. sphaeroides (445), es debido, en el caso de Rps.palustris a una inhibición por producto. El ALA inhibe fuertemente tanto a la enzima de células crecidas fotosintéticamente como aeróbicamente (Tablas V y XIII), y ello explicaría, por un lado, la inhibición por exceso de proteína , y por otra parte, el curso no lineal de la reacción, ya que la acumulación de ALA en ambos casos ocasiona inhibición del sistema que lo forma. Si bien no puede deducirse si el ALA inhibe al ALA-S ó la Succinil-CoA-S, este fenómeno quizá pone de manifiesto un sistema regulatorio muy directo y eficz de la síntesis de tetrapirroles. Es sabido que en condiciones normales no se acumulan tetrapirroles ni precursores (99); además, no se han detectado tampoco en Rps. palustris, lo que confirma que también en este microorganismo los controles regulatorios operan con máxima eficiencia.

Los dos fenómenos puestos en evidencias, el gran requerimiento de glicina aún con extractos crudos junto con la baja afinidad por este sustrato por parte de la enzima, como la inhibición por ALA, podrían constituir un sistema regulatorio para la formación del primer producto de la biosíntesis de tetrapirroles, jugando con los niveles de uno de los sustratos y del producto de la reacción. Es dificil evaluar este mecanismo "in vivo" con los datos actuales.

El ALA ha sido aislado de las incubaciones mediante el procedimiento de Ebert et al.(586) y caracterizado por el espectro de absorción del producto formado entre el ALA-pirrol y el reactivo de Ehrlich (588) y por su movilidad cromatográfica y de la de un derivado en diversos sistemas (587,588) (Figuras 38,39a y 39b). Es importante la observación de que en el sistema cromatográfico de Elliot (587) (Figura 39a) no se detecta aminoacetona, con lo cual cabe descartar la reacción de glicina con acetil-CoA en estos ensayos, y por tanto lo que se mide con la formación del pirrol y reacción de Ehrlich es exclusivamente ALA.

La enzima ALA-S tanto de células de Rps. palustris crecidas anaeróbicamente como aeróbicamente, es inestable, pero en extractos crudos es estable por un buen período de tiempo, almacenados a 0-4°C, con lo que se permite ensayarla con comodidad.

En extractos de ambos tipos de células no se activa espontáneamente a 0-4°C (Figuras 42,43 y 54;Tabla XV), con lo que se establece una diferencia fundamental con la enzima de Rps. sphaeroides (471,565). A 37°C es relativamente inestable en extractos crudos en los dos tipos de células (Figuras 45 y 55). También se pierde actividad por almacenamientos a -15°C(Figuras 40 y 41; Tabla XIV).

En base a todo lo visto se decidió no incubar extractos recién preparados, y por períodos no mayores de una hora a fin de minimizar los efectos por inestabilidad de la enzima y del producto.

Sustancias tales como la cistína, el glutation reducido o el 2-mercaptoetanol no tuvieron efecto activador destacable de la actividad enzimática (Tablas VI,VII, y VIII). El 2- mercaptoetanol tampoco altera la actividad enzimática por almacenamiento a 0-4°C(Figura 46).

A las mayores concentraciones ensayadas de cisteína y glutation reducido, se observa una inhibición de la reacción.

El efecto estimulatorio logrado con glutation no es lo suficientemente importante como para considerar necesaria su inclusión sistemática en el sistema standard de incubación.

La L-cistina tampoco tiene efecto sobre la actividad ALA-S de Rps.palustris crecida fotosintéticamente, a diferencia de lo que ocurre con la actividad del ALA-S de Rps. sphaeroides, la que es activada por L-cistina y otros disulfuros orgánicos mediante una reacción enzimática (570).

El efecto de la diálisis establece otra diferencia entre el ALA-S de Rps. palustris y de Rps.sphaeroides . En extractos del segundo de los microorganismos por diálisis se elimina un inhibidor, con lo que se incrementa la actividad enzimática (488); en Rps. palustris , la actividad enzimática decae notablemente por diálisis (Figura 47; Tabla X). Este efecto no es debido a pérdida de fosfato de piridoxal ni a inestabilidad de la enzima por almacenamiento por el tiempo que tarda la diálisis. Hay una pérdida de metabolitos de bajo peso molecular que actúan como activadores de la enzima o bien como cofactores de la misma.Su estructura es desconocida por el momento.

El $SO_4(NH_4)_2$ agregado a los ensayos, inhibe la actividad formadora de ALA, aunque no muy marcadamente (Tabla XI) ya que la inhibición se manifiesta a concentraciones de la sal relativamente altas.

Si se intenta precipitar la enzima con $SO_4(NH_4)_2$ se pierde actividad en forma notable. A similitud de lo que ocurre en las diálisis , ni el PyP ni el 2-mercaptoetanol evitan la caída de actividad enzimática. Sin embargo, un activador de la enzima, aislado por filtración por Sephadex G-25, y que activa hasta sus valores iniciales a la enzima eluída de dicho gel, no es

capaz de activar a la enzima precipitada por la sal, por lo que debe concluirse que en este caso ocurre una inactivación parcial por efecto del $SO_4(NH_4)_2$ y no sólo una pérdida de metabolitos esenciales de bajo peso molecular. El hecho de que el precipitado 0-100% de saturación también pierda actividad indica que no existe una fracción proteica precipitable por sales capaz de activar a la enzima, tal como se demostró para el ALA-S de mitocondria de hígado de rata (604).

El espectro de la reacción de Ehrlich demuestra que también con la enzima precipitada se forma ALA como principal producto.

La determinación del peso molecular del ALA-S de Rps. palustris crecida en condiciones anaeróbicas y a la luz resultó ser, mediante una sistema de gráficos 61.000 (Figura 51), y mediante el de Andrews 64.000 (Figura 52), valores coincidentes dentro de la exactitud que estos métodos tienen (± 5-10%). Este valor es similar al obtenido para la misma enzima de otras fuentes: en Rps .sphaeroides 61.000 mediante filtración por Sephadex G-100 (496), 57.000 ± 5.000 mediante geles de poliacrilamida (495), 60.000 o bien 80.000 (dependiendo de los standards de referencia) mediante filtración por Sephadex G-200 (567), 100.000 para la FI inactiva y 80.000 para la FI activa, mediante filtración por Sephadex G- 200 (569), 62.000 para la FI inactiva, 53.000 para la FI activa, 67.000 para la FII activa e inactiva (572)- se atribuye la discrepancia con los anteriores valores al hecho de haber empleado diferentes métodos de purfficación-, 80.300 por sedimentación al equilibrio (579); en Micrococcus denitrificans se halló el valor 68.000 mediante filtración por Sephadex G-100 (170).

Salvo algunos valores discrepantes, los valores del peso molecular del ALA-S bacteriana, en las epecies ensayadas, es del orden 60-70.000.

No se han detectado subunidades funcionales mediante la filtración por geles para la enzima de Rps.palustris, pero recientemente se ha demostrado una estructura de dímero para la enzima de Rps.sphaeroides (579), con subunidades de peso molecular 45.000 ó 41.000 (dependiendo del desnaturalizante).

Cuando se filtran por Sephadex G-25 extractos sobrenadantes de 140.000 xg de Rps.palustris , crecida tanto en condiciones fotosintéticas como aeróbicas a la oscuridad, se produce un decaimiento de la actividad del ALA-S, el cual no es evitado adicionando al buffer de elución 2-mercaptoetanol, o PyP , o bien PyP + glicina, Debe concluirse que en estos extractos crudos bacterianos están presentes una o varias sustancias de bajo peso molecular que son capaces de activar al ALA-S.

Los activadores presentes en los extractos bacterianos, se separan de la fracción proteica filtrando por Sephadex G-25. Los eluídos de bajo peso molecular, son capaces de activar al ALA-S inhibida por la filtración (Figuras 48 y 56).

Esto debe vincularse con los resultados de la diálisis, donde también se perdía actividad del ALA-S, la que no era protegida tampoco por el PyP. Es de destacar que el activador del ALA-S de células fotosintética no activa a la enzima que ha sido precipitada por sulfato de amonio, indicando esto que la sal produce una inhibición no reversible de la enzima.

No conocemos, hasta el presente, ningún reporte de otro autor, de un comportamiento similar del ALA-S de otras fuentes, tanto microbianas como eucarióticas y tampoco se dispone de ningún dato hasta el presente que indique la posible estructura del o los activadores.

El hecho de que el ALA-S deRps.palustris crecida aeróbicamente tenga menor actividad que en células crecidas

fotosintéticamente, llevó a realizar las experiencias de mezclas de extractos a fin de detectar la presencia de algún inhibidor de la enzima de células aerobias. Esto ya podía descartarse,en principio, recordando que por filtración por Sephadex G-25 el ALA-S de células aerobias no se activa. En la Tabla XVI se demuestra que si se mezclan extractos de los dos tipos de células, el ALA-S se activa entre 30 y 50% . Esto no es debido a una activación de la enzima en función del tiempo, tanto en extractos crudos sonicados (Figura 58) o bien centrifugados a 15.000 xg (Figura 59). En el caso de extractos no centrifugados no se detecta activación, pero ella si ocurre, y en forma instantánea, en los centrifugados.

Como el ALA-S de ambos tipos de células tiene activadores de bajo peso molecular (Figura 48 y 56) puede pensarse que la activación enzimática detectada al incubar mezclas de extractos bacterianos sea debida a una mayor cantidad de dichos activadores presentes en los ensayos. Si se calientan extractos bacterianos y se mezclan con el extracto heterólogo, resulta que sólo los extractos de células aerobias calentados son capaces de activar al ALA-S de células fotosintéticas, mientras que los de este tipo de células no activan a la enzima de células aerobias (Tabla XVII). No puede suponerse que este resultado sea debido a inestabilidad térmica de algún posible activador de la enzima de células aerobias presente en las células anaerobias, puesto que si se los separa de la fracción proteica mediante filtración por Sephadex G-25 y se los mezcla con los extractos heterólogos se reproduce el efecto mostrado en la Tabla XVII(ver Figura 60).

De todos estos resultados puede concluirse que cuando las células de Rps. palustris crecen aeróbicamente se forma un activador del ALA-S, pero de las células crecidas fotosintéticamente.

Los resultados de la Tabla XVII y de la Figura 60 pueden explicarse en base a los resultados de las experiencias de oxigenación, y suponiendo que en los dos tipos de células de Rps. palustris el ALA-S existiría como formas diferentes: en células crecidas fotosintéticamente existiría un ALA-S_f sensible a un activador A_i, mientras que en las crecidas aeróbicamente existiría un ALA-S_c sensible a un activador A_c. Puede suponerse que en condiciones aerobias se formaría un activador X del ALA-S_f, pero no pueden hacerse postulaciones válidas sobre su identidad.

Es probable que el ALA-S en células crecidas fotosintéticamente exista en dos formas: una forma constitutiva -que correspondería a los niveles medidos en células crecidas aeróbicamente- y otra inducible en condiciones que la bacteria realice fotosíntesis, y que denominaremos ALA-S_i. Entonces, en este tipo de células, la actividad de sintetasa sería la suma de las dos actividades mencionadas, es decir:

$$ALA\text{-}S_f = ALA\text{-}S_c + ALA\text{-}S_i$$

La forma ALA-S_c sería sensible a A_c mientras que la isoenzima ALA-S_i lo sería a A_i, y quizá, a X.

Otra postulación sería que X sea A_c, el que se formaría exclusivamente en condiciones aerobias, y que A_i sólo se formaría en condiciones anaerobias. Entonces, un extracto calentado o filtrado por geles de células crecidas fotosintéticamente no actuaría sobre la actividad enzimática de células aerobias porque ALA-S_c no sería sensible a A_i y porque no existiría A_c, pero en cambio, un extracto así preparado de células aerobias actuaría sobre la actividad de la isoenzima ALA-S_c de células anaerobias. Por otra parte, nada inpide suponer que la isoenzima ALA-S_i sea sensible no sólo a A_i sino también a A_c.

Puede postularse también que A_c y ALA-S_c se forman en las dos condiciones de crecimiento, y que la enzima está saturada de su activador. La isoenzima ALA-S_i se puede pensar como sensible a A_c y A_i y sólo saturada para A_i. Por tanto, al mezclar un extracto de células aerobias con, por ejemplo un filtrado de bajo peso molecular de células anaerobias, la enzima no se activaría puesto que está saturada de su activador. La mezcla opuesta activaría porque ALA-S_i no está saturada para el A_c. Quizá alguno de estos activadores puedan actuar modificando el estado de grupos -SH esenciales para la actividad.

No es posible decidir, por el momento, la validez de ninguna de estas hipótesis, pero el rol de los activadores sería fundamental en la adaptación a condiciones anaerobias, puesto que se establecería un efecto sinérgico de la formación de BChl entre enzima ALA-S que sería inducible por condiciones anaerobias y activación de dicha enzima, o de la forma constitutiva, por acción del activador preformado en condiciones aerobias, lo que aceleraría la síntesis de BChl.

Puede suponerse, considerando los principios de economía celular que rigen las transformaciones metabólicas, que tanto aeróbica- como anaeróbicamente se forma sólo una molécula, reruladora, llamada F_r (ver Figura 70). Esta molécula sería capaz de actuar, según la forma en que se uniera, tanto sobre ALA-S_c como ALA-S_i, dando como resultado, en el caso de células crecidas en aerobiosis, la forma ALA-S_c de alta actividad; mientras que en condiciones anaeróbicas este factor regulador se uniría al ALA-S_c básica y también al ALA-S_i básica, dando por resultado un ALA-S_i de alta actividad.

En la transición de anaerobiosis a aerobiosis se puede postular que se destruiría o modificaría el factor regulador, o bien se modificaría el sitio de unión de la enzima ALA-S_i para dicho factor.

En la adaptación a anaerobiosis se favorecería la posible reducción de grupos disulfuro a -SH, tal vez vecinos, por acción de una enzima unida a membrana (ver más adelante orden cero de la reacción de activación) quedando unido el factor activo a ella, y luego transfiriéndose a la isoenzima ALA-S_i. Esto explicaría el hecho de que los activadores no se hayan detectado unidos a membrana.

En Rps. <u>sphaeroides</u> se ha demostrado que el ALA-S existe en dos formas: la medida en células aerobias sería enzima constitutiva, mientras que la enzima de células crecidas a la luz sería inducible por anaerobiosis y estaría muy afectada por el estado redox intracelular (561).

Al oxigenarse un cultivo de Rps. palustris previamente crecido en condiciones fotosintéticas cesa en forma casi inmediata la síntesis de BChl y decae la actividad específica del ALA-S sin que se afecte al crecimiento del cultivo (Figuras 61,62,64,66).En ciertos aspectos,estos hechos son parecidos a los que ocurren cuando se oxigenan células de Rps. sphaeroides (564),pero con la muy importante diferencia de que en estas últimas,la actividad de ALA-S no se altera si las células se oxigenan en presencia de inhibidores de la síntesis proteica,mientras que en el caso de Rps.palustris, aún en presencia de estos inhibidores decae la actividad del ALA-S cuando se oxigena un cultivo crecido fotosintéticamente (Figura 66).

Al cesar el burbujeo de oxígeno, el ALA-S incrementa su actividad (Figuras 63 y 65) mediante un proceso que no depende de síntesis proteica (Figura 65), o sea que puede suponerse que este incremento de actividad es debido a activación de la enzima que de alguna manera ha sido inhibida por el oxígeno, y no a síntesis de nuevas moléculas de enzima. Puede postularse que en el período de oxigenación se forma un activador del ALA-S y que se establece una competencia entre los procesos de inhibición debida al oxígeno y activación de la enzima por este supuesto activador,lo cual evitaría que los valores de actividad enzimática decaigan a los previstos por una ley exponencial (Tabla XX).Debe mencionarse que no siempre burbujeando oxígeno cuatro horas se llega a los valores del ALA-S de células aerobias,puesto que la actividad final depende de la actividad inicial, tal como se expresa en la fórmula de página 183.

La recuperación de los niveles de ALA-S luego de interrumpido el burbujeo de oxígeno,en un cultivo que ha sido sometido a oxigenación en presencia de un inhibidor de la síntesis proteica,es bastante menor que en el caso que el tratamiento se haga en ausencia del antibiótico (Figura 66).Esto pareciera indicar que si se forma un activador de la enzima durante el burbujeo de oxígeno,su síntesis depende de síntesis proteica.Esta experiencia indicaría que durante la oxigenación se ha formado alguna sustancia que de alguna manera coopera en la recuperación posterior de los niveles enzimáticos.

La cinética de este proceso de recuperación de la actividad "in vivo" del ALA-S en determinadas condiciones es de orden cero.Esto lleva a suponer,que si durante el proceso de oxigenación se forma un activador de la enzima,éste está asociado a una superficie,en particular,la membrana citoplasmática.

En términos de la teoría de Langmuir (609), sea A la superficie total ocupada por moléculas de activador y A_o la superficie que en condiciones estacionarias está cubierta por moléculas de AIA-S; entonces, el número de moléculas de enzima que ocupan sitios en la superficie por segundo es

$$A(1 - A_o)K_o N_o$$

con K_o una constante y N_o la concentración de AIA-S inactiva.

Sea Ps la probabilidad por segundo de que una molécula de enzima unida al sitio activador salga de él sin activarse y P la probabilidad por segundo de que una molécula unida al sitio activador lo deje vacante habiéndose transformado, entonces, el número de moléculas de enzima que se alejan de la superficie por segundo es:

$$AA_o N_a (P_s + P)$$

donde N_a es el número de sitios activadores por área catalítica. En el estado estacionario ambas velocidades son iguales y por lo tanto:

$$\frac{K_o N_o}{K_o N_o + N_a (P_s + P)} = A_o$$

y la velocidad de transformación

$$-\frac{dN_o}{dt} = AA_o N_a P = AN_a P \frac{K_o N_o}{K_o N_o + N_a (P_s + P)}$$

ecuación formalmente idéntica a la de Michaelis-Menton. A altas concentraciones de enzima, esto es, si en la oxigenación no desaparecieron moléculas de AIA-S la reacción tiene un orden aparente cero

$$-\frac{dN_o}{dt} = AN_o P$$

o, si se adopta la ecuación de Herzfeld (610):

$$-\frac{dN_o}{dt} = \left(\frac{kT}{h}\right) e^{-E/kT}$$

con h constante de Planck, y E representando la energía crítica requerida para que una molécula de AIA-S unida al sitio activador lo abandone en forma activada.

Si la enzima abandona la superficie junto con la molécula activadora, se mantiene la relación entre N_o y N_a con lo cual siempre el número de moléculas de enzima serán superiores al de activador y el proceso seguirá siendo formalmente de orden cero.

Debe destacarse muy especialmente el hecho de que el ALA-S de extractos de células de Rps. palustris oxigenadas se active espontáneamente a 0-4ºC, puesto que apoya a la idea de que durante la oxigenación se ha formado un activador de la enzima. Este proceso de activación sólo se puede detectar en estas condiciones; la enzima de células crecidas fotosintéticamente o bien aeróbicamente no sufren esta activación espontánea. Es en esta situación donde se encontrarían juntos las isoenzimas del ALA-S, como así también todos los posibles activadores, tanto A_c como A_f y el que pudiera formarse en la oxigenación, y entonces se logra el efecto.

En el caso de Rps. sphaeroides, el ALA-S de células oxigenadas no sufre activación espontánea en extractos crudos a 0-4ºC (565).

Si la concentración de enzima N_o disminuyera, el orden aparente de la reacción de activación dejaría de ser cero, para finalmente, a bajas concentraciones volverse de orden aparente igual a uno. Si se sonican células de Rps. palustris recientemente oxigenadas se logra una dispersión de las moléculas de ALA-S inactivadas, y por ello, la activación de la misma resulta de un orden superior, probablemente orden cero, pero no puede asegurarse con los datos obtenidos (Figura 67). Una mayor dilución es crítica, puesto que casi se anula el efecto activador. Por otra parte, no puede descartarse que el activador esté débilmente unido a la membrana, por lo que el tratamiento sónico también lo dispersaría, y al diluirse no actuaría tan velozmente. Todo esto explicaría el inmediato incremento de actividad al mezclar extractos de células crecidas aeróbica y anaeróbicamente, donde además, la concentración de activador debería ser mucho mayor que en células oxigenadas cuatro horas. La activación es dependiente de la concentración de activador, o lo que es equivalente, de la fracción eluída por geles ensayada (Figura 60).

En la figura 70 se muestra un esquema del posible rol de los activadores sobre las distintas isoenzimas del ALA-S.

En la tabla XXX se resumen las principales diferencias entre el ALA-S de Rps. sphaeroides y el de Rps. palustris.

Los inhibidores del transporte de electrones y desacoplantes de la fotofosforilación ejercen un efecto inhibitorio de la síntesis de BChl, además de influir sobre la velocidad de crecimiento de la bacteria (Tabla XXVIII). De la Tabla XXIX puede deducirse que el efecto inhibitorio de la síntesis de BChl se ejerce sobre la síntesis de la molécula y no sobre su incorporación al aparato fotosintético.

Es de destacar que en todos los casos, luego de incubaciones prolongadas, de más de 30 horas, hay una notable recuperación de los cultivos que crecen en presencia de los inhibidores o desacoplantes. Quizá en presencia de estas sustancias se genere un factor inhibitorio de la síntesis de Bchl, el cual por posterior crecimiento del cultivo se di-

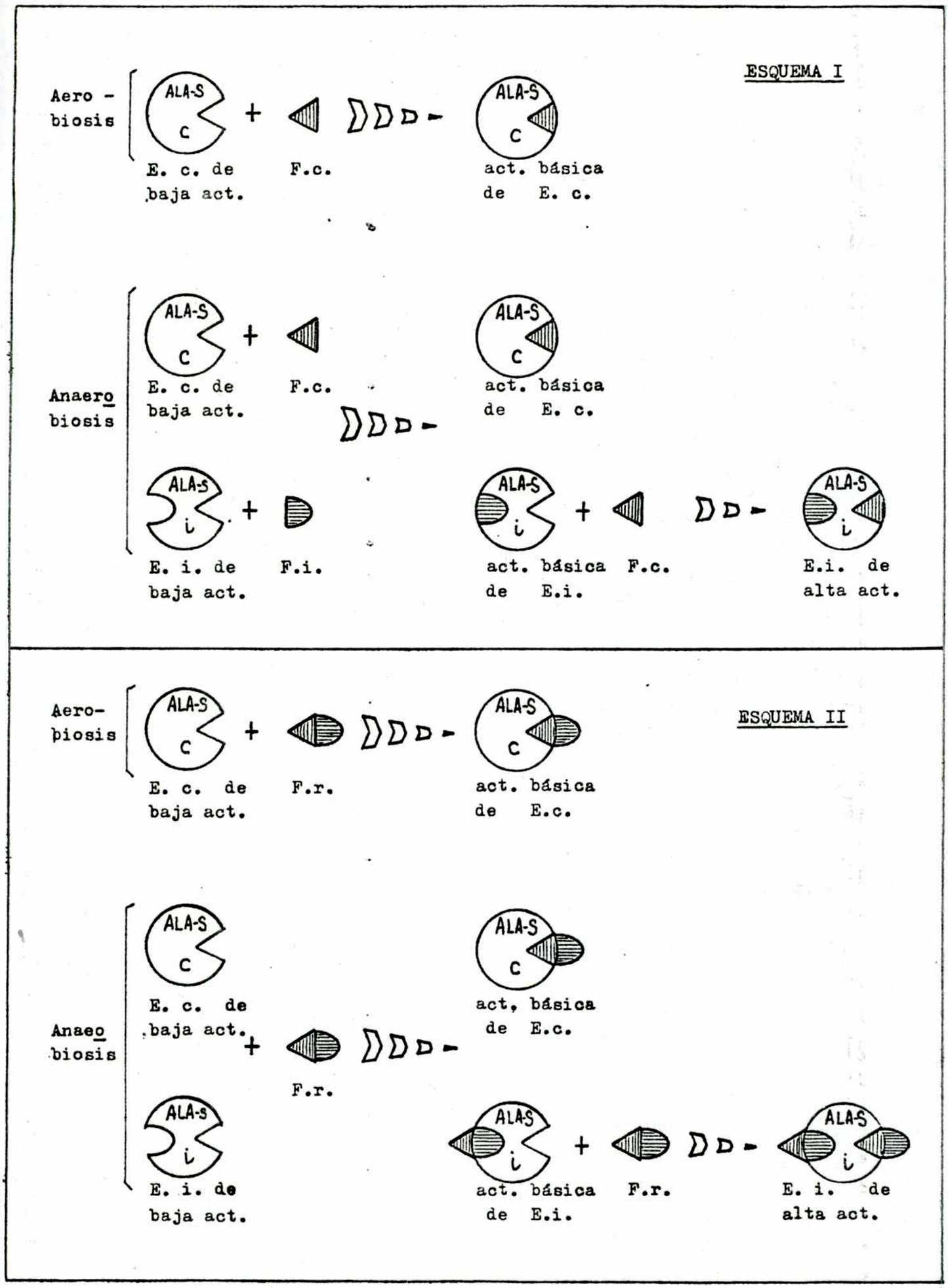


Figura 70 : Esquemas (I y II) propuestos acerca de la posible existencia y mecanismo de acción de los (o del) factores reguladores de la actividad del ALA-S y de una forma constitutiva y una inducida de la enzima. La explicación se encuentra en el texto. E = Enzima, F = Factor, c = constitutiva(o), i = inducible, act. = actividad, r = regulador.

TABLA XXX

Propiedad del ALA-S	Especie bacteriana	
	Rps. sphaeroides	Rps. palustris
Activación espontánea a 0-4ºC en extractos crudos.	+	-
Activación espontánea en extractos de células oxigenadas.	-	+
Dependencia de la síntesis proteica para la inactivación por oxígeno.	+	-
Activación por cistina	+	-
Pérdida de actividad por diálisis o filtración por geles.	-	+

Comparación de algunas propiedades del ALA-S de Rps. sphaeroides y Rps. palustris

luiría desapareciendo así su efecto. Otra explicación alternativa es que dichas sustancias afecten la provisión de energía necesaria para la síntesis de BChl.

A diferencia de lo hallado en Rps. sphaeroides (548), el anital no incrementa el contenido específico de BChl en Rps. palustris. El anital es un pobre inhibidor de la fotofosforilación cíclica en cromatóforos de R. rubrum (611), pero bloquea la oxidación de NADH por flavoproteínas en mitocondrias (612) y la oxidación de NADH en oscuridad y aerobiosis (613). Si se inhibiera la reducción del NAD por flavoproteínas, el NADH consumido no se regeneraría a la velocidad adecuada, alterándose así la relación NAD/NADH y afectándose la síntesis de BChl. Al crecer el cultivo, aumentarían las cantidades totales de los componentes de la cadena de transporte de electrones y la concentración de anital no alcanzaría a inhibir efectivamente la reducción del NAD, con lo que recomenzaría la síntesis de BChl.

El CCCP también inhibe la síntesis de BChl. Dado que es un verdadero desacoplante de la fotofosforilación cíclica haría caer la "carga de energía" del sistema, con lo que debería haber aumentado la síntesis de BChl. Esto no resultó ser así, por lo cual debe concluirse que hay otro factor que afecta la síntesis de tetrapirroles y es evidente que el ATP es necesario en su síntesis, convirtiéndose así en el principal factor limitante.

El DNP es un desacoplante de la fosforilación en mitocondrias y se ha comprobado que es un inhibidor del transporte de electrones fotosintético (614). Si se supone que el factor que controla la síntesis de BChl en Rps. palustris es la relación NAD/NADH, el sitio de inhibición estaría entre ferredoxina y flavoproteínas.

En R. rubrum el anital 5×10^{-3} M, el DNP $1,25 \times 10^{-4}$ M y la fenazinametosulfato 10^{-6} M inhiben completamente la síntesis de BChl en cultivos anaeróbicos en la oscuridad. En condiciones anaerobias a la luz el grado de inhibición de la síntesis de BChl era dependiente del contenido específico inicial de la misma (593). Luego de precultivos anaeróbicos o semianaeróbicos de esta bacteria, aumenta el contenido de BChl, con lo cual el efecto de los inhibidores sobre la síntesis de BChl y velocidad de crecimiento se ve disminuido.

De todas formas, si bien Sistrom (548), Schön (593) y nosotros hemos demostrado inhibiciones de la síntesis de BChl y del crecimiento tanto con anital como con DNP, los resultados no son directamente comparables, ya sea porque han sido obtenidos en diferentes organismos y porque la influencia de la concentración de bacterias y sus estados fisiológicos deben ser cuidadosamente considerados. Aún así, en forma cualitativa, los resultados son coincidentes.

R E S U M E N

-Se investigó la citología de células de R. palustris, comprobándose que cuando crece anaeróbicamente a a la luz posee un sistema de membranas intracitoplasmáticas continuo con la membrana citoplasmática, que no existe en células que crecen aeróbicamente a la oscuridad.

-Por primera vez se reporta la detección de la enzima ALA-S en Rps. palustris crecida en diversas condiciones y medios, habiéndose logrado un método rápido, reproducible y sencillo para la medición de su actividad.

-Se caracterizó el producto de la reacción enzimática como ácido delta aminolevúlico.

-Se comprobó que en células crecidas aeróbicas, ente en oscuridad los nivles de ALA-S son menores que en células crecidas fotosintéticamente, sugiriéndose un rol regulatorio de la bicsíntesis de BChl para esta enzima. Los niveles de Succinil-CoA-S y ALA-D no varían al cambiar condiciones.

-La enzima de células crecidas fotosintética, ente tiene un pH óptimo de 7,5 y una temperatura óptima de reacción de 37°C. Ni cisteína, ni glutation, ni 2-mercaptoetanol tienen efecto activador destacable del ALA-S. Tampoco su actividad es afectada por cistina. Su peso molecular es de 61.000 - 64.000.

-La enzima de células anaerobias y la de células aerobias presentan el mismo Km para glicina. Ambas se inhiben por producto, lo que sugiere un posible mecanismo regulatorio. Se trata de una enzima relativamente inestable, aunque en extractos crudos resulta ser bastante estable si ellos no se congelan.

-La precipitación con sulfato de amonio del ALA-S de células crecidas anaeróbicamente ocasiona una pérdida irreversible de us su actividad. Como tambien se pierde actividad al filtrar por geles, se dificultó el intento de purificación dela enzima.

-Tanto en células crecidas fotosintéticamente como aerobias existen activadores del ALA-S, de bajo peso molecular. En células crecidas aeróbicamente en oscuridad existe un activador del ALA-S de células crecidas fotosintéticamente. Se postula un mecanismo que explicaría la acción de los distintos activadores detectados.

-Si se burbujea oxígeno a un cultivo de Rps. palustris crecido fotosintéticamente, cesa inmediatamente la síntesis de BChl y decae la actividad específica del ALA-S, sin alterar notablemente el crecimiento bacteriano. La pérdida de actividad del ALA-S es una inhibición provocada por el oxígeno, aparentemente sin que decaiga en forma importante el número de moléculas del ALA-S puesto que al cesar dicho burbujeo gaseoso, la actividad enzimática recupera rápidamente sus niveles, aún en presencia de inhibidores de síntesis proteica. La cinética de la activación "in vivo" del ALA-S es de orden cero, postulándose que durante la oxigenación del cultivo se forma un activador. de la enzima asociado a membrana. Si la oxigenación se efectúa en presencia de inhibidores de la síntesis proteica, el ALA-S decae pero la recuperación de los niveles al cesar el burbujeo gaseoso no es tan acentuada como si no hubiera inhibidor.

-El ALA-S de células de Rps. palustris crecidas fotosintéticamente y luego oxigenadas se activa espontáneamente en extractos crudos a 0-4°C, dependiendo esta activación fuertemente de la concentración de extracto.

-Inhibidores del transporte de electrones y desacoplantes de la fotofosforilación afectan al crecimiento y la biosíntesis de BChl en Rps.palustris, sin alterar los niveles de ALA-S.

B I B L I O G R A F I A

1. van Niel C.B.(1929) en Contributions to Marine Biology,Stanford Univ.Press: pag. 161.
2. van Niel C.B. (1931) Arch.Mikrobiol.3,1
3. Molisch H. (1907) Die Purpurbakterien nach neuen Untersuchungen,G. Fisher, Jena.
4. Gaffron H. (1933) Biochem. Z. 260, 1.
5. Gaffron H.(1935) Biochem. Z. 275, 301.
6. Foster J.W. (1940) J.Gen. Physiol. 24, 123.
7. Muller F.M.(1933) Arch. Mikrobiol. 4, 131.
8. van Niel C.B. (1941) Advances in Enzymology 1, 263.
9. Vernon L.P. (1964) Ann.Rev. Plant Physiol. 15 , 73.
10. Gest H. (1951) Bacteriol. Rev. 15, 183.
11. Ormerod J.G. y Gest H.(1962) Bacteriol. Rev. 26, 51.
12. Stanier R.Y. (1961) Bacteriol. Rev.25 , 1.
13. van Niel C.B. (1954) Ann. Rev. Microbiol. 8, 105.
14. van Niel C.B. (1962) Ann.Rev. Plant Physiol. 13, 1.
15. Frenkel A.W. (1959)Ann.Rev. Plant Physiol. 10, 53.
16. Doelle H.W.(1969) en Bacterial Metabolism, Academic Press, New York; pag.46.
17. Parson W.W.(1974) Ann. Rev. Microbiol. 28 , 41
18. Gest H.,San Pietro A. y Vernon L.P. (Ed.) (1963) Bacterial Photosynthesis, The Antioch Press, Yellow Springs.
19. Clayton R.(1962) Bacteriol. Rev. 26, 151.
20. Clayton R.K.(1963) Ann. Rev. Plant Physiol. 14, 159.
21. Clayton R. K. (1965) Molecular Physics in Photosynthesis, Blaisdell Publishing Co., New York
22. Vernon L.P. y Ke B. (1966) en The Chlorophylls, Vernon L.P. y Seely G.R. (Ed.) Academic Press, New York; pag. 569.
23. Buder J.(1919) Jahrb.wiss. Botan. 58. 525.
24. Winogradsky S. (1887) Botan. Ztg. 45, 489.
25. Winogradsky S. (1888) Beitrage zur Morphologie und Physiolgie der Bakterien. Heft. 1: Schwefelbakterien. Arthur Felix, Leipzig.
26. Nadson G.A. (1903) Bull. Jard. Imp. Bot. St. Pétersb. 3, 99.
27. Gaffron H. (1934) Biochem. Z. 269 , 447.
28. Gaffron H. (1935) Biochem. Z. 279 , 1.
29. van Niel C.B. (1936) Arch. Mikrobiol. 7, 323.
30. van Niel C.B. (1944) Bacteriol. Rev. 8, 1.
31. van Niel C.B. (1963) en Bacterial Photosynthesis, Gest H., San Pietro A. y Vernon L.P. (Ed.) The Antioch Press, Yellow Springs; pag. 459.
32. Pfennig N. (1967) Ann. Rev. Microbiol. 21, 285.
33. Pfennig N. y Truper H. (1974) en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology , 8° Ed., Buchanan R. E. y Gibbons N. E (Ed.) ,Williams Wilkins Co,, Baltimore; pag. 24.
34. van Niel C.B. (1948) en Bergey's Manueal of Determinative Bacteriology , 6° Ed., Breed R.S., Murray E.G.D. y Parker Hitchens A. (Ed.), The Williams and Wilkins Co., Baltimore;pag.838

35. Sybesma Chr.(1970) en Photobiology of Microorganisms, Halldal P. (Ed.), Wiley-Interscience, London; pag. 57.

36. Marmur J.,Falkow S. y Mandel M. (1963) Ann. Rev. Microbiol. 17, 329.

37. Hill L.R. (1966) J.Gen. Microbiol. 44 ,419.

38. Mandel M.,Bergendahl J.C. y Pfennig N. (1965) J.Bacteriol. 80, 917.

39. Bose S.K. (1963) en Bacterial Photosynthesis, Gest H., San Pietro A. y Vernon L.P. (Ed.), The Antioch Press, Yellow Springs; pag. 501.

40. Sistrom W.R., Griffiths M. y Stanier R.Y. (1956) J. Cell. Comp. Physiol. 48, 473.

41. Duchow E. y Douglas H.C. (1949) J.Bacteriol. 58. 409.

42. Schlegel H.G.y Pfennig N. (1961) Naturwissenschaften 48, 136

43. Schlegel H.G. y Pfennig N. (1961) Arch. Mikrobiol. 38, 1.

44. Pfennig N. (1962) Arch. Mikrobiol. 42, 90.

45. Collins V.G. (1969) en Methods Microbiol., Norris J.R. y Ribbons D. W.(Ed.)Academic. Press, London; 3B, 1.

46. Carr N.G.(1969) en Methods Microbiol.,Norris J.R. y Ribons D.W. (Ed.) Academic Press, London; 3B, 53

47. Gloe A.,Pfenning N., Brockman Jr. H. y Trowitzsch W. (1975) Arch. Mikrobiol. 102, 103.

48. Whittenbury R. y McLee G.A. (1967) Arch. Mikrobiol. 59, 324.

49. Qadri S.M.H. y Hoare D. S. (1968) J.Bacteriol. 95, 2344.

50. Tauschel H.D. y Drews G. (1967) Arch. Mikrobiol. 59, 381.

51. Rolls J.P. y Lindstrom E.S. (1967) J.Bacteriol. 94, 800.

52. Scher S.,Scher D. y Hutner S. H. (1963) en Symposium on Marine Microbiology, Oppenheimer C.H. (Ed.) C.C. Thomas Publ.,Springfield; pag. 580.

53. Leadbetter E.R., mencionado en 32.

54. Pardee A.B.,Schachman H.K. y Stanier R.Y. (1952) Nature 169, 282

55. Schachman H. K.,Pardee A.B. y Stanier R.Y. (1952) Arch. Biochem. Biophys. 38 , 245.

56. Thomas J.B. (1952) Kon, Ned. Acad. Wetensch. Proc. C55 , 207.

57. Frenkel A.W. (1954) J.Am. Chem. Soc. 76 , 5568.

58. Frenkel A.W. (1956) J.Biol. Chem. 85, 623.

59. Vatter A.E. y Wolfe R.S. (1958) J.Bacteriol 75, 480.

60. Bergeron J.A. (1959) en Brookhaven Symposia in Biology n°11, Brookhaven Nat. Lab., Upton : pag. 118.

61. Tuttle A.L. y Gest H. (1959) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 45,1261.

62. Drews G. (1960) ARch. Mikrobiol. 36, 99.

63. Boatman E.S. y Douglas H.C.(1961) J.Biophys. Biochem. Cytol. 11 409.

64. Cohen-Bazire G. y Sistrom W.R. (1966) en The Chlorophylls, Vernon L.P. y Seely G.R. (Ed.) Academic Press, New York; pag.313

65. Gibbs S.P.,Sistrom W.R. Worden F.B. (1965) J.Cell. Biol. 26 ,395'

66. Giesbrecht P. y Drews G. (1962) Arch. Mikrobiol. 43, 152.

67. Cohen-Bazire G. y Kunisawa R. (1963) J.Cell. Biol. 16, 401.

68. Drews G. y Giesbrecht P. (1963) Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. I. Orig. 190, 508.

69. Hickman D.D. y Frenkel A.W. (1965) J.Cell. Biol. 25, 279.

70. Oelze J. y Drews G. (1972) Biochim. Biophys. Acta 265 , 209.

70. Oelze J. y Drews G.(1972) Biochim.Biophys. Acta 265, 209.
71. Cohen-Bazire G.(1963) en Bacterial Photosynthesis, Gest H., San Pietro A. y Vernon L.P.(Ed.) The Antioch Press, Yellow Springs; pag.89.
72. Cohen- Bazire G.,Pfening N. y Kunisawa R.(1964) J.Cell.Biol. 22, 207.
73. Pfening N. y Cohen-Bazire G.(1967) Arch. Mikrobiol. 59, 226.
74. Holt S.C.,Conti S.F. y Fuller R.C. (1966) J.Bacteriol. 91, 311.
75. Gorlenko,V.M. y Zhilina T.N. (1968) Mikrobiologiya 37, 1052.
76. Drews G.,Lampe H.H. y Ladwig R. (1969) Arch. Mikrobiol.65,12.
77. Kran G.,Schlcte F.W. y Schlegel H.G. (1963) Naturwissenschaften 50, 728 .
78. Fuller R.C., Conti S.F. y Mellini D.B. (1963) en Bacterial Photosynthesis, Gest H.,San Pietro A. y Vernon L.P. (Ed.) The Antioch Press, Yellow Springs; pág.71.
79. Takacs B.J. y Holt S.C. (1971) Biochim. Biophys. Acta 233, 258.
80. Eimhjellen K.E., Steensland H. y Traetterberg J. (1967) Arch. Mikrobiol. 59, 82.
81. Weckesser J.,Drews G. y Tauschel H.D.(1969) Arch.Mikrobiol. 65, 346.
82. de Boer W.E.(1969) Antonie van Leeuwenhook J. Microbiol. Serol. 35 ,241 .
83. Niklowitz W. y Drews G.(1955) Arch.Mikrobiol. 23, 123.
84. Drews G. y Ladwig R.,mencionado en 70.
85. Remsen,C.G.,Watson S.W.,Waterbury J.B. y Truper H.G.(1968) J. Bacteriol. 96, 2374.
86. Drews G. y Giesbrecht P.(1965) Arch.Mikrobiol.52, 242.
87. Giesbrecht P. y Drews G. (1966) Arch. Mikrobiol. 54, 297.
88. Cohen-Bazire G. y Kunisawa R. (1960) Proc.Nat.Acad. Sci. U.S.A.46, 1543.
89. Worden P.B. y Sistrom W.R.(1964) J.Cell.Biol. 23, 135.
90. Cusanovich M.A. y Kamen M.D.(1968) Biochim.Biophys. Acta 153, 376.
91. Gibson K.D. (1965) Biochemistry 4,2027.
92. Langridge R.Barron P.D. y Sistrom W.R.(1964) Nature 204, 97.
93. Low H. y Afzelius B.A. (1964) Exptl. Cell. Res. 35, 431.
94. Holt S.C. y Marr A.G. (1965) J. Bacteriol 89, 1413.
95. Baccarini-Melandri A.,Gest H. y San Pietro A. (1970) J.Biol. Chem. 245, 1224.
96. Hochman A. y Carmelli C.(1971) FEBS Lett.13, 36.
97. Howell S. H. y Moudrianakis E.N. (1967) Proc.Nat.Acad. Sci. USA 58, 1261.
98. Fitz-James P.C. (1960) J.Biophys.Biochem. Cytol. 8, 507.
99. Lascelles J. (1964) Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation, W.A.Benjamin, Inc.,New York.
100. Falk J.E.(1964) Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier Publishir Co.,Amsterdam.
101. Smith K.M.(Ed.) (1975) Porphyrins and Metalloporphyrins. Elsevier Scientific Publ. Co.,Amsterdam.
102. Burnham B.F.(1960) en Metabolic Pathways 3° Ed.,Greenberg D.M.(Ed.) Academic Press, New York; 3, 403.
103. Granick S. y Sassa S. (1971) en Metabolic Pathways 3°Ed.Vogel H.J.(Ed.) Academic Press, New York; 5, 77.
104. Hoppe-Seyler F.(1880) Z. Physiol. Chem. 4, 193.
105. Smith E.L. (1948) Nature 162 , 144.
106. Smith E.L.(1965) Vitamin B_{12} . John Wiley and Sons Inc., New York.
107. Willstatter R.(1920) en Nobelstiftelsen, Stockholm, Les Prix Nobel en 1914-1918, Norsted P.A.(Ed.) Stockholm,pag.1.
108. Fischer H. y Orth H.(1937) Die Chemie des Pyrrols, 2 Vols. Akademisches Verlagsgesellschaft, Leipzig.
109. Woodward R.B., Ayer W.A., Beaton J.M.,Bickelhaupt F.,Bonnett R., Buchschacher P.,Closs G.L.,Dutler H.,Hannah J., Hauck P.,Ito. S., Langemana A., LeFoff E. , Leimgruber W., Lwowski W.,Sauer J., Valenta J. y Volz H. (1960) J.Am. Chem.Soc. 82 , 3800.

110. Lwowski W. (1966) en The Chlorophylls, Vernon L.P. y Seely G.R.(Ed.) Academic Press, New York; pag. 119.

111. Rickes E.L., N.G., Koniuszy F.R., Wood T.R. y Folkers K. (1948)Science 107 , 396.

112. Smith E.L. y Parker L.F.J.(1948) Biochem. J. 43, viii.
113. Wolf D.E., Jones W.H.,Valiant J. y Folkers K. (1950) J.Am.Chem. Soc. 72, 2820.

114. Armitage J.B.,Cannon J.R.,Johnson A.W.,Parker L.F.J.,Smith E.L. Stafford W.H. y Todd A.R. (1953) J. Chem. Soc.pag.3849.
115. Brink C.,Hodgkin D.C., Lindsey J., Pickworth J.,Robertson J.H. y White J.G. (1954) Nature 174, 1169 .
116. Hodgkin D.C.,Pickworth J., Robertson J.H., Prosen R.J., Sparks R.A. y Trueblood K.H.(1959)Proc.R.Soc. Lond. A 251, 306.
117. Lenhert P.G. y Hodgkin D.C. (1961) Nature 192, 937.
118. Hoard J.L., Hamor M.J. y Hamor T.A. (1963) J.Am.Chem.Soc. 85,2334.
119. Hamor T.A., Caughey W.S. y Hoard J.L. (1965) J.Am. Chem. Soc. 87, 2305.
120. Hoard J.L., Hamor M.J.,Hamor T.A. y Caughey W.S. (1965) J.Am. Chem. Soc. 87, 2312.
121. Koenig D.F. (1965) Acta Cryst. 18, 663.
122. IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomeclature (1966) Biochem. Biophys. Acta 117, 285.
123. Bertele E.,Boss H. Dunitz J.D.,Elsinger F.,Eschenmoser A., Filner I., Gribi H.P., Gschwend H.,Meyer E.F.,Pesaro M. y Scheffold R.(1964) Angewandte Chemie (Eng.Ed.) 3, 490.
124. Johnson A.W. y Kay I.T.(1965) J.Chem. Soc. pag.1620.
125. Jensen A., Aasmundrud O. y Eimhjellen K.E. (1964) Biochim. Biophys. Acta 88, 466.
126. Purdie J.W. y Holtz A.S. (1965) Can.J.Chem. 43, 3347.
127. Holt A.S. (1965) en The Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Goodwin T.W.(Ed.) Acadmic Press, New York; pag.3.
128. Holt A.S., Purdie J. W.y Wasley J.W.F.(1966) Can.J.Chem.40, 171.
129. Brockman jr.H. (1976) Phil. Trans. R.Soc.Lond.B 273, 277.
130. Olson J.M. y Stanton E.K. (1966) en The Chlorophylls, Vernon L.P. y Seely G.R.(Ed.) Academic Press, New York ; pag. 381
131. Clayton R.K. (1963) en Bacterial Photosynthesis, Gest H.,San Pietro A. y Vernon L.P.(Ed.) The Anthioc Press, Yellow Springs; pag.495.
132. Strain, H.H. y Svec W.A.(1966) en The Chlorophylls, Vernon L.P. y Seely G.R. (Ed.) Academic Press, New York; pag. 21.
133. Katz E. y Wassink E.C.(1939) Enzymologia 7, 97.
134. Wassink E.C., Katz E. y Dorrestein R. (1939) Enzimologia 7,113.
135. Ke B. (1966) en The Chlorophylls, Vernon L.P. y Seely G.R. (Ed.) Academic Press, New York; pag. 427.
136. Jacobs E.E., Holt A.S., Kromhout R. y Rabinowitch E. (1957) Arch. Biochem. Biophys. 72, 495.
137. Trurit H.J. y Colomano G.(1959) Biochim. Biophys. Acta 31 ,435.
138. Krasnovskii A.A., Voynovskaya K.K. y Kosubutskaya. L.M.(1952) Dokl. Akad. Nauk SSSR 85, 389.
139. Krasnovskii A.A., Erokhim Y.E. y Yui-Tsum K.H.(1962) Dokl.Akad. Nauk SSSR 143, 456.
140. Oster G. y Billin .J.S.(1957) J. Amm.Chem. S c. 79, 2461.
141. Oster G. y Broyd S.D.(1961) Nature 192, 132.
142. Goedheer J.C.(1966) en THe Chlorophylls, Vernon, L.P. y Seely G.R.(Ed.) Academic Press, New York; pag. 399.
143. Allen M.D.,Murchic J.C.,Jeffrey S.W. y Bendix S.A. (1963) en Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria, Japan. Soc. Plant Physiol. (Ed.) University of Tokyo Press, Tokyo; pag. 407.
144. Olson J.M. y Romano C.A. (1962) Biochim.Biophys. Acta 59, 726.
145. Olson J.M.,Filmer D.,Radloff R.,Romano C.A. y Sybesma Ch. (1963) en Bacterial Photosynthesis, Gest H. , San Pietro A. y Vernon L.P.(Ed.) TheAntioch Press, Yellow Springs; pag. 423.
146. Olson J.M. (1966) en The Chlorophylls, Vernon L.P. y Seely G.R.(Ed.) Academic Press, New York; pag.413.
147. Fenna R.E. y Matthews B.W. (1975) Nature 258, 573.
148. Reed D.W. y Clayton R.K. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 30 471.
149. Reed D.W.(1969) J.Biol. Chem.244, 4936.
150. Reed D.W.,Raveed D. y Israel H.W. (1970) Biochim. Biophys.Acta 223, 281.

151. Vernon L.P. y García A.F.(1967) Biochim. Biophys. Acta 143, 144.
152. Griffiths M.,Sistrom W.R., Cohen-Bazire G. y Stanier R.Y. (1955) Nature 176,1211.
153. Bergeron J.A. y Fuller R.C.(1959) Nature 194 , 553.
154. Crounse J.,Sistrom W.R. y Nemser S.(1963) Photochem. Photobiol. 2,361.
155. Granick S.y Levere R.D. (1964) Progress in Hematology, Ed.Guirre y Stratton, New York , 4, 1.
156. Tait G.H.(1960) en Porphyrins and Related Compounds; Goodwin T.W.(Ed.) Academic Press, London; pag. 19.
157. Wider de Xifra E.A.(1972) Tesis FCEN.
158. Mazumder R.,Sanadi D.R. y Rodwell V.W.(1960) J.Biol.Chem. 235, 2546.
159. Cha S. y Parks R.E. jr.(1964) J.Biol.Chem.239,961.
160. Labbe R.F.,Kurumada T. y Onisawa J. (1965) Biochim.Biophys. Acta 111, 403.
161. Kaufman S.(1955) Meth.Enzymol. 1, 719.
162. Kaufman S. y Alivisatos S.G.A.(1955) J.Biol.Chem.216, 141.
163. Nandi D.L. y Waygood E. (1965) Can.J.Biochem. 43, 1605.
164. Palmer J.M. y Weddin R.T.(1960) Biochim.Biophys. Acta 113, 167.
165. Bush L.P. (1969) Plant Physiol. 44, 347.
166. Stobart A.K. y Pinfield N.S. (1970) New Phytol. 69, 31.
167. Wider E.A. y Tigier H.A.(1971) Enzymologia 41, 217.
168. Hager L.P. (1957) J.Am.Chem. Soc. 79, 4864
169. Gibson J.,Upper C.D. y Gunsalus C.(1967) J.Biol. Chem. 242; 2474.
170. Tait G.H. (1973) Biochem.J. 131, 389.
171. Burnham B.F.(1963) Acta Chem. Scand. 17, 123.
172. Fluhr R. y Harel E. (1975) Phytochemistry 14, 2157
173. Mitchell R.A.,Butler L.G. y Boyer P.D. (1964) Biochem.Biophys. Res.Commun. 6, 545.
174. Upper C.D.(1964) Ph.D.Thesis, Illinois University.
175. Brownie E.R. y Bridger W.A.(1972) Can. J.Biochem. 7, 720.
176. Ramaley R.F., Bridger W.A., Meyer R.W. y Boyer P.D. (1967) J. Biol.Chem. 242, 4287.
177. Leitzman C., Wu J. y Boyer P.D. (1970) Biochemistry 9, 2338.
178. Bridger W.A. (1971) Biochem. Biophys. Res.Commun. 42, 948.
179. Wider W.A. y Tigier H.A. (1970) FEBS Lett.9, 30.
180. Hager L.P. (1962) en The Enzymes,Boyer, Lardy y Myrback (Ed.) Academic Press, New York; 6, 387.
181. Nishimura J.S. y Grinnell F. (1972) Enzymol. 36, 183.
182. Wider de Xifra E.A., Mendiara S.N. y Batlle A.M. del C. (1972) FEBS Lett. 37 , 275.
183. Wider de Xifra E.A. y Batlle A.M.del C.(1973) Enzyme 16 , 128.
184. Wider de Xifra E.A. y Batlle A.M.del C.(1975) en Porphyrins in Human Diseases, Doss, M. (Ed.) S. Karger , Basel; pág. 25.
185. Grinnel F. y Nishimura J.S. (1969)Biochemystry 8, 568.
186. Cha S., Cha C.M. y Parks R.E.(1965) J.Biol. Chem. 240, PC 3700
187. Hulquist D.E., Moyer R.W. y Boyer P.D.(1966) Biochemistry 6,322
188. Pearson P.H. y Bridger W.A. (1975) J.Biol.Chem.250, 8524.
189. Gibson K.D., Neuberger A. y Scott J.J.(1955) Biochem.J. 61, 618
190. Sachs P.(1931) Klin.Wochsr.10, 1123.
191. Waldenstrom J. y Vahlquist B. (1939) Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 260, 189.
192. Prunty F.T.G. (1945) Biochem.J. 39, 446.
193. Grinstein M.,Schwartz S. y Watson C.J. (1945) J.Biol.Chem.157, 323.
194. Granick S. y Bogorard L. (1953) J.Am.Chem.Soc. 75 , 3610.
195. Cookson G.H. y Rimington C. (1953) Nature 171, 875
196. Cookson G.H.(1953) Nature 172, 457.
197. Kennard O. (1953) Nature 171, 870.
198. Prasad K.S.N. y Raper R. (1955) Nature 175, 629 .
199. Rimington C. y Krol, S. (1955) Nature 175, 630.
200. Jackson A.H. , Mc Donald D.M. y McDonald S.F. (1956) J.Am.Chem. Soc. 78. 505.
201. Jackson A.H. y McDonald S.F.(1957) CAn. J.Chem. 35, 715.
202. Falk J.E. , Dresel E.I. B. y Rimington C. (1953) Nature 172 ,292.
203. Dresel, E.I.B. y Falk J.E. (1956) Biochem. J. 63, 80.

204. Dresel E.I.B. y Falk J.E.(1956) Biochem.J. 63 ,72.
205. Lascelles J.(1956) Biochem.J. 62, 78 .
206. Carrel E.F. y Kahn J.S. (1964) Arch.Biochem.Biophys.108,1.
207. Batlle A.M. del C. , Ferramola A.M. y Grinstein M.(1967)Biochem. J.104, 244.
208. Tomio J.M.,Tuzman V. y Grinstein M.(1968) Eur.J.Biochem. 6, 64.
209. Calissano P.,Cartasegna C. y Matteini M. (1966) Giornale di Biochimics, 15.18.
210. Nandi D.L. y Waygood E. (1967) Can.J.Biochem. 45 , 325.
211. Schneider H.A.W. (1970) Z. Pflazenphysiol. 62, 133.
212. Tigier H.A.,Batlle A.M.del C.y Locascio (1968) Biochim.Biophys. Acta 151, 300.
213. Stella A.M. (1978) Tesis FCEN.
214. Burnham B.F. y Lascelles J.(1963)Biochem. J. 87, 462.
215. Nandi D.L.,Baker-Cohen K.F. y Shemin D.(1968) J.Biol. Chem. 243, 1224.
216. Ho Y.K. y Lascelles J (1971) Arch. Biochem. Biophys. 144 , 734.
217. Nandi D.L. y Shemin D.(1973) Arch. Biochem.Biophys. 158 , 305.
218. Menon I.A. y Shemin D.(1967) ARch. Biochem, Biophys. 121, 304.
219. Walerych W. (1963) Acta Biochim. Polon. 10, 243.
220. Komai H. y Neilands J.B. (1969) Biochim.Biophys. Acta 171 , 311.
221. Barreiro O.L.C. (1967) Biochim. Biophys. Acta 139 , 479.
222. Granick S. (1962) [illegible] Acad. Sci., Ser.2, 25 , 53 .
223. Granick S. (1961) Plant Physiol. 36 XLVIII.
224. Stobart A.K. y Thomas D.R. (1968) Phytochemistry 7, 1313.
225. Granick S. y Mauzerall D. (1958) J.Biol. Chem. 232 , 1119.
226. Schmid R. y Shemin D (1955) J. Am.Chem . Soc. 77 , 506.
227. Shemin D. (1968) en Porphyrins and Related Compounds, Goodwin. T.W. (Ed.) Academic Press, London ; pag. 75.
228. Nandi D. y Shemin D. (1968) J.Biol.Chem. 243, 1231.
229. Stella A.M. y Batlle A.M.del C. (1978) Plant. Sciencie (en prensa)
230. Shemin D. (1976) Phil.Trans. R.Soc. London , B 273 , 109
231. Wu U., Shemin D. , Richards K.E. y Williams R.C. (1974) Proc.Nat, Acad. Sci. USA 69, 2585.
232. Van Heynigen S. y Shemin D.(1971) Biochemistry 10 , 4676
233. Doyle D. (1971) J. Biol. Chem. 246 , 4965.
234. Gurba P.E., Senett R.F. y Kobes R.D. (1972) Arch. Biochem.Biophys. 150,130.
235. Wilson E.L., Burger P.E. y Dowle E.B.(1972) Eur. J.Biochem.29,563
236. Chech A. y Neilands J.B.(1973) Biochem. Biophys.Res.Commun. 55, 1060.
237. Coleman D.L.(1966)J.Biol.Chem. 241 , 5511.
238. Steer B.T. y Gibbs M.(1969) Plant Physiol. 44, 775.
239. Schneider H.A.W. (1971) Z.Naturforsch. 26, 908.
240. Riley P.B.,Jackson D.W.,Ross, D. y Savage P.A. (1960) Soc. Chem.Ind.(London), Monograph 12, 127.
241. Speedle J.D., Bebengton W. y Hull G.W. (1960) U.S. Pat. Office N°2951017.
242. Stadtman E.R., Overath P., Eggeres H. y Lynen F. (1960) Biochem. Biophys. Res. Commun. 2,1.
243. Smith R.M. y Monty K.J. (1959) Biochem. Biophys. Res.Commun. 1, 105.
244. Sterjnholm R. y Wood H.G.(1961) Proc. Nat. Acad.Sci. USA 47, 303.
245. Muthukrishnan S., Padmanaban G. y Sarma P.S. (1969) J.Biol. Chem. 244, 4241.
246. Nandi D. y Shemin D.(1968) J.Biol.Chem.243 .1236.
247. Batle A.M. del C., Stella A.M., Ferramola A.M., Sopena Y., Wider de Xifra E.A. y Sancovich H.A. (1978) Int.J.Biochem.9
248. Cookson G.H. y Rimington C.(1954) Biochem. J. 57, 476.
249. Mauzerall D. (1960) J.Am. Chem. Soc. 82 , 2601.
250. Mauzerall D. (1960) J.Am.Chem. Soc. 82, 2605.
251. Bogorard L. y Granick S. (1953) Proc.Nat. Acad. Sci. USA 39,1176.
252. Bogorard L.(1955) Science 121 , 878.
253. Bogorard L. (1958) J.Biol. Chem. 233, 501.
254. Llambías E.B.C. (1971) Tesis FCEN.
255. Battersby A.R. y McDonald E.(1975) en Porphyrins and Metalloporphyrins, Smith K.M. (Ed.) Elservier, Amsterdam
256. Batle A.M. del C. y Rosetti M.V. (1977) Int.J.Biochem. 8, 251.
257. Bogorard L.(1958) J.Biol. Chem. 233 , 510.
258. Bogorard L. y Marks G.S. (1960) J.Biol.Chem. 235 , 2127.
259. Lockwood W.H. y Benson A. (1960) Biochem. J. 75, 372.
260. Bogorard L.(1960) en Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems, Allen M.B. (Ed.) Academic Press, New York ; pag.226.

261. Carpenter A.T. y Scott J.J.(1961) Biochim. Biophys. Acta 52, 195.

262. Frydman R.B. y Feinstein G. (1974) Biochim. Biophys.Acta 350, 358.
263. Bogerard L. y Marks G.S. (1960) Biochim. Biophys. Acta 41, 356.
264. Battersby A.R. y McDonald E. (1976) Phil. Trans. R.Soc. Lond. B. 273, 161.
265. Battersby A.R. ,Gibson K.H., McDonald E. Mander L.N.,Moron J. y Nixon L.N. (1973) , J.Chem.Soc. Chem.Commun.pag. 768.
266. Fryd,an B.,Frydman R.B.,Valasinas A., Levy E.S. y Feinstein G. (1976) Phil. Trans. R.Soc. Lond.B 273 , 137.
267. Scott A.I., Ho K.S., Kajiwara M. y Takahashii T.(1970) J. Am. Chem. Soc. 98, 1589.
268. Llambías E.B.C. y Batlle A.M. del C. (1971) Biochem. J.121 , 327.
269. Hoare D.S. y Heath H.(1968) Nature 181, 1592.
270. Hoare D.S. y Heath H. (1959) Biochem.J. 72 , 14.
271. Rimington C. y Bocij H.L. (1957) Biochem. J. 65, 3P.
272. Mauzerall D. y Granick S. (1958) J.Biol.Chem. 232 , 1141.
273. Batlle A.M. del C. y Grinstein M.(1962) Biochim. Biophys. Acta. 62, 197.
274. Batlle A.M.del C. y Grinstein M.(1964) Biochim. Biophys. Acta 82, 13.
275. San Martin de Viale L.C. y Grinstein M.(1968) Biochim. Biophys. Acta 158, 79.
276. Tomic J.M.,García R.C., San Martín de Viale L.C. y Grinstein M. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198, 353.
277. García R.C., San Martín de Viale L.C., Tomic J.M. y Grinstein M. (1973) Biochim. Biophys. Acta 309, 203.
278. Romeo G. y Levin E.Y. (1971) Biochim. Biophys. Acta 230, 330.
279. Tomio J.M. y Grinstein M.(1968) Eur. J.Biochem. 6, 80.
280. Dresel E.I.B. y Falk J.E. (1956) Biochem. J. 63, 368.
281. Bogorard L.(1958) J.Biol.Chem. 233, 510.
282. Neve A.R.,Labbe R.F. y Aldrich R.A. (1956) J.Am.Chem. Soc. 78, 691.
283. Comford P. (1964) Biochem. J. 91, 64.
284. Urata G. y Kimura H. (1960) J. Biochem. (Tokyo) 47, 150.
285. Jackson A.H.,Sancovich H.A.,Ferramola A.M. Evans N., Games D.E., Matlin S.A., Elder G.H. y Smith S.G. (1976) Phil. Trans.R. Soc. Lond. B. 273 , 191.
286. Smith S.G., Ferramola A.M., Sancovich H.A.,Evans N., Matlin S.A. Ryder D.J. y Jackson , A.H. (1970) Ann. Clin. Res. 8 Suppl.17,89.
287. Jackson A.H., Ferramola A.M., Sancovich H.A., Evans N.,Matlin S.A., Ryder D.J. y Smith S.G.(1976) Ann.Clin.Res. 8 Suppl. 17,64.
288. Dresel E.I.B. (1965) en CIBA Foundation Symposium on Porhyrin Biosynthesis and Metabolism, Wolstenholme G.E.W. y Miller E.C.P. (Ed.)J. y A. Churchill Ltd.,London; pag. 72.
289. Rimington C.(1959) Br. Med. Bull. 15, 19.
290. Sano S. y Granick S. (1961) J.Biol. Chem. 236 , 1173.
291. Batlle A.M.del C. , Benson A. y Rimington C. (1965) Biochem.J. 97, 731.
292. Al Azimi H., Jackson A. y Ryder D.(1970) J.Chem.Soc. Commun.
293. Mori M. y Sano S. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 610.
294. Tait, G.H. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 116.
295. Tait G.H. (1970) Biochem. J. 116, 281.
296. Tait G.H. (1972) Biochem. J. 126, 1159.
297. Batlle A.M. del C. y Rimington C. (1966) Ciencia e Investigación 22, 369.
298. French J., Nicholson D.C. y Rimington C.(1970) Biochem.J. 120,393
299. Sano S. (1966) J.Biol. Chem. 241, 5276.
300. Kennedy G.Y., Jackson A.H., Kenner G.W. y Suckling C.J. (1971) FEBS Lett. 6,9.
301. Cavaleiro J.A.S., Kenner G.W. y Smith K.N. (1973) J.Chem. Soc. Chem. Commun.,pag. 183 .
302. Games D.E.,Jackson A.H., Jackson J.R., Belcher R.V. y Smith S. G.(1975) No publicado mencionado en cita 285.
303. Battersby A.R.,Baldas J.,Collins J., Grayson D.H., James K.J. y McDonald E.(1972) J.Chem .Soc. Chem.Commun. pág. 1265.
304. Jackson A.H.,Games D.E.,Couch P. Jackson J.R., Belcher R.V. y Smith S.G. (1974) Enzyme 17, 81.
305. Jackson A.H., Games D.E., (1975) Proc.N.Y. Acad. Sci.244, 591.
306. Poulson R. y Polglase W. (1973) Biochim. Biophys. Acta 329, 256.
307. Labbe P., Volland C. y Chaix P.(1967) Biochim. Biophys. Acta 143,70.
308. Poulson R. y Polglase W.J. (1974) FEBS Lett. 40, 258.
309. Olden y Hempfling (1973) J.Bacteriol. 113 , 914.

310. Kamtakahand-Pearlstone, Poulsen R. y Polglase W.(1973) Can.J. Microbiol. 19, 1235.
311. Poulsen R. (1970) Ann. Clin. Res. 6, Suppl. 17, 50.
311.a.Poulson R. y Polglase W. (1975) J.Biol. Chem. 230, 1209.
311.b.Smith S.,Jackson A.H. y Jackson J.R. (1970)Ann. Clin. Res. 8, 53.
312. Granick S. (1954) Fed. Proc.13, 219.
313. Labbe R.F. (1959) Biochim. Biophys. Acta.31, 509.
314. Yoneyama Y.,Ohyama H.,Sugita Y. y Yoshikawa H. (1962) Biochim. Biophys. Acta 62, 264.
315. Minakami S.,Kagawa Y.,Sugita Y. y Yoneyama Y.(1959) Biochim. Biophys Acta 35, 569.
316. Ohyama H., Sugita Y., Yoneyama Y. y Yoshikawa H. (1961) Biochim. Biophys. Acta 47, 413.
317. Yoneyama Y., Ohyama H., Sugita Y. y Yoshikawa H. (1963) Biochim. Biophys. Acta 74, 635.
318. Neve R.A. (1961) en Haematin Enzymes, Falk J.E., Lemberg R. y Morton R.K. (Ed.) Pergamon Press, London ; 19, 207.
319. Langelaan D.E., y [illegible] y Tochill C. (1[illegible]) Clin.Chim. Acta 20, 245.
320. Porra R.J. y Jones O.T.G.(1963) Biochem. J. 87, 181.
321. Nishida G. y Labbe R.F. (1959) Biochim : Biophys. Acta 31, 519.
322. Labbe R.F. y Hubbard N. (1961) Biochim. Biophys. Acta 52 ,130.
323. Labbe R.F., Hubbard N. y Caughey W.S. (1963) Biochemistry 2, 372.
324. Goldin B.R. y Little H.N. (1959) Biochim. Biophys. Acta 171 , 321.
325. King R.F. y Page E.R. (1960) Biochem. J. 110, 45P.
326. Jones O.T.G.(1968) Biochem.J. 107 , 113.
327. Porra R.J. y Lascelles J. (1968) Biochem. J. 108 , 343.
328. Porra R.J. y Jones O.T.G. (1963) Biochem.J. 87, 186.
329. Labbe P.,Volland C. y Chaix P. (1968) Biochim. Biophys.Acta 159,527.
330. Jones M.S. y Jones O.T.G. (1970) Biochem.J. 119, 453.
331. Dailey H.A. Jr. y Lascelles J.(1974) Arch. Biochem.Biophys. 160,523.
332. Goldberg A. (1959) Br. J. Haematol. 5, 150.
333. Labbe R.F. y Hubbard N.(1960) Biochim. Biophys . Acta 41, 185.
334. Porra R.J. , Witols K.S., Labbe R.F. y Newton N.A. (1967) Biochem. J. 104, 321.

335. Yoneyama Y., Tamai, A., Yasuda T. y Yoshikawa H. (1965) Biochim. Biophys. Acta 105, 100.
336. Yoshikawa H. y Yoneyama Y. (1964) en Iron Metabolism, Gross F.(Ed.) Springer Verlag, Berlin; pag.24.
337. Mazanowska A.M., Neuberger A. y Tait G.H. (1966) Biochem.J.98, 117.
338. Mazanowska A.M.,Dancewicz A.M., Malinowska T. y Kowalski E. (1969) Eur. J.Biochem. 7, 583.
339. Takeshita M.,Sugita Y. y Yoneyama Y. (1970) Biochim. Biophys. Acta 202. 544.
340. Sugita Y. (1962) J. Biochem. (Tokyo) 51, 436.
341. Schwartz H.C. , Goudsmit R.,Hill R.I., Cartwright S.F. y Wintrobe M.M. (1961) J.Clin. Invest.40, 188.
342. Granick S. (1948) J.Biol. Chem. 172, 717.
343. Granick S.(1961) J.Biol. Chem. 236, 1108.
344. Gough S. (1972) Biochim.Biophys. Acta 280 , 36
345. Granick S. (1948) J.Biol. Chem. 175,333.
346. Rebeiz C.A. Mattheis J.R., Smith B.D.,Rebeiz C.C., y Dayton D.F. (1975) Arch. Biochem. Biophys, 166 ,446..
347. Rebeiz C.A., Smith B.D., Mattheis J.R.,Rebeis C.C. y Dayton D. F.(1975) Arch.Biochem. Biophys. 167, 351.
348. Granick S.(1954) Science 120, 1105.
349. Battersby A.R., Staunton J. y Wightman R.H. (1972) J.Chem.Soc. Chem.Commun. pag. 1118.
350. Wider de Xifra E.A., Batlle A.M.del C. y Tigier H.A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 235, 511.
351. Manetas Y. y Akcyunoglou G. (1975) Plant Sci.Lett. 5, 375.
352. Ellis R.J. y Schift J.A. (1976)Plant Sci.Lett.7,143.
353. Rebeiz C.A. y Castelfranco P.A. (1973) Ann.Rev.Plant. Physiol.24, 129.
354. Rebeiz C.A.,Mattheis J.R.,Smith B.D.,Rebeiz,C.C. y Dayton D. F. (1975) Arch.Biochem.Biophys. 171, 549.
355. Gorhein A.(1972) Biochem.J. 127, 97.
356. Gorchein A. (1973) Biochem.J. 134, 833'.
357. Gibson K.D.,Neuberger A. y Tait G.H. (1963) Biochem.J.88, 325.
358. Radmer R.J. y Bogorard L.(1967) Plant Physiol. 42, 463.
359. Ebbon J.G. y Tait G.H. (1969) Biochem.J.111, 573.
360. Jones O.T.G. (1968) en Porphyrins and Related Compounds, Goodwin B. W.(Ed.) Academic Press , London; pag. 131.
361. Dujardin E. y Sinroval C. (1970) Photosynthetica 4, 129.
362. Buttler W.L. y Briggs W.R. (1966) Biochim. Biophys. Acta 112, 45.
363. Gassman M.L. (1973) Plant Physiol.51, 139.
364. Henningsen K.W.(1970) J.Cell.Sci. 7, 587.
365. Kahn A.,Boardman N.K. y Thorne S. W.(1970) J.Mol.Biol. 48, 85.
366. Kahn A. y Nielsen O.E.(1974) Biochim. Biophys. Acta 333, 409.
367. Granick S. (1959) Plant Physiol. 34, XVIII.

368. Griffiths W.T. (1975) Biochem.J. 140, 17.
369. Gassman M.L. y Bogorard L.(1967) Plant Physiol, 42, 774.
370. Sundqvist C.(1969) Physiol. Pl.22, 147.
371. Gassman M.L.(1973) Biochem.Biophys. Res. Commun.53, 693.
372. Sundqvist C. y Klockare B. (1975) Photosynthetica 9, 62.
373. Sundqvist C. (1970) Physiol. Pl.23, 412.
374. Schopfer P. y Siegelman H.W.(1968) Plant Physiol.43, 990.
375. Gassman M.,Granick S. y Mauzerall D.(1968) Biochem.Biophys. Res.Commun. 32, 295.
376. Shibata K.(1957) J.Biochem. (Tokyo) 44, 147.
377. Granick S. y Gassman M.(1970) Plant Physiol. 45,201.
378. Griffiths W.T.(1974) FEBS Lett. 40, 301.
379. Schultz A. y Sauer K.(1972) Biochim. Biophys. Acta 267, 320.
380. Mathis P. y Sauer K. (1972) Biochim. Biophys. Acta 267, 498.
381. Smith J.H.C.(1960) en Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems, Allen, M.B. (Ed.) Academic Press, New York; pag.257.
382. Boardman N.K.(1962) Biochim.Biophys. Acta 64, 279.
383. Thorne S.W.(1971) Biochim.Biophys. Acta 226, 113.
384. Henningsen K.W. y Kahn A.(1971) Plant Physiol. 47, 685.
385. Smith J.H.C. (1960) en The Photochemical Apparatus its Structure and Functions, Brookhaven Symp. Quant. Biol. 11, 296.
386. Jones O.T.G. (1963) Biochem.J. 88, 335.
387. Jones O.T.G.(1963) Biochem.J. 89, 182.
388. Richards W.R. y Lascelles J. (1969) Biochemistry 8, 3473.
389. Jones O.T.G. (1966) Biochem. J.101 , 153.
390. Houssier C. y Sauer, K. (1969) Biochim. Biophys. Acta 172, 476.
391. Griffiths W.T. y Jones O.T.G. (1975) FEBS Lett. 50, 355.
392. Ellsworth R.K. y Aronoff S. (1968) Arch.Biochem. Biophys.125 , 35
393. Ellsworth R.K. y Aronoff S. (1968) Arch. Biochem. Biophys.125, 269.
394. Ellsworth R.K. y Aronoff S. (1969) Arch.Biochem.Biophys.130, 374.
395. Jones O.T.G. (1976) Phil.Trans.R.Soc. Lond.B. 273, 207.
396. Ellsworth R.K. y Hsing A.S. (1973) Biochim.Biophys.Acta 313, 119.
397. Ellsworth R.K. y Hsing A.S. (1974) Photosynthetica 8, 228.
398. Klein A.O. y Vishniac W. (1961) J. Biol. Chem. 236 , 2544.
399. Holden M. (1961) Biochem.J. 78, 359.
400. Sudyina E.G. (1963) Photochem. Photobiol.2,181.
401. Chiba Y.,Aiga I, Idemoir M., Satch Y., Matushita K. y Sasa T. (1967) Plant Cell Physiol. (Tokyo) 8, 623.
402. Wellburn A.R. (1970) Phytochemistry 9, 2311.
403. Ellsworth R.K. (1972) Photosynthetica 6, 32.
404. Ellsworth R.K. (1972) Photosynthetica 6, 276.
405. Katz J.J.,Strain H.H., Harkness A.L.,Studier M.H., Svec W.A., Janson T.R. y Cope B.T. (1972) J.AM.Chem. Soc. 94 , 7938.
406. Jones O.T.G. (1964) Biochem.J. 91, 572.
407. Lascelles J. (1966) Biochem.J. 100, 175.
408. Lascelles J. y Altschuler T. (1967) Arch. Mikrobiol. 59, 204.
409. Kenner G.W.,Rimmer J.,Smith K.M. y Unsworth J.F. (1976) Phil.Trans. R.Soc.Lond. B.273, 255.
410. Holt A.S.,Hughes D.W.,Kende H.J. y Purdie J.W. (1962) J.Am.Chem. Soc. 84, 2835.
411. Hughes D.W. y Holt A.S.(1962) Can.J.Chem.40, 171.
412. Shemin D., Corcoran J.W.,Rosenblum C. y Miller I.M. (1956) Science 124, 272.
413. Schawartz S., Ikeda K.,Miller I.M. y Watson C.J. (1959) Science 129, 40.
414. Corocoran J.W.y Shemin D.(1957) Biochim. Biophys. Acta 25, 661.
415. Shemin D. y Bray R.C. (1964) Ann.N.Y.Acad. Sci. 112, 615.
416. Brown C.E., Katz J.J. y Shemin D.(1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2565.
417. Bray R.C. y Shemin D. (1963) J.Biol. Chem. 238, 1501.
418. Franck B.,Gantz D.,Montforts F.P. y Schmitchon F. (1972) Angewandte Chemie (Eng. Ed.) 11, 421.
419. Muller G. y Dieterle W. (1971) Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 352, 143.
420. Burnham I.F. y Plane R.A. (1960) Biochem.J. 98, 130.
421. Porra R.J. (1965)Biochim. Biophys. Acta 107, 176.
422. Scott A.I., Towsend C.A., Okada K., Kajiwara M., Whitman P.J. y Cushley R.J. (1972) J.Am.Chem. Soc.94, 8269.
423. Scott A.I., Towsend C.A., Okada K. y Kajiwara M.,(1974) J.Am. Chem.Soc. 96, 8054.
424. Scott A.I.,Towsend C.A. Okada K., Kajiwara M. , Cushley R.J. y Whitman P.J. (1974) J.Am. Chem.Soc.96, 8063.
425. Scott A.I., Towsend C.A., Okada K., Kajiwara M.,Whitman P.J. y Cushley R.J. (1972)J.Am.Chem. Soc. 94, 8267.

426. Scott A.I., Townsend C.A. y Cushley R.J. (1973) J.Am.Chem.Soc.95, 5759.
427. Scott A.I., Yagen B. y Lee E. (1973) J.Am. Chem.Soc. 95 , 5761
428. Scott A.I.(1975) Tetrahedron 31, 2639.
429. Scott A.I. (1976) Phil.Trans.R.Soc. Lond.B. 273, 303.
430. Friedman H.C. y Cagen L.M.(1970) Ann. Rev. Microbiol. 24, 159.
431. Plaut G.W.E., Smith C.M. y Alworth W.L. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43, 899.
432. Bloch K. y Rittenberg D. (1945) J.Biol.Chem. 159 , 45.
433. Shemin D. y Rittenberg D. (1946) J.Biol. Chem. 166, 621.
434. Wittenberg J. y Shemin D. (1949) J.Biol.Chem. 178, 47.
435. Wittenberg J. y Shemin D. (1950) J.Biol. Chem. 185, 103.
436. Muir H.M. y Neuberger A. (1950) Biochem. J. 47, 97.
437. Shemin D. y Wittenberg J. (1951) J.Biol.Chem. 192 , 315.
438. Shemin D. (1955) en Amino Acid Metabolism, McElroy W.D. y Glas H.B.(Ed.) John Hopkins Press, Baltimore; pag.727.
439. Shemin D. y Kumin S. (1952) J.Biol.Chem. 198, 827.
440. Shemin D. y Russell C.S. (1953) J.Am.Chem. Soc.75, 4873.
441. Neuberger A. y Scott J.J. (1953) Nature 172, 1093.
442. Shemin D., Russell C.S. y Abramsky T. (1955) J.Biol.Chem. 215. 613.
443. Laver W.G., Neuberger A. y Udenfriend S. (1958) Biochem.J.70,71 .
445. Kikuchi,G.Kumar A.,Talmage, P. y Shemin D.(1958) J.Biol.Chem. 233.1214.
446. Gibson K.D.,(1958) Biochim.Biophys.Acta 28, 451.
447. Chick H.,Macrae T.F.,Martin A.J.P. y Martin C.J. (1938) Biochem.J. 32,2207.
448. Carter C. W.,McFarlane R.G.,O'Brien, J.R.P. y Robb-Smith A.H.T.(1945) Biochem.J.39, 239.
449. Jukes T.H. (1953) en Biochemistry and Physiology of Nutrition, Bourne G.H. y Kidder G.W.(Ed.) Academic Press, New York 1,328.
450. Lascelles J. (1957) Biochem. J. 66, 65.
451. Schulman M.P. y Richert D.A. (1957) J.Biol.Chem.226 , 181.
452. Kikuchi G.,Shemin D. y Dachman D.J. (1958) .Biochim.Biophys.Acta 28, 219.
453. Sawyer E. y Smith R.A.(1958) Bacteriol. Proc.(Soc.Ann.Bacteriol).pag.111
454. Burnham B.F. (1970) Methods Enzymol. 17A, 195.
455. Clark-Walker G.D.,Rittenberg D. y Lascelles J. (1967) J.Bacteriol 94, 1648.
456. Porra R.J. y Irving E.A. (1970) Biochem.J.116, 42P.
457. Porra R.J. , Irving E.A. y Tennick A. (1972) ARch.Biochem.Biophys. 149,563
458. Brown E.G. (1958) Biochem.J. 70, 313.
459. Granick S. y Urata G. (1963) J.Biol.Chem. 238, 821.
460. Marver H.S., Tschudy D.P.,Perlroth M.G. y Collins A. (1966) J.Biol. Chem.241, 2803.
461. Brigs D.W.,Condie L.W.,Sedman R.M. y Tephly T.R.(1976) J.Biol. Chem.251, 4996.
462. Condie L.W.,Baron J. y Tephly T.R. (1976) Arch.Biochem.Biophys. 172, 123.
463. Aoki Y.,Wada O.,Urata G. Takaku F. y Nakao K. (1971) Biochem. Biophys.Res.Commun. 42, 568.
464. Feldman F. y Lichtman H.C. (1967) Biochim.Biophys.Acta 141, 653.
465. Marver H.S.,Strand E.,Swanson W.,Manning F. y Branchaud R. (1972) Anal.Biochem.47, 457.
466. Miyagi K. y Watson C. (1972) Blood 39, 13.
467. Osanai M. y Rembold H. (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.355, 327.
468. Rhee K.S. y Plapp F.W. jr.(1975) Pestic.Biochem.Physiol. 5, 412.
469. Gibson K.D.,Laver W.G. y Neuberger A. (1958) Biochem.J.68, 17P.
470. Narisawa K. y Kikuchi G. (1965) Biochim.Biophys.Acta 99, 580.
471. Marriot J.(1968) en Porphyrins and Related Compounds, Goodwin T.W. (Ed.) Academic Press, London; pag. 61.
472. Neuberger A. (1961) Biochem. J. 78, 1.
473. Matthew M. y Neuberger A. (1963) Biochem. J. 87, 601.
474. Laver W.G., Neuberger A. y Scott J.J. (1959) J.Chem. Soc. pag. 1463.
475. Urata G. y Ganick S. (1963) J.Biol.Chem.238 , 811.
476. Akhtar M. y AbboudM.M. Barnard G.,. Jordan P.M. y Zaman Z. (1976) Philos. Trans. R.Soc. Lond. B 273, 117.
477. Akhtar M. y Jordan P.M. (1968) Chem.Commun.pag. 1691.

478. Akhtar M. y Jordan P.M. (1969) Tetrahedron Lett. pag. 875.
479. Jordan P.M. y Akhtar M. (1970) Biochem.J. 116, 277.
480. Akhtar M., El- Obeid H.A. y Jordan P.M. (1975) Biochem. J. 145, 159.
481. Zaman,Z. ,Jordan P.M. y Akhtar M.(1973) Biochem. J. 135, 257.
482. Abboud M.M., Jordan P.M. y Akhtar M. (1974) Chem.Commun.pag . 843.
483. Laghai A. y Jordan P.M. (1976) Biochem. Soc.Transac. 4. 52.
484. Marver H.S., Tschudy D.P., Perlroth M.G.,Collins A. Y Hunter G. jr. (1966) Anal. Biochem.14, 53.
485. Tschudy D.P., Perlroth M.G.,Marver H.S. ,Collins,A. y Hunter G.jr. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 841.
486. Perlroth M.G.,Tschudy D.P., Marver H.S., Berard C.W., Zeigel R.F. Rechcigl M. y Collins A.(1966) Am.J.Med. 41, 149.
487. Lascelles J. (1960) J.Gen Microbiol. 23, 487.
488. Tuboi, S. Kim H. J. y Kikuchi G. (1969) Arch. Biochem.Biophys. 130,92.
489. Vogel W, Richert D.A., Pixley B.Q. y Shulman M.P. (1960) J.Biol.Chem. 235, 1769.
490. Brown E.G. (1958) Nature 182, 314.
491. Granick S.(1966) J.Biol.Chem. 241, 1359.
492. Marver H.S., Collins A., Tschudy D.P. y Rechcigl M.(1966) J. Biol. Chem.241, 4323.
493. Bull M.J. y Lascelles J. (1963) Biochem. J. 87, 15.
494. Granick S. (1963) J.Biol. Chem. 238 ,PC 2247.
495. Warnick G.R. y Burnham B.F. (1971) J.Biol. Chem. 246, 6880.
496. Yubisui T. y Yoneyama Y. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 150, 77.
497. Yubisui T., Takeshita M. y Yoneyama Y. (1976) Experientia 32,859.
498. Shemin D. (1955) en Ciba Foundation Symposium on Porphyrin Biosynthesis and Metabolism, Wolstenhome G.E.W . y Millar E. C.P.(Ed.) Little Brown amd Co., Boston ; pag.4.
499. Nemeth A. M.,Russell C.S. y Shemin D. (1959) J.Biol.Chem.229, 415.
500. Berlin N.I.,Neuberger A. y Scott J.J. (1956) Biochem J.64, 80.
501. Kowalski E., Dancewicz A.M. y Scot Z. (1959) 4°Cong. Int. Bioquim. Viena, Abstr., 1-8 .
502. Bagdasarian M. (1958) Nature 181, 1399.
503. Gibson K.D., Neuberger A. y Tait G.H. (1962) Biochem.J.83 , 539.
504. Neuberger A. y Turner J.M. (1963) Biochim. Biophys. Acta 67 , 342 .
505. Turner J.M. (1963) Biochim. Biophys. Acta 77, 697.
506. Lohr J.B. y Friedman H.C. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun, 69 ,908.
507. Gough S.P. , Beale S.I. y Granick S.(1976) Ann. Clin.Res., Suppl.8 ,70.
508. Jurgeson J.E., Beale, S.I. y Troxler R.F. (1976) Biochem. Biophys.Res. Commun. 69 , 149.
509. Beale S.I. (1976) Phil. Trans. R.Soc. Lond. B. 273 ,99.
510. Barret J.(1969) Biochim. Biophys. Acta 177, 442.
511. Labbe P., Dechateaubodeau G. y Labbe- Bois R. (1972).Biochimie 54,513.
512. Hickam S., Sanders J., Duelle E. y Eales L. (1968). Biochim. Biophys. Acta 241., 197.
513. Gajdos A. y Gajdos Török M. (1970) Biochim. Biophys.Acta 215,200.
514. Utter M.F., Duell E.A. y Bernofsky C. (1967) en Aspects of Yeast Metabolism; Mill A.K. y Krebs H.A. (Ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford; pag. 197.
515. Jayaraman J., Cotman C., Mahler H.R. y Sharp C.W. (1966) Arch. Biochem., Biophys. 116 , 224.
516. Chapman C. y Bartley W. (1968) Biochem. J. 108, 455.
517. Mahler H.R. y Lin C.C. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 61 , 963.
518. Krebs H.A. y Lowenstein J.M. (1960) en Metabolic Pathways, Greenberg D.M. (Ed.) Academic Press Inc. , New York; 1 , 129.
519. Fanica-Gaignier M. Y Clément-Metral J. (1973) Eur.J. Biochem. 40, 19.
520. Kikuchi, G., Kumar A. y Shemin D. (1959) Fed.Proc. 18, 259.
521. Gibson K.D., Matthew M., Neuberger A. y Tait G.H. (1961) Nature 192 , 204.
522. Burnham B.F. (1962) Biochem. J. 84, 15P.
523. Kaplan B. (1971) Biochim. Biophys. Acta 235 ,381.
524. Porra R.J., Irving E.A. y Tennick A.M. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 148, 37.

525. Gajdos A. y Gajdos -Török M. (1963) Nature 199 , 1093.
526. Gajdos A. y Gajdos -Török M. (1963) Comp. R.Soc.Biol. 157, 117.
527. Gajdos A. y Gajdos-Török, M. (1965) Nature 207, 640.
528. Gajdos A. y Gajdos- Török M., Gorchein A., Neuberger A., y Tait G. H. (1968) Biochem. J. 106 , 185.
529. Gibson K. D., Neuberger A. y Tait G.H. (1962) Biochem. J. 83 , 550.
530. Fanica-Gaignier M. y Clément-Metrak J.D. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 192.
531. Fanica-Gaignier M., Clément -Metral J.D. y Kamen M.D. (1971) Biochim. Biophys. Acta 226, 135.
532. Celze J. y Kamen M.D. (1971) Biochim. Biophys. Acta 234 , 131.
533. Schmidt G.L. y Kamen M.D. (1971) Arch. Mikrobiol. 76, 51.
534. Fanica-Gaignier M.(1971) 2nd. Int.Congress Photosynthesis, Stresa.
535. Ferroti J.J. y Gray E.D. (1967) Biochem. Biophys. Res.Commun. 29, 501.
536. Gajdos A., Gajdos-Török M., Palma-Carlos A. y Palma Carlos M.L. (1966) Comp.R.Soc.Biol. 160, 496.
537. Gajdos A. (1966) Acta Med. Scand.Suppl. 455 , 36.
538. Palma-Carlos A., Palma-Carlos M.L., Gajdos-Török M. y Gajdos A. (1966) Nature 211, 977.
539. Gajdos A., Gajdos-Török M., Palma-Carlos A. y Palma-Carlos M.L. (1967) Nature 213, 1022.
540. Gajdos A. y Gajdos-Török M. (1968) en Porphyrins and Related Compounds, Goodwin T.W.(Ed.) Academic Press, London; pag. 45.
(*) 542. Gajdos A. y Gajdos- Török M. (1973) Biomedicine 18 , 240 .
543. Gajdos A. y Gajdos-Török M. (1963) Bull.Soc. Chim. Biol. 45,1227
544. Gajdos A. y Gajdos-Török M. (1965) Bull.Soc.Chim.Biol. 47, 349.
545. Gajdos A. y Gajdos-Török M. (1973) Enzyme 16, 101.
546. Lascelles J. (1959) Biochem. J. 72 , 508.
547. Cohen-Bazire G., Sistrom W. R. y Stanier R.Y. (1957) J.Cell. Comp. Physiol. 49, 25.
548. Sistrom W.R. (1963) en Bacterial Phptosynthesis, Gest H., San Pietro A. y Vernon L.P. (Ed.) The Antioch Press, Yellow Springs; pag. 53.
549. Schön G. y Drews G.(1968) Arch. Mikrobiol 61, 317.
550. Schön G. (1971) Arch. Mikrobiol. 79, 147.
551. Atkinson D.E. y Walton G.M. (1967) J.Biol.Chem. 242 , 3239.
552. Sojka G.A., Din G.A. y Gest H. (1967) Nature 216 , 1021.
553. Sojka G.A. y Gest H. (1968) Proc. Nat.Acad. Sci. USA 61, 1486.
554. Sojka G.A., Baccarini A. y Gest H. (1969) Science 166, 113.
555. Sojka G.A. y Gest H. (1970)Bacteriol. Proc. pag. 64 .
556. Zilinsky J.W., Sojka G.A. y Gest H. (1971) Biochem. Biophys. Res.Commun. 42, 955.
557. Biedermann M., Drews G., Marx R. y Schröder J. (1967) Arch. Mikrobiol 56 , 133.
558. Ketchum P.A. y Holt S.C. (1970) Biochim. Biophys. Acta 196 ,141.
559. Lascelles J. (1968) Adv.Microbial Physiol. 2, 1.
560. Higuchi M., Goto K., Fujimoto M.,Naniki O. y Kikuchi G. (1965) Biochim. Biophys. Acta 95, 94.
561. Higuchi M.,Ohba T.,Sakai, H., Karushima Y. y Kikuchi G. (1968). J. Biochem. (Tokyo) 64, 795.

(*)
541, Gajdos,A y Gajdos-Torok M.(1971) .Arch.Environ.Health 23, 270

562. Fanica-Faignier M. y Clement-Metral J. (1973) Eur. J. Biochem. 40,13.
563. Fanica-Gaignier M. y Clément Metral J. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 610.
564. Gorchein A., Neuberger A. y Tait G.H. (1967) en Biochemistry Chloroplasts, Goodwin T.W. (Ed.) Academic Press, London; vol. 2 pag. 411.
565. Marriot J., Neuberger A. y Tait G.H. (1969) Biochem. J. 111, 385.
566. Marriot J, Neuberger A. y Tait G.H. (1970) Biochem. J. 117, 609.
567. Tuboit S., Kin H.J. y Kikuchi G. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 138, 147 .
568. Tuboi S. Kin H.J. y Kikuchi G. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 138, 155.
569. Tuboi S. Hayasaka S. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 146 , 282
570. Tuboi S. y Hayasaka S. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 150, 690 .
571. Tuboi S. y Hayasaka S. (1972) J. Biochem. (Tokio) 72, 219.
572. Hayasaka S. y Tuboi S. (1972) J. Biochem. (Tokio) 76, 157.
573. Neuberger A., Sandy J.D. y Tait G. H. (1973) Biochem. J. 136, 477.
574. Neuberger A., Sandy. J.D. y Tait G.H.(1973) Biochem. J. 136, 491.
575. Neuberger A., Sandy J.D. y Tait G.H. (1973) Enzyme 16, 79.
576. Davies R.C., Gorchein A., Neuberg A, Sandy J.D. y Tait G.H.(1973) Nature 245, 15.
577. Sandy J.D. , Davies R.C. y Neuberger A. (1975) Biochem . J. 150, 245.
578. Wider de Xifra E.A., Sandy J.D., Davies R.C. y Neuberger A. (1976). Phil. Trans.R.Soc.Lond. B.273 , 79.
579. Nandi D.L. y Shemin D.(1977) J. Biol. Chem. 252 , 2278.
580. Whiting M.J. y Granick S. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1340.
581. Conn H.J., Barholomew J.W. y Jennison M.W.(1957) en Manual of Microbiological Methods. Society of American Bacteriologists, Palczar M.J. (Chairmen), Mc Graw-Hill Book Co. Inc., New York pag.10.
582. Margulies M.M. y Michaels A. (1974) J.Cell.Biol. 60, 65.
583. Milloning G.A. (1962) Proc. 5th. Int. Cong. Electron Microscopy, Philadelphia, 2:8.
584. De Moss R.D. y Bard R.C. (1957) en Manual of Microbiological Methods, Society of American Bacteriologists, Pelczar, M.J. (Chairman), McGrae-Hill Co.Inc. , New Yorl; pag. 169.
585. Mauzeral D. y Granick S. (1956) J. Biol. Chem. 219, 435.
586. Ebert S.P., Tschudy D.P., Chourdry J.N. y Chirigos M.A. (1970) Biochim. Bipphys. Acta 208, 236.
587. Elliot W.H. (1960) Biochem. J. 74, 90.
588. Tomio J.M. y San Martín de Viale L.C.(1972) Bioquimica Clínica 6,217.
589. Moore D. y Labbe R. (1964) Clin. Chem. 10, 1105.
590. Andrews P. (1964) Biochem. J. 91, 222.
591. Fledin P. (1962) Dextran Gels and Their Applications in Gel Filtration, Pharmacia, Uppsala.
592. Sephadex Theory and Experimental Technique, Pharmacia, Uppsala ,.

593. Schön G. (1968) Arch. Mikrobiol. 61, 187.
594. Lowry O.H., Rosebrough N.J.,Farr A.L. y Randal R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
595. Layne E. (1957) Method Enzymol, 3 ,447.
596. Tauschel H.D. y Ladwig R., mencionado en Pfennig N. y Trüper H.G. (1974) en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8° Ed .,Buchanan R.E. y Gibbons N.E. (Ed.) The Williams and Wilkins Co., Baltimores; pág. 62.
597. Whittenbury R. y Dow C.S. (1977) Bacteriol. Rev.41, 754.
598. Schlegel H.G. (1932) Arch. Mikrobiol. 42, 110.
599. Hillmer P. y Amelunxen F., en Microbiología General , Schlegel H.G. (1975), Omega S.A., Barcelona; pag. 55.
600. Cohen-Bazire G. mencionado en Pfennig N. y Trüper, H.G. (1974) en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology , 8° Ed., Buchanan R.E. y Gibbons N.E. (Ed.) The Williams and Wilkins Co., Baltimore; pág. 64.
601. Holt.S.C. y Marr A.G. (1965) J.Bacteriol. 89, 1421.
602. Algranati I.D.(1963) Biochim. Biophys. Acta 73 , 152.
603. Lee W.S.,Shalita A.R. y Poh-Fitzpatrick M.B. (1978) J. Bacteriol. 133 , 811.
604. Patton, G.M. y Beatie D.S.(1976) en Porphyrins in Human Diseases, Doss M.(Ed.), Karger, Basel; pag.98.
605. Viale A.A. no publicado .
606. Dixon M. y Webb E.G.(1964) Enzymes, second ed'; Longmans, Green and Co.,Ltd., London.
607. Lucas N.,King H.K. y Browns J. (1962) Biochem. J.84 118.
608. Piper, W.N., Condie L.W. y Tephly T.R. (1978) Arch. Biochem.Biophys. 159, 671
609. Moelwyn-Hughes E.A. (1961) Physycal Chemistry 2º Ed. Pergamon Press, Oxford; pag. 1190.
610. Herzfeld K. F. (1919) Ann. Physik 59, 635.
611. Baltscheffsky H. y Baltscheffsky M. (1960) Acta Chem. Scand. 14, 257.
612. Chance B. (1956) en Enzymes: Units of Biological Structure and Function, Gaebler (Ed.) Academic Press, New York; pag 447.
613. Geller D. M. (1962) J. Biol. Chem. 237, 2947.
614. Krogman D. W., Jagendorf A. T. y Avron M. (1959) Plant Physiol. 34, 272.

I N D I C E

INTRODUCCION 1
I. Bacterias fotosintéticas 2
I.1. Introducción 2
I.2. Breve descripción de las bacterias fotosintéticas 4
I.2.1. Bacterias púrpuras no sulfúreas. Rhodospirillaceae 5
I.2.2. Bacterias púrpuras sulfúreas. Chromatiaceae 6
I.2.3. Bacterias verdes sulfúreas. Chlorobiaceae ... 7
I.3. Rhodopeudomonas palustris 8
I.3.1. Morfología 8
I.3.2. Color 8
I.3.3. Fisiología 8
I.3.4. Características bioquímicas 9
I.3.5. Reproducción 9
I.3.6. Cultivos de enriquecimiento 9
I.4. Citología de las bacterias fotosintéticas ... 10
II. Propiedades generales de lostetrapirroles ... 14
II.1. Estructuras químicas y propiedades espectrales 15
II.2. Bacterioclorofilas 20
II.2.1. Estado natural de la bacterioclorofila 20
III. Biosíntesis de tetrapirroles 23
III.1. Introducción 23
III.2. Precursores, intermediarios y enzimas comunes en la biosíntesis del hemo y clorofila .. 23
III.2.1. Succinil-CoA-sintetasa 25
III.2.1.1. Propiedades 25
III.2.1.2. Mecanismo de acción 25
III.2.2. ALA-dehidrasa 26
III.2.2.1. Propiedades 26
III.2.2.2. Mecanismo de acción 28
III.2.3. Porfobilinogenasa 29
III.2.3.1. Propiedades 29
III.2.3.2. Mecanismo de acción 29
III.2.4. Decarboxilasa 31
III.2.4.1. Porfirinógenos como intermediarios en la biosíntesis de tetrapirroles 32
III.2.4.2. Propiedades 33
III.2.4.3. Mecanismo de acción 33

III.2.5. Coprogenasa 34
III.2.5.1. Propiedades 34
III.2.5.2. Mecanismo de acción 34
III.2.6. Protogen-oxidasa 35
III.2.6.1. Propiedades 36
III.2.6.2. Mecanismo de acción 36
IV. Diversas ramificaciones en la biosíntesis de tetrapirroles 37
IV.1. Rama hierro en la biosíntesis de tetrapirroles 37
IV.2. Rama magnesio en la biosíntesis de tetrapirroles 39
IV.3. Rama cobalto en la biosíntesis de tetrapirroles 47
V. Biosíntesis del ácido delta-aminolevúlico 49
V.1. ALA como intermediario en la biosíntesis de tetrapirroles 49
V.2. Acido delta-aminolevúlico sintetasa 50
V.2.1. Fuentes de la enzima 50
V.2.2. Mecanismo de acción 52
V.2.3. Inestabilidad del ALA-S 57
V.3. Caminos metabólicos del ALA distintos del de tetrapirroles 59
V.4. Biosíntesis de ALA en tejidos vegetales 60
VI. Acido delta-aminolevúlico sintetasa en microorganismos no fotosintéticos 61
VII. Acido delta-aminolevúlico sintetasa de microorganismos fotosintéticos y su rol en la regulación de la síntesis de bacterioclorofila 64
MATERIALES Y METODOS 76
I. Materiales e instrumental 77
I.1. Especies bacterianas 77
I.2. Drogas, reactivos y solventes 77
I.3. Instrumental 78
II. Métodos 78
II.1. Cultivo de las bacterias 78
II.2. Microscopía de contraste de fases 80
II.3. Microscopía electrónica 80
II.4. Determinación de la relación entre peso seco y absorbancia a 680 nm 81

II.5. Preparación de una fracción enriquecida en Succinil-CoA-S de Rhodopseudomonas sphaeroides 81
II.6. Preparación de extractos de Rhodopseudomonas palustris 81
II.7. Determinación de actividades enzimáticas . 82
II.7.1. Acido delta-aminolevúlico sintetasa 82
II.7.1.1. Determinación del ALA formado en las incubaciones..... 82
II.7.1.2. Caracterización del producto formado en las incubaciones 83
II.7.1.2.1. Mediante espectro de absorción 83
II.7.1.2.2. Mediante aislamiento del producto formado 83
II.7.2. Succinil-Coenzima A sintetasa..... 84
II.7.3. ALA-dehidrasa 84
II.8. Determinación de pesos moleculares mediante filtración por geles 84
II.9. Determinación de bacteriocloroofila 85
II.10. Determinación de proteinas 85
RESULTADOS 86
CARACTERES MORFOLOGICOS GENERALES 87
ACIDO DELTA AMINOLEVULICO SINTETASA DE Rhodopseudomonas palustris CRECIDA FOTOHETEROTROFICAMENTE 96
I. Condiciones de ruptura de las células bacterianas 97
I.1. Tiempo de sonicación 97
I.2. Concentración de la suspensión bacteriana que se sonica 100
II. Localización intracelular de la enzima ...100
III. Condiciones de incubación 102
III.1. Efecto de los componentes del sistema de reacción 102
III.2. pH de incubación 102
III.3. Temperatura de incubación 107
III.4. Cantidad de proteína agregada al sistema de incubación 107
III.5. Tiempo de incubación 110
III.6. Inhibición de la reacción por producto ...110
IV. Identificación del producto formado en las incubaciones 115

IV.1. Espectro de absorción de la reacción de Ehelich 115
IV.2. Aislamiento del ALA formado en las incubaciones 115
V. Estabilidad de la actividad enzimática 118
V.1. Estabilidad a -15 ºC de extractos sobrenadantes de 15.000 xg 118
V.2. Estabilidad a -15 ºC de extractos sobrenadantes de 140.000 xg 120
V.3. Estabilidad a 0-4 ºC 120
V.3.1. Estabilidad a 0-4 ºC de extractos sobrenadantes de 140.000 xg 123
V.4. Estabilidad a 37 ºC 123
VI. Efecto de compuestos sulfhidrílicos y de disulfuros sobre la actividad del ALA-S 126
VI.1. Efecto de compuestos sulfhidrílicos 126
VI.2. Efecto de L-cistina 128
VII. Efecto de diálisis 131
VIII. Efecto del sulfato de amonio sobre la actividad del ALA-S 134
IX. Efecto de la precipitación con sulfato de amonio 134
X. Efecto de la filtración por Sephadex G-25 ...136
XI. Constante de Michaelis para glicina 137
XII. Peso molecular del ALA-S de Rhodopseudomonas palustris crecida fotoheterotróficamente 137
ACIDO DELTA AMINOLEVULICO SINTETASA DE Rhodopseudomonas palustris CRECIDA QUIMIOHETEROTROFICAMENTE 144
I. Localización intracelular de la enzima 145
II. Curso de la reacción 145
III. Inhibición de la reacción por producto 148
IV. Espectro de absorción de la reacción de Ehrlich 148
V. Estabilidad de la actividad enzimática 149
V.1. Estabilidad a - 15ºC 149
V.2. Estabilidad a 0-4 ºC 149
V.3. Estabilidad a 37 ºC 152
VI. Efecto de la filtración por Sephadex G-25....152
VII. Constante de Michaelis para glicina 155

DETECCION EN CELULAS DE Rhodopseudomonas palustris CRECIDAS AEROBICAMENTE EN OSCURIDAD DE LA PRESENCIA DE UN ACTIVADOR DEL ALA-S DE CELULAS CRECIDAS FOTOSINTETICAMENTE 157
ADAPTACION DE Rhodopseudomonas palustris A CONDICIONES AEROBIAS 167
I. Efecto del oxígeno sobre el cultivo bacteriano, contenido de BChl y niveles enzimáticos.. 168
II. Activación espontánea del ALA-S de células de Rps. palustris oxigenadas 179
III. Modelos matemáticos del comportamiento del ALA-S 181
INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LOS NIVELES DE ALA-S, SUCCINIL-CoA-S y ALA-D y CONTENIDO DE BChl EN Rhodopseudomonas palustris 190
I. Influencia del medio de cultivo sobre niveles enzimáticos y BChl 191
II. Efecto de inhibidores del transporte de electrones y desacoplantes sobre la síntesis de bacterio clorofila en Rhodopseudomonas paluestris 195
CONCLUSIONES Y DISCUSION 201
RESUMEN 225
BIBLIOGRAFIA 228