

Tesis de Posgrado

Formación enzimática del ácido 5-aminolevúlico en *Euglena Gracilis* : Probable participación de la 4, 5-dioxovalérico transaminasa

Lombardo, María Elisa

1990

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:

Lombardo, María Elisa. (1990). Formación enzimática del ácido 5-aminolevúlico en *Euglena Gracilis* : Probable participación de la 4, 5-dioxovalérico transaminasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2328_Lombardo.pdf

Cita tipo Chicago:

Lombardo, María Elisa. "Formación enzimática del ácido 5-aminolevúlico en *Euglena Gracilis* : Probable participación de la 4, 5-dioxovalérico transaminasa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2328_Lombardo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

FORMACION ENZIMATICA DEL
ACIDO 5-AMINOLEVULICO EN *Euglena gracilis*.
PROBABLE PARTICIPACION DE LA 4,5-DIOXOVALERICO TRANSAMINASA

por:

MARIA ELISA LOMBARDO

DIRECTOR: Dra. Alcira M. del C. Batlle de Albertoni

CONSEJERO: Dra. Alcira M. del C. Batlle de Albertoni

LUGAR DE TRABAJO: Centro de Investigaciones sobre
Porfirinas y Porfirias (CIPYP). Departamento de Química
Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Tesis presentada para optar al título de:

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1 9 9 0

2328
ef. 2

A MIS PADRES

INDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	
ABREVIATURAS	
INTRODUCCION	1
- CAPITULO I: ACIDO 5-AMINOLEVULICO: PRECURSOR UNIVERSAL Y ESPECIFICO DE LAS PORFIRINAS	2
I.1. Biosíntesis de protoporfirina IX a partir de ALA	3
I.2. Biosíntesis de hierro-porfirinas	7
I.3. Biosíntesis de magnesio-porfirinas	12
I.4. Biosíntesis de cobalaminas	19
I.5. Biosíntesis de tetrapirroles de cadena abierta	22
- CAPITULO II: BIOSINTESIS DEL ACIDO 5-AMINOLEVULICO	23
II.1. Ruta A: Síntesis de ALA a partir de glicina y succinil-CoA	24
II.2. Ruta B: Síntesis de ALA a partir de precursores de cinco átomos de carbono	31
II.3. Síntesis de ALA a partir de ácido 4,5-dioxovalérico	38
II.4. Rol fisiológico de las dos vías de síntesis de ALA	44
- CAPITULO III: REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL ACIDO 5-AMINOLEVULICO	46
III.1. Control sobre la vía del ALA-S	47
III.2. Control sobre la vía de 5 átomos de carbono	51

	Página
- CAPITULO IV: OBJETIVOS Y FUENTE EXPERIMENTAL EMPLEADA	52
IV.1. Objetivos	53
IV.2. Fuente experimental empleada: <i>Euglena gracilis</i>	53
MATERIALES Y METODOS	58
- CAPITULO V: MATERIALES Y METODOS	58
V.1. Materiales	59
V.2. Métodos	60
RESULTADOS Y DISCUSION	66
- CAPITULO VI: EFECTO DE LA ILUMINACION SOBRE EL CRECIMIENTO, CONTENIDO DE CLOROFILA Y SINTESIS DE ALA EN <i>Euglena gracilis</i>	66
VI.1. Efecto de la iluminación sobre el crecimiento celular	67
VI.2. Formación de clorofila al variar las condiciones de iluminación	68
VI.3. Síntesis de ALA en células etioladas y pigmentadas	72
VI.4. Conclusiones parciales	76
- CAPITULO VII: L-GLUTAMATO:4,5-DIOXOVALERICO TRANSAMINASA	77
VII.1. Determinación de las condiciones óptimas para la medición de actividad	78
VII.2. Propiedades y caracterización de la L-glutamato:DOVA transaminasa	91
VII.3. Conclusiones parciales	106
- CAPITULO VIII: POSIBLE IDENTIDAD DE LA L-GLUTAMATO:DOVA Y L-GLUTAMATO:GLIOXALATO TRANSAMINASAS	109
VIII.1. L-Glutamato:glioxalato-transaminasa	111

	Página
VIII.2. Estudios comparativos entre la L-glutamato:DOVA y L-glutamato:glioxalato transaminasas	131
- CAPITULO IX: CONCLUSIONES FINALES	139
CAPITULO X: REFERENCIAS	145

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco a la *Dra. Alcira Batlle de Albertoni* por haber aceptado ser mi Directora, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo y por haber hecho posible que me desarrolle en el campo de la investigación con gran independencia, pero sabiendo que en todo momento podía contar con su guía, apoyo e invaluable experiencia.

- Agradezco a la *Lic. Lidia Araujo* por haber participado en la realización de gran parte de este trabajo, discusión y presentación de los resultados. Fuera del ámbito profesional le agradezco su incondicional y valiosa amistad.

- Agradezco a todos mis compañeros del CIPYP con quienes fue sumamente grato compartir la tarea realizada. De un modo especial deseo manifestar mi reconocimiento a la *Dra. Elba Vázquez*, a la *Dra. Ana María Buzaleh* y a la *Srta. Hilda Gasparoli*. También deseo agradecer a mis compañeros del Departamento de Química Biológica con quienes compartí gran parte de mis tareas docentes.

- Agradezco a la *Ing. Marta Araujo*, *Dra. Victoria Parera* y *Lic. Viviana Melito* por su amistad, por su constante apoyo y estímulo. Asimismo deseo manifestar mi agradecimiento a la *Dra. Honorina Conti* y al *Dr. Jorge Zampaglione* por la ayuda que me brindaron que posibilitó en gran parte la finalización de este trabajo.

- Agradezco a la Universidad de Buenos Aires, al CONICET, a la SUBCYT, a la Secretaría de Salud Pública del Ministerio de Bienestar Social y al Banco de la Nación Argentina por las becas y subsidios otorgados.

Resumiendo, en vista de mi fe y de mis convicciones, doy gracias a *DIOS* por la colaboración que recibí de todos.

ABREVIATURAS

ALA-S	5-Aminolevúlico Sintetasa
DOVA-T	4,5-Dioxovalérico Transaminasa
ALA-D	5-Aminolevúlico Dehidrasa
PBG-Deaminasa	Porfobilinógeno-Deaminasa
PBGasa	Porfobilinogenasa
Urogen-D	Uroporfirinógeno Decarboxilasa
Coprogenasa	Coproporfirinogenasa
Protogen oxidasa	Protoporfirinógeno Oxidasa
Hemo-S	Hemosintetasa
Glioxalato-T	Glioxalato Transaminasa
ALA	Acido 5-aminolevúlico
DOVA	4,5-Dioxovalérico
PBG	Porfobilinógeno
Urogen	Uroporfirinógeno
Coprogen	Coproporfirinógeno
Protogen	Protoporfirinógeno
Proto	Protoporfirina
Glu	L-Glutamato
Gli	Glicina
HSCoA	Coenzima A
OFDA	o-Ftaldialdehído
TCA	Acido tricloroacético
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano

INTRODUCCION

Este trabajo está vinculado con el origen biosintético del ácido 5-aminolevúlico (ALA) (Figura 1), primer precursor específico de todas las porfirinas (hemos, clorofilas, bacterioclorofilas, vitamina B₁₂, catalasa, etc.).

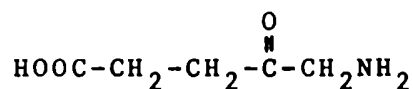


FIGURA 1: Acido 5-aminolevúlico (ALA)

La importancia de las porfirinas, y por ende del ALA, surge en forma inmediata al considerar el rol fisiológico que desempeñan, sin ellas no podría asegurarse la supervivencia de la mayor parte de las especies que habitan nuestro planeta. Según estudios realizados respecto al origen y evolución de la vida (1), se considera como paso clave la formación de una primer porfirina relacionada muy probablemente con los citocromos, puesto que esto habría conducido al desarrollo de una partícula transportadora de electrones, capaz de realizar la fosforilación oxidativa, permitiendo el empleo de fuentes de energía no utilizables por fosforilación a nivel de sustrato. Una vez formadas las hierro-porfirinas (citocromos), el paso siguiente podría haber sido la sustitución del hierro por el magnesio para dar lugar a la clorofila. Pudo entonces haberse dado una gran explosión de vida como consecuencia de la transformación de enormes cantidades de energía solar en energía química, merced al proceso de fotosíntesis, ocasionando efectos profundos en los acontecimientos evolutivos posteriores.

Las porfirinas también juegan un rol importante desde el punto de vista clínico, debido a que cualquier trastorno, ya sea hereditario o adquirido que se observe en el metabolismo de las mismas da origen a un grupo de enfermedades denominadas porfirias.

Refiriéndonos específicamente al ALA, a continuación describiremos de qué forma este compuesto integra la estructura de todas las porfirinas (Capítulo I), cómo se biosintetiza (Capítulo II), los mecanismos de control que actúan sobre su formación (Capítulo III), y por último estableceremos los objetivos de este trabajo (Capítulo IV).

CAPITULO I

ACIDO 5-AMINOLEVULICO: PRECURSOR UNIVERSAL Y ESPECIFICO DE LAS PORFIRINAS

	Página
I.1. Biosíntesis de protoporfirina IX a partir de ALA	3
I.2. Biosíntesis de hierro-porfirinas	7
I.3. Biosíntesis de magnesio-porfirinas	12
I.4. Biosíntesis de cobalaminas	19
I.5. Biosíntesis de tetrapirroles de cadena abierta	22

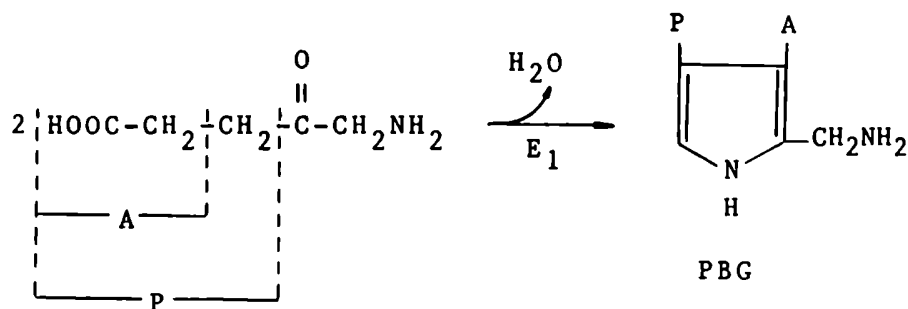
Estudios de marcación isotópica demostraron que el ALA es la fuente de todos los átomos de carbono y nitrógeno presentes en el hemo (2), anillo corrínico de la vitamina B₁₂ (3), porción tetrapirrólica de la clorofila (4, 5) y grupos cromóforos de la ficocianina y ficoeritrina (6). En estos mismos trabajos también se verifica la relación molar estequiométrica de 8:1 existente entre el ALA y la porfirina correspondiente.

Todas las formas vivientes son capaces de sintetizar sus tetrapirroles a través de un camino, cuyas etapas hasta la formación de protoporfirina IX son exactamente coincidentes; luego, dependiendo de cual fuere el producto final se producen las ramificaciones y correspondientes reacciones específicas.

I.1. BIOSINTESIS DE PROTOPORFIRINA IX A PARTIR DE ALA

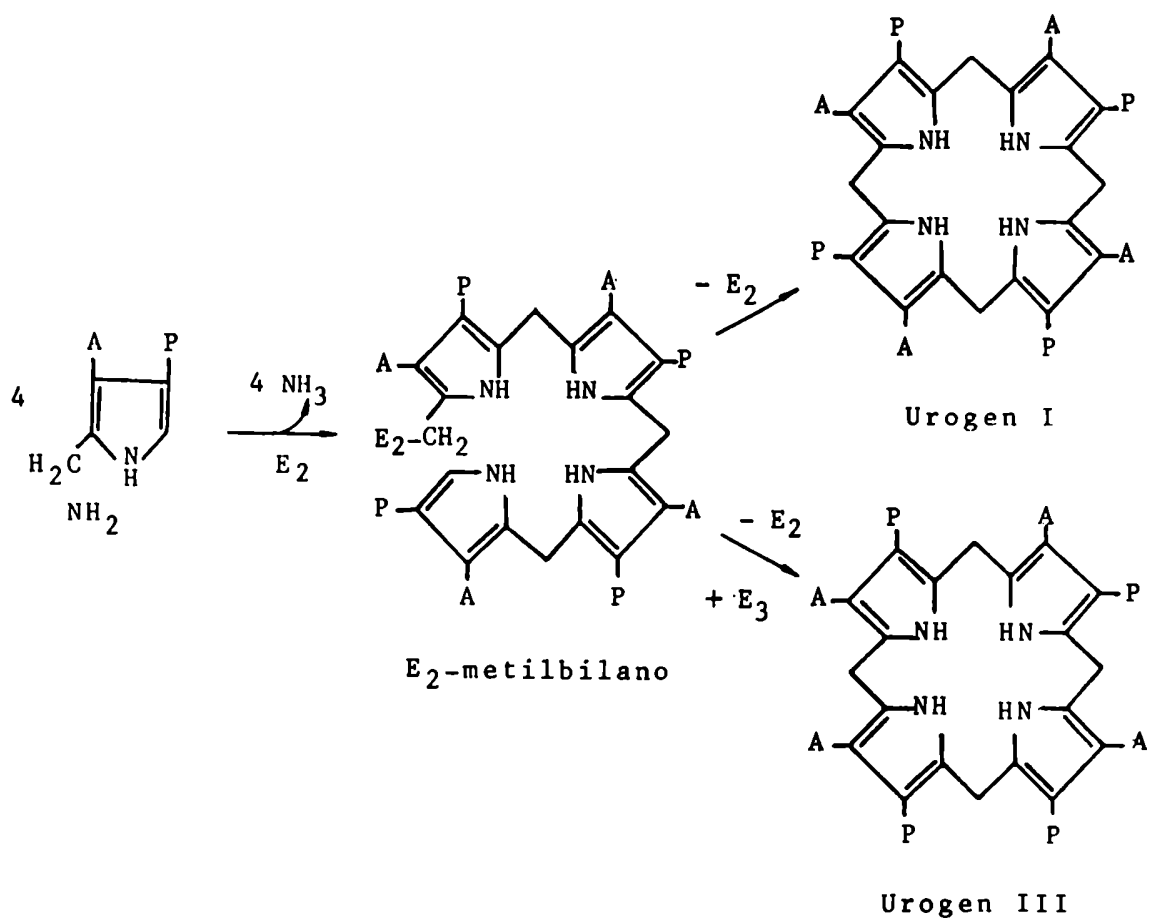
La protoporfirina IX se origina a partir del ALA mediante la secuencia de reacciones enzimáticamente catalizadas (7) que enumeramos a continuación. Los nombres de las enzimas intervinientes se indicarán en cada caso y se simbolizarán con la letra E y un subíndice que se correlaciona con el orden de participación en el camino biosintético.

- 1º Etapa: Por condensación de dos moléculas de ALA se forma el primer anillo aromático correspondiente al porfobilinógeno (PBG):



E_1 : 5-aminolevúlico Dehidrasa (ALA-D)

- 2º Etapa: La ciclotetramerización enzimática de cuatro moléculas de PBG forma el uroporfirinógeno (Urogen), pudiéndose obtener los isómeros I y III según la posición relativa de las cadenas laterales. Con la PBG-Deaminasa se forma un intermediario enzima-metilbilano que en ausencia de Isomerasa puede ciclarse no enzimáticamente a Urogen I, mientras que en su presencia se convierte en Urogen III. Si bien ambos isómeros pueden encontrarse *in vivo*, en condiciones normales sólo se sintetiza el isómero III; la presencia de Urogen I es indicio de patología, dando origen a un tipo de porfiria que se caracteriza por una deficiencia a nivel de la Isomerasa. Como veremos, en las etapas siguientes sólo el Urogen III conduce a la formación de protoporfirina IX.

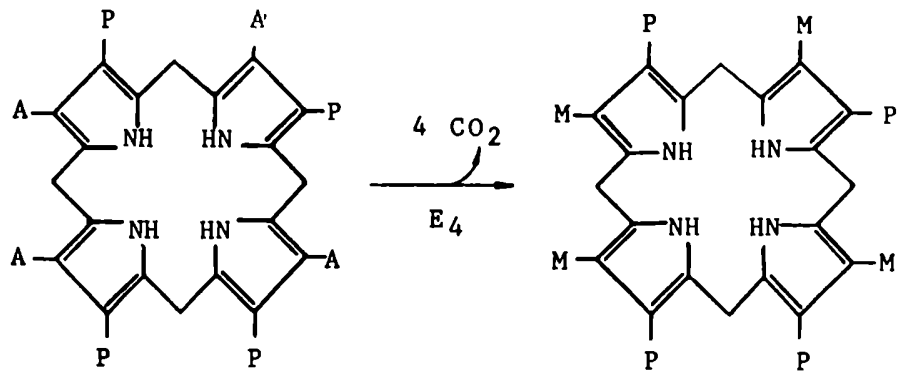


E_2 : Porfobilinógeno-Deaminasa (PBG-Deaminasa)

E_3 : Uroporfirinógeno III-Sintetasa (Urogen III-Sintetasa) o Isomerasa.

Las dos enzimas intervinientes en la síntesis de uroporfirinógenos, PBG-Deaminasa e Isomerasa, se asociarían *in vivo* formando un complejo conocido como Porfobilinogenasa (PBGasa). La concentración relativa de ambas enzimas en el complejo gobernaría la relación de Urogen III:I que se sintetiza.

- 3ª Etapa: Por decarboxilación sucesiva de los cuatro restos acetato del Urogen III ó I se obtiene el correspondiente coproporfirinógeno (Coprogen):

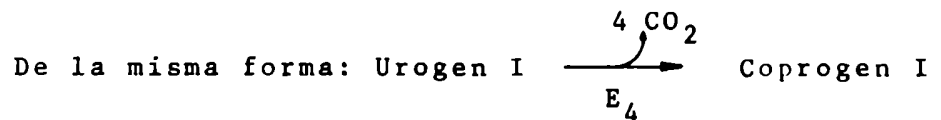


Urogen III

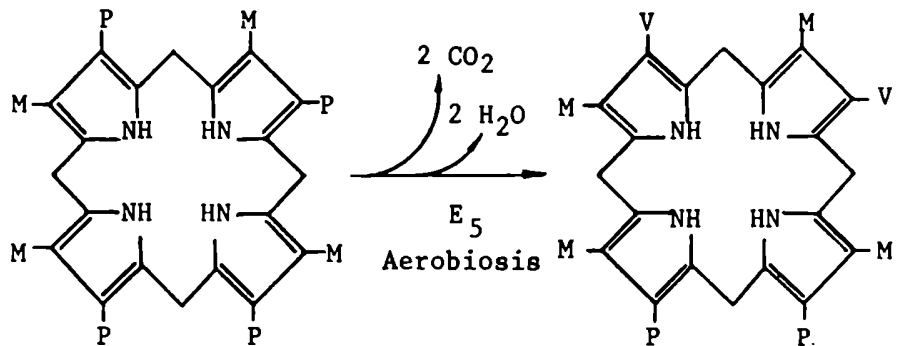
Coprogen III

M: $-\text{CH}_3$

E_4 : Uroporfirinógeno Decarboxilasa (Urogen-D)



- 4ª Etapa: Por decarboxilación oxidativa de los dos restos propiónico del Coprogen III se llega al protoporfirinógeno IX (Protogen IX):



Coprogen III

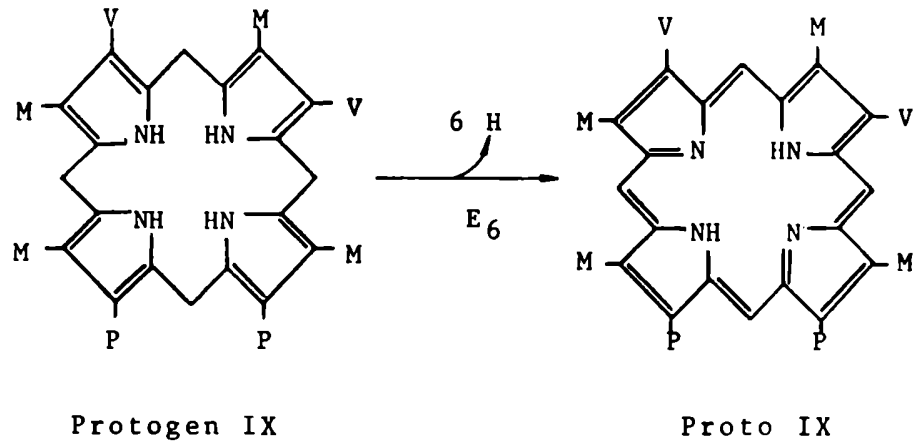
Protogen IX

V: $-\text{CH}=\text{CH}_2$

E_5 : Coproporfirinogenasa (Coprogenasa)

La Coprogenasa no actúa sobre el Coprogen I. La reacción también se lleva a cabo en condiciones anaeróbicas pero empleando un aceptor de electrones distinto al oxígeno.

- 5º Etapa: El Protogen IX se oxida a protoporfirina IX (Proto IX) con la consecuente pérdida de 6 átomos de hidrógeno:



E_6 : Protoporfirinógeno Oxidasa (Protogen-Oxidasa)

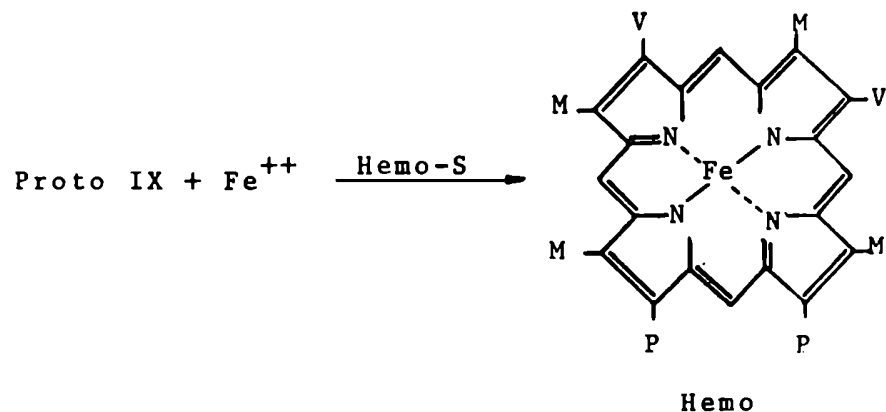
Aunque para esta oxidación se ha identificado la enzima correspondiente, debe indicarse que todos los porfirinógenos mencionados en las etapas anteriores pueden, a temperatura y pH fisiológicos y en condiciones aeróbicas, oxidarse fácilmente a porfirinas; sin embargo, en esta forma, ya no actúan como intermediarios en la biosíntesis de Proto IX.

Con la secuencia de reacciones descrita se comprueba fehacientemente el requerimiento de sólo ocho moléculas de ALA para dar origen a una molécula de Proto IX. Cabe aclarar, para cuando se analice la regulación de la biosíntesis de ALA, que de las cinco enzimas mencionadas anteriormente, en células animales, las tres primeras son de localización citoplasmática mientras que las dos últimas son mitocondriales.

Tanto la Proto IX como las porfirinas en general, tienen la propiedad de combinarse con distintos iones metálicos y formar complejos que son los que dan origen a la gran gama de tetrapirroles cíclicos de interés biológico. La mayor parte de estos compuestos se forman a partir de Proto IX a excepción de las corrinas que utilizan como precursor el Urogen III. A continuación se describe someramente la forma en que se obtienen los distintos productos finales.

I.2. BIOSINTESIS DE HIERRO-PORFIRINAS

La inserción de un átomo de hierro (Fe^{++}) en la molécula de Proto IX conduce a la formación del protohemo o hemo. La enzima encargada de catalizar esta reacción se conoce con el nombre de ferroquelatasa o hemosintetasa (Hemo-S) y es de localización mitocondrial.



El hemo posee una estructura en la cual los cuatro ligandos o grupos coordinantes de la porfirina forman con el Fe (II) un complejo planar cuadrado (Figura 2). Como el metal posee un número de coordinación total de seis, existe la posibilidad de formar otros dos enlaces coordinados que se ubican perpendicularmente al plano anterior y orientados en direcciones opuestas. Cuando estas dos últimas posiciones están ocupadas, la estructura resultante se denomina hemocromo o hemocromógeno (Figura 2). La hemoglobina y mioglobina constituyen dos ejemplos de hemoproteínas en las cuales el grupo prostético se encuentra en la forma de hemocromo.

Como podemos ver en la Figura 3, la molécula de hemoglobina es un dímero formado por la asociación de dos protómeros. Cada protómero consta de una cadena polipeptídica α (141 aminoácidos) y una β (146 aminoácidos), a cada una de las cuales se le une un grupo hemo. La mioglobina en cambio, es monomérica; tiene una sola cadena de 153 aminoácidos unida también a un grupo hemo. En ambos compuestos, el quinto enlace de coordinación de cada átomo de hierro se establece con un nitrógeno imidazólico de un resto histidina de la cadena polipeptídica correspondiente, mientras que la sexta posición puede estar

desocupada (desoxihemoglobina y desoximioglobina) o bien ocupada por oxígeno (oxihemoglobina y oximioglobina) o por otros ligandos tales como el monóxido de carbono.

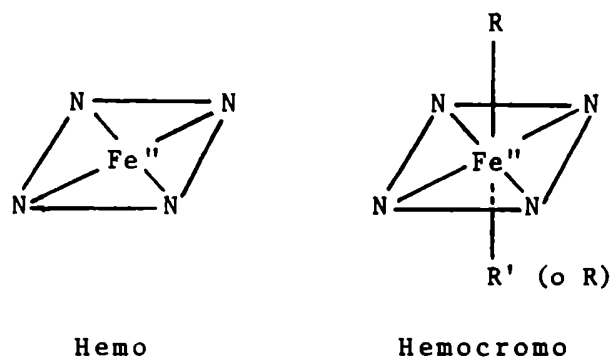


FIGURA 2: Representación esquemática de los complejos con Fe(II)

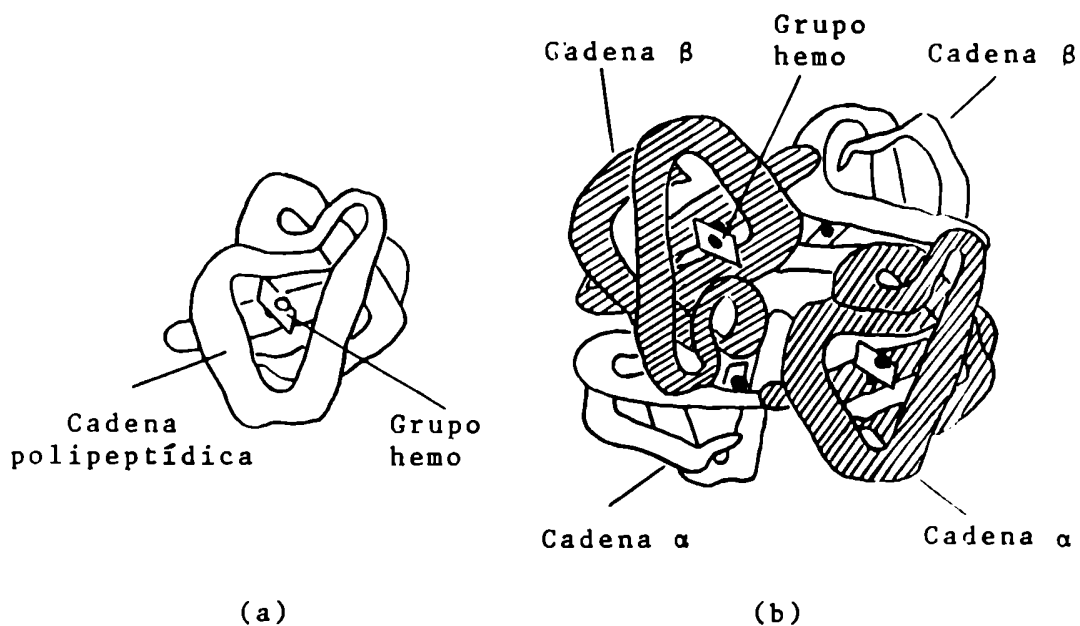


FIGURA 3: Estructura cuaternaria de la mioglobina (a) y hemoglobina (b). El distinto trazo (▨, □) representa los dos protómeros ($\alpha\beta$) de la molécula de hemoglobina.

En su función normal como transportador de oxígeno, los átomos de hierro de las moléculas de hemoglobina y mioglobina no experimentan cambio en su estado de oxidación, permaneciendo siempre como Fe(II). Sin embargo, ambas moléculas pueden ser oxidadas a la forma Fe(III), los productos respectivos reciben el nombre de metahemoglobina y metamioglobina, y ya no funcionan como transportadores de oxígeno.

En la Figura 4 se esquematiza la estructura de los complejos correspondientes al Fe(III). La metahemoglobina y metamioglobina constituyen dos ejemplos de hemoproteínas en las cuáles el grupo prostético se encuentra en la forma de hemicromo.

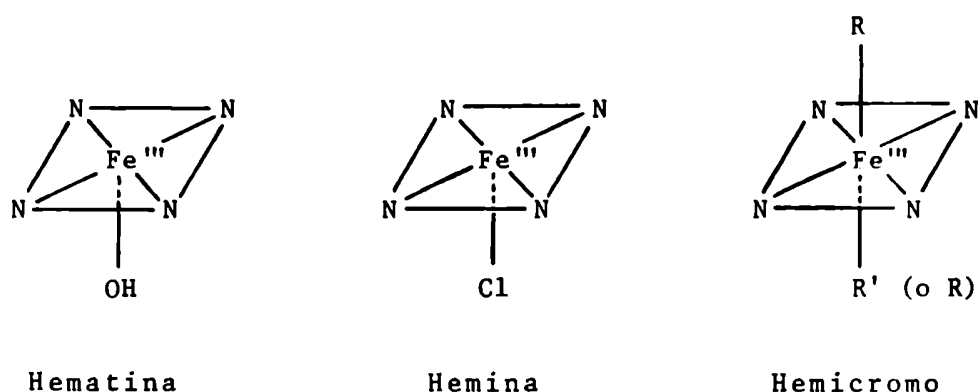


FIGURA 4: Representación esquemática de los complejos de Fe(III).

Los citocromos son otro ejemplo de proteínas conjugadas con hierro-porfirinas. Los citocromos se clasifican en tres tipos principales: a, b y c, según sus diferentes propiedades espectrales que se deben fundamentalmente a variaciones en los sustituyentes laterales de la molécula de hierro-porfirina y a modificaciones en el modo en que esta última se une al componente polipeptídico.

Los citocromos tipo a contienen hemo a como grupo prostético. El hemo a (Figura 5) difiere del protohemo en que posee un grupo formilo en lugar de un metilo en la posición 8, no tiene grupo metilo en la posición 5 y en la posición 2 existe una cadena lateral isoprenoide de 17 carbonos en vez de un grupo vinilo.

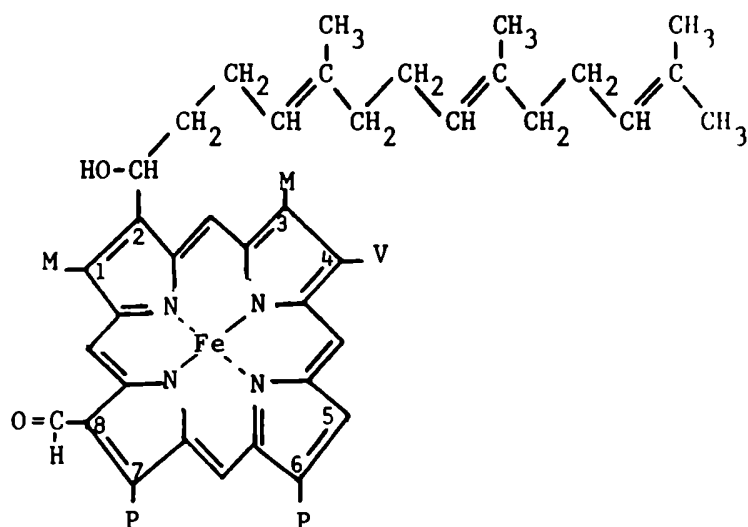


FIGURA 5: Hemo a (grupo prostético de los citocromos a). La numeración utilizada para identificar las posiciones de los carbonos externos de los anillos pirrólicos corresponde a la nomenclatura de Fischer (7).

La unión del hemo a con el componente proteico correspondiente se establece mediante la quinta y sexta posición de coordinación del hierro que se halla ocupada por algún grupo de un aminoácido específico de la cadena polipeptídica.

Los citocromos tipo b contienen protohemo como grupo prostético y la unión del mismo con la porción proteica tiene las mismas características que para los citocromos tipo a.

Los citocromos tipo c poseen protohemo como grupo prostético, el cual se une a la cadena polipeptídica mediante el quinto y sexto enlace de coordinación del hierro, pero difieren de los citocromos b en que se forman uniones covalentes entre la porción proteica y el hemo (Figura 6), representadas por puentes tioéter que se establecen entre los sustituyentes de las posiciones 2 y 4 del anillo porfirínico y dos restos cisteína de la proteína.

La función que cumplen todos los citocromos es la de transportadores de electrones, mediante reacciones de oxidoreducción reversibles del átomo de hierro contenido en el grupo prostético respectivo.

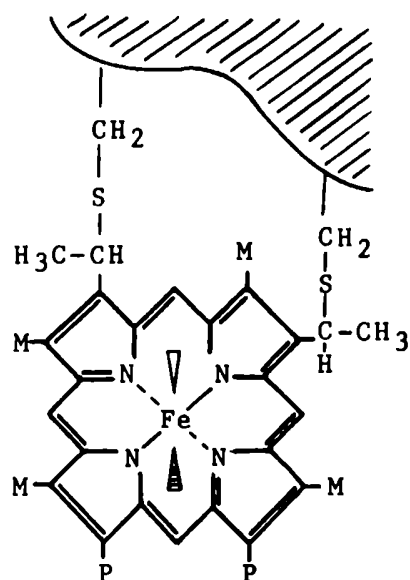


FIGURA 6: Representación esquemática de la estructura de los citochromos c (los triángulos representan el quinto y sexto enlace de coordinación del hierro).

Por último, mencionaremos también como ejemplos de hierro-porfirinas a las hemoenzimas peroxidasa, catalasa y triptofano-oxigenasa.

Las peroxidasas catalizan la oxidación de toda una serie de compuestos, por peróxido de hidrógeno



donde AH_2 , el dador de hidrógenos, puede ser desde moléculas orgánicas de alto peso molecular como ácidos grasos, fenoles, aminas o indoles, hasta pequeños iones inorgánicos como por ejemplo el ión ioduro.

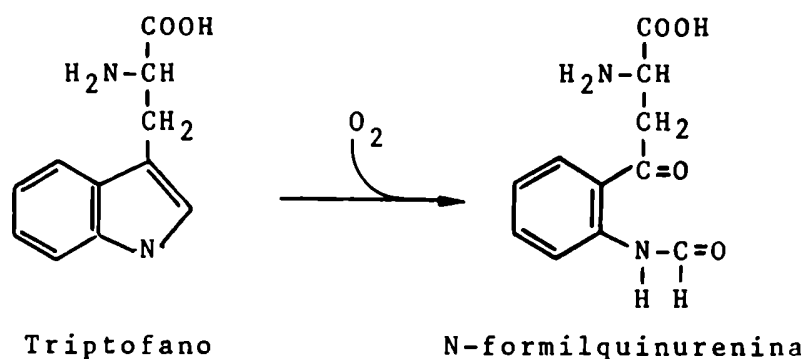
Las catalasas son enzimas que catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno, de acuerdo con la siguiente ecuación:



Son altamente específicas y en algunos casos pueden actuar como peroxidasas.

La función biológica de las catalasas y peroxidasas sería, no sólo la meramente oxidativa, sino que además cumplirían una importante acción protectora, destruyendo el peróxido de hidrógeno, que es tóxico para los organismos vivos.

La triptofano-oxigenasa, también denominada triptofano-pirrolasa, cataliza la oxidación del triptofano a N-formilquinurenina. La reacción requiere oxígeno molecular y constituye la primer etapa de la ruta que convierte el triptofano en acetil-CoA:



La bibliografía consultada para la descripción de las distintas hierro-porfirinas figura en las referencias (8 - 11).

I.3. BIOSINTESIS DE MAGNESIO-PORFIRINAS

La inserción de un átomo de magnesio (Mg^{++}) en el núcleo tetrapirrólico de la Proto IX, representa la primer etapa del camino mediante el cual se sintetizan los distintos tipos de clorofilas.

Las clorofilas son los pigmentos fotosintéticos más importantes. En la actualidad se pueden distinguir por lo menos diez tipos de clorofilas (12, 13), ampliamente distribuidas entre las plantas superiores, algas y bacterias fotosintéticas (Tabla 1). Los cloroplastos de todas las algas y plantas verdes superiores contienen dos clases de clorofilas, una de las

cuales es siempre la clorofila a, mientras que la segunda es variable (clorofila b, c, d ó e); las bacterias fotosintéticas en cambio, parecen contener un solo tipo de bacterioclorofila.

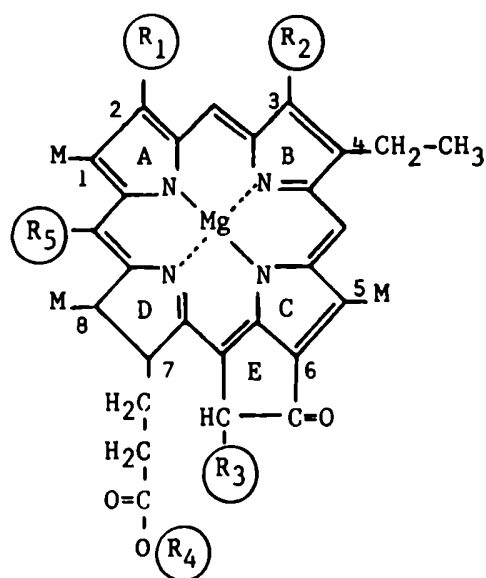
TABLA 1: Tipos de clorofilas y distribución de las mismas

PIGMENTOS	LOCALIZACION
Clorofila a	Todas las plantas verdes superiores y todas las algas.
Clorofila b	Plantas verdes superiores y algas verdes (<i>Clorofitas</i> y <i>Euglenofitas</i>).
Clorofila c	Algas pardas (<i>Feofitas</i>), diatomeas y dinoflagelados.
Clorofila d	Algas rojas (<i>Rodofitas</i>).
Clorofila e	Algas verde-amarillentas (<i>Xantofitas</i>).
Bacterioclorofila a	Bacterias purpúreas y en pequeñas cantidades en bacterias verdes sulfúreas.
Bacterioclorofila b	En sólo dos especies de <i>Rhodopseudomonas</i> (<i>Rp. viridis</i> y <i>Rp. sulfoviridis</i>) y en una especie de la familia <i>Chromatiaceae</i> (<i>Thiocaspa pfennigii</i>).
Bacterioclorofila c y d	Especies verdes de la familia <i>Chlorobiaceae</i> .
Bacterioclorofila e	Especies marrones de la familia <i>Chlorobiaceae</i> .

Desde el punto de vista estructural, las distintas clorofilas difieren entre sí en cuanto a los sustituyentes del anillo porfirínico (Figura 7), mientras que el anillo porfirínico de las clorofilas difiere del grupo hemo en los siguientes aspectos:

- a) El ión metálico coordinado con los cuatro átomos de nitrógeno centrales es magnesio, en lugar de hierro.
- b) El anillo D de todas las clorofilas está parcialmente reducido.
- c) El pirrol C tiene fusionado un anillo de ciclopentanona.

- d) El grupo vinilo de la posición 4 se encuentra reducido.
- e) No existen cadenas laterales ácidas, sino que están todas esterificadas. En particular, el resto propiónico ubicado en la posición 7 aparece siempre esterificado con alcoholes isoprenoides de cadena larga (farnesol o fitol), característica que le confiere liposolubilidad a la molécula.



SUSTITUYENTES	CLOROFILA		BACTERIOCLOROFILA	
	a	b	a*	e
R ₁	-CH=CH ₂	-CH=CH ₂	-CO-CH ₃	-CHOH-CH ₃
R ₂	-CH ₃	-CHO	-CH ₃	-CHO
R ₃	-COOCH ₃	-COOCH ₃	-COOCH ₃	-H
R ₄	Fitilo	Fitilo	Fitilo	Farnesilo
R ₅	-H	-H	-H	-CH ₃

Fitilo: -C₂₀H₃₉ ; Farnesilo: -C₁₅H₂₅

(*) La bacterioclorofila a posee el anillo B reducido en forma análoga al D.

FIGURA 7: Estructura de las clorofilas. Adaptado de Pfennig (14). Se describen las estructuras de las clorofilas a y b y bacterioclorofila a por ser las más abundantes y mejor conocidas; la bacterioclorofila e fue seleccionada con fines estrictamente comparativos.

El sistema conjugado de dobles enlaces de la unidad tetrapirrólica es el responsable del gran poder de absorción que presentan las clorofilas, en la región visible del espectro. Debido a las diferencias estructurales, anteriormente citadas, cada tipo de clorofila exhibe un espectro de absorción característico, que además varía según el solvente orgánico en el cual se halla extraído el pigmento. Todas las clorofilas *in vivo* están unidas a complejos lipoproteicos, de allí su notable solubilidad en solventes apolares.

A continuación describiremos someramente la secuencia de pasos, de localización plastídica, que partiendo de Proto IX conduce a la formación de clorofilas a y b (15). Nos

interesan específicamente estos dos tipos de pigmentos por ser los que están presentes en el microorganismo que utilizaremos en este trabajo como fuente experimental.

Según la secuencia metabólica diagramada en la Figura 8, las etapas implicadas en la síntesis de clorofilas a y b a partir de Proto IX son las siguientes:

- 1) Inserción de ión magnesio en la molécula de profirina para formar Mg-protoporfirina IX. La enzima que participa sería una quelatasa aún no caracterizada.
- 2) Metilación del resto propiónico ubicado en la posición 6, obteniéndose Mg-protoporfirina IX monometiléster. Esta reacción es catalizada por la S-adenosil-L-metionina Mg-protoporfirina IX-metiltransferasa, siendo la S-adenosil-L-metionina el compuesto donador de grupos metilo.
- 3) Conversión de Mg-protoporfirina IX monometiléster en protoclorofilida a, involucrando las siguientes transformaciones: a) reducción del grupo vinilo ubicado en la posición 4 del núcleo tetrapirrólico; b) oxidación y posterior ciclación de la cadena lateral localizada en la posición 6, originando el anillo ciclopentanona (E).

El orden en que ocurren ambos eventos aún no ha sido esclarecido, lo que sí se sabe es que el anillo E proviene de la β -oxidación del propionato de metilo ubicado en la posición 6, ya que se han encontrado todos los intermediarios normales característicos para este tipo de reacción (Figura 9). En la Figura 9 sólo se esquematiza la porción de la molécula que sufre las transformaciones que dan origen al anillo E. Considerando que los distintos intermediarios aislados podían o no tener el vinilo reducido, al nombrarlos se contempla la posibilidad de que dicha reducción haya o no ocurrido.

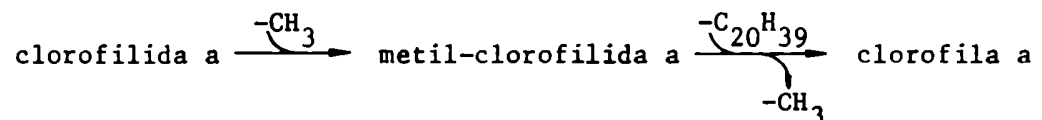
- 4) Fotorreducción de la protoclorofilida a para formar clorofilida a. Esta conversión implica la adición de dos hidrógenos en trans en las posiciones 7 y 8 del macrociclo, y constituye la única etapa dependiente de la luz durante la biosíntesis de clorofila.

Para que este proceso ocurra en plantas superiores, la protoclorofilida debe estar unida a una proteína llamada holocromo que posee actividad de reductasa. Los complejos

protoclorofilida-holocromo, así como sus productos de fotoconversión, se caracterizan por sus espectros de absorción, espectros de fluorescencia y por su capacidad para fototransformarse. En general, se acepta la existencia de principalmente tres formas para estos complejos, denominados P-650, P-635, y P-628 donde los números representan la longitud de onda, expresada en nm, a la cual se observa un máximo de absorción; además, los complejos P-650 y P-635 se caracterizan por ser fototransformables mientras que el P-628 no lo es.

En cuanto al dador de hidrógenos involucrado en la fotorreducción, podría ser el NADPH, aunque también se ha sugerido la presencia de una plastoquinona encargada de cumplir tal función.

- 5) Transformación de la clorofilida a en clorofila a por esterificación con fitol del grupo propiónico ubicado en la posición 7 del macrociclo. La enzima interviniente se denomina clorofilasa, habiéndose demostrado que la misma cataliza reacciones de trans-esterificación, se acepta a la metilclorofilida a como intermediario en esta transformación. La conversión sería entonces:



- 6) La transformación de clorofila a en clorofila b requiere la oxidación del grupo metilo ubicado en la posición 3 a grupo formilo. Para que esta reacción ocurra eficientemente *in vitro* es necesaria la presencia de NADP^+ ; acerca de la enzima interviniente y su mecanismo de acción, resta aún mucho por aclarar.

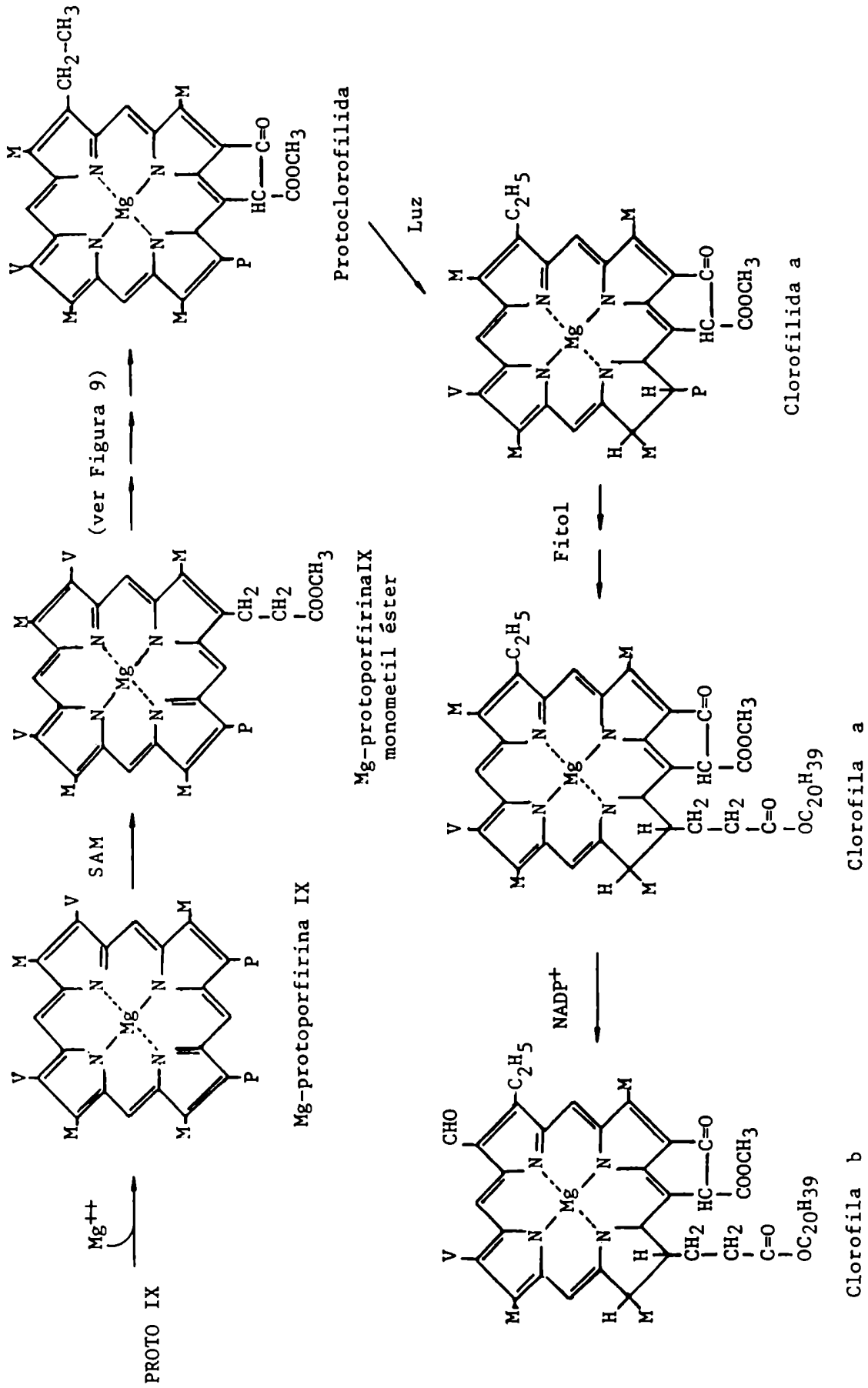


FIGURA 8: Esquema de la biosíntesis de clorofila a y b, a partir de Proto IX.
 SAM: S-adenosil-L-metionina ; Fitol: C₂₀H₄₀O

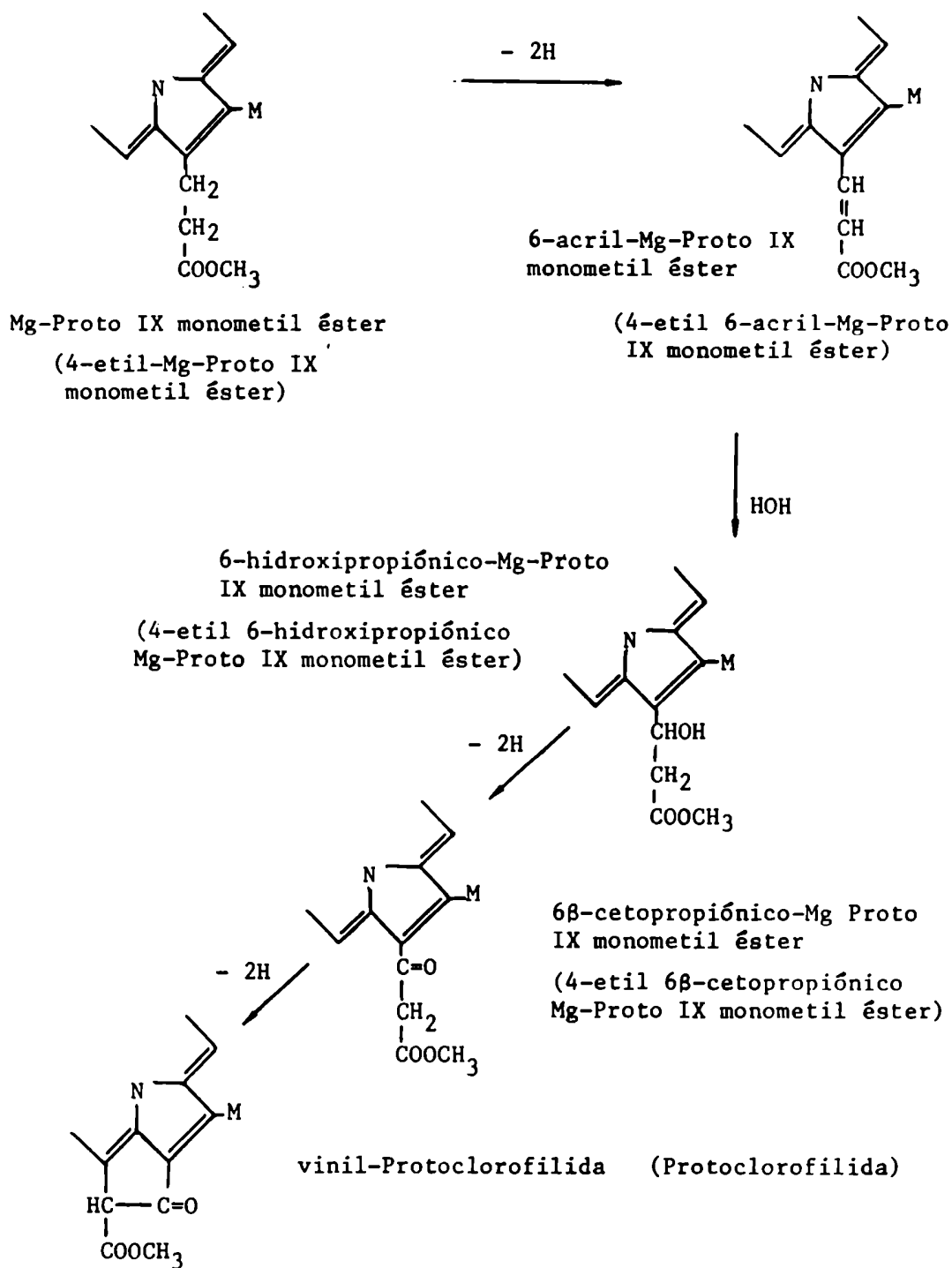


FIGURA 9: Biosíntesis de protochlorofilida a partir de Mg-protoporfirina IX monometiléster. Al mencionar los distintos intermediarios se contempla la posibilidad de que el grupo vinilo ubicado en la posición 4 haya sido (nombre entre paréntesis) o no reducido.

I.4. BIOSINTESIS DE COBALAMINAS

La inserción de un átomo de cobalto (Co^{3+}) en el anillo corrínico (Figura 10 a) conduce a la formación de las cobalaminas. Este grupo de compuestos comprende a la cianocobalamina o vitamina B_{12} y sus distintas coenzimas (5'desoxiadenosilcobalamina, metilcobalamina, hidroxicobalamina, etc.).

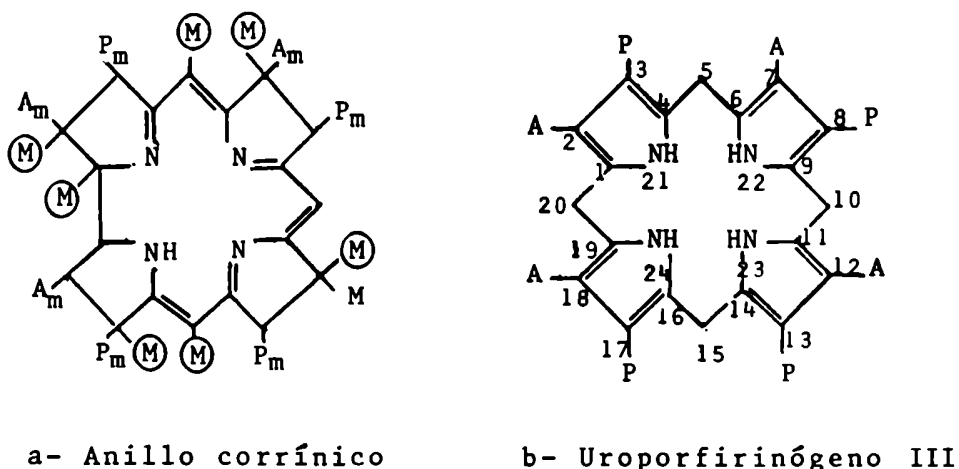


FIGURA 10: Estructuras del anillo corrínico y Urogen III. La nomenclatura utilizada para identificar los átomos del macrociclo corresponde a la aceptada por la IUPAC (7).
 A: $-\text{CH}_2-\text{COOH}$; P: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$; Am: $-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$
 Pm: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$; M: $-\text{CH}_3$

El anillo corrínico, semejante al núcleo porfirínico, deriva del Urogen III (Figura 10 b) y para su conversión es necesario que ocurran las siguientes transformaciones (16):

- a) Introducción de 7 grupos metilo, provenientes de la S-adenosil-L-metionina, en los carbonos identificados con los números 1, 2, 5, 7, 12, 15 y 17.
- b) Decarboxilación de la cadena lateral acetato unida al carbono 12.
- c) Pérdida del átomo de carbono 20 y formación de un nuevo enlace entre el átomo de carbono 1 y 19.
- d) Reducciones en el macrociclo (equivalentes a cuatro electrones).
- e) Conversión de las cadenas laterales acetato y propionato en

acetamida y propionamida, respectivamente.

Para la obtención de las distintas cobalaminas, a partir del anillo corrínico, se requiere en primer lugar la inserción de un átomo de cobalto en el centro de dicha estructura formando un complejo planar cuadrado, y luego la ocupación de las dos restantes posiciones de coordinación del metal (6 en total) que se proyectan por encima y por debajo del plano (en forma análoga a lo ya descrito para las hierro-porfirinas).

Las diferentes cobalaminas surgen de los distintos grupos que ocupan la quinta y sexta posición de coordinación del cobalto. En la vitamina B₁₂ y todos sus derivados (Figura 11), la estructura que se ubica por debajo del plano es siempre la misma, un ribonucleótido del 5,6-dimetilbencimidazol, que se fija al macrociclo mediante el quinto enlace de coordinación del metal en el que interviene un átomo de nitrógeno de la base, y por una unión covalente en la que participa el sustituyente del carbono 17 del anillo corrínico. El grupo que ocupa la sexta posición de coordinación del cobalto (grupo R de la Figura 11) se ubica en cambio por encima del plano, es variable y es el que da origen al gran número de derivados de la vitamina B₁₂. Si esta posición está ocupada por cianuro, se obtiene la cianocobalamina que es la forma en que se administra terapéuticamente la vitamina B₁₂. Si en cambio el grupo ocupante es metilo o 5'-desoxiadenosilo se tienen dos formas activas o coenzimas de la vitamina B₁₂.

Existe otra forma de cobalamina, la pseudovitamina B₁₂, que difiere de la vitamina B₁₂ en que contiene adenina en lugar de 5,6-dimetilbencimidazol en su ribonucleótido. Esta variante se encontró en *Clostridium tetanomorphum* y algunos otros microorganismos que son incapaces de sintetizar 5,6-dimetilbencimidazol, pero pueden sintetizar adenina. El derivado de la pseudovitamina B₁₂, que se aisló y posee actividad de coenzima contiene el grupo 5'-desoxiadenosilo unido a la sexta posición de coordinación del cobalto.

En cuanto a la función que desempeñan las cobalaminas, la vitamina B₁₂ es esencial para la normal maduración y el desarrollo de los eritrocitos; la metilcobalamina actúa como transportador de grupos metilo procedentes del N⁵-metiltetrahidrofolato a ciertas moléculas de aceptor, particularmente la homocisteína que se metila para transformarse en metionina; la

5'-desoxiadenosilcobalamina funciona como cofactor de enzimas que tienen en común catalizar reacciones de desplazamiento intramolecular 1,2 de un átomo de hidrógeno, acompañadas por un corrimiento en sentido inverso 2,1 de algún otro grupo de la molécula, es decir:



Un ejemplo que ilustra este tipo de reacción es la conversión intramolecular de metilmalonil-CoA en succinil-CoA, catalizada por la metilmalonil-CoA mutasa.

Otra reacción importante en la que interviene la 5'-desociadenosilcobalamina como coenzima es en la reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos mediante una ribonucleótido reductasa.

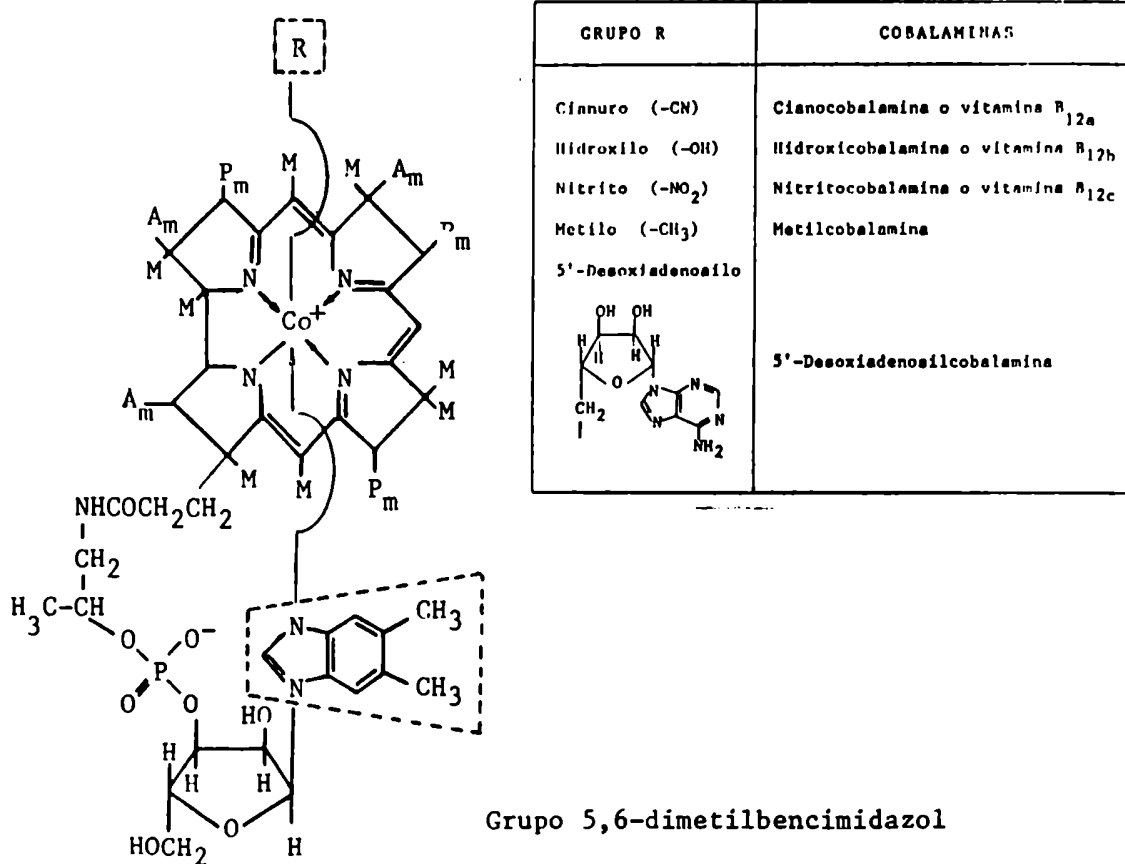


FIGURA 11: Vitamina B₁₂ y sus derivados

El derivado 5'-desoxiadaenosilo de la pseudovitamina B₁₂ es un cofactor esencial en la conversión enzimática del ácido glutámico en ácido β-metilaspártico en *Clostridium tetanophun* y otras bacterias anaerobias.

1.5. BIOSÍNTESIS DE TETRAPIRROLES DE CADENA ABIERTA

Estos compuestos altamente coloreados se producen en la naturaleza por degradación del anillo porfirínico. Son ejemplos de tetrapirroles de cadena abierta los pigmentos biliares, biliverdina y bilirrubina (Figura 12 a y b), que provienen del catabolismo de la hemoglobina (17), y las ficobilinas, ficoeritrobilina y ficocianobilina (Figura 12 c y d), compuestos de color rojo y azul respectivamente, que actúan como grupos prostéticos de la ficoeritrina y ficocianina, pigmentos accesorios de la fotosíntesis en la mayoría de las cianofíceas y rodofíceas (18).

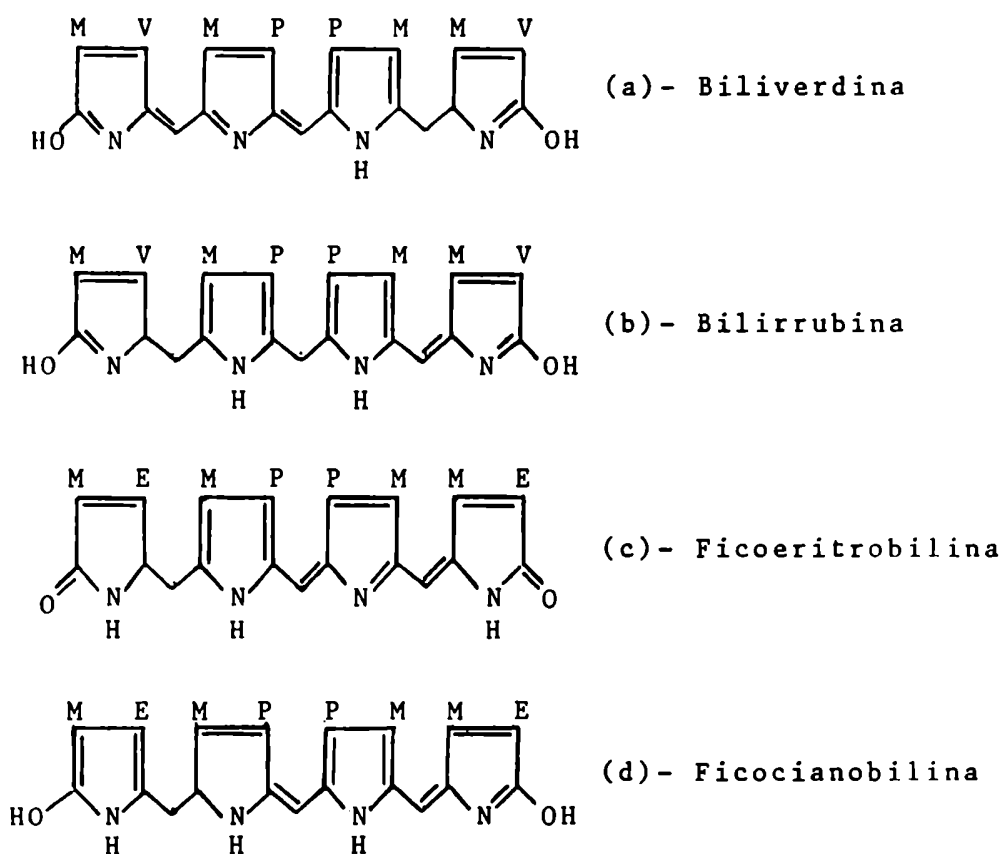


FIGURA 12: Estructuras de tetrapirroles de cadena abierta. Pigmentos biliares (a y b) y ficobilinas (c y d).
M: -CH₃; V: -CH=CH₂; E: -CH₂-CH₃; P: -CH₂-CH₂-COOH

CAPITULO II

BIOSINTESIS DEL ACIDO 5-AMINOLEVULICO

	Página
II.1. Ruta A: Síntesis de ALA a partir de glicina y succinil-CoA	24
II.1.1. Propiedades	25
II.1.2. Estructura y peso molecular	26
II.1.3. Mecanismo de acción	29
II.2. Ruta B: Síntesis de ALA a partir de precursores de cinco átomos de carbono	31
II.3. Síntesis de ALA a partir de ácido 4,5-dioxo-valérico	38
II.3.1. Propiedades	40
II.3.2. Mecanismo de acción	42
II.4. Rol fisiológico de las dos vías de síntesis de ALA	44

El ácido 5-aminolévlvulico (ALA) puede ser sintetizado por dos vías enzimáticas distintas (Figura 13), según se empleen como sustratos glicina y succinil-CoA (Ruta A) o precursores de cinco átomos de carbono tales como glutamato, glutamina o 2-cetoglutarato (Ruta B). A continuación describiremos en detalle cada una de ellas.

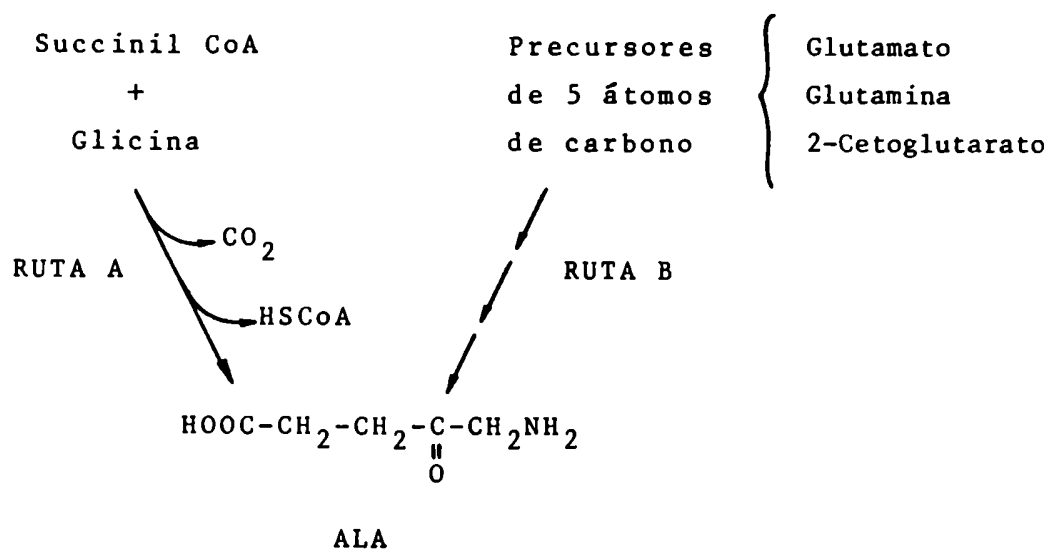


FIGURA 13: Esquema de las dos posibles rutas (A y B) que conducen en forma enzimática a la biosíntesis de ALA.

II.1. RUTA A: SINTESIS DE ALA A PARTIR DE GLICINA Y SUCCINIL CoA

El ALA se obtiene por condensación de la glicina con succinil CoA, en presencia de fosfato de piridoxal como cofactor. Esta reacción ocurre en la mitocondria y es catalizada por la enzima limitante del camino biosintético de las porfirinas llamada 5-aminolevúlico sintetasa (ALA-S), razón por la cual a esta ruta se la conoce con el nombre de vía del ALA-sintetasa.

Las primeras evidencias de actividad de esta enzima surgen de mediciones realizadas en bacterias fotosintéticas (19) y eritrocitos de pollo (20). De aquí en más, se midió actividad de ALA-S en diversas fuentes de origen animal (21-26), levaduras (27, 28), insectos (29) y algas (30, 31). Sin embargo, en tejidos vegetales únicamente pudo ser detectada en callos de soya (32) y cáscaras de papas (33).

II.1.1. Propiedades

En general, se acepta que el ALA-S es la enzima que controla la biosíntesis de tetrapirroles, de modo que la cantidad de porfirinas formadas por una célula dada depende de la cantidad y actividad de esta enzima. El establecimiento del rol regulatorio del ALA-S surgió de estudios realizados en *Rhodospseudomonas spheroides* (34) y en células de animales porfíricos (35, 36). Otras experiencias demostraron que el ALA-S está sujeta a la mayoría de los mecanismos de control que se conocen, a saber: inducción (37), represión (37, 38), inhibición feed-back por hemo (39) e inhibición por producto (40) (ver Capítulo III).

Si bien en casi todos los tejidos estudiados el ALA-S se encuentra asociada a la fracción particulada, un notable aumento de actividad de esta enzima puede ser observado en la fracción soluble de hígado y riñón de animales tratados con inductores del ALA-S (41, 42) habiéndose demostrado que la enzima citosólica era una forma inmadura de la proteína en tránsito desde los polirribosomas libres citoplasmáticos donde se sintetizaba, hacia la matriz mitocondrial donde manifestaba su actividad (43-45).

El ALA-S se caracteriza además por ser una proteína inestable y de vida media corta, alrededor de 70 minutos para la enzima mitocondrial de hígado de rata adulta (22), 34 minutos para la de hígado fetal (46) y 160 minutos en hepatocitos de embrión de pollo (37). La vida media del ALA-S citosólica en hígado de rata es de 20 minutos, menor aún que la de la enzima mitocondrial (47). La vida media corta es una característica importante del ALA-S que posibilita la regulación, por inducción o represión de su síntesis, efectuada por la enzima sobre la formación de porfirinas.

La baja actividad y concentración de la enzima presente *in vivo* en condiciones normales dificulta su detección y purificaci^on. El tratamiento previo con inductores del ALA-S tales como 2-alil-2-isopropilacetamida (AIA) ó 1,4-dihidro-3,5-dicarbetoxicolidina (DDC), soluciona en parte este problema. La enzima purificada requiere de la presencia de compuestos sulfhidr^ílicos para manifestar su actividad y es altamente específica por sus sustratos.

Los valores de la constante de afinidad (Km) para succinil CoA, glicina y fosfato de piridoxal, obtenidos con la enzima mitocondrial hepática parcialmente purificada, son del orden de 50 a 200 μM , 5 a 20 mM y 1 a 10 μM respectivamente (48-50).

El ALA-S es una proteína esencial ("housekeeping") para asegurar el desarrollo y normal funcionamiento de todas las células de origen animal (51); esta propiedad no se hace extensiva a todo tipo de células ya que como veremos al analizar la ruta B, en la mayoría de los tejidos vegetales y algunas algas, su presencia es aún cuestionable (la enzima podría no existir o bien dadas sus características, estar presente en muy baja concentración).

II.1.2. Estructura y peso molecular

Según estudios realizados con la enzima de hígado de rata (52), el ALA-S se encontraría en el citoplasma formando parte de un agregado (peso molecular 320.000) constituido por tres componentes proteicos (Figura 14). Una porción catalíticamente activa, que corresponde a la enzima (A según el esquema) de peso molecular 110.000 compuesta por dos subunidades idénticas de peso molecular 51.000, y dos proteínas sin actividad catalítica, que actuarían como transportadores, de pesos moleculares 120.000 y 79.000, denominadas B y C respectivamente. El agregado se separa en sus tres componentes (A, B y C) cuando se lo somete a centrifugación en un gradiente de sacarosa en presencia de cloruro de sodio 0,25 M pero las proteínas no pierden su capacidad de reasociarse para volver a constituir la forma citosólica nativa de peso molecular 320.000, o especies de pesos moleculares de alrededor de 170.000 y 250.000 que corresponderían a los complejos (A + C) y (A + B) respectivamente. La enzima citosólica (A) también puede separarse de las proteínas transportadoras catalíticamente inactivas (B y C) por acción de proteasas. El tratamiento con papaína permite obtener el dímero de peso molecular 110.000, mientras que el empleo de tripsina produce una especie de peso molecular 170.000 que se correspondería con el complejo (A + C) (Figura 14). Además, cuando el agregado citosólico se aísla trabajando a baja fuerza iónica, tiende a formar un dímero de

peso molecular 650.000-700.000. Para la enzima mitocondrial (A') de hígado de rata, cuyo peso molecular se estimó en 115.000 (53), estudios inmunológicos (41) y cromatografías por columnas de CM-Sephadex e hidroxapatita (52), habían demostrado su posible identidad con el dímero que proviene de tratar con papaína el agregado citosólico.

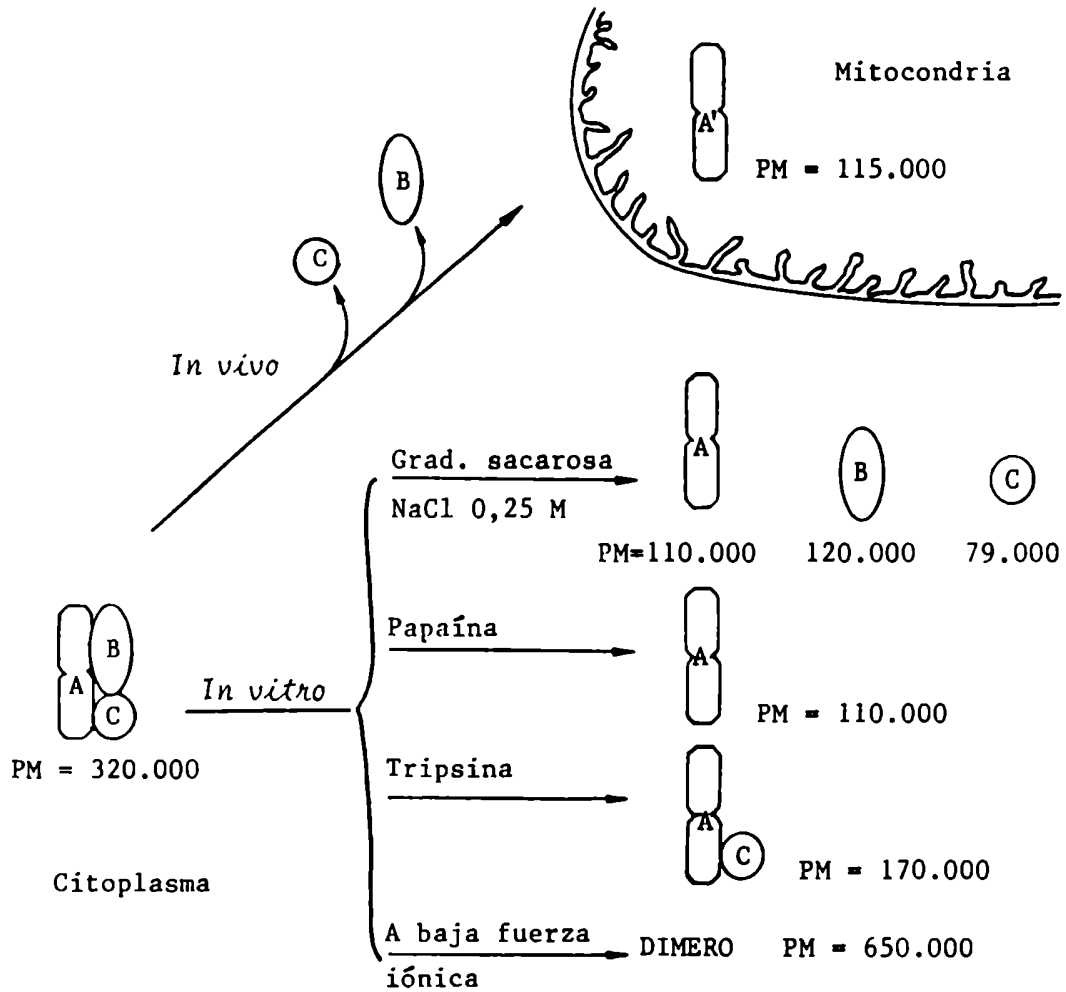


FIGURA 14: Posible relación entre las formas citosólica y mitocondrial del ALA-S en hígado de rata. Las técnicas empleadas para determinar los pesos moleculares fueron filtración por geles y centrifugación en gradiente de sacarosa (52).

El esquema de la Figura 14 permite explicar además, los distintos pesos moleculares obtenidos por otros autores para la enzima de esta misma fuente. Hayashi y col. (53) aplicando filtración por geles y centrifugación en gradiente de

sacarosa, ambas técnicas en ausencia de cloruro de sodio, obtuvieron para la forma citosólica pesos moleculares de 600.000 y 178.000 respectivamente; este último valor coincide con el estimado por Whiting y Elliott (54) utilizando cromatografía por Sephadex G-200 en presencia de cloruro de sodio y ditioneitol. Estos resultados avalarían la formación de un dímero del agregado citosólico y además permitirían postular que la fracción proteica B sería más fácilmente disociada del complejo que la C (52). Con respecto al ALA-S asociada a la fracción particulada de hígado de rata, los pesos moleculares obtenidos varían desde 115.000-120.000 (53, 55) hasta 77.000 (54), dependiendo de las precauciones experimentales que se hayan tomado para evitar la formación de agregados con otro tipo de proteínas presentes en la matriz mitocondrial. Las propiedades de dichos agregados han sido investigadas (48, 54), descartándose la posibilidad de que correspondan a complejos de la enzima mitocondrial con las proteínas transportadoras citoplasmáticas, que podrían haberse internalizado (54).

El ALA-S también ha sido aislada a partir de mitocondrias de hígado de pollo, para la cual se ha determinado un peso molecular de 110.000 (56).

Para la enzima proveniente de mitocondrias de hígado de embrión de pollo, Whiting y Granick (57) obtuvieron, por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, un peso molecular de 87.000, mientras que si la electroforesis se efectuaba en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) el peso molecular resultante era de 49.000, por lo cual los autores sugirieron que en esta fuente, al igual que en hígado de rata, la enzima mitocondrial estaría constituida por un dímero de dos subunidades idénticas. Posteriormente, Borthwick y col. (58), con un método de purificación más rápido y reproducible, determinaron para el ALA-S de mitocondria de hígado de embrión de pollo un peso molecular mínimo de 68.000, observando además que por degradación proteolítica aparecía una forma enzimática igualmente activa, pero más pequeña (peso molecular 50.000) que podría ser identificada con la especie reportada anteriormente como monómero por Whiting y Granick (57).

El clonado del gen que codifica para la enzima proveniente de distintas fuentes animales (51, 59-61),

bacterias (62) y levaduras (63), aportó nuevos conocimientos respecto a la estructura del ALA-S. Se estableció que esta enzima, codificada por un gen nuclear, se sintetiza sobre los polirribosomas libres como un precursor citosólico que contiene de 50 a 60 aminoácidos más de lo que corresponde a la proteína mitocondrial madura (51, 64). Dichos aminoácidos se ubican en el extremo N-terminal de la proteína, dando origen a una pre-secuencia que sería posteriormente clivada por una proteasa localizada en la matriz mitocondrial (65). La pre-secuencia, de naturaleza básica, es característica de muchas proteínas mitocondriales y cloroplásticas, y si bien su significado no está aún claramente definido, hay una gran probabilidad de que juegue un rol importante en la interacción del precursor citosólico con algún receptor de la membrana externa de la organela correspondiente, ya sea mitocondria o cloroplasto (66).

Volviendo entonces al esquema de la Figura 14 correspondiente al ALA-S de hígado de rata, en la actualidad se sabe que la enzima citosólica (A) contiene 642 aminoácidos (peso molecular aproximado 70.000) de los cuáles 586 darán origen a la enzima mitocondrial madura (A') y los 56 restantes constituyen la pre-secuencia (51). En lo que concierne a estructura primaria, comparando la enzima de esta fuente con la proveniente de hígado de embrión de pollo (64) se comprobó la existencia de amplias zonas homólogas, mientras que la similitud con la proteína de hígado de ratón (61) fue significativamente menor.

Por último, trabajos recientes (51, 61, 66) sugieren que es un único gen el que codifica para la enzima proveniente de distintos tejidos de una misma especie, contrariamente a lo indicado en trabajos anteriores (60, 68, 69) que postulaban para el ALA-S la existencia de familias multigénicas.

II.1.3. Mecanismo de acción

En base a estudios realizados con ALA-S purificada de *Rhodopseudomonas spheroides* (70, 71), surge para la enzima el mecanismo de acción esquematizado en la Figura 15.

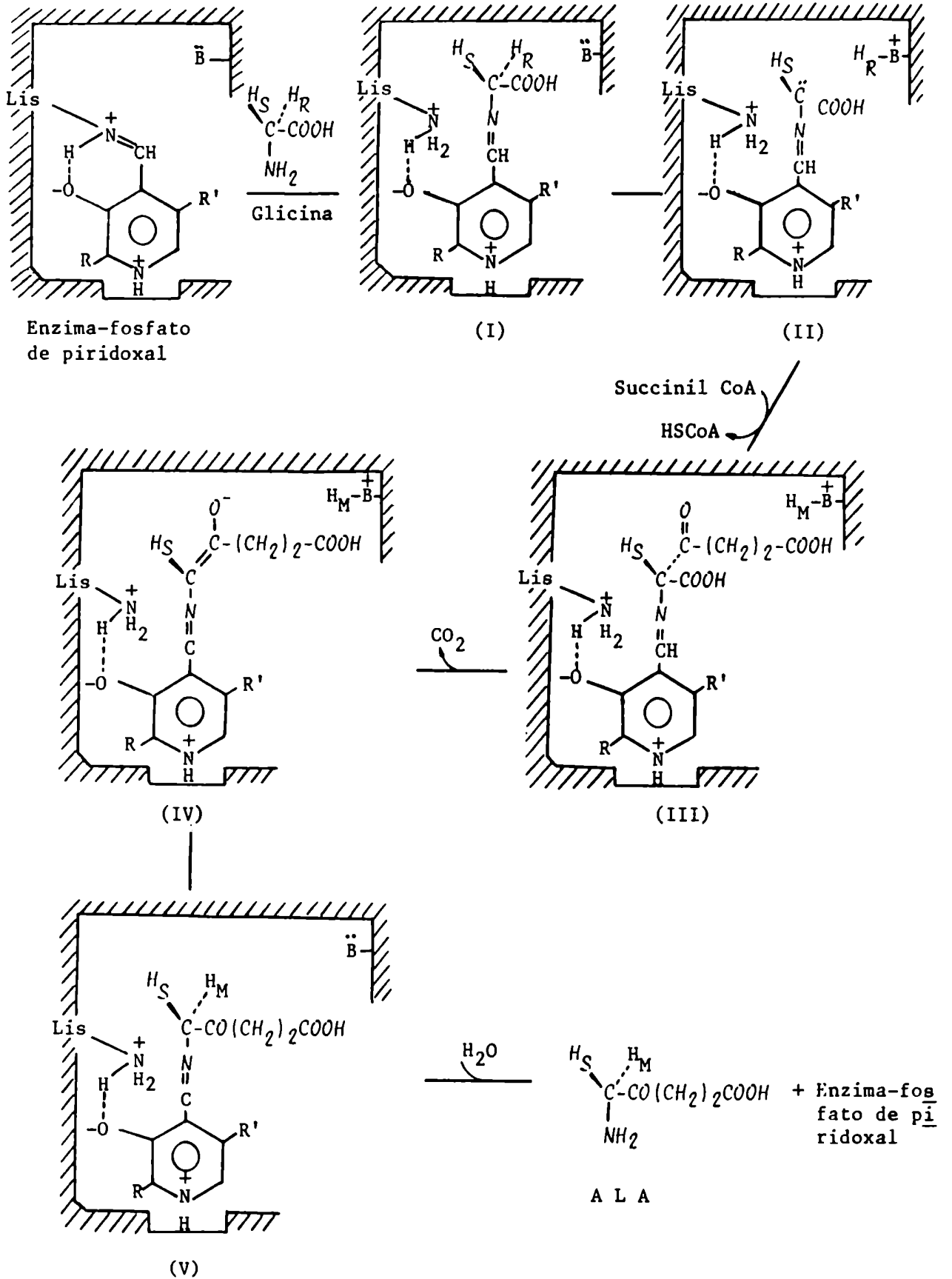


FIGURA 15: Mecanismo propuesto para la formación de ALA por la vía del ALA-S.
 Las reacciones se describen detalladamente en el texto. R: -CH₃; R': -CH₂-O-PO₃H₂

Se parte de la proteína unida al fosfato de piridoxal mediante el átomo de nitrógeno del anillo pirimidínico y una base de Schiff que se establece entre el aldehído del cofactor y un grupo ϵ -amino de un residuo lisina de la cadena polipeptídica (72). La reacción comienza cuando la glicina se condensa con el fosfato de piridoxal para formar una nueva base de Schiff (I). Luego el protón H_R de este complejo es liberado y capturado por un grupo básico de la enzima, originándose un carbanión estable (II) que reacciona con el átomo de carbono del carbonilo electrofílico de la succinil CoA para producir un intermediario inestable, el ácido 2-amino-3-cetoadípico (III). Durante esta última conversión el protón H_R unido a la proteína se intercambia con un protón H_M proveniente del medio. A continuación, el ácido 2-amino-3-cetoadípico, aún unido a la enzima, se decarboxila para dar (IV), se adiciona el protón H_M (V) y por hidratación el ALA se libera del complejo enzima-fosfato de piridoxal.

II.2. RUTA B: SINTESIS DE ALA A PARTIR DE PRECURSORES DE CINCO ATOMOS DE CARBONO

Como consecuencia de las dificultades encontradas para detectar niveles de actividad de ALA-S en plantas superiores y algas, se investigaron otras posibles vías para la síntesis del precursor. Las únicas fuentes de origen vegetal en las que se midió síntesis de ALA a partir de glicina y succinil CoA han sido callos de soya (32) y cáscaras de papas (33), ambos sistemas incapaces de enverdecer por exposición a la luz.

Las experiencias llevadas a cabo en cultivos de *Chlorella* (73, 74) y plantas superiores (75-77), en las cuales se midió incorporación de ^{14}C -succinato o ^{14}C -glicina en la molécula de clorofila, podrían considerarse evidencias indirectas de actividad de ALA-S, pero su validez es cuestionable por las siguientes razones: a) no se demostró que la marca radiactiva se incorpore en la porción tetrapirrólica de la clorofila, podría hacerlo en los sustituyentes del núcleo porfirínico que no se sintetizan a partir de ALA; b) la glicina se incorpora en el pigmento en la misma proporción que lo hace el acetato

aún cuando este último necesita ser metabolizado para su posterior utilización como sustrato del ALA-S y c) en muchas experiencias se incorpora indistintamente la marca del carbono 1 o carbono 2 de la glicina, lo cual no es compatible con la vía enzimática analizada (el carbono 1 de la glicina se elimina como dióxido de carbono).

Sabiendo que el ALA es indiscutiblemente necesario para la biosíntesis de porfirinas en todos los tejidos de origen vegetal (especialmente en los expuestos a la luz para su enverdecimiento), como hemos dicho, hace aproximadamente 20 años comenzó la búsqueda, por parte de distintos grupos de investigadores, de una nueva vía de síntesis de ALA.

Beale y Castelfranco (78), trabajando con cotiledones de pepinos etiolados sometidos a iluminación, midieron radiactividad en el ALA formado cuando se incubaba en presencia de ácido levulínico (inhibidor competitivo del ALA-Dehidrasa) y distintos precursores radiactivos (Tabla 2). Los resultados obtenidos no pudieron ser explicados considerando la incorporación de los diferentes compuestos por la vía del ALA-S, dado que:

- a) La incorporación de glicina fue muy baja y de igual magnitud para el aminoácido marcado en el carbono 1 ó 2.
- b) Los intermediarios metabólicos generales se incorporaban todos en mayor proporción que la glicina, descartándose entonces la posibilidad de que se metabolizaran por la misma vía que este aminoácido.
- c) Los compuestos de 5 átomos de carbono fueron los que mostraron mayor eficiencia en la incorporación. Dado que el carbono 1 del glutamato se incorporaba en igual proporción que el carbono 3 y carbono 4, queda sin efecto la posibilidad de su incorporación por la siguiente secuencia de reacciones:

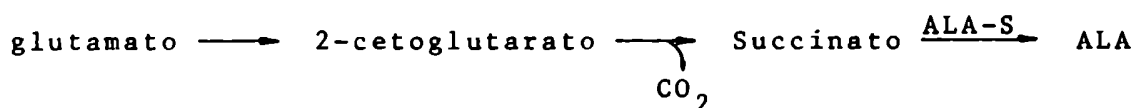


TABLA 2: Incorporación en el ALA del ^{14}C proveniente de distintos precursores

PRECURSOR MARCADO	INCORPORACION RELATIVA
$1\text{-}^{14}\text{C}$ -glicina	1,0
$2\text{-}^{14}\text{C}$ -glicina	1,2

Metabolitos generales:	
^{14}C -formiato	2,9
$1,2\text{-}^{14}\text{C}$ -acetato	14,0
$1,4\text{-}^{14}\text{C}$ -succinato	4,0
*U- ^{14}C -prolina	5,5
$1\text{-}^{14}\text{C}$ -glioxalato	4,1
$2\text{-}^{14}\text{C}$ -glioxalato	11,7

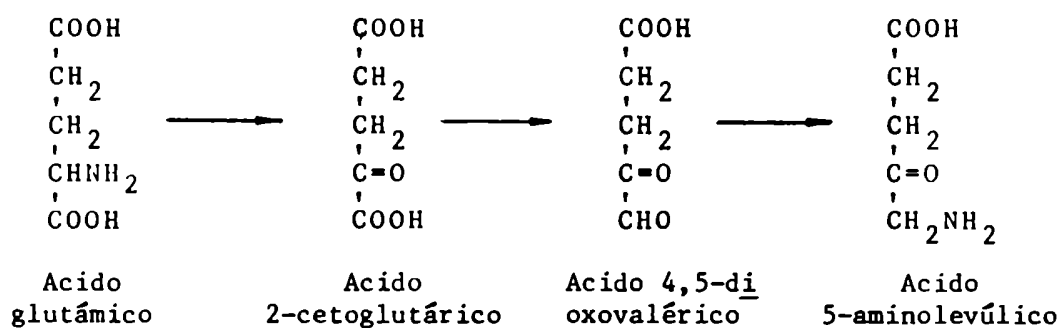
Compuestos de 5 átomos de carbono:	
U- ^{14}C -2-cetoglutarato	21,3
U- ^{14}C -glutamina	34,1
$1\text{-}^{14}\text{C}$ -glutamato	28,1
$3,4\text{-}^{14}\text{C}$ -glutamato	29,8

La experiencia se llevó a cabo con cotiledones de pepinos etiolados que fueron pre-iluminados durante 4 horas y luego incubados durante 4 horas más, en presencia de luz y con el agregado de ácido levulínico (100 mM), dimetilsulfóxido (10 %) y $10\ \mu\text{C}$ de los distintos compuestos marcados. Los datos de incorporación correspondientes al trabajo de Beale y Castelfranco (78) fueron aquí normalizados respecto a la $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glicina. (*) U: uniformemente marcado.

Resultados similares a los detallados en la Tabla 2 fueron obtenidos por los mismos autores empleando hojas de puros y cebada en enverdecimiento (79). A partir de estos trabajos se postula la existencia de una nueva vía de síntesis de ALA que utiliza como sustratos precursores de 5 átomos de carbono; posteriormente se demostró (80) que la misma se caracteriza por mantener en el producto la integridad del esqueleto carbonado presente en los distintos posibles sustratos (glutamato, glutamina o 2-cetoglutarato). Un buen número de trabajos adicionales (4, 81-92) corroboraron esta hipótesis; razón por la cual, hoy día se acepta, sin lugar a dudas, la existencia de esta nueva ruta biosintética para el ALA denominada vía de 5 átomos de carbono, debido a la conformación de sus sustratos.

De aquí en más se trató de dilucidar la secuencia de reacciones por la cual los precursores de 5 átomos de carbono se metabolizan para formar el ALA. Partiendo de la base de que el glutamato, glutamina y 2-cetoglutarato pueden ser fácilmente interconvertidos, a continuación se enumeran todas las rutas hipotéticas posibles que a partir de glutamato conducen a la formación de ALA. Para cada secuencia se mencionan las evidencias existentes en el momento en que fueron propuestas, que permitían tanto avalarlas como descartarlas.

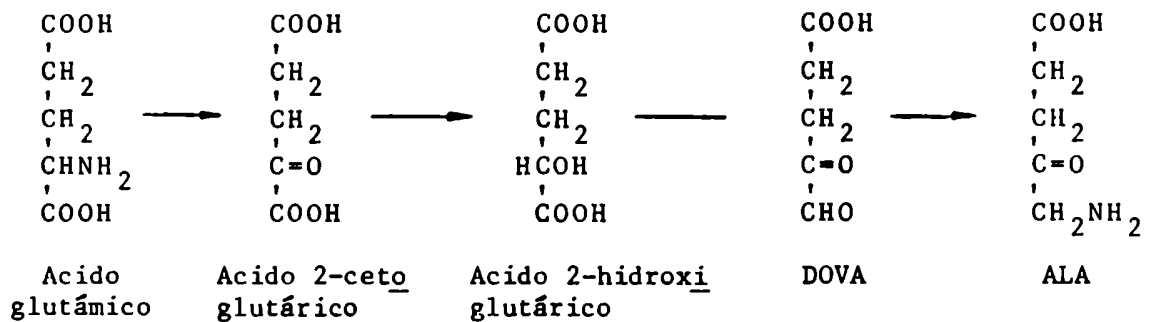
- Secuencia 1



Esta vía de tres etapas es particularmente interesante dado que existen estudios relacionados con todos los pasos que la constituyen. La glutamato transaminasa sería la encargada de catalizar la conversión de ácido glutámico a 2-cetoglutarico. Para la formación de ALA a partir de ácido 4,5-dioxoaléxico (DOVA) ya se había reportado la existencia de una aminotransferasa, detectada en *Rhodopseudomonas spheroides* (93) y

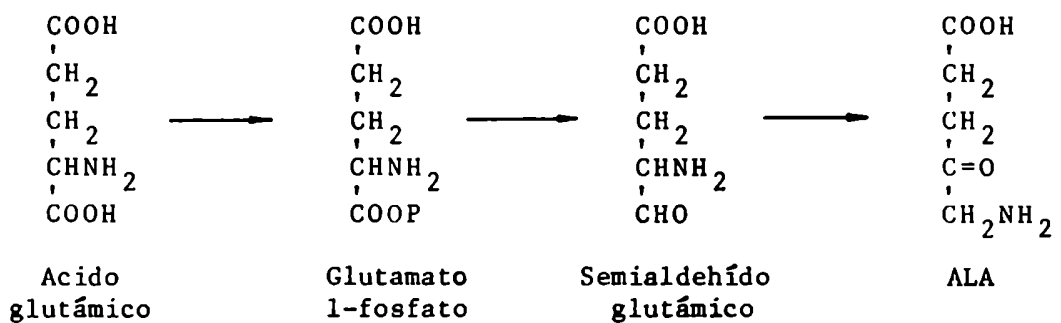
Chlorella (94). Además, Lohr y Friedmann (95) trabajando con extractos de plantas superiores, lograron purificar parcialmente dos enzimas que catalizaban la transformación de 2-cetoglutarato a DOVA y de DOVA a ALA, respectivamente.

- Secuencia 2



Esta sería una variación de la secuencia anterior, aquí la conversión de 2-cetoglutarato a DOVA se realiza previo pasaje por 2-hidroxiglutarato. Jerzykowski y col. (96) encontraron que el sistema de la glioxalasa de hígado de vaca era capaz de catalizar la transformación de DOVA a 2-hidroxiglutarato, mientras que Okuyama y col. (97) trabajando con *Rhodospseudomonas spheroides*, observaron que enzimas presentes en este microorganismo podían oxidar el 2-hidroxiglutarato a 2-cetoglutarato.

- Secuencia 3

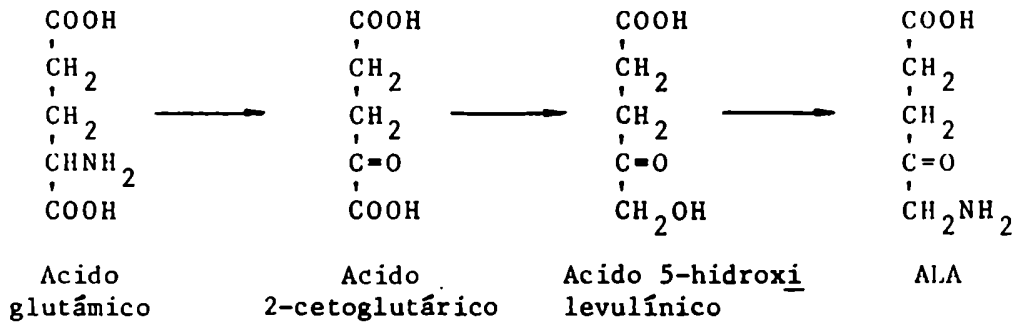


En este caso se propone que el glutamato, en primer lugar, debe ser activado a glutamato 1-fosfato mediante una quinasa que emplea ATP y magnesio como cofactores. Luego una deshidrogenasa reduce el glutamato 1-fosfato a semialdehído glutámico y finalmente, el semialdehído glutámico se isomeriza a ALA.

Esta secuencia fue propuesta por el grupo de Kannangara y

Gough (98), quienes detectaron en plásmidos de cebada actividad de una aminotransferasa que catalizaba la formación de ALA por transaminación interna del semialdehído glutámico.

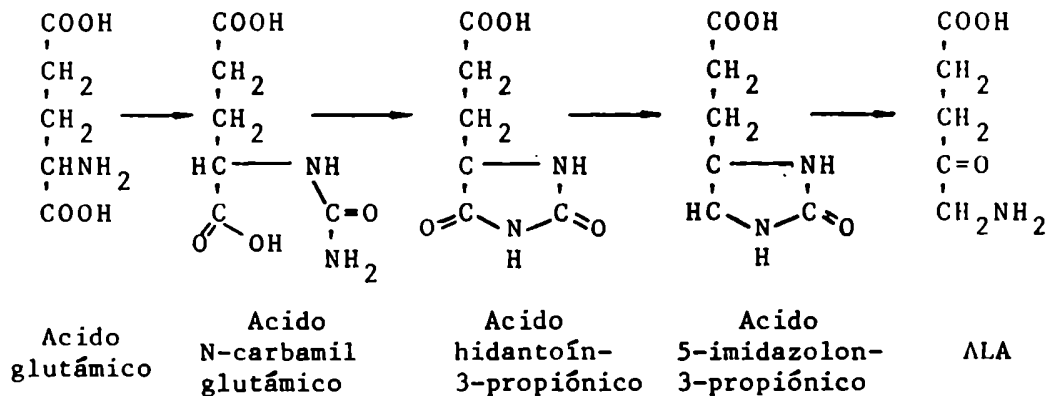
- Secuencia 4



Estudiando el metabolismo del ácido 5-hidroxi levulínico en mitocondrias de hígado de rata, Wang y col. (99) observaron que este compuesto se transformaba en ALA. Teniendo en cuenta esta evidencia se postula la secuencia que incluye a este compuesto como intermediario.

La única forma conocida de obtener *in vivo* ácido 5-hidroxi levulínico a partir de precursores de 5 átomos de carbono es mediante una carboligasa que emplea 2-cetoglutarato y glioxalato como sustratos (100). En esta reacción se liberan dos moléculas de dióxido de carbono, una de las cuáles proviene del carbono 1 del 2-cetoglutarato; dado que la vía de síntesis de ALA que estamos tratando de dilucidar se caracteriza por mantener la integridad del esqueleto de 5 átomos de carbono, se considera poco probable la participación del ácido 5-hidroxi levulínico en dicha ruta.

- Secuencia 5

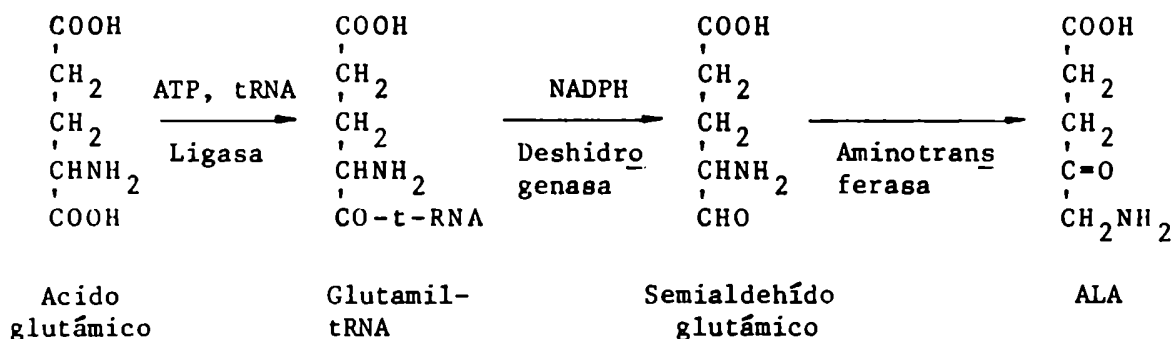


Esta secuencia surge por analogía con otras rutas metabólicas y no existe ningún tipo de evidencias directas que avalen su participación en la biosíntesis de ALA. En primer lugar, se postula que el ácido glutámico podría reaccionar con el N-carbamil fosfato formando el ácido N-carbamil glutámico, el cual por deshidratación daría ácido hidantoína-3-propiónico; ambas reacciones serían análogas a las que ocurren con el aspartato durante la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos. Luego, el derivado de la hidantoína debería reducirse para formar una imidazolona, en forma similar a lo que ocurre en la vía degradativa de la histidina. Finalmente, por clivaje hidrolítico del ácido 5-imidazolón-3-propiónico se originaría el ALA junto con dióxido de carbono y amoníaco.

De todas las secuencias postuladas para explicar la formación de ALA por la vía de 5 átomos de carbono, se consideran como más factibles la 1 y la 3, es decir las que involucran al DOVA y al semialdehído glutámico respectivamente, como intermediarios de reacción.

Este trabajo trata de esclarecer la probable participación del DOVA como precursor del ALA; por tal razón a continuación describiremos detalladamente todo lo relacionado con este compuesto.

Respecto a la secuencia 3, sólo diremos que en la actualidad varios trabajos (101-105) sugieren que la forma activada del glutamato sería un complejo glutamil-tRNA en lugar del glutamato-1-fosfato, con lo cual la secuencia quedaría:



II.3. SINTESIS DE ALA A PARTIR DE ACIDO 4,5-DIOXOVALERICO

Los primeros trabajos en los que se relaciona al ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA) con la biosíntesis de porfirinas ya provenían del laboratorio de Shemin (2) y dieron origen al ciclo del succinato-glicina o ciclo de Shemin y Russell (Figura 16). Según éste, el ALA se forma por condensación de la glicina y succinil CoA y cuando no se requiere para la síntesis de tetrapirroles, puede sufrir una reacción de desaminación dando origen al DOVA. Luego, este último compuesto pierde el grupo carbonilo terminal regenerando el succinato y liberando un fragmento de un átomo de carbono (proveniente del carbono 2 de la glicina) capaz de participar en la biosíntesis de purinas, eliminarse como formiato e intervenir en las reacciones de metilación como podría ser la síntesis de metionina.

Identificando los átomos de carbono y nitrógeno de la glicina, y relacionándolos con los productos salientes del ciclo, observamos que por cada vuelta del mismo se produce como resultado final la degradación de una molécula de dicho aminoácido. Por tal razón, el ciclo de Shemin y Russell fue postulado como una vía alternativa para metabolizar glicina, cuando ésta no se requiere para la formación de porfirinas. En cuanto al DOVA sería un metabolito intermedio proveniente del catabolismo del ALA.

El funcionamiento del ciclo del succinato-glicina se comprobó posteriormente en una gran variedad de tejidos y organismos (106-108). Asimismo en homogenato de hígado de rata (109) y en extracto crudo de *Corynebacterium diphtheriae* (110) se detectó una proteína capaz de catalizar la formación del DOVA por desaminación del ALA. Pero en el año 1961, Gibson y col. (111) demostraron que en realidad, el equilibrio de esta última reacción estaría desplazado favoreciendo la transaminación en el sentido opuesto al propuesto por el ciclo (ver Figura 16, flecha en línea discontinua). Efectivamente, incubando un extracto enzimático de *Rhodopseudomonas spheroides* con DOVA y L-alanina, estos autores obtuvieron formación de ALA y piruvato.

De aquí en más surgen una serie de estudios relacionados con la actividad de una aminotransferasa, la 4,5-dioxo-valérico Transaminasa (DOVA-T), involucrada en la síntesis de

ALA en bacterias fotosintéticas (93), *Chlorella* (94) y plantas superiores (95). Estos últimos trabajos corresponden a los mencionados anteriormente para avalar la secuencia que propone al DOVA como intermediario (Secuencia 1) en la vía de síntesis de ALA a partir de precursores de 5 átomos de carbono.

A continuación se describen las características más salientes de la DOVA-T.

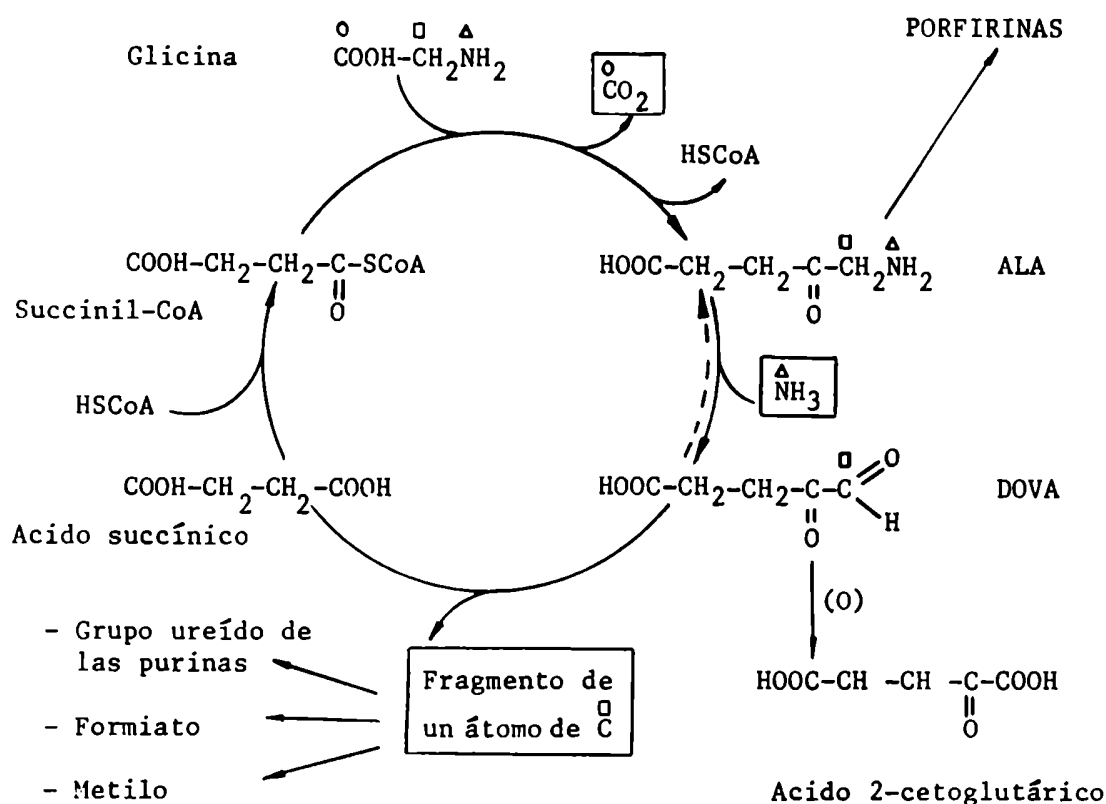


FIGURA 16: Ciclo del succinato-glicina (o de Shemin y Russell). Los intermediarios se representan como ácidos libres. Los productos finales se hallan recuadrados, habiéndose identificado además los átomos de carbono y nitrógeno provenientes de la glicina.

II.3.1. Propiedades

La reacción catalizada por la DOVA-T (Figura 17) emplea como sustratos DOVA y un aminoácido, que funcionan como aceptor y donador de grupos amino respectivamente; requiere fosfato de piridoxal como cofactor, y forma como productos ALA y el cetoácido que proviene del amino donador correspondiente.

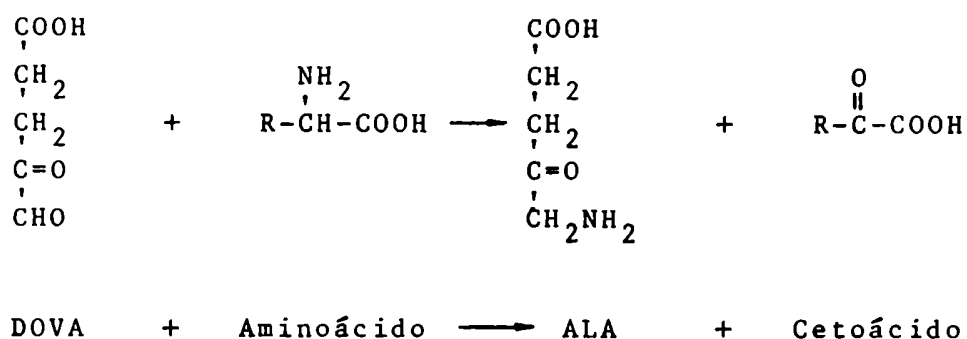


FIGURA 17: Reacción catalizada por la DOVA-T.

Estudios de especificidad por el aminoácido demostraron que los valores más altos de actividad de DOVA-T se obtienen empleando L-alanina o L-glutamato, apareciendo entonces piruvato o 2-cetoglutarato respectivamente como cetoácidos productos de la reacción.

La presencia de una transaminasa capaz de catalizar la formación de ALA a partir de DOVA se detectó en bacterias (93, 112, 113), algas (94, 114-117), mitocondrias de hígado de vaca (118, 119) y plantas superiores (95, 117, 120, 121). En la Tabla 3 se resumen las propiedades obtenidas para la enzima proveniente de las distintas fuentes.

Como vemos, se trata de una proteína que al pH óptimo, empleado habitualmente como pH de trabajo, presenta una carga neta negativa. En cuanto a estructura, en la mayoría de las fuentes la DOVA-T aparece como un dímero, aunque también puede aislarse como monómero o tetramero. No obstante, independientemente del número de subunidades, todos los resultados coinciden en que el peso molecular del protómero oscila entre 55.000 y 60.000, sea cual fuere el método empleado para estimar su valor (el caso de la *Euglena*, si correspondiera a un monómero constituiría una excepción pero, como discutiremos

al analizar los resultados, este peso molecular podría no estar bien establecido).

TABLA 3: Propiedades de la DOVA-T proveniente de distintas fuentes

FUENTES	PESO MOLECULAR	NUMERO DE SUBUNIDADES	pI	pH OPTIMO	K_m DOVA (mM)	K_m aminoácido* (mM)	REFERENCIA
Bacterias:							
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	-		-	7,0	0,4	8,0 (Ala)	(93)
<i>Clostridium tetanomorphum</i>	111.000		-	-	0,26	1,96 (Ala)	(113)
Algas:							
<i>Chlorella vulgaris</i>	-		-	6,7-7,6	2,62	28,6 (Ala)	(94)
<i>Euglena gracilis</i>	98.000		-	6,8	1,1	11 (Glu)	(115)
<i>Chlorella fusca</i>	60.000		-	7,3	2,0	0,48 (Glu)	(116)
<i>Chlorella regularis</i>	126.000		4,8	8,0	0,12	3,5 (Ala)	(117)
Mitocondrias de hígado de vaca	240.000		5,4	6,9	0,24	3,7 (Ala)	(118,119)
Plantas superiores:							
<i>Cucumis sativus</i>	104.000	2	5,95	-	-	-	(120)
<i>Zea mays L.</i>	-	-	-	6,7	3	18,5 (Glu)	(121)
<i>Raphanus sativus</i>	123.000	2	5,4	8,0	0,71	1,7 (Ala)	(117)

(*) Ala: L-alanina; Glu: L-glutamato

Observando los parámetros cinéticos vemos que el K_m para el DOVA es siempre menor que el obtenido para el aminoácido, ya sea éste L-alanina o L-glutamato. Respecto al cofactor, éste estaría fuertemente unido a la proteína, de modo tal que el agregado adicional de fosfato de piridoxal normalmente no produce aumento de actividad. La reacción catalizada por esta enzima se diferencia fundamentalmente de la mayoría de las reacciones de transaminación por su irreversibilidad.

La DOVA-T es inhibida por una gran cantidad de dioxo-compuestos (ácidos 2-cetocarboxílicos, cetoaldehídos o ácidos dicarboxílicos) que pueden actuar como análogos del DOVA. Este tipo de inhibición, la falta de especificidad en general característica de las aminotransferasas y el desconocimiento de una ruta que conduzca *in vivo* a la síntesis de DOVA, llevó a un grupo de investigadores a considerar que la transaminasa involucrada en esta reacción podría no ser específica para el

DOVA como sustrato. En varios trabajos se concluye que la DOVA-T funcionaría *in vivo* catalizando la transaminación del glioxalato (115-117, 119).

Cabe aclarar, que si bien no se ha establecido aún en forma definitiva la vía metabólica que a partir de precursores de 5 átomos de carbono y sin ruptura del esqueleto carbonado, posibilite la obtención de DOVA *in vivo* (existe sólo un reporte (95) de actividad de una deshidrogenasa en hojas de maíz capaz de convertir 2-cetoglutarato en DOVA), lo que sí se pudo detectar fue formación de DOVA a partir de glutamato en hojas de cebada etioladas en las que se indujo la síntesis de porfirinas por el agregado de quelantes del hierro (122) y en cultivos de *Scenedesmus obliquus* al ser sometidos a iluminación (123).

En cuanto a la localización celular, la DOVA-T es una enzima asociada a la fracción particulada, su compartimentalización aún no ha sido esclarecida, pero podría ser mitocondrial y/o cloroplástica. Tampoco existe información respecto a si esta transaminasa posee o no función regulatoria.

II.3.2. Mecanismo de acción

La mayoría de los trabajos adjudican a la DOVA-T el clásico mecanismo ping-pong o de doble desplazamiento, típico de las transaminasas (Figura 18).

El mecanismo consta esencialmente de dos etapas o hemirreacciones:

- Etapa 1: Desaminación del aminoácido (L-alanina o L-glutamato) para ser convertido en el cetoácido correspondiente (piruvato o 2-cetoglutarato).
- Etapa 2: Aminación del DOVA para formar ALA.

Se parte de la enzima unida al fosfato de piridoxal mediante el átomo de nitrógeno del anillo pirimidínico y una base de Schiff que se establece entre el aldehído del cofactor y un ϵ -amino de un residuo lisina de la proteína. La primera etapa comienza cuando el aminoácido sustrato de la reacción se condensa con el fosfato de piridoxal para formar una nueva base de Schiff (I). Este complejo experimenta un reordenamiento del enlace imino dando (II), que por hidrólisis

libera el cetoácido producto de la reacción y el sistema enzima-cofactor que transporta el grupo amino (Enzima-fosfato de piridoxamina). Así, con esta nueva forma enzimática comienza la segunda etapa, exactamente inversa a la anterior, en la que se establece una base de Schiff (III) entre el grupo amino del cofactor y el aldehído del DOVA. El complejo III sufre un reordenamiento del enlace imino dando (IV) y éste por hidrólisis libera ALA y la forma enzimática inicial (Enzima-fosfato de piridoxal). El resultado neto de este proceso cíclico es la transferencia de un grupo amino del aminoácido dador (L-alanina o L-glutamato) al DOVA que funciona como aceptor.

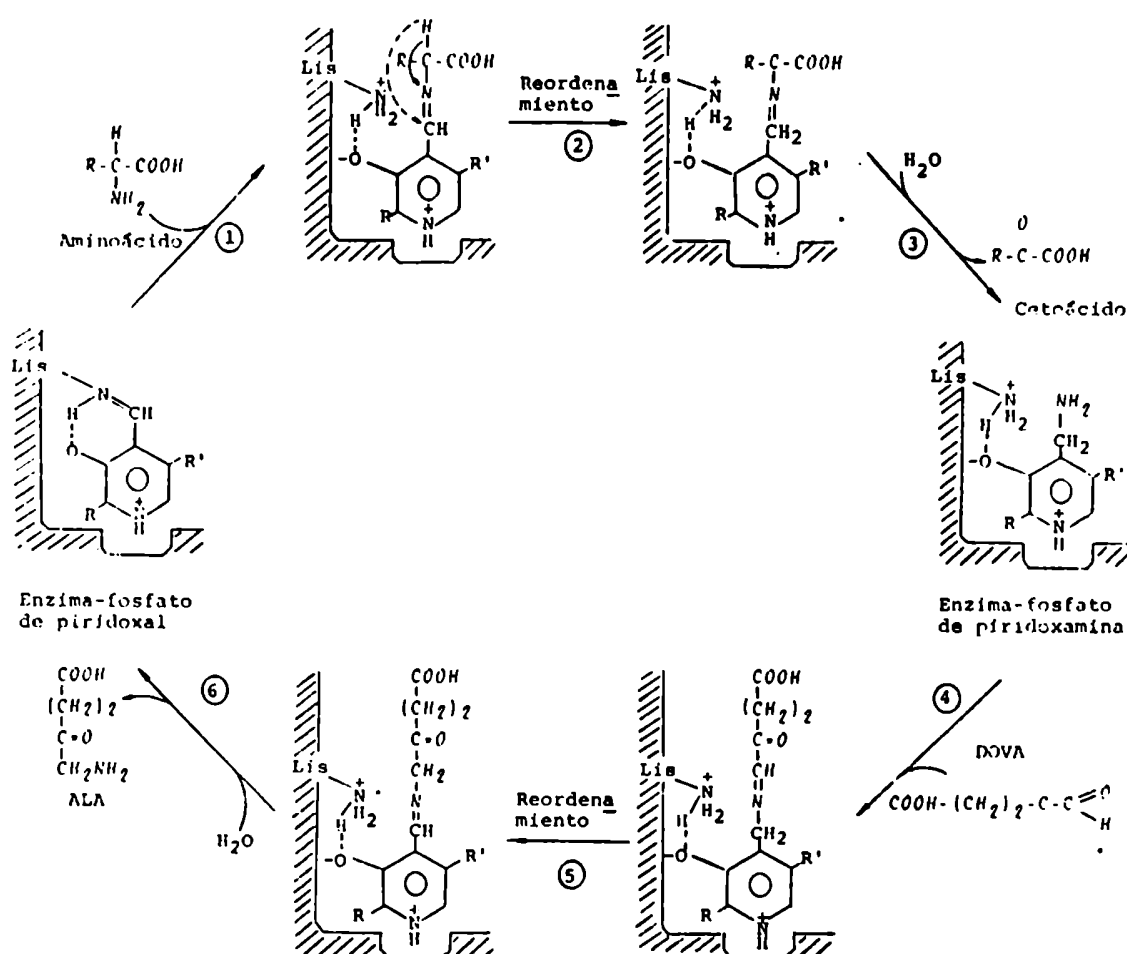


FIGURA 18: Mecanismo ping-pong o de doble desplazamiento propuesto para explicar el comportamiento de la DOVA-T. El mecanismo consta de dos etapas o hemirreacciones representadas de la siguiente forma: Etapa 1: secuencia ①-②-③; Etapa 2: secuencia ④-⑤-⑥. Las modificaciones que ocurren en cada reacción se describen detalladamente en el texto. R': $-\text{CH}_3$; R'': $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$.

II.4. ROL FISIOLÓGICO DE LAS DOS VIAS DE SÍNTESIS DE ALA

En un principio se pensó que la vía del ALA-S existía únicamente en tejidos animales y bacterias, mientras que la de 5 átomos de carbono operaría exclusivamente en plantas y algas. En la actualidad se sabe que ésto no es correcto, ya que cada una de estas rutas ha sido detectada en un gran número de fuentes de diversos orígenes, y además hay trabajos en los que se demuestra que la existencia de una vía no excluye la presencia de la otra. Una mutante del alga *Scenedesmus obliquus* (85), *Euglena gracilis* (124) y hojas de cebada (88) constituyen ejemplos de sistemas en los que coexisten ambas vías de síntesis de ALA. Estas últimas fuentes representan modelos experimentales adecuados para tratar de esclarecer el significado fisiológico que tendría para la célula, la formación de ALA por dos rutas diferentes.

Meller y Gassman (88), trabajando con hojas de cebada etioladas, midieron incorporación de radiactividad en el ALA formado cuando se incubaba en presencia de los sustratos de ambas vías marcadas con ^{14}C , variando las condiciones de iluminación y con o sin el agregado de ácido 4,6-dioxoheptanoico, un potente inhibidor del ALA-Dehidrasa que impide la metabolización del precursor. Observaron que el ALA que se sintetizaba en oscuridad provenía principalmente del succinil CoA y de la glicina, mientras que el formado en presencia de luz derivaba de la vía de 5 átomos de carbono. En base a los resultados obtenidos postularon que el ALA sería sintetizado por una u otra vía dependiendo del producto final que originara. En las plantas, la vía de 5 átomos de carbono, localizada en los plástidos, produciría el ALA necesario para formar todos los tetrapirroles plastídicos, ya sea protoclorofilida, protoclorofila, tetrapirroles de cadena abierta y grupos hémicos de los citocromos presentes en esta organela; mientras que la vía del ALA-S, localizada en mitocondrias o citoplasma, suministraría el ALA requerido para la síntesis de hemos mitocondriales. Los autores no excluyen la posibilidad de que ambos sistemas se encuentren en los plástidos y que existan otros mecanismos regulatorios que hagan funcionar el ALA-S para producir exclusivamente hierro-porfirinas y la vía de 5 átomos de carbono para originar magnesio-porfirinas.

Posteriormente, Weinstein y Beale (124) empleando dos cepas de *Euglena gracilis* (una salvaje y una mutante aplastídica) cultivadas en presencia de $1\text{-}^{14}\text{C}$ -glutamato o $2\text{-}^{14}\text{C}$ -glicina y bajo distintas condiciones de crecimiento (fotoautotrófico y heterotrófico, a la luz y en oscuridad), midieron directamente incorporación de radiactividad en tetrapirroles de distinta localización celular: protohemo, hemo a y clorofila a. Los resultados obtenidos confirmaron la hipótesis de Meller y Gassman (89). Se demostró que la vía de 5 átomos de carbono proporcionaba el ALA necesario para sintetizar el protohemo y la clorofila presentes en el cloroplasto, mientras que el ALA-S suministraba el precursor que daba origen a los hemos no plastídicos. Además, se observó que las dos vías de síntesis de ALA se ubican en distintos compartimientos, mitocondrial y cloroplástico, conteniendo cada uno toda la maquinaria enzimática necesaria para completar la síntesis de los distintos tetrapirroles.

Habiendo quedado establecida, en plantas y algas, la existencia de dos reservorios de ALA intracelular, perfectamente separados, restaría esclarecer si puede o no existir comunicación entre ambos y bajo qué condiciones. El trabajo llevado a cabo por Klein y Senger (85) en *Scenedesmus obliquus*, previo a los descriptos anteriormente, sugiere tal intercambio ya que demuestra que frente a situaciones en las que se requiere rápidamente del precursor, ambas vías se encargan de suministrarlo, independientemente de cual sea el producto final.

CAPITULO III

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL ACIDO 5-AMINOLEVULICO

	Página
III.1. Control sobre la vía del ALA-S	47
A) Control por disponibilidad de sustrato (glicina)	47
B) Inhibición por producto (ALA)	47
C) Represión por producto final (hemo)	47
D) Inhibición por producto final (hemo)	49
E) Inducción por drogas porfirinogénicas	49
F) Activación por trisulfocistina	49
G) Control por constituyentes del medio ambiente o celular	50
III.2. Control sobre la vía de 5 átomos de carbono	51
A) Inhibición por producto final (protoclorofilida)	51
B) Control por iluminación	51

La formación de ALA, en una gran variedad de fuentes, constituye el paso limitante de la biosíntesis de tetrapirroles; por lo tanto, todo control que se efectúe a nivel de síntesis de ALA servirá también para regular la cantidad de porfirinas formadas. A continuación se describen separadamente los distintos mecanismos de control que actúan sobre ambas vías de síntesis de ALA, la del ALA-S y la de 5 átomos de carbono.

III.1. CONTROL SOBRE LA VIA DEL ALA-S

El ALA-S está sujeta a la mayoría de las formas de regulación conocidas (Figura 19), a saber:

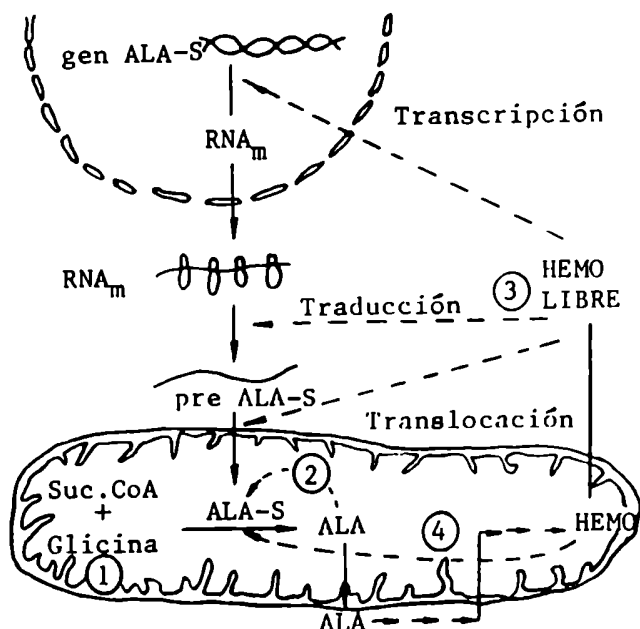
- A) Control por disponibilidad de sustrato (glicina): El ALA-S muestra por la glicina una afinidad notablemente baja, con valores de K_m de 5 a 20 mM. Sabiendo que la concentración intracelular de este aminoácido es significativamente menor, del orden de 1 mM (125), se postula la posibilidad de que la concentración de este sustrato constituya un factor limitante para la actividad del ALA-S. Dicha suposición se confirma cuando en ratas tratadas con ácido p-aminobenzoico o benzoato de sodio (compuestos que secuestran la glicina formando complejos conjugados) se observa reversión de la porfiria experimental inducida por DDC (126). Asimismo, en forma consistente con este resultado, la administración de glicina previene la reversión mencionada anteriormente.
- B) Inhibición por producto (ALA): Tanto para el ALA-S proveniente de *Rhodopseudomonas spheroides* (127) como de mitocondrias de médula ósea de conejo (40), se observa inhibición por ALA. Bottomley y Smithee (40) encontraron una inhibición del 20 % para una concentración de ALA 0,025 mM, mientras que con concentraciones mayores de 0,20 mM se produce inhibición total.
- C) Represión por producto final (hemo): El hemo regula la expresión genética o síntesis *de novo* del ALA-S (37, 38). Como se indica en la Figura 19, el hemo como represor puede actuar a nivel de transcripción (51), traducción (128) y translocación de la enzima desde el citosol hacia la mitocondria (129, 130). Este tipo de control se explica con mayor claridad asumiendo la existencia de un "pool" o reservorio de hemo libre, que tendría propiedades regulatorias y estaría localizado en el citosol. Dicho pool, formado por el hemo recientemente sintetizado y por el hemo liberado de las hemoproteínas, debería ser pequeño y tener además una elevada velocidad de recambio (131).

① CONTROL POR GLICINA. -

② INHIBICION POR ALA. -

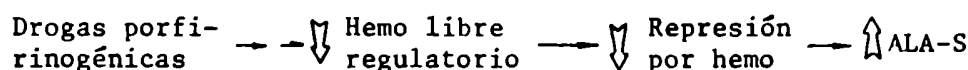
③ REPRESION POR HEMO. -

④ INHIBICION POR HEMO. -



⑤ INDUCCION POR DROGAS PORFIRINOGENICAS. -

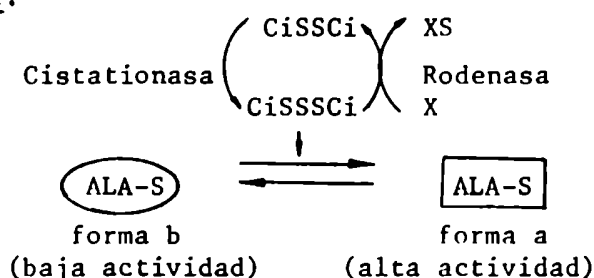
En general:



⑥ ACTIVACION POR TRISULFOCISTINA. -

Esquema postulado para el control del ALA-S en *Rp. spheroides* (135)

X: anión tiofílico
 CiSSCi: cistina
 CiSSSCi: trisulfocistina



⑦ CONTROL POR CONSTITUENTES DEL MEDIO AMBIENTE CELULAR. -

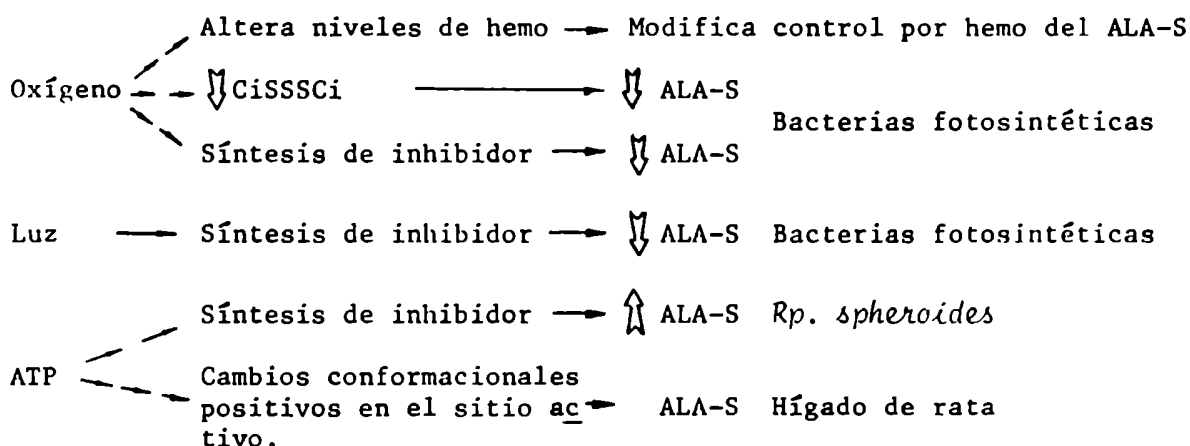


FIGURA 19: Mecanismos de control que actúan sobre el ALA-S.

- D) Inhibición por producto final (hemo): Las concentraciones de hemo necesarias para reprimir la síntesis de ALA-S son del orden de 10^{-7} M, mientras que para actuar como inhibidor de la enzima ya formada se requieren concentraciones de alrededor de 10^{-5} M (132). Estos datos sugieren que la inhibición por hemo es poco probable, ya que la cantidad acumulada en la mitocondria es insuficiente para alcanzar tales valores; sin embargo, dicha inhibición por producto final no puede descartarse totalmente ya que el ALA-S y el hemo se localizan en el mismo compartimiento celular.
- E) Inducción por drogas porfirinogénicas: Reciben el nombre de drogas porfirinogénicas todos aquellos compuestos capaces de inducir porfirias, es decir, de producir alteraciones a distintos niveles en el camino biosintético de las porfirinas. Son ejemplos de tales compuestos el AIA, DDC, griseofulvina, fenobarbital, etc. Todas estas drogas tienen en común la propiedad de disminuir la concentración del pool de hemo regulatorio ubicado en el citosol, ya sea por inhibir la síntesis de hemo y/o por aumentar su utilización o degradación (133, 134). Independientemente del mecanismo por el cual actúen, al disminuir el contenido de hemo citosólico, disminuye el efecto del mismo como represor del ALA-S, produciéndose así una estimulación de la síntesis de esta enzima.
- F) Activación por trisulfocistina: Trabajando con *Rhodopseudomonas spheroides* se demostró la regulación del ALA-S por trisulfocistina (135), un metabolito de bajo peso molecular capaz de interactuar directamente con la enzima, produciendo la conversión de una forma prácticamente inactiva (forma b) en otra de alta actividad (forma a). Considerando que el activador se sintetiza y se degrada *in vivo* por acción de la cistationasa y rodenasa respectivamente (Figura 19), se postula que las actividades relativas de estas dos enzimas serían las encargadas de limitar los niveles intracelulares de trisulfocistina, controlando así la actividad del ALA-S. Posteriormente se demostró que esta forma de regulación también existe en callos de soya (136) y en *Rhodopseudomonas palustris* (137), aunque en esta última fuente el mecanismo de acción propuesto difiere del esquematizado en la Figura 19 correspondiente a *Rhodopseudomonas spheroides*. Como aval

de la hipótesis anterior, Vázquez y col. (138) trabajando con eritrocitos humanos provenientes de pacientes porfíricos, encontraron recientemente una clara correlación entre una actividad disminuída de rodenasa y aumentada de ALA-S.

G) Control por constituyentes del medio ambiente o celular:

- Oxígeno: La tensión de oxígeno y el estado de óxido-reducción de la célula influyen en forma diferencial sobre las distintas etapas del camino biosintético de las porfirinas. Así por ejemplo, la transformación de coproporfirinógeno en protoporfirinógeno depende exclusivamente del oxígeno molecular, mientras que la inserción de hierro en la protoporfirina se ve favorecida por condiciones anaeróbicas. De este modo el oxígeno actuaría indirectamente sobre el ALA-S, por modificar la formación de producto final (hemo) y por ende la regulación que el mismo ejerce sobre esta enzima (139).

Estudios efectuados en bacterias fotosintéticas demostraron que en estos organismos la acción inhibitoria del oxígeno sobre el ALA-S podía deberse tanto a una modificación en el metabolismo de sulfocompuestos que produce una disminución en el contenido celular de trisulfocistina como a la síntesis estimulada de un compuesto que posee propiedades inhibitorias (139).

- Iluminación: Trabajando con bacterias fotosintéticas se observó que una elevada intensidad luminosa, al igual que los aumentos de oxigenación, tenía un efecto inhibitorio sobre el ALA-S, de manera que se sugirió que en esta fuente los efectos de la luz y el oxígeno responderían a un mecanismo de control común, en el que probablemente también estaría involucrado el ATP (139).
- ATP: En cuanto al rol del ATP en la regulación del ALA-S existen evidencias que avalan dos comportamientos diferentes (139). En *Rhodopseudomonas spheroides* el ATP induciría la formación de un inhibidor de naturaleza proteica que actuaría inactivando la enzima mitocondrial, mientras que en hígado de rata, el ATP se uniría a un sitio alostérico del ALA-S citoplasmática provocando cambios conformacionales en los sitios de unión de los sustratos que llevarían a una activación de la enzima.

Resumiendo, en bacterias fotosintéticas los resultados experimentales concuerdan en postular que el efecto inhibitorio producido por altos niveles de oxígeno, iluminación y ATP se debería a la síntesis estimulada de un inhibidor (Figura 19).

III.2. CONTROL SOBRE LA VIA DE 5 ATOMOS DE CARBONO

A diferencia de lo que ocurre con la vía del ALA-S, muy poco se conoce acerca de los mecanismos que controlan la síntesis de ALA por la ruta de 5 átomos de carbono. Esta falta de información se debe fundamentalmente a que aún no se ha establecido la secuencia de reacciones que constituyen esta vía. Sin embargo, en base a todo lo conocido y aceptando que la ruta de 5 átomos de carbono suministra el ALA necesario para la síntesis de tetrapirroles plásticos, podríamos postular en principio dos formas de regulación:

- A) Inhibición por producto final (protoclorofilida): Ha sido fehacientemente demostrado que altas concentraciones de protoclorofilida disminuyen la formación de ALA en plantas superiores (140 y referencias). Se ha establecido que este compuesto, para ejercer su efecto debe estar unido a la proteína holocromo (protoclorofilida reductasa) y NADPH formando un complejo ternario, y además se sabe que el mismo actuaría como inhibidor y no como represor de las enzimas encargadas de sintetizar ALA en estas fuentes (140).
- B) Control por iluminación: Las condiciones de iluminación limitan los niveles de protoclorofilida (ver Figura 8) y por lo tanto, la regulación que este compuesto ejerce sobre las enzimas que sintetizan ALA en los plástidos.

CAPITULO IV

OBJETIVOS Y FUENTE EXPERIMENTAL EMPLEADA

	Página
IV.1. Objetivos	53
IV.2. Fuente experimental empleada: <i>Euglena gracilis</i>	53
IV.2.1. Caracteres morfofisiológicos esenciales	53
IV.2.2. Comparación de las células cultivadas en presencia y ausencia de luz	56

Establecida la existencia de dos vías de síntesis de ALA y el rol que ellas desempeñan, el objetivo general de este trabajo consistió en establecer la participación o no del DOVA como real intermediario en la vía de 5 átomos de carbono. Para ello era preciso disponer de una fuente experimental en la que coexistieran la vía del ALA-S y la de 5 átomos de carbono, y que además presentara actividad de DOVA-T.

Por trabajos anteriores (31, 115, 124) y ensayos preliminares, *Euglena gracilis* resultó ser el modelo experimental adecuado. Una de las propiedades más importantes que posee este microorganismo es su capacidad para crecer tanto en luz como oscuridad, produciendo cultivos enverdecidos o no, en los cuales *Euglena* se comporta como alga (vegetal) o protozoo (animal) respectivamente.

En este capítulo se detallan los objetivos parciales que se desarrollaron durante este trabajo para lograr el objetivo general propuesto, y a continuación se realiza una breve descripción de las características más salientes de la fuente experimental empleada.

IV.1. OBJETIVOS

Empleando células etioladas y/o pigmentadas de *Euglena gracilis*, nuestros objetivos fueron:

- Correlacionar los niveles de actividad de ALA-S y DOVA-T con las condiciones de iluminación durante el crecimiento.
- Establecer las condiciones óptimas para medir actividad de DOVA-T y caracterizar esta enzima fundamentalmente desde el punto de vista cinético.
- Analizar la probable identidad de la DOVA-T y glioxalato Transaminasa (glioxalato-T) para lo cual fue necesario:

Poner a punto un método reproducible y confiable para cuantificar el producto de reacción de la glioxalato-T.

Establecer las condiciones óptimas para medir actividad de esta enzima y llevar a cabo su caracterización.

Correlacionar los niveles de actividad de DOVA-T y glioxalato-T con la presencia o ausencia de luz durante el crecimiento.

Realizar estudios cinéticos, principalmente de competencia, entre el DOVA y glioxalato como sustratos.

IV.2. FUENTE EXPERIMENTAL EMPLEADA: *Euglena gracilis*

IV.2.1. Caracteres morfofisiológicos esenciales

A continuación daremos una breve reseña de las características más salientes de *Euglena gracilis* cultivada en su hábitat natural, es decir en presencia de luz (Figura 20). La bibliografía consultada corresponde a las referencias (141) y (142).

- Es un organismo unicelular de vida libre, que habita en cuerpos lénticos de agua dulce (charcos, lagunas, lagos, estanques).
- Las células son aproximadamente cilíndricas con el extremo

anterior y posterior redondeados, o bien el posterior terminado en un apéndice caudal muy breve y romo. Dimensiones: longitud 31 - 68 μ , ancho 6 - 22 μ .

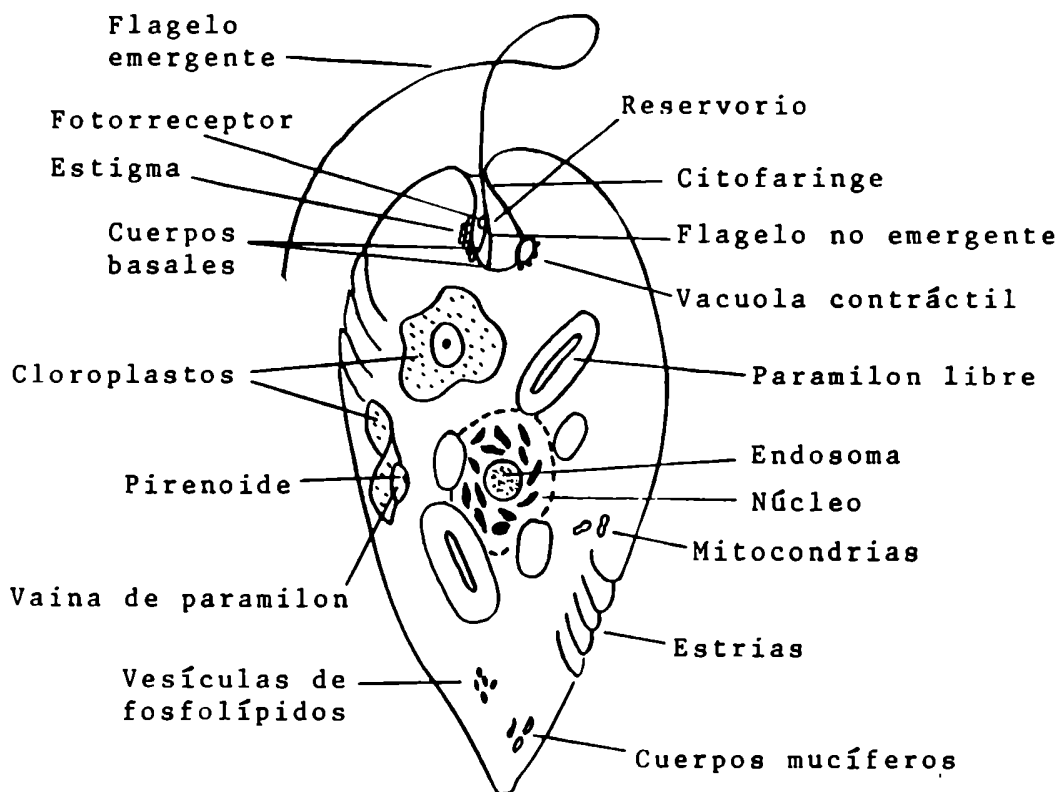


FIGURA 20: Esquema de una célula pigmentada de *Euglena gracilis*.

- Como pigmentos presentan clorofila a y b, carotenos y diversas xantofilas, adquiriendo los cultivos un intenso y hermoso color verde.
- En la superficie celular se distinguen tres cubiertas que desde afuera hacia adentro se disponen en el siguiente orden: en primer lugar aparece una capa de mucus, luego encontramos una delgada película llamada cutícula y por último una membrana denominada plasmalema que responde a la definición de unidad de membrana.
- La cutícula está formada por bandas separadas por estrias frecuentemente dispuestas en espiral.
- Los cuerpos mucíferos ubicados en el espacio subcuticular son los encargados de segregar, a través de canales, el mucus

que forma la cubierta más externa de la célula.

- Poseen una invaginación anterior bien marcada en la cual se distinguen dos zonas, apical y distal, que corresponden al canal o citofaringe y al reservorio respectivamente.
- El reservorio es una cámara colectora dentro de la cual las vesículas contráctiles vacían sus contenidos. Dicho contenido, proviene de las vacuolas secundarias y accesorias que transportan los productos de desecho de la célula.
- *Euglena gracilis* posee dos flagelos de los cuales sólo uno emerge y tiene aproximadamente igual largo que el cuerpo celular.
- Los cuerpos basales de los cuales surgen ambos flagelos se localizan en el reservorio. El flagelo emergente se extiende a lo largo de todo el canal llegando por la apertura anterior hasta el exterior, mientras que el no emergente se halla contenido dentro del reservorio. Los dos flagelos se encuentran adheridos o unidos a la altura del fotorreceptor de tal forma que ambos parecen una estructura flagelar bifurcada.
- El flagelo más largo se emplea en la locomoción (desplazamiento en zig-zag) mientras que el más corto no posee movimientos.
- El estigma es una estructura independiente de los cloroplastos, de color carmín claro y por lo general, de posición lateral al reservorio.
- El fotorreceptor también llamado cuerpo paraflagelar, es una estructura cristalina que se relaciona con la porción no emergente de uno de los flagelos.
- Desde el punto de vista funcional, el estigma actúa como una pantalla que absorbe y selecciona los rayos luminosos que llegan a la célula, protegiendo al cuerpo paraflagelar que es el verdadero receptor de luz.
- El paramilon extraplastidial constituye el carbohidrato de reserva de la célula. Los gránulos de paramilon se hallan ampliamente distribuidos en el citoplasma.

- Contienen de 7 a 12 cromatóforos o cloroplastos laminares verde-amarillentos, parietales y de forma circular o poligonal cuando están muy próximos entre sí. Cada una de estas organelas posee además un pirenoide central envainado por paramilon y está totalmente rodeada por tres membranas de las cuales las dos internas corresponden a la envoltura propia del cloroplasto y la externa representa el plasmalema.
- El núcleo, bien visible y de forma ovoide presenta en general un nucleolo o endosoma muy neto.
- La división celular ocurre por el proceso de mitosis pero con características muy particulares. En la metafase los cromosomas se ubican paralelos al eje de división, el nucleolo persiste y se divide, estando ausentes el huso y centrosoma.
- El resto de organelas celulares, como ser mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, lisosomas, peroxisomas y microtúbulos, presentan todas las características propias de la célula eucariota.

IV.2.2. Comparación de las células cultivadas en presencia y ausencia de luz

Como mencionáramos anteriormente, *Euglena gracilis* tiene la propiedad de poseer características, tanto del reino vegetal como animal, dependiendo de las condiciones de iluminación durante su crecimiento, que la convierten en un interesantísimo objeto de investigación al mismo tiempo que todavía constituye un problema taxonómico universal para los biólogos. Sin embargo, cabe aclarar que lo más correcto sería incluirla en el reino protista creado por Haeckel en 1866.

En la Figura 21 se esquematizan dos células de *Euglena gracilis* cultivadas en presencia y ausencia de luz respectivamente, con el objeto de poner de manifiesto las diferencias morfológicas que existen entre ambas. Fundamentalmente, la célula etiolada es de menor tamaño, carece de estigma, de fotoreceptor y cloroplastos, pero está dotada de pequeños proplástidos incoloros que se transforman en cloroplastos maduros, bien desarrollados cuando las células se transfieren a la luz.

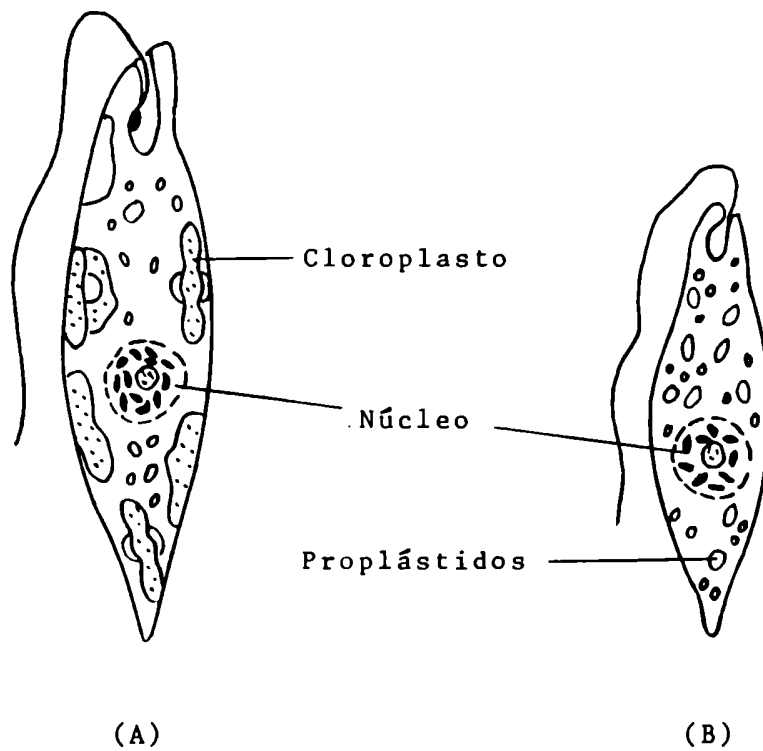


FIGURA 21: Comparación entre una célula pigmentada (A) y etiolada (B) de *Euglena gracilis*.

Esta inducción cloroplástica que ocurre en forma casi simultánea con la síntesis de clorofila y el inicio del proceso de fotosíntesis implica además una estimulación compleja y coordinada a nivel de distintos metabolismos, como ser síntesis de proteínas, carotenos, ácidos nucleicos, etc.

MATERIALES Y METODOS

CAPITULO V

MATERIALES Y METODOS

	Página
V.1. Materiales	59
V.1.1. Fuente experimental	59
V.1.2. Reactivos	59
V.1.3. Equipos	59
V.2. Métodos	60
V.2.1. <i>Euglena gracilis</i> : Cultivo y mantenimien to de las células.	60
V.2.2. Preparación del extracto enzimático	61
V.2.3. Obtención del DOVA	61
V.2.4. Determinación de las actividades enzimá ticas	62
A) Sistemas y condiciones de incubación	62
- ALA-S	62
- DOVA-T	62
- Glioxalato-T	62
B) Cuantificación del ALA	63
C) Cuantificación del DOVA	64
D) Cuantificación de la glicina	64
E) Cuantificación de proteínas	64
F) Expresión de los resultados	64
V.2.5. Determinación del contenido de clorofila	64
V.2.6. Determinación de pesos moleculares	65

V.1. MATERIALES

V.1.1. Fuente experimental

Se emplearon células etioladas y pigmentadas de *Euglena gracilis* Klebs strain, Z.Pringsheim. La muestra inicial de esta cepa fue cedida gentilmente al Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias en el año 1973 por los Dres. Belocopitow y Marechal del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Luis F. Leloir".

V.1.2. Reactivos

El DOVA se sintetizó a partir del ácido 3,5-dibromolevulínico (Porphyrins Products) siguiendo la metodología detallada en Métodos.

La succinil CoA sintetasa, empleada para medir actividad de ALA-S, se obtuvo de *Rhodopseudomonas palustris*, de la manera descrita por Viale (143).

Los demás reactivos y solventes utilizados fueron todos de grado analítico P.A. provenientes de distintas fuentes comerciales (en su mayoría de Merck o Sigma Chem. Co.).

V.1.3. Equipos

Para llevar a cabo este trabajo se empleó el siguiente instrumental:

- Estufa de cultivo Ghilon Modelo DBO 120
- Autoclave Ghilon
- Flujo laminar Labconco
- Sonicador Soniprep 150 MSE
- Centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B
- Centrífuga Rolco modelo CM-36
- Baño de incubación Precisión Scientific C.O.
- Balanzas Mettler PC 2000 y AK 160
- Espectrofotómetro Beckmann Model 35

- Espectrofotómetro SHIMADZU UV 210 A
- pHmetro Altronix
- Colector de fracciones Frac 100 de Pharmacia Fine Chemicals
- Bomba peristáltica Perista Pump SJ-1215

V.2. METODOS

V.2.1. Euglena gracilis: Cultivo y mantenimiento de las células

El medio de cultivo utilizado contiene por cada 100 ml: 0,5 g de peptona (Difco); 0,2 g de extracto de levadura (Difco); 1 ml de etanol; 5 µg de vitamina B₁₂ y agua destilada hasta completar el volumen. Tanto el medio de cultivo como el material empleado en los repiques se esterilizó con vapor a 1,5 atmósferas durante 20 minutos en autoclave.

Para conservar la cepa se emplearon tubos que contenían medio de igual composición que el líquido, al que se le adicionó agar (2 g/100 ml) y se hizo solidificar en forma inclinada. Las células repicadas a estos tubos se hicieron crecer a la luz hasta alcanzar el grado de desarrollo adecuado, conservándose luego a 4 °C hasta el momento de ser utilizadas.

El crecimiento a la luz consistió en exponer los cultivos a la luz solar durante el día y a oscuridad durante la noche, es decir, se emplearon condiciones naturales de iluminación.

Para obtener la masa de células necesarias para llevar a cabo cada experiencia, se repicaron inóculos del medio sólido a tubos que contenían 10 ml de medio líquido y se hicieron crecer a 28 °C durante 5-6 días en oscuridad o luz, según se desearan obtener células etioladas o pigmentadas respectivamente. Luego, el contenido de cada tubo se transfirió a frascos Roux de 1 litro de capacidad, conteniendo 200 ml de medio cada uno, y se continuó el crecimiento durante 4 días (hasta fase exponencial tardía). Finalmente, las células se cosecharon por centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos en centrífuga refrigerada. Todas las operaciones de aquí en adelante se llevaron a cabo a 4 °C.

Cabe aclarar que todas las experiencias de este trabajo se realizaron partiendo de extractos frescos de *Euglena gracilis*, ya que se utilizaron células recién cosechadas.

V.2.2. Preparación del extracto enzimático

Las células cosechadas fueron resuspendidas en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 en relación 1:4 (g de células/ml de buffer). Esta suspensión se sonicó a una amplitud de 10 μ durante 30 segundos, obteniéndose así la fracción enzimática denominada homogenato (H). El sobrenadante que resultó de centrifugar esta fracción a 24.000 x g durante 20 minutos fue identificado como sobrenadante (S) y se utilizó como extracto enzimático, a no ser que se especifique lo contrario.

V.2.3. Obtención del DOVA

El DOVA fue sintetizado a partir del ácido 3,5-dibromolevulínico por el método de Gnuchev y col. (144) de la manera descrita por Varticovski y col. (118). A 100 ml de agua destilada se le agregaron 1,37 g de ácido 3,5-dibromolevulínico y se hizo hervir durante 3 horas. Con el transcurso del tiempo, la solución fue tornándose progresivamente amarilla y se fue añadiendo agua periódicamente a fin de mantener el volumen cercano a los 100 ml. Luego de enfriar la solución se la extrajo 3 veces con alícuotas de alrededor de 30 ml de acetato de etilo. La mayor parte del color amarillo fue transferido al acetato de etilo que se descartó. La fase acuosa se lavó con 3 alícuotas de 30 ml de éter etílico descartándose nuevamente la fase orgánica. El éter residual se evaporó de la fase acuosa calentando a 40 °C aproximadamente y burbujeando nitrógeno en la solución.

Finalmente la solución de DOVA se llevó a pH 4,2 con hidróxido de sodio, se dividió en alícuotas de alrededor de 10 ml y se la conservó a -20 °C hasta el momento de ser utilizada. El procedimiento arrojó un rendimiento cercano al 40 %.

V.2.4. Determinación de las actividades enzimáticas

A) Sistemas y condiciones de incubación:

- ALA-S: El sistema standard de incubación contenía 25 μmoles de buffer Tris-HCl pH 7,4; 5,5 μmoles de cloruro de magnesio; 4,5 μmoles de ATP; 45 μmoles de succinato de sodio; 90 μmoles de glicina; 0,25 μmoles de SHCoa; 0,25 μmoles de fosfato de piridoxal; 2 μmoles de EDTA; 50 μl de una suspensión de succinil CoA sintetasa de *Rhodospseudomonas palustris* (1 ml de esta suspensión fue capaz de catalizar la formación de 58 μmoles de succinil hidroxamato en 1 hora a 37 °C); 0,6 ml de extracto enzimático (9 - 10 mg de proteína) y buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 hasta completar un volumen de 1 ml. Se incubó a 37 °C, con agitación constante, en oscuridad y en aerobiosis durante 30 minutos. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de TCA al 10 % (p/v), la proteína precipitada se separó por centrifugación y en el sobrenadante se cuantificó el ALA formado.
- DOVA-T: El sistema standard de incubación contenía 100 μmoles de buffer fosfato de sodio pH 7,4; 200 μmoles de L-glutamato de sodio; 4,0 - 5,5 μmoles de DOVA; 0,4 - 0,6 ml de extracto enzimático (6 - 10 mg de proteína) y buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 hasta completar un volumen de 1 ml. Se incubó a 37 °C, con agitación constante, en aerobiosis y a la luz durante 30 minutos. La reacción se detuvo adicionando 1 ml de TCA al 10 %, la proteína precipitada se separó por centrifugación y en el sobrenadante se cuantificó el ALA formado y el DOVA remanente.
- Glioxalato-T: El sistema standard de incubación contenía 100 moles de buffer fosfato de sodio pH 7,4; 200 μmoles de L-glutamato de sodio; 24 μmoles de glioxalato; 0,2 - 0,4 ml de extracto enzimático (3-6 mg de proteína) y buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 hasta completar un volumen de 1,2 ml. Se incubó a 37 °C, con agitación constante, en aerobiosis y a la luz durante 30 minutos. La reacción se detuvo por el agregado de 1,2 ml de TCA al 10 %, la proteína precipitada se separó por centrifugación y en el sobrenadante se cuantificó la glicina formada.

En todos los casos se realizaron los blancos y controles correspondientes.

B) Cuantificación del ALA: El ALA se condensó con acetilacetona (2-4-pentanodiona) a pH 4,6 formando un pirrol, con una posición α libre que reacciona luego con el reactivo de Ehrlich formando un compuesto coloreado que tiene un máximo de absorción a 553 nm (145). El sistema utilizado para la formación del pirrol corresponde al reportado por Moore y Labbe (146). En un tubo de ensayos se colocó 1 ml del sobrenadante desproteinizado llevado a pH 4,6 con 0,1 ml de hidróxido de sodio 3 N; 1 ml de buffer acetato de sodio 1 M pH 4,6 y 0,05 ml de acetilacetona. Se calentó 10 minutos a ebullición en un baño de agua a 100 °C, se dejó enfriar y se le agregó igual volumen de reactivo de Ehrlich modificado (145). El complejo coloreado se cuantificó espectrofotométricamente registrando la absorbancia a 553 nm entre los 10 y 30 minutos del agregado del reactivo. El coeficiente de extinción molar utilizado en los cálculos fue $7,2 \times 10^4 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Al cuantificar el ALA sintetizado por la DOVA-T fue necesario tener en cuenta la interferencia producida por el DOVA residual (Figura 22).

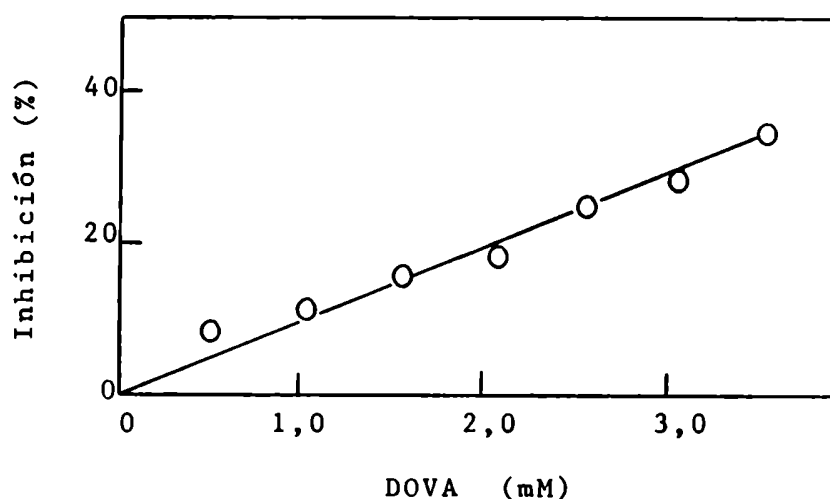


FIGURA 22: Interferencia producida por el DOVA en la cuantificación del ALA

- C) Cuantificación del DOVA: Se llevó a cabo una reacción cuantitativa del DOVA con o-fenilendiamina, por el método descrito por Milligan y Baldwin (147) para metilglioxal. Este ensayo se empleó para calcular la concentración de la solución original del DOVA (que fue sintetizado según detallamos en V.2.3.) y la cantidad de DOVA remanente en el sistema de incubación. El sistema empleado para la medición contenía: 3 ml de ácido perclórico 1 N: 45 μ l de o-fenilendiamina 0,3 % en ácido sulfúrico 1 N y 0,15 ml de la solución de DOVA cuya concentración se desea determinar (cuando fue necesario, esta última se diluyó en ácido perclórico 1 N). Se dejó 1 hora a temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 336 nm. El coeficiente de extinción molar utilizado en los cálculos fue $9 \times 10^3 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (96).
- D) Cuantificación de la glicina: Se efectuó mediante una reacción cuantitativa de la glicina con el o-ftaldialdehído (OFDA), por el método descrito por Klein y Linser (148) al que se le realizaron, para evitar interferencias, las modificaciones detalladas en el Capítulo VIII.
- E) Cuantificación de proteínas: Se realizó según la técnica original descrita por Lowry y col. (149).
- F) Expresión de los resultados: Se define una unidad enzimática (UE) como la cantidad de enzima capaz de catalizar la formación de 1 nmol de producto en 30 minutos, bajo las condiciones standard de incubación.
La actividad específica se expresa como el número de nmoles de producto formados en 30 minutos por mg de proteína. En el caso de estar trabajando en condiciones standard corresponde al número de unidades enzimáticas por mg de proteína (UE/mg).

V.2.5. Determinación del contenido de clorofila

El contenido de clorofila se determinó a partir de las células cosechadas, extrayendo con metanol en relación 1:9 (g células/ml metanol) hasta fluorescencia negativa. Se registró absorbancia de la fase orgánica a 650 nm y 665 nm, empleándose para los cálculos los coeficientes de absorción reportados

por Mackinney (150) según:

$$\text{Clorofila a (mg/ml)} = 16,5 \times A^{665} - 8,3 \times A^{650}$$

$$\text{Clorofila b (mg/ml)} = 33,8 \times A^{650} - 12,5 \times A^{665}$$

V.2.6. Determinación de pesos moleculares

La estimación de pesos moleculares se efectuó mediante la cromatografía por tamices moleculares.

En nuestras experiencias utilizamos una columna de Sephadex G-150 (Pharmacia) de 48 cm de longitud y 1,90 cm de diámetro interno, que se eluyó con buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,4 con un flujo de 22,2 ml/h, recogiendo fracciones de 1,85 ml. La calibración de la misma se realizó empleando proteínas de peso molecular conocido, graficándose luego el volumen de elución relativo (V_e/V_o) en función del logaritmo del peso molecular (PM) (Figura 23).

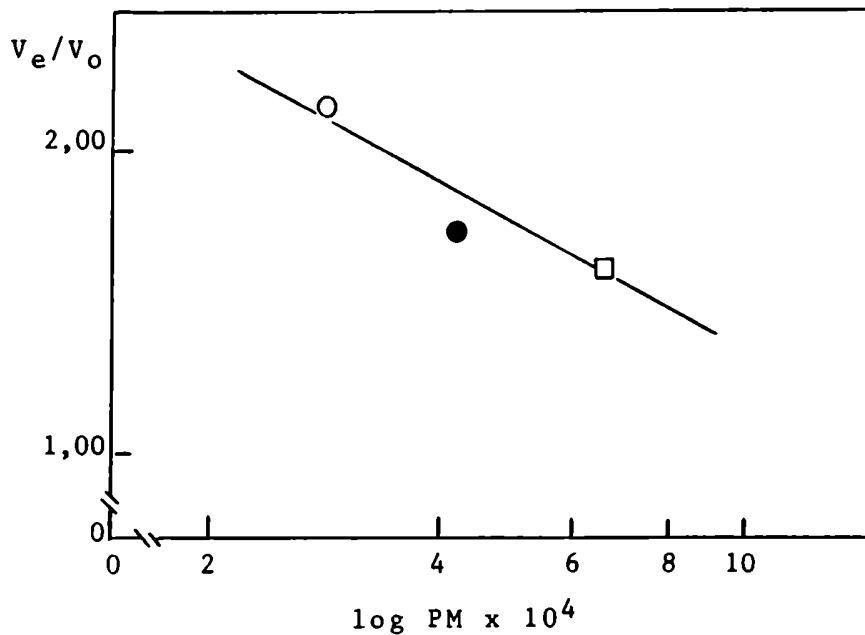


FIGURA 23: Curva de calibración para la determinación de pesos moleculares (Sephadex G-150). Las dimensiones de la columna y condiciones de elución son las descritas en el texto. Para la calibración se emplearon las siguientes proteínas: (O) anhidrasa carbónica: PM $2,9 \times 10^4$; (●) ovoalbúmina: PM $4,3 \times 10^4$; (□) albúmina sérica bovina: PM $6,7 \times 10^4$ y blue dextrano para determinar el $V_o = 47,88$ ml.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO VI

EFFECTO DE LA ILUMINACION SOBRE EL CRECIMIENTO, CONTENIDO DE CLOROFILA Y SINTESIS DE ALA EN *Euglena gracilis*

	Página
VI.1. Efecto de la iluminación sobre el crecimiento celular	67
VI.2. Formación de clorofila al variar las condiciones de iluminación	68
VI.3. Síntesis de ALA en células etioladas y pigmentadas	72
VI.4. Conclusiones parciales	76

Teniendo en cuenta que la vía de 5 átomos de carbono suministra el ALA necesario para la formación de hemos y pigmentos plastídicos y que nuestro objetivo era evaluar la participación del DOVA como intermediario en esta vía, en primer lugar se debía determinar si existía o no variación en los niveles de actividad de la transaminasa capaz de convertir el DOVA en ALA al inducir el desarrollo de los plástidos.

Para ello, empleando células de *Euglena gracilis* cultivadas heterotróficamente tanto a la luz como en oscuridad, analizamos el efecto de la iluminación sobre el crecimiento celular, formación de clorofila y síntesis de ALA *in vitro* catalizada por el ALA-S y DOVA-T.

Como veremos, todas las determinaciones se llevaron a cabo entre el tercer y séptimo día de crecimiento. No se estudiaron tiempos más cortos debido a que la masa celular no era suficiente para poder realizar todas las mediciones necesarias. Tampoco se emplearon células crecidas durante más de 7 días para evitar el agotamiento de algún nutriente esencial o la acumulación de algún producto metabólico tóxico.

VI.1. EFECTO DE LA ILUMINACION SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR

Observando a simple vista una suspensión de células en crecimiento vemos que se vuelve cada vez más turbia. La turbidez está íntimamente relacionada con el aumento de masa celular, y su medición representa una forma rápida, simple y no destructiva de evaluar el crecimiento celular.

Un parámetro adecuado para cuantificar la turbidez de los cultivos de *Euglena gracilis* fue la lectura de absorbancia a 680 nm. En la Figura 24 se muestran los resultados obtenidos al seguir el crecimiento celular entre el tercer y séptimo día variando las condiciones de iluminación.

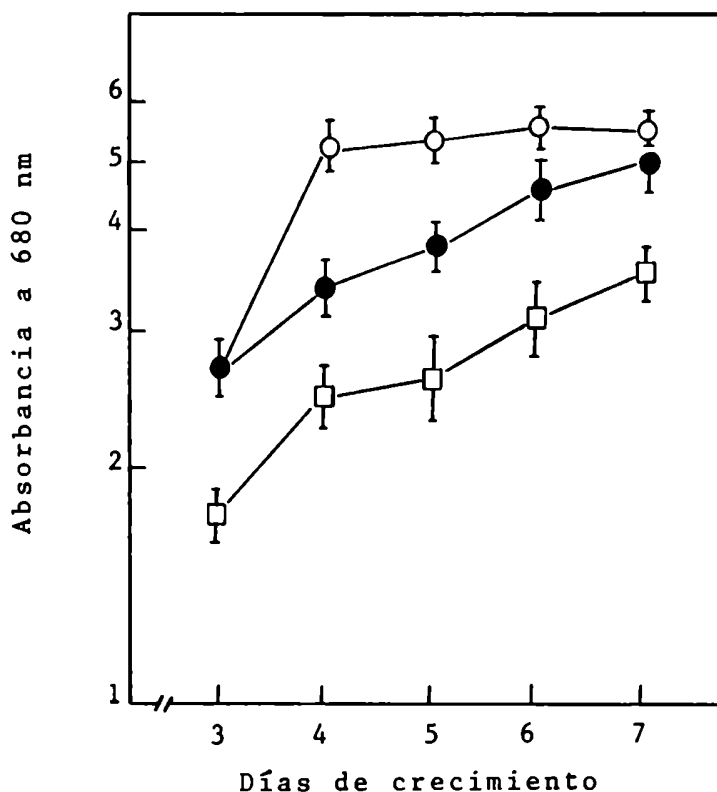


FIGURA 24: Efecto de las condiciones de iluminación sobre el crecimiento celular. Se mide la absorbancia a 680 nm como una medida del crecimiento celular bajo las siguientes condiciones de iluminación: (O) oscuridad, (●) 3 días en oscuridad y luego a la luz; (□) luz.

Para las células mantenidas en oscuridad, entre el tercer y cuarto día se observó la última parte del crecimiento

exponencial, denominada fase exponencial tardía, y luego el cultivo dejó de crecer entrando en la fase estacionaria. Los cultivos expuestos continuamente a la luz en cambio, no cesan su crecimiento y entre el tercer y séptimo día la densidad celular aumentó progresivamente. Un comportamiento análogo se evidenció para las células que luego de ser cultivadas tres días en oscuridad fueron transferidas a la luz.

Pudimos ver además que a igualdad de inóculo, cuando las células se cultivaban en condiciones fotoheterotróficas la densidad celular alcanzada era siempre menor que la correspondiente a los cultivos mantenidos el mismo tiempo en oscuridad; estos resultados coinciden con los reportados para la misma fuente por Corriveau y Beale (151). En el caso del enverdecimiento de *Euglena gracilis* crecida en oscuridad, luego de cuatro días de exposición a la luz los cultivos presentaban la misma densidad que los que se mantuvieron continuamente en oscuridad, aunque a lo largo de este período de iluminación el crecimiento en estas condiciones siempre fue menor que el obtenido en ausencia de luz.

Evidentemente en el medio de cultivo empleado el crecimiento heterotrófico en oscuridad se ve ampliamente favorecido con respecto al fotoheterotrófico.

VI.2. FORMACION DE CLOROFILA AL VARIAR LAS CONDICIONES DE ILUMINACION

El efecto más importante de la luz sobre las células de *Euglena gracilis* crecidas en oscuridad es la inducción de la síntesis de clorofila y el desarrollo de los cloroplastos, con lo cual los cultivos inicialmente amarillos van enverdecido progresivamente.

Conjuntamente con las determinaciones de densidad celular en las condiciones ya descritas (Figura 24) se midió el contenido de clorofila en función de los días de crecimiento (Figura 25).

Cuando las células de *E. gracilis* crecieron continuamente en oscuridad no se observó, como era de esperar, formación de clorofila. Las determinaciones en este caso se

consideraron controles para evaluar la posible interferencia de algún tipo de compuesto presente en los cultivos en estas condiciones.

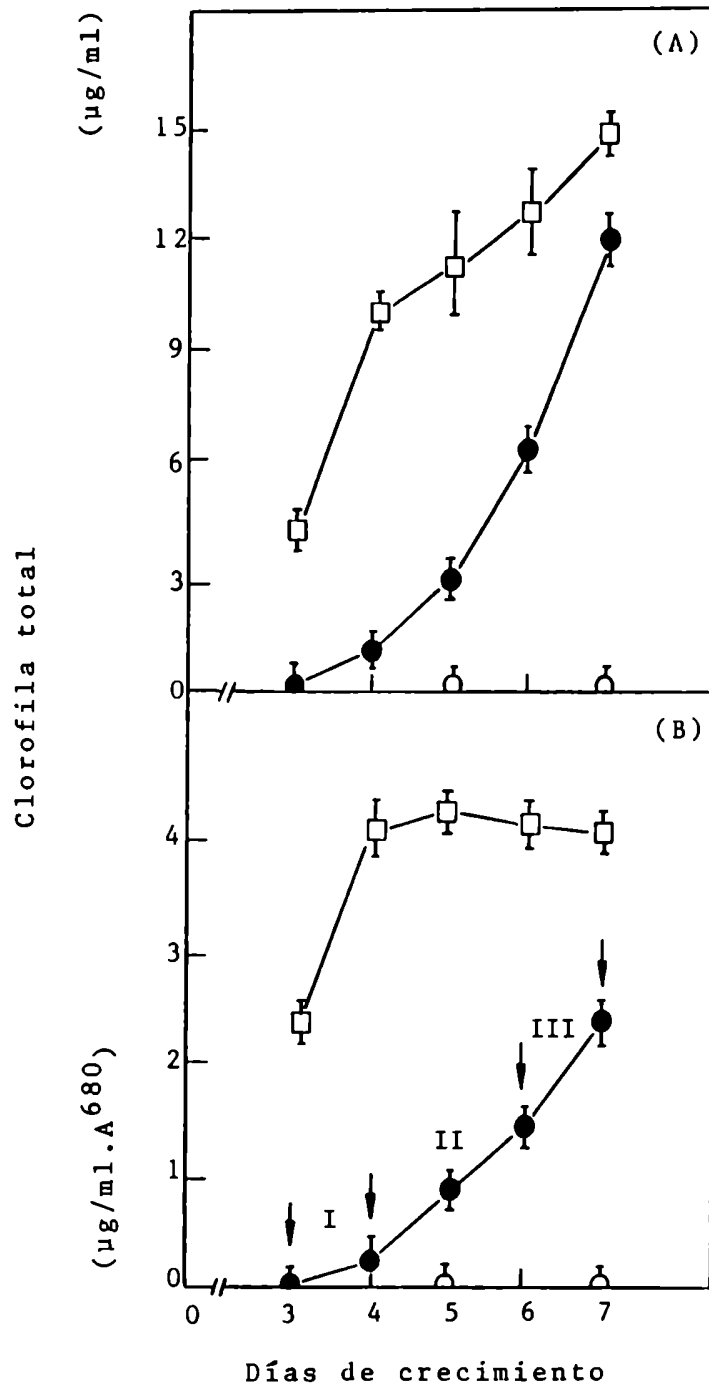


FIGURA 25: Formación de clorofila en función de los días de crecimiento. El contenido de clorofila se expresa por volumen de cultivo (A) y por undad de masa celular (B). Las distintas curvas corresponden a células crecidas en oscuridad (O), 3 días en oscuridad y luego a la luz (●), y continúamente a la luz (□). El significado de los números romanos se discute en el texto.

Para las células crecidas en oscuridad y transferidas a la luz, se obtuvo una continua acumulación de clorofila independientemente de que los resultados se expresen por unidad de volumen de cultivo (Figura 25 A) o por unidad de masa celular (Figura 25 B). En esta última curva pueden distinguirse, tal como fue reportado por Rosenberg y Pecker (152), tres etapas en la producción de clorofila. Durante la fase I (24 horas) la formación de clorofila transcurre a una velocidad muy lenta. En el estadio II, de aproximadamente 48 horas, la síntesis del pigmento se ve estimulada mostrando una relación lineal con el tiempo, y finalmente, en la etapa III el incremento continúa progresivamente y a mayor velocidad hasta la obtención de un verdeo máximo.

Cuando el microorganismo se desarrolló directamente a la luz, el contenido de clorofila presente en los cultivos aumentó con el tiempo (Figura 25 A); sin embargo, al expresar estos valores en función de la masa celular (Figura 25 B) pudimos ver que la formación de clorofila sólo se incrementaba entre el tercer y cuarto día alcanzándose luego un estado estacionario, como consecuencia de que la cantidad de pigmento y densidad celular aumentaban ambas en igual proporción.

En el caso en que las células etioladas fueron expuestas a la luz, el contenido de clorofila al cuarto día de iluminación resultó ser un 60 % del correspondiente a las células crecidas desde un comienzo en condiciones fotoheterotróficas. Según la bibliografía, estos resultados son similares a los publicados por Brody y col. (53) para *Euglena gracilis* Z, mientras que Stern y col. (54) encontraron para las células de *E. gracilis* var. *bacillaris* sometidas a enverdecimiento un contenido de clorofila coincidente al obtenido para el microorganismo cultivado siempre a la luz.

Finalmente, aprovechando que el método de cuantificación empleado nos permite distinguir entre clorofila a y b, analizamos en nuestros cultivos la relación existente entre ambas formas del pigmento. Como se observa en la Tabla 4, la clorofila a representa un 90 - 95 % de la cantidad total de clorofila formada. Los resultados obtenidos eran predecibles, puesto que la clorofila a en esta fuente representa el pigmento fotosintético por excelencia (si no está presente la fotosíntesis no tiene lugar) mientras que la clorofila b aún en

células completamente desarrolladas constituye sólo una pequeña proporción de la clorofila total.

TABLA 4: Contenido de clorofila a y b en *Euglena gracilis* Z

DIAS DE CRECIMIENTO		CLOROFILA TOTAL ($\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{A}^{680}$)	CLOROFILA a ($\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{A}^{680}$)	CLOROFILA b ($\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{A}^{680}$)
Oscuridad	Luz			
3	-	no contiene	no contiene	no contiene
3	1	0,27	0,25	0,02
3	2	0,82	0,78	0,05
3	3	1,42	1,38	0,05
3	4	2,40	2,26	0,14
	3	2,40	2,10	0,30
	4	4,09	3,72	0,37
	5	4,31	3,74	0,57
	6	4,17	3,80	0,37
	7	4,09	3,84	0,23

Las cantidades de clorofila a y b fueron calculadas empleando los coeficientes de absorción reportados por Mackinney (150), según se detalla en Métodos.

Los espectros de la Figura 26 confirmaron estos resultados y demostraron para las células crecidas en oscuridad la presencia de carotenoides y la ausencia de posibles interferencias o pigmentos de naturaleza clorofílica. En concordancia con otros investigadores (15) observamos que cuando las células etioladas se someten a enverdecimiento, los niveles de carotenoides y clorofila a aumentaban en forma paralela.

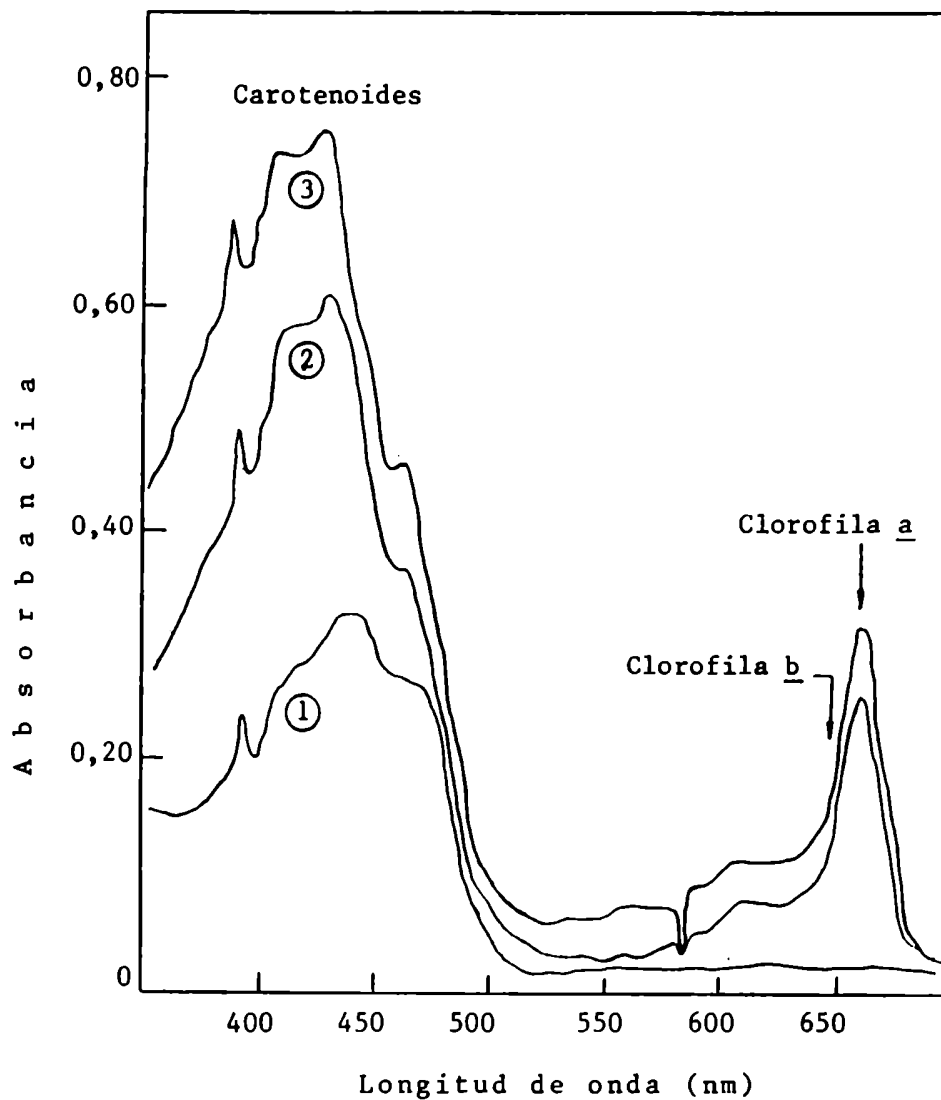


FIGURA 26: Espectros de absorción correspondientes a los pigmentos extraídos de *Euglena gracilis*. Los espectros corresponden a extractos metanólicos obtenidos a partir de células enteras cultivadas bajo distintas condiciones de iluminación: (1) luz, (2) oscuridad y posterior transferencia a la luz y (3) oscuridad.

VI.3. SINTESIS DE ALA EN CELULAS ETIOLADAS Y PIGMENTADAS

Paralelamente con el análisis de las diferencias existentes en los valores de densidad celular y contenido de clorofila, observamos qué ocurría con los niveles de actividad del ALA-S y DOVA-T *in vitro* al variar las condiciones de iluminación durante el crecimiento de las células (Figura 27).

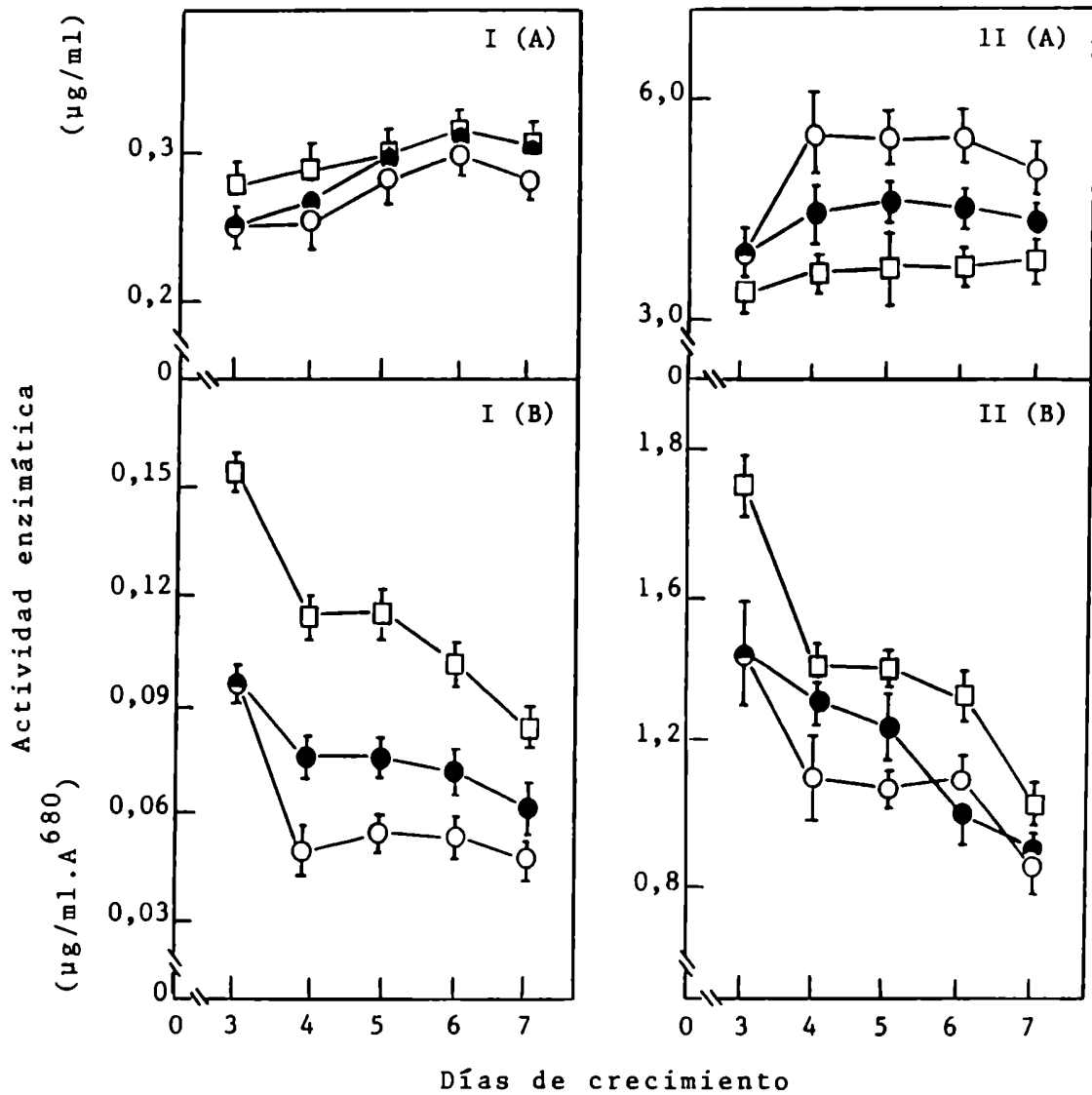


FIGURA 27: Actividad del ALA-S (I) y DOVA-T (II) en función de los días de crecimiento. La actividad se expresa por volumen de cultivo (A) y por unidad de masa celular (B). Las distintas curvas corresponden a células crecidas en oscuridad (O), 3 días en oscuridad y luego a la luz (●) y continuamente a la luz (□). La medición de actividad se realizó de la manera descrita en Métodos, empleando el sobrenadante S como extracto enzimático.

Para el ALA-S pudimos ver que si las unidades enzimáticas se expresaban por volumen de cultivo (Figura 27 I(A)) las curvas mostraban un máximo aunque no muy marcado al sexto día, sin observarse variaciones apreciables entre las distintas condiciones de iluminación. Pero si los valores de actividad se

expresaban en función de la densidad celular (Figura 27 I(B)) entonces sí aparecían diferencias significativas entre los niveles de ALA-S, obteniéndose siempre valores más altos de actividad para las células crecidas continuamente a la luz. Comparando las células etioladas sometidas a enverdecimiento con las mantenidas en oscuridad, se observó por efecto de la luz un incremento de actividad de alrededor del 50 a 60 %. El perfil descendente que muestran las curvas de la Figura 26 B se debe a que el aumento de la masa celular en función de los días de crecimiento fue mayor que el incremento de unidades enzimáticas.

En el caso de evaluar la síntesis de ALA catalizada *in vitro* por la DOVA-T (Figura 27 II), el comportamiento observado fue similar al ya descrito para el ALA-S.

De la Figura 27 se deduce que: 1) al inducir el desarrollo de los plástidos en los cultivos de *Euglena gracilis* se incrementan las actividades de ambas enzimas capaces de sintetizar ALA; 2) independientemente de las condiciones de iluminación durante el crecimiento, la actividad de DOVA-T fue siempre mayor (de 10 a 15 veces) a la del ALA-S; y 3) para la medición de actividades óptimas de ALA-S y DOVA-T *in vitro* las células debencosecharse entre el tercer y cuarto día.

Nuestros resultados difieren considerablemente de los reportados anteriormente para ambas enzimas en esta misma fuente (31, 115). Beale y col. (31) no sólo obtuvieron para el ALA-S valores más altos de actividad, sino que además observaron que las células etioladas poseían una actividad 3 veces mayor a la de las células pigmentadas. Para la DOVA-T en cambio, no se detectaron diferencias en los niveles de actividad al variar las condiciones de iluminación (115). En lo que respecta a la relación de actividades DOVA-T/ALA-S había sido de 1,5 y 5,2 según las células se cultiven en oscuridad o a la luz respectivamente. Cabe aclarar que si bien en estos trabajos (31,115) se empleó la misma línea celular que utilizamos en nuestro laboratorio, el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento fueron diferentes; no obstante, nosotros no pudimos obtener los mismos resultados ni aún reproduciendo todas las condiciones experimentales descritas por el grupo de Beale. Volviendo a nuestros datos, la correlación entre los niveles de actividad de ALA-S y DOVA-T no reflejaría el rol

fisiológico adjudicado a la vía del ALA-S y a la vía de 5 átomos de carbono en *Euglena gracilis* (124), pero sí estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por Klein y Senger (85) en *Scenedesmus obliquus*. En este último trabajo se observa que ante una gran demanda de síntesis de ALA, como podría ser en nuestro caso la provocada por el enverdecimiento, ambas rutas biosintéticas incrementan su actividad.

Por último, en la Figura 28 se muestra como varían los niveles de proteínas solubles con las distintas condiciones de crecimiento. Las células crecidas a la luz presentaron un contenido proteico mayor al de las células etioladas, además, en todos los casos la cantidad de proteína disminuye con los días de crecimiento.

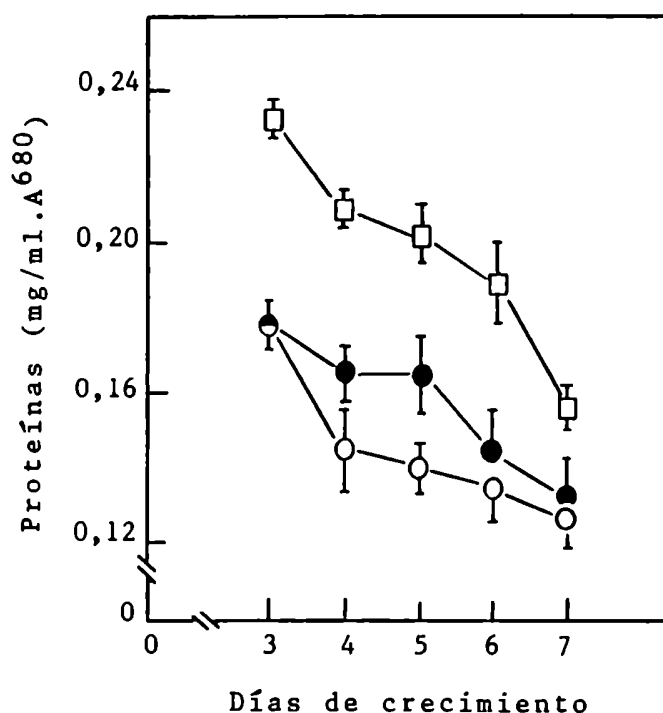


FIGURA 28: Contenido de proteínas solubles en función de los días de crecimiento. La cantidad de proteínas se expresa por unidad de masa celular y las distintas curvas corresponden a células crecidas en oscuridad (O), 3 días en oscuridad y luego a la luz (●) y continuamente a la luz (□).

Este tipo de gráfico es de gran importancia al relacionar actividades enzimáticas ya que pone de manifiesto la posibilidad de obtener resultados erróneos si los valores que se comparan corresponden a actividades específicas. De haberlo hecho hubiésemos encontrado para el ALA-S y DOVA-T un máximo de actividad al sexto día de crecimiento y además, las actividades de ambas enzimas habrían sido siempre mayores para las células crecidas en oscuridad. Estas conclusiones, totalmente opuestas a las obtenidas anteriormente, no reflejarían variaciones debidas a las condiciones de iluminación durante el crecimiento, sino que se deberían únicamente a modificaciones en el contenido de proteínas.

VI.4. CONCLUSIONES PARCIALES

Trabajando con células de *Euglena gracilis* cultivadas bajo diferentes condiciones de iluminación observamos que:

- En el medio de cultivo empleado el crecimiento heterotrófico en oscuridad se ve ampliamente favorecido con respecto al fotoheterotrófico.
- Cuando las células crecidas en oscuridad son transferidas a la luz se induce la síntesis de clorofila. El 90 - 95 % de la cantidad total de clorofila sintetizada por *Euglena* es clorofila a. Por efecto de la luz el aumento de clorofila a es paralelo al de los carotenoides.
- Las actividades de DOVA-T y ALA-S son mayores para las células crecidas en presencia de luz. Cuando en las células etioladas se induce el desarrollo de los cloroplastos por iluminación ambos niveles enzimáticos aumentan.
- Independientemente de las condiciones de crecimiento, la actividad de DOVA-T es siempre mayor (alrededor de 10 a 15 veces) que la del ALA-S.

CAPITULO VII

L-GLUTAMATO:4,5-DIOXOVALERICO TRANSAMINASA

	Página
VII.1. Determinación de las condiciones óptimas para la medición de actividad	78
VII.1.1. Efecto de distintas concentraciones de sustrato	78
A) Concentración óptima de DOVA	78
B) Especificidad por el aminoácido	78
C) Concentración óptima de L-glutamato	82
VII.1.2. Requerimiento por fosfato de piridoxal	83
VII.1.3. Variación del tiempo de incubación	84
VII.1.4. Efecto de la concentración de proteína	86
VII.1.5. pH óptimo	86
VII.2. Propiedades y caracterización de la L-glutamato:DOVA transaminasa	91
VII.2.1. Efecto del fraccionamiento salino	91
VII.2.2. Cinética de la reacción	91
A) Estudios de velocidades iniciales	92
B) Estudios de inhibición	96
VII.2.3. Estabilidad de la enzima	104
VII.3. Conclusiones parciales	106

VII.1. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA LA MEDICION DE ACTIVIDAD

VII.1.1. Efecto de distintas concentraciones de sustratos

En la reacción catalizada por la DOVA-T intervienen dos sustratos: DOVA y glutamato, en consecuencia debimos establecer la concentración óptima para cada uno de ellos. Además, para el dador de grupos amino se realizaron estudios de especificidad, no así para el DOVA puesto que partiendo de otro cetoácido se obtendría un producto distinto del ALA.

A) Concentración óptima de DOVA: Empleando como extracto enzimático el sobrenadante S, proveniente de células cultivadas en oscuridad o a la luz hasta fase exponencial tardía, se midió actividad de DOVA-T variando las concentraciones de DOVA y manteniendo constante la concentración de L-glutamato (Figura 29). Observamos que la máxima actividad de la enzima se manifestaba a concentraciones de DOVA que oscilaban entre 4,0 y 5,5 mM; concentraciones más altas de este sustrato producían una marcada inhibición. El mismo comportamiento se observó para las células crecidas en presencia o ausencia de luz.

En la Tabla 5 podemos ver que sin el agregado de DOVA no se detecta formación de ALA, de donde se concluye que los niveles de DOVA endógenos son despreciables.

B) Especificidad por el aminoácido: Si bien la reacción presenta un requerimiento absoluto por el DOVA (Tabla 5) no ocurre lo mismo para el glutamato, sin su agregado el sistema muestra alrededor de un 70 % de la actividad máxima obtenida en presencia de ambos sustratos. Este resultado no es sorprendente ya que el extracto crudo con el que trabajamos podría aportar el amino dador necesario para que la reacción se lleve a cabo, existiendo la posibilidad de que el mismo se encuentre en forma libre o bien unido a la proteína. Con el objeto de esclarecer esto último y además establecer el requerimiento y especificidad por el aminoácido, medimos actividad de DOVA-T empleando como extractos enzimáticos el sobrenadante S, obtenido de la manera habitual, y el sobrenadante D que corresponde al S dializado durante 6 horas

contra buffer fosfato de sodio 5 mM. El sistema de incubación se completó agregando DOVA a una concentración 4,50 mM y reemplazando el L-glutamato por distintos dadores de grupos aminos (Figura 30). El tiempo de incubación fue de 60 minutos para asegurar la utilización del aminoácido agregado.

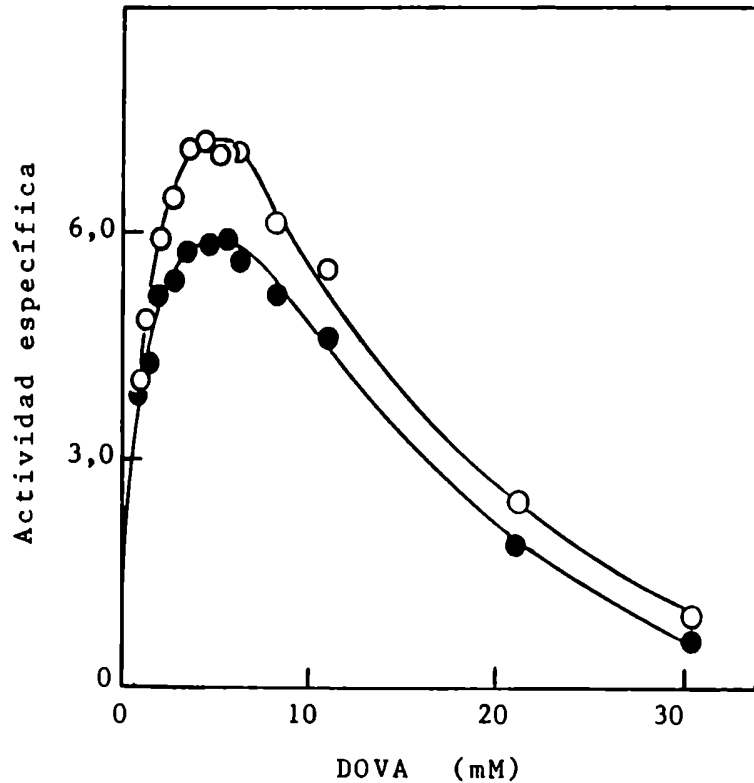


FIGURA 29: Actividad de DOVA-T en función de distintas concentraciones de DOVA. Utilizando como extracto enzimático el sobrenadante S proveniente de células etioladas (O) y pigmentadas (●), se midió actividad de DOVA-T de la manera descrita en Métodos, variando las concentraciones de DOVA y manteniendo fija la de L-glutamato (166,67 mM).

Según los resultados obtenidos la diálisis no modificó significativamente el requerimiento por el aminoácido. Sin el agregado exógeno de este sustrato el sobrenadante dializado manifestó el 90 % de la actividad que presentaba el sobrenadante S incubado en las mismas condiciones; estos datos estarían sugiriendo: 1) Baja disponibilidad en el sobrenadante S del aminoácido específico para la reacción, en forma

libre, ya que de lo contrario a los 60 minutos de incubación deberían observarse diferencias significativas de actividad entre ambos sobrenadantes S y D. 2) El aminoácido específico endógeno estaría unido a la proteína formando una especie de complejo enzima-sustrato. Estos datos son in suficientes para afirmar que la totalidad de la proteína ca paz de transaminar el DOVA en ALA se encuentre de esta forma, parte de ella podría existir además como enzima libre.

TABLA 5: DOVA-T: Determinación de los niveles endógenos de sustratos

DOVA (mM)	L-GLUTAMATO (mM)	ACTIVIDAD ESPECIFICA	
		nmoles ALA/30 min.mg	%
(A)			
4,15	166,67	7,13	100
4,15	-	4,85	68
-	166,67	0	0
(B)			
4,15	166,67	6,23	100
4,15	-	4,36	70
-	166,67	0	0

Se mide actividad de DOVA-T empleando como extracto enzimático el sobrenadante S proveniente de células cultivadas 4 días en oscuridad (A) o a la luz (B). El 100 % de actividad corresponde a la evaluada en presencia de ambos sustratos.

Independientemente del sobrenadante empleado observamos que el L-glutamato fue el único aminoácido capaz de estimular la actividad inicial del extracto, lo cual nos estaría indi cando que posiblemente para la DOVA-T de *Euglena gracilis* éste sea el amino dador específico. Cambios en los valores de actividad concomitantes con variaciones en la concentra

concentración de L-glutamato confirmarían, por el momento, (Figura 31) dicha especificidad.

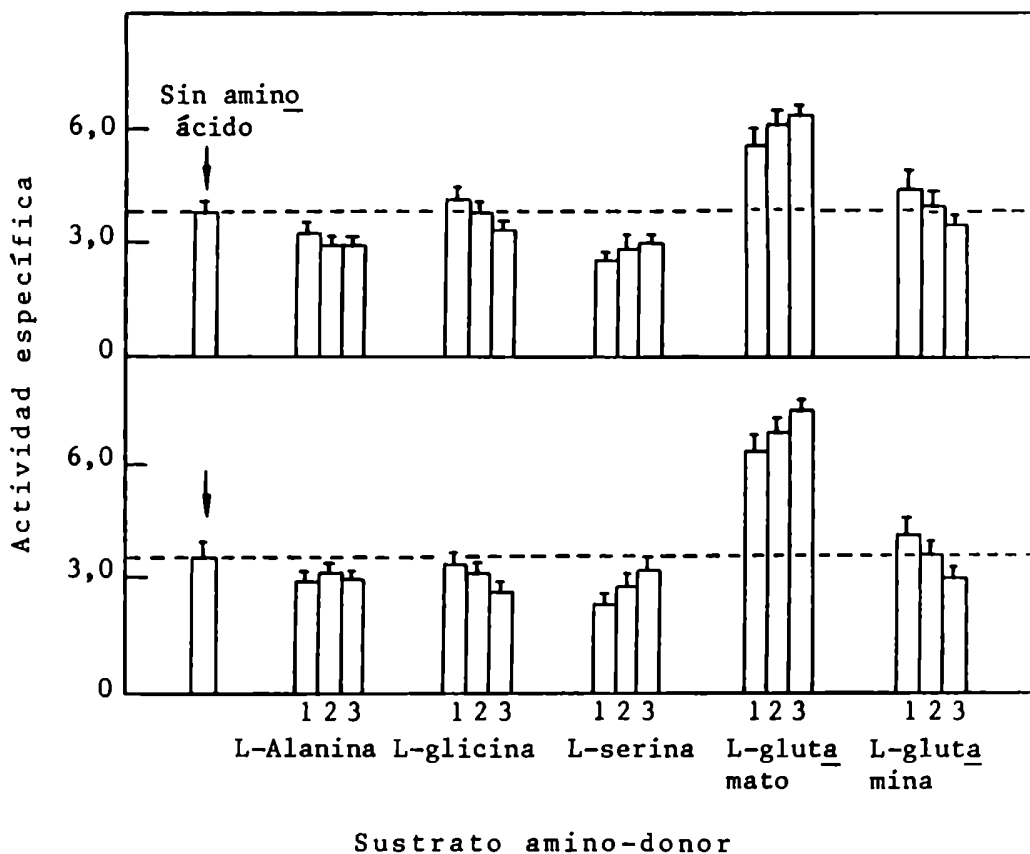


FIGURA 30: Efecto de distintos aminoácidos sobre la actividad de DOVA-T. Empleando como extracto enzimático el sobrenadante S (A) y el sobrenadante D (B), se mide actividad de DOVA-T según se detalla en Métodos pero utilizando distintos aminoácidos a tres concentraciones diferentes: 1:20 mM, 2:50 mM y 3:100 mM. La línea punteada representa el nivel de actividad obtenido sin el agregado de aminoácido.

Las conclusiones obtenidas hasta aquí, si bien coinciden con las reportadas por Foley y Beale (115) en lo que respecta a que el L-glutamato es el mejor aminoácido sustrato de la reacción, no concuerdan en lo que concierne al requerimiento por el mismo, ya que estos autores observaron que luego de un pasaje del extracto enzimático por Sephadex G-25, surgía como consecuencia un requerimiento absoluto por el aminoácido.

Cabe aclarar que si bien los valores presentados en la Figura 30 corresponden a sobrenadantes provenientes de células

etioldadas, se observó un comportamiento similar para las células crecidas en presencia de luz, por tal razón de aquí en más a no ser que se realicen estudios en los que se evidencien diferentes propiedades para la enzima proveniente de células cultivadas en luz u oscuridad, sólo mostraremos los datos correspondientes a células etioldadas.

- C) Concentración óptima de L-glutamato: Utilizando como extracto enzimático el sobrenadante S y una concentración óptima de DOVA (4,33 mM) medimos actividad de DOVA-T en función de distintas cantidades de L-glutamato (Figura 31).

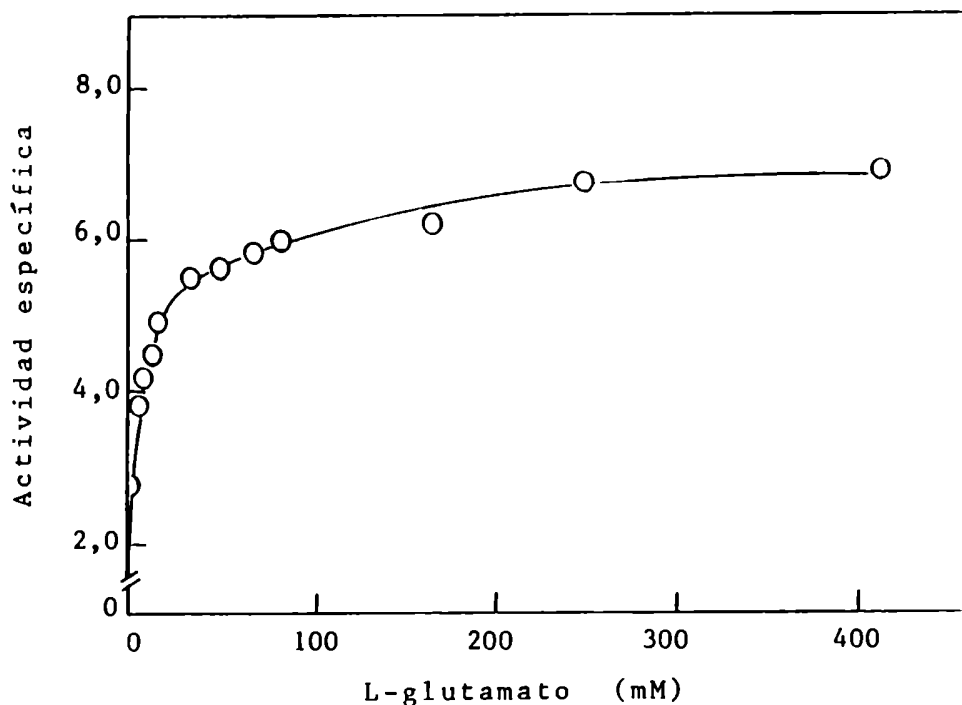


FIGURA 31: Actividad de DOVA-T al variar la concentración de L-glutamato. Se mide actividad de DOVA-T de la manera descrita en Métodos, empleando el sobrenadante S como extracto enzimático, DOVA a una concentración 4,33 mM y cantidades variables de L-glutamato.

De acuerdo con los valores obtenidos la concentración óptima de L-glutamato se establece entre 150 - 200 mM, a concentraciones más altas (hasta 450 mM) no se observa inhibición por este sustrato.

En todos los casos se tuvo en cuenta la transaminación no

enzimática del DOVA en ALA en presencia de L-glutamato.

VII.1.2. Requerimiento por fosfato de piridoxal

Para manifestar su actividad todas las transaminasas requieren la participación de fosfato de piridoxal (ver Figura 18). En nuestro caso, empleando el sobrenadante S como extracto enzimático observamos que la formación de ALA no se estimulaba con el agregado de este cofactor (Tabla 6). Estos resultados estarían indicando que independientemente de la forma en la cual se encuentre la enzima, ya sea libre o unida al aminoácido, dispondría del fosfato de piridoxal necesario para manifestar su óptima actividad. Este comportamiento es diferente al descrito anteriormente para la enzima de esta misma fuente (115) ya que se había observado que una concentración 30 μM de fosfato de piridoxal producía un incremento del 35 % en la actividad.

TABLA 6: Efecto del fosfato de piridoxal sobre la actividad de DOVA-T

FOSFATO DE PIRIDOXAL (μM)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (UE/mg)
0	6,40
3,33	6,54
6,67	6,68
10,00	6,98
16,67	6,65
33,33	6,80
50,00	6,86
83,33	7,14
166,67	7,05

Se midió actividad de DOVA-T de la manera habitual, adicionando distintas cantidades de fosfato de piridoxal y empleando concentraciones óptimas de DOVA (4,07 mM) y L-glutamato (166,67 mM).

VII.1.3. Variación del tiempo de incubación

A continuación analizamos el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de DOVA-T presente en el sobrenadante S (Figura 32).

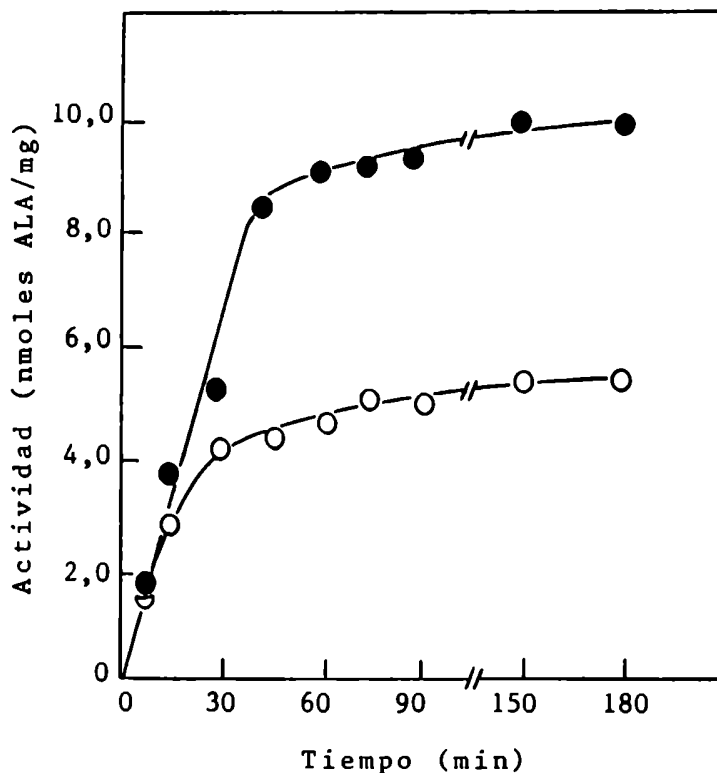


FIGURA 32: Variación de la actividad de DOVA-T en función del tiempo de incubación. La medición de actividad enzimática se efectuó según se describió en Métodos, empleando sólo DOVA (O) y DOVA + L-glutamato (●) como sustratos. (DOVA) = 5,7 mM; (L-glutamato) = 200 mM.

En el caso de incubar en presencia de DOVA y L-glutamato como sustratos, observamos una relación lineal entre la cantidad de producto formado y el tiempo que se mantuvo hasta alrededor de los 45 minutos. Cuando la actividad enzimática se evaluó agregando sólo DOVA, la zona de linealidad fue mucho menor. En ambos casos se observa que las curvas alcanzan un valor máximo de formación de producto que permanece constante aunque el tiempo de incubación se prolongue hasta 180 minutos, este comportamiento podría deberse ya sea a una falta de sustratos y/o a una inestabilidad de la enzima al ser incubada en

estas condiciones.

Según la Figura 33, basta con preincubar a 37 °C tan sólo 15 minutos para que la actividad disminuya un 40 %; el perfil de inactivación no se modifica por el agregado o no de L-glutamato durante la incubación. La mayor actividad medida en presencia de ambos sustratos podría corresponder a enzima inicialmente libre de aminoácido y/o al posible inicio de nuevos ciclos de reacción. La existencia de gran cantidad de enzima libre es poco probable dado que las curvas de la Figura 32 son prácticamente superponibles hasta alrededor de los 20 minutos.

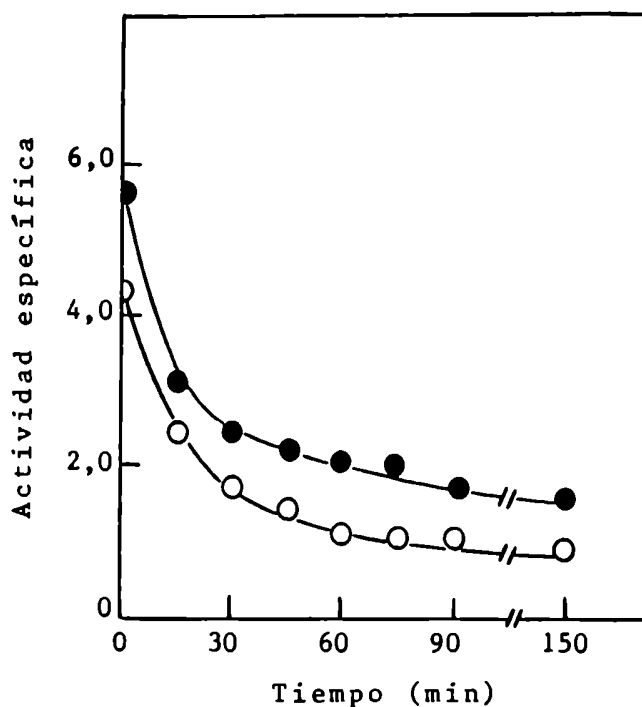


FIGURA 33: Estabilidad de la DOVA-T al preincubar a 37 °C. Luego de preincubar el sobrenadante S a 37 °C a los tiempos que se indican, se midió actividad enzimática de la manera descrita en Métodos, empleando DOVA (○) y DOVA + L-glutamato (●) como sustratos. (DOVA) = 5,5 mM; (L-glutamato) = 200 mM.

Como conclusión importante, comparando las dos últimas figuras se hace evidente la protección que ejercen los sustratos sobre la enzima durante la incubación.

En base a los resultados obtenidos elegimos como tiempo standard de incubación 30 minutos, con lo cual aún para concentraciones de glutamato menores que 200 mM nos aseguramos estar dentro del intervalo de tiempo en que la velocidad de formación de producto sea constante.

VII.1.4. Efecto de la concentración de proteína

El objeto de este análisis fue establecer el rango de concentración de proteína que nos permita obtener valores detectables de actividad, y además verificar la necesidad de mantener o no constante la relación (DOVA/proteína) teniendo en cuenta los resultados ya obtenidos al variar la concentración de DOVA, ilustrados en la Figura 29.

Utilizando el sobrenadante S proveniente de células crecidas en oscuridad y una concentración de DOVA 4,0 mM medimos formación de ALA en función de la concentración de proteína, al incubar con y sin el agregado de L-glutamato (Figura 34). En ambos casos los valores se ajustaron a una recta, lo que implica que la actividad específica representada por la pendiente de la misma permanece constante, independientemente de la concentración de proteína y de la relación que exista con la concentración de DOVA. Este dato es importante porque nos permite comparar valores de actividad de extractos enzimáticos aunque difieran en su contenido proteico.

VII.1.5. pH óptimo

La actividad enzimática generalmente varía en función del pH, de manera característica y de forma distinta según la enzima considerada.

Para la DOVA-T de *Euglena gracilis*, la curva de actividad en función del pH (Figura 35) tiene forma de campana con un rango de pH óptimo estrecho que oscila entre 6,8 y 7,4 respectivamente. Experimentalmente la variación de pH en el sistema de incubación se logró utilizando distintos buffers (ver leyenda de la Figura 35). Ensayando el mismo rango de pH con más de una solución reguladora pudimos apreciar posibles interferencias por parte de algunos de los constituyentes de la mezcla buffer. De esta forma surge que el intervalo de pH 7,4-9,0 debe ser evaluado empleando ácido bórico-bórax en lugar de Tris-HCl como solución reguladora, debido al fuerte efecto inhibitorio (aproximadamente del 75 %) que presenta este último.

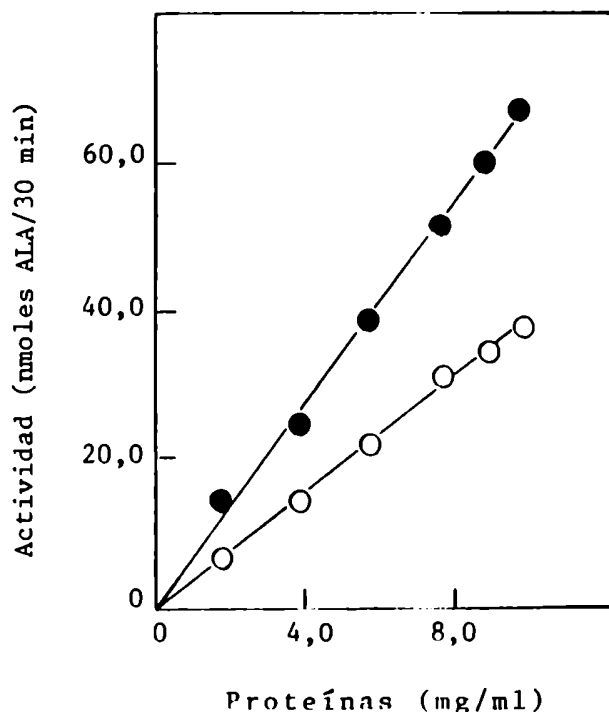


FIGURA 34: Efecto de distintas concentraciones de proteína sobre la actividad de DOVA-T. La medición de actividad se realizó de la manera habitual, en presencia de DOVA (O) y DOVA + L-glutamato (●) como sustratos. (DOVA) = 4,0 mM; (L-glutamato) = 166,67 mM.

Teniendo en cuenta que el agregado del extracto enzimático y la metabolización de sustancias a lo largo del tiempo de incubación pueden contribuir a modificar el pH del buffer empleado, cabe aclarar, que se consideró como pH experimental al promedio de los valores medidos antes y después de la incubación.

La variación de actividad enzimática con el pH depende fundamentalmente del comportamiento ácido-base de la enzima y del sustrato. El efecto producido por el pH sobre el estado de ionización de la proteína no pudo ser analizado debido a la inestabilidad propia de la enzima (Figura 33); mientras que, el efecto sobre el sustrato (DOVA) se evaluó directamente a partir de los blancos de reactivos utilizados como controles al construir la curva de la Figura 35 (estos tubos contenían, a excepción de la enzima, todos los otros componentes del sistema de incubación).

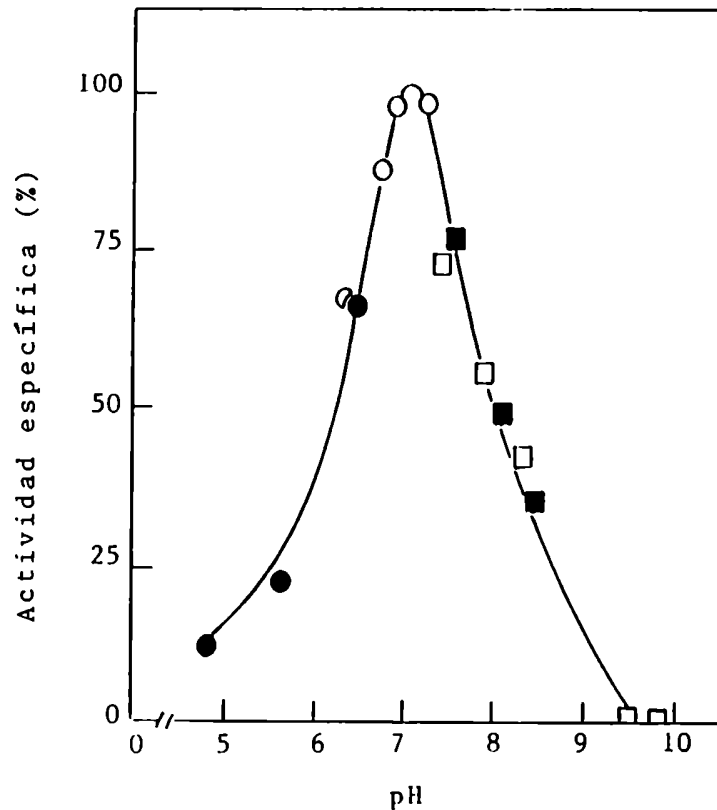
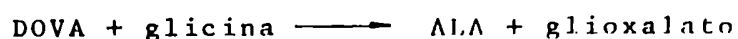


FIGURA 35: Actividad de DOVA-T en función del pH de incubación. Se midió actividad de DOVA-T en presencia de DOVA (4,1 mM) y L-glutamato (200 mM) como sustratos, pero empleando diferentes buffers (100 mM) para alcanzar los distintos pH's, correspondiendo: (●) citrato-fosfato de sodio, (○) fosfato de sodio, (■) ácido bórico-bórax y (□) glicina-NaOH. El resto de la metodología fue la empleada habitualmente.

Partiendo de aproximadamente 4,0 μ moles de DOVA observamos (Figura 36) que esta cantidad se mantiene constante (dentro del error del método) para pH's comprendidos entre 4,88 y 8,73 independientemente de que el buffer utilizado haya sido citrato-fosfato de sodio, fosfato de sodio, Tris-HCl o ácido bórico-bórax. En cambio, en presencia de glicina-NaOH se produce una pérdida progresiva de sustrato, conjuntamente con la formación de ALA, que no se observa para valores de pH's similares alcanzados con otras soluciones reguladoras. Lo que está ocurriendo en este último buffer, debido a la presencia de glicina, es la transaminación no enzimática del DOVA en ALA:



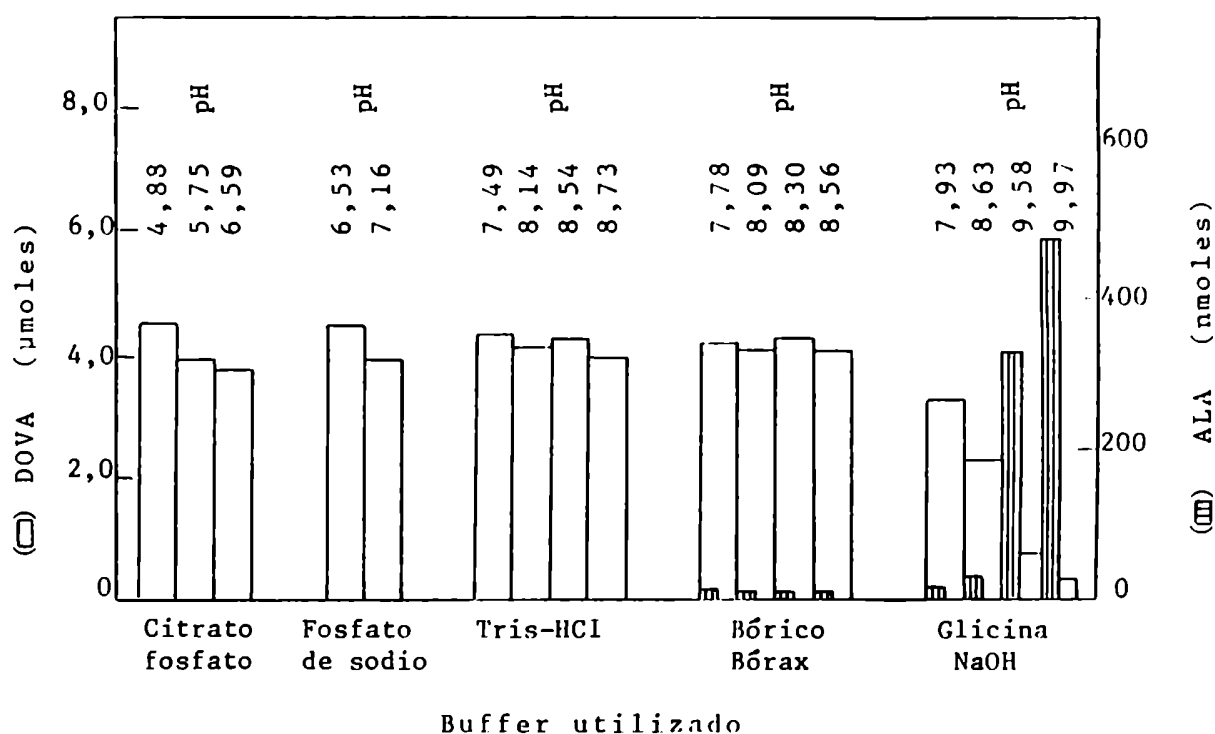
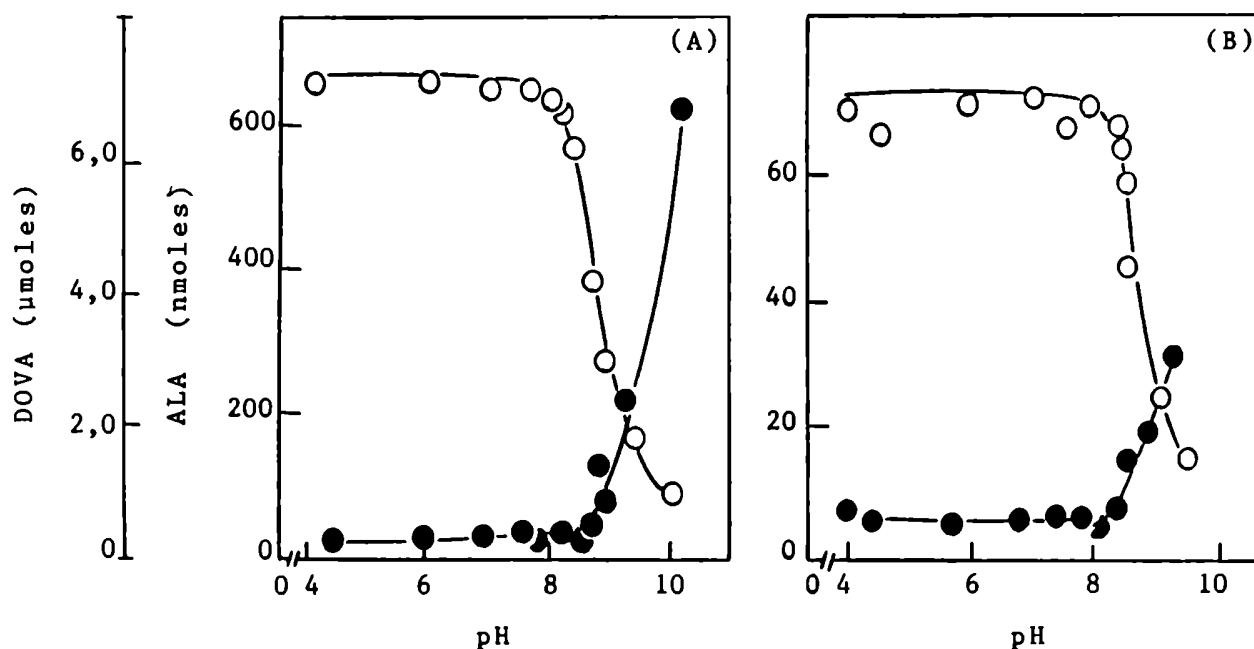


FIGURA 36: Estabilidad del sustrato (DOVA).

En los blancos de reactivos que corresponden a cada buffer empleado en la obtención de la curva de pH, se determinó según se especificó en Métodos la cantidad de DOVA remanente y de ALA formado, luego de incubar en las condiciones standard.

Comparando la cantidad de ALA capaz de sintetizarse enzimáticamente en las condiciones óptimas de incubación (punto máximo de la Figura 35) con la cantidad obtenida no enzimáticamente a pH's alcalinos comprendidos entre 9,6 y 10, observamos que en este último caso la conversión fue de 6 a 10 veces mayor, aún cuando sólo el 10 % del DOVA desaparecido se ha transformado en ALA.

Al evaluar la transaminación no enzimática en función del pH, empleando L-glicina o L-glutamato como aminoácidos (Figura 37), surge como conclusión que el DOVA se descompone a partir de pH's comprendidos entre 8 y 8,7 independientemente de que se forme o no ALA; mientras que para llevar a cabo la reacción de transaminación del DOVA que ocurre a pH's mayores de 9,0 la L-glicina resultó ser un sustrato más adecuado que el L-glutamato. El empleo de L-alanina como amino donar arrojó resultados similares a los obtenidos con L-glutamato.



Buffer utilizados para alcanzar los distintos pH's

SOLUCION REGULADORA	RANGO DE pH
Citrato-fosfato de sodio	3,5 - 6,0
Fosfato de sodio	6,0 - 7,4
Tris-HCl	7,4 - 9,0
Acido bórico-bórax	7,4 - 9,0
Carbonato-bicarbonato de sodio	9,0 - 10,0

FIGURA 37: Descomposición del DOVA en función del pH y del aminoácido.

Se incubaron en condiciones standard tubos que contienen 6,8-7,0 μmoles de DOVA, 150 μmoles del aminoácido (A: L-glicina, B: L-glutamato), 150 μmoles del buffer correspondiente a cada pH y agua hasta un volumen final de 1,5 ml. Luego de incubarse se agregó igual volumen de TCA al 10 % y se determinó el DOVA remanente (O) y ALA formado (●) de la manera descrita en Métodos.

Resumiendo, la conversión no enzimática del DOVA en ALA a pH 7,4 y en presencia de L-glutamato (200 mM), que son nuestras condiciones de incubación, será considerada como control a lo largo de todas nuestras experiencias aunque en la mayoría de los estudios no alcanzó valores significativos.

VII.2. PROPIEDADES Y CARACTERIZACION DE LA L-GLUTAMATO:DOVA TRANSAMINASA

VII.2.1. Efecto del fraccionamiento salino

Empleando el sobrenadante S como extracto enzimático, se investigó el efecto del tratamiento con sulfato de amonio sobre la actividad de DOVA-T (Tabla 7). Fraccionando en los rangos 0-40, 40-75 y 75-90 % (de este último intervalo no se muestran resultados puesto que no precipitó cantidad suficiente de proteína) observamos que alrededor del 70 % de las unidades enzimáticas se concentran en la fracción 40-75 % de saturación, alcanzándose un grado de purificación de casi 3 veces. Además, el aumento de fuerza iónica resultó ser un tratamiento adecuado para obtener la enzima libre de aminoácido unido, ya que la preparación resultante evidenció un requerimiento absoluto por el agregado de este sustrato.

Utilizando como extracto enzimático la fracción que precipita entre 40-75 % de saturación con sulfato de amonio, de aquí en adelante denominada fracción E, estudiamos nuevamente especificidad por el sustrato amino dador (Tabla 8) y requerimiento por el fosfato de piridoxal (Tabla 9). Con los resultados obtenidos corroboramos fehacientemente la participación del L-glutamato en la reacción de transaminación del DOVA en ALA y demostramos además que en la fracción E el cofactor sigue unido a la enzima.

VII.2.2. Cinética de la reacción

El principal objetivo al llevar a cabo estudios cinéticos es determinar los mecanismos por los que transcurren las reacciones enzimáticas y analizar de qué forma distintos com-

compuestos pueden actuar sobre los mismos. Para ello comparamos los resultados obtenidos experimentalmente con los calculados teóricamente para todos los mecanismos posibles. Se requiere contar con datos provenientes de distintos estudios para poder asegurar que una reacción procede, o un compuesto actúa, según un mecanismo determinado. A continuación se describen para la DOVA-T de *Euglena gracilis* los resultados provenientes de estudios cinéticos de velocidades iniciales e inhibición.

TABLA 7: Efecto del fraccionamiento con sulfato de amonio sobre la actividad de DOVA-T

FRACCION	PROTEINAS (mg)	ACTIVIDAD (UE)		ACT. ESP. (UE/mg)	REND. (%)	PURIF.
		(*)	(**)			
Sobrenadante S	532	2.656	3.919	7,37	100	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ :						
0-40 %	143	18	195	1,36	5	0,2
40-75 %	136	0	2.777	20,45	71	2,8

La proteína precipitada en los distintos rangos se resuspendió en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4; se desaló a través de una columna de Sephadex G-25 (dimensiones: longitud:25 cm, diámetro interno: 10 mm, volumen de gel: 20 ml) y se midió actividad de la manera descrita en Métodos, empleando como sustratos (*) DOVA 3,75 mM y (**) DOVA 3,75 mM + L-glutamato 166,67 mM. El rendimiento y grado de purificación corresponden a los obtenidos en presencia de ambos sustratos.

- A) Estudios de velocidades iniciales: Estamos en presencia de una reacción en la que participan dos sustratos (A: L-glutamato y B: DOVA) y se generan dos productos (P: 2-cetoglutarato y Q: ALA)). La determinación del modelo de velocidades iniciales implica llevar a cabo mediciones de actividad cuando se varía la concentración de un sustrato a diferentes niveles fijos del otro.

TABLA 8: Efecto de distintos aminoácidos sobre la actividad de DOVA-T

AMINOACIDO UTILIZADO (mM)	ACTIVIDAD (%)
Ninguno	5
Alanina 20 50 100	29 39 48
Glicina 20 50 100	13 10 9
Serina 20 50 100	10 15 21
Glutamato 20 50 100	94 99 100
Glutamina 20 50 100	26 23 20

Empleando como extracto enzimático la fracción E desalada a través de una columna de Sephadex G-25, se midió actividad de DOVA-T según se describe en Métodos pero utilizando distintos aminoácidos a tres concentraciones diferentes. El 100 % se le adjudicó al valor más alto de actividad.

Los gráficos de las dobles recíprocas o sea de $1/v$ vs $1/(A)$ para distintas concentraciones fijas de B (Figura 38) y de $1/v$ vs $1/(B)$ para distintas concentraciones fijas de A (Figura 39) confirmaron para la DOVA-T de *Euglena gracilis* un

modelo de velocidades iniciales paralelo, correspondiente a un mecanismo cinético tipo ping-pong, representado en la Figura 40, según la notación de Cleland (155).

TABLA 9: Efecto del fosfato de piridoxal sobre la actividad de DOVA-T

FOSFATO DE PIRIDOXAL (μ M)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (UE/mg)
0	13,17
3,33	13,30
6,67	12,36
10,00	13,47
16,67	12,78
33,33	13,76
50,00	14,04
83,33	14,25
166,67	14,19

Empleando como extracto enzimático la fracción E desalada, se midió actividad de DOVA-T de la manera habitual, adicionando distintas cantidades de fosfato de piridoxal. (DOVA) = 4,07 mM; (L-glutamato) = 166,67 mM.

La expresión de velocidad para un mecanismo ping-pong bi-reactante es:

$$v = \frac{V (A) (B)}{K_a (B) + K_b (A) + (A) (B)}$$

donde v es la velocidad inicial, (A) y (B) las concentraciones de los sustratos, V representa la velocidad máxima y K_a y K_b las constantes de afinidad para los sustratos A y B respectivamente.

Como en nuestras experiencias, hasta los 30 minutos, la formación de producto fue lineal con el tiempo, entonces

tomamos la cantidad de ALA formado en este intervalo como proporcional a la velocidad inicial de la reacción. Los valores numéricos de las constantes cinéticas se obtuvieron a partir de las intersecciones (ordenadas al origen) y puntos de cruce con el eje horizontal de coordenadas de los gráficos de dobles recíprocas (Figuras 38 y 39), evidenciándose una buena concordancia entre los resultados obtenidos.

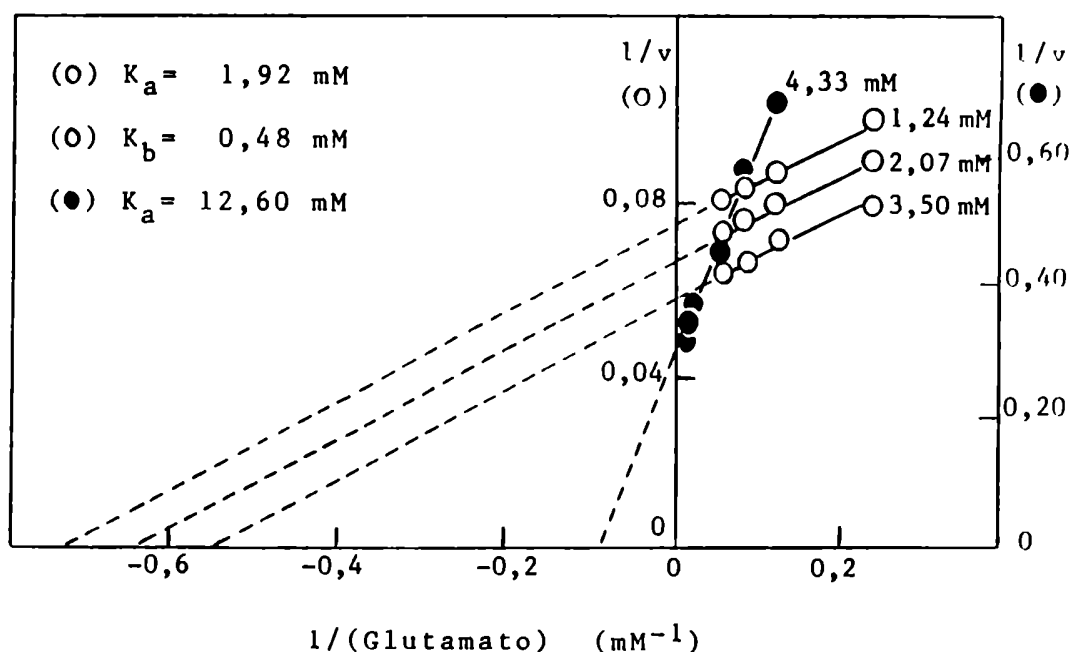


FIGURA 38: Gráfico de Lineweaver-Burk para el L-glutamato como sustrato variable y el DOVA como sustrato fijo. Se midió actividad de DOVA-T de la manera descrita en Métodos, empleando como extracto enzimático la fracción E (O) o el sobrenadante S (●). El ajuste de las rectas se efectuó por el método de cuadrados mínimos. v: nmoles ALA/30 min.mg

Observando los valores de K_a y K_b vemos que la enzima libre presenta, en forma análoga a lo reportado por distintos autores en diferentes fuentes (ver Tabla 3) una constante de afinidad siempre menor para el DOVA que para el aminoácido. Comparando el comportamiento cinético de la fracción E y el sobrenadante S a altas concentraciones de sustrato fijo (Figuras 38 y 39), surge que la enzima libre presenta mayor afinidad por el L-glutamato que la proteína presente en el sobrenadante S, mientras que la afinidad por el DOVA es

independiente del extracto enzimático utilizado. Las diferencias en los valores de K_a son perfectamente justificables si tenemos en cuenta que la mayor parte de la enzima presente en el sobrenadante S está en la forma de complejo enzima-L-glutamato.

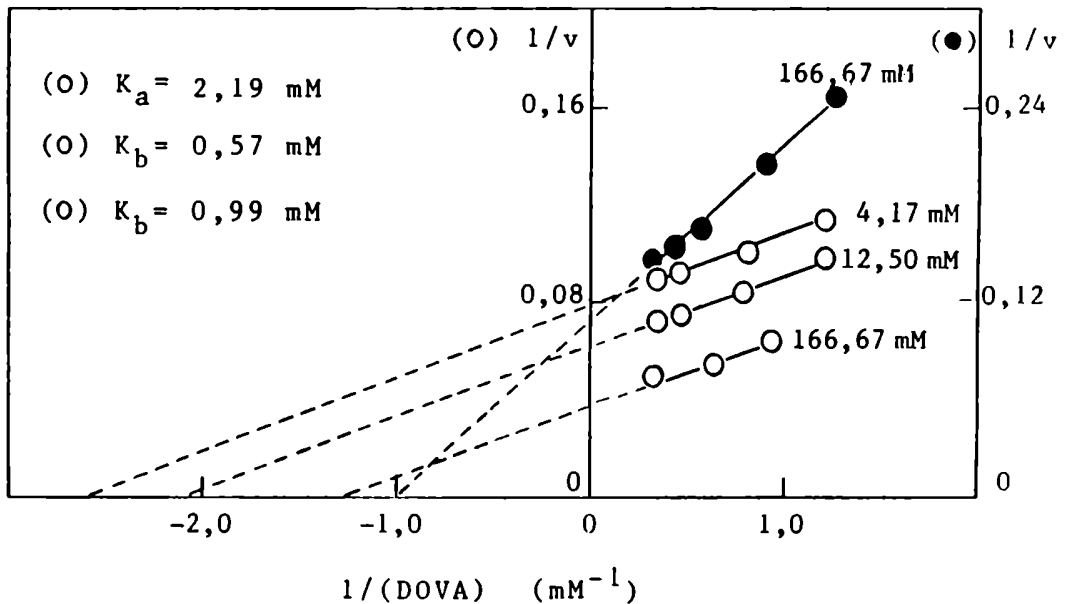


FIGURA 39: Gráfico de Lineweaver-Burk para el DOVA como sustrato variable y el L-glutamato como sustrato fijo. Se midió actividad de DOVA-T según se describe en Métodos, empleando como extracto enzimático la fracción E (O) o el sobrenadante S (●). El ajuste de las rectas se efectuó por el método de cuadrados mínimos. v : nmoles ALA/30 min. mg

Los gráficos de Hill (Figura 41) corroboran el comportamiento michaeliano para la enzima presente en ambos extractos, indicando la presencia de un solo tipo (o población) de sitios de unión para cada sustrato.

- B) Estudios de inhibición: Continuando con los estudios cinéticos se investigó la inhibición producida por la acción de:
- Sustratos: Los sustratos actúan como inhibidores dead-end. Un inhibidor dead-end es una sustancia que se une a la enzima formando un complejo que no puede ser transformado químicamente, en consecuencia, conduce a un "camino sin salida".

- Análogos del sustrato: Actúan compitiendo con el verdadero sustrato por sus sitios de unión.
- Productos: Esta inhibición se debe a que los productos pasan a actuar como sustratos de la reacción que ocurre en sentido inverso.

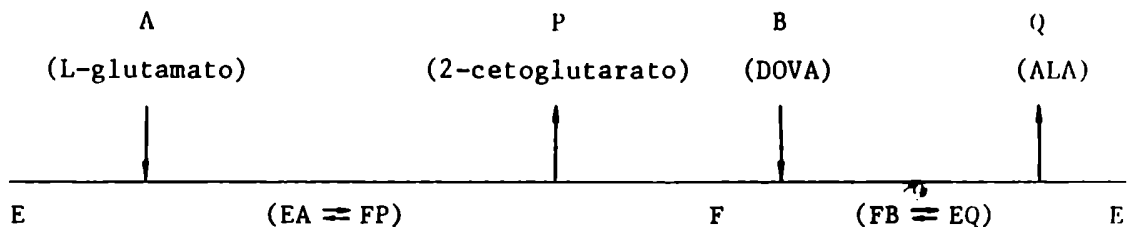


FIGURA 40: Mecanismo cinético tipo ping-pong característico de las transaminasas. Según la notación de Cleland (155) la línea horizontal representa la enzima, E (Enzima-fosfato de piridoxal) y F (Enzima-fosfato de piridoxamina) son las formas enzimáticas estables, A y B los sustratos, P y Q los productos, EA y FB corresponden a los complejos transitorios enzima-sustrato y FP y EQ son complejos transitorios enzima-producto.

- Inhibición por sustrato: Mientras que concentraciones tan altas como 400 mM de L-glutamato no afectaban la velocidad de la reacción, concentraciones de DOVA mayores de 3,5 - 4,5 mM producían una marcada inhibición sobre la actividad de DOVA-T de *Euglena gracilis* (Figura 42). Teóricamente, la mayoría de las inhibiciones por sustrato resultan de combinaciones dead-end entre el sustrato inhibidor y una forma enzimática que no es la adecuada para dar producto (155). Este tipo de inhibición es característica de un mecanismo ping-pong ya que en él participan más de una forma enzimática estable. Entonces, la inhibición observada a altas concentraciones de DOVA, podría deberse a que este sustrato se combina con E, además de hacerlo con F. Dicha inhibición será lineal (es decir, el gráfico de $1/v$ vs concentración del inhibidor se ajustaría a una recta) si sólo una molécula de inhibidor (DOVA) se une a la enzima, o parabólica si el sustrato inhibidor se combina dos veces con la misma forma enzimática.

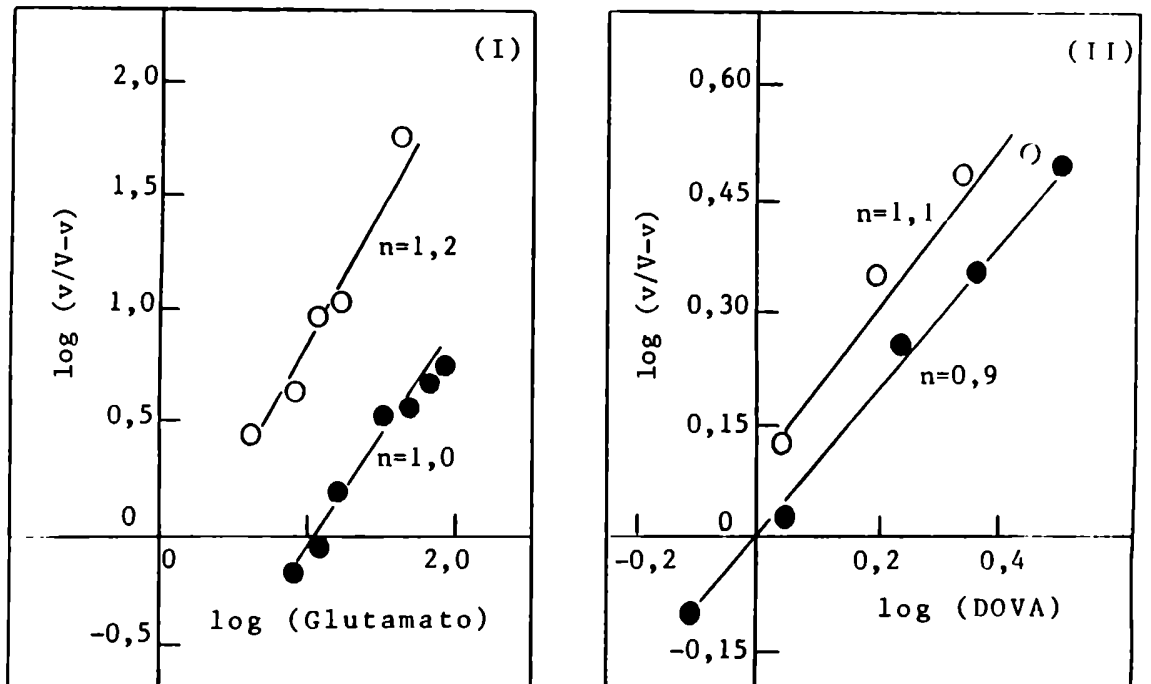


FIGURA 41: Gráfico de Hill para ambos sustratos.

Los valores representados corresponden a las velocidades iniciales y velocidad máxima obtenidas para: I) concentraciones variables de L-glutamato y constante de DOVA (O : 3,50 mM; ● : 4,33 mM) y II) concentraciones variables de DOVA y constante de L-glutamato (O, ● : 166,67 mM). En ambos casos se analizó el comportamiento de la fracción E (O) y sobrenadante S (●).

Según los gráficos de Dixon obtenidos al emplear el sobrenadante S o la fracción E como extractos enzimáticos (Figura 42), las curvas de inhibición por DOVA presentan una primera zona lineal, que obedece a la ecuación correspondiente a inhibiciones lineales por sustrato:

$$v = \frac{V(B)}{K_b + (B) + \frac{(B)^2}{K_i}}$$

donde B es el sustrato inhibidor (DOVA), K_i es la constante de inhibición (el resto de los símbolos tiene el mismo significado dado anteriormente) y representaría a la siguiente reacción:



Luego, a concentraciones más altas de DOVA (mayores de 10 mM para el sobrenadante S y 8 mM para la fracción E), la inhibición deja de ser lineal para transformarse en parabólica debido a la unión de una segunda molécula de DOVA:

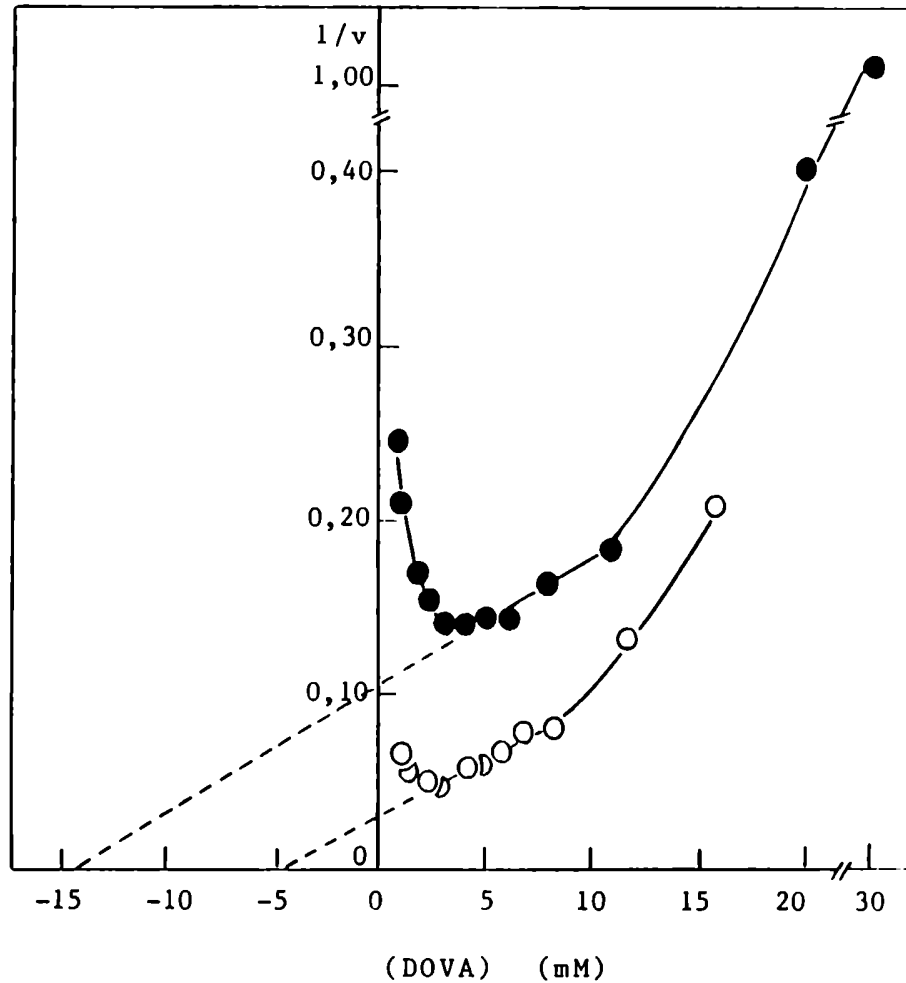
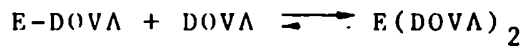


FIGURA 42: Gráfico de Dixon para la inhibición por sustrato (DOVA).

Empleando como extracto enzimático el sobrenadante S (●) y la fracción E (○), se midió actividad de DOVA-T, según Métodos, variando la concentración de DOVA y manteniendo constante la concentración de L-glutamato (166,67 mM). Las rectas se ajustaron por el método de cuadrados mínimos.
v: nmoles ALA/30 min. mg

De la Figura 42 surge, para la formación del complejo E-DOVA valores de K_i de 14,74 mM y 4,90 mM para el sobrenadante S y la fracción E respectivamente; además como era

de esperar luego del tratamiento con sulfato de amonio la enzima ya libre de L-glutamato es más sensible a la inhibición por DOVA.

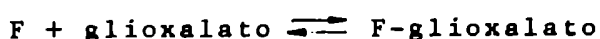
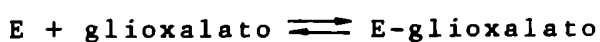
Esta inhibición por sustrato desaparece si se satura con L-glutamato (400 mM), corroborando que dicho aminoácido y el sustrato inhibidor se combinan con la misma forma enzimática (E), razón por la cual la inhibición por DOVA es de tipo competitiva parabólica (hasta el momento no se registra en la literatura referente a esta enzima ningún trabajo que describa este tipo de inhibición).

- Inhibición por análogos de sustrato: Teniendo en cuenta la similitud estructural del DOVA y glioxalato, se postuló que las actividades de L-glutamato:DOVA y L-glutamato:glioxalato aminotransferasas podrían atribuirse a una misma enzima. En base a esta posibilidad se investigó de qué forma el glioxalato interfería en la reacción de transaminación del DOVA en ALA al emplear como fuente enzimática la fracción E proveniente de células de *E. gracilis* cultivadas en oscuridad.

En la Figura 43 se representa el gráfico de inversas ($1/v$ vs $1/(\text{DOVA})$) obtenido al variar los niveles de glioxalato entre 0-10 mM, manteniendo constante la concentración de L-glutamato (166,67 mM). Las concentraciones de DOVA fueron seleccionadas dentro del rango en el cual se observa un comportamiento michaeliano para este sustrato (concentraciones menores de 4,0-4,5 mM).

Los resultados obtenidos muestran claramente distintos tipos de inhibición, dependiendo de la concentración de glioxalato. Hasta una concentración de inhibidor de 4 mM se observa una inhibición no competitiva mientras que para concentraciones de glioxalato entre 4 y 10 mM se convierte en competitiva.

La inhibición no competitiva, en un mecanismo ping-pong, sólo puede explicarse si el glioxalato es capaz de unirse tanto a la forma enzimática E como a la F, resultando por lo tanto las siguientes combinaciones:



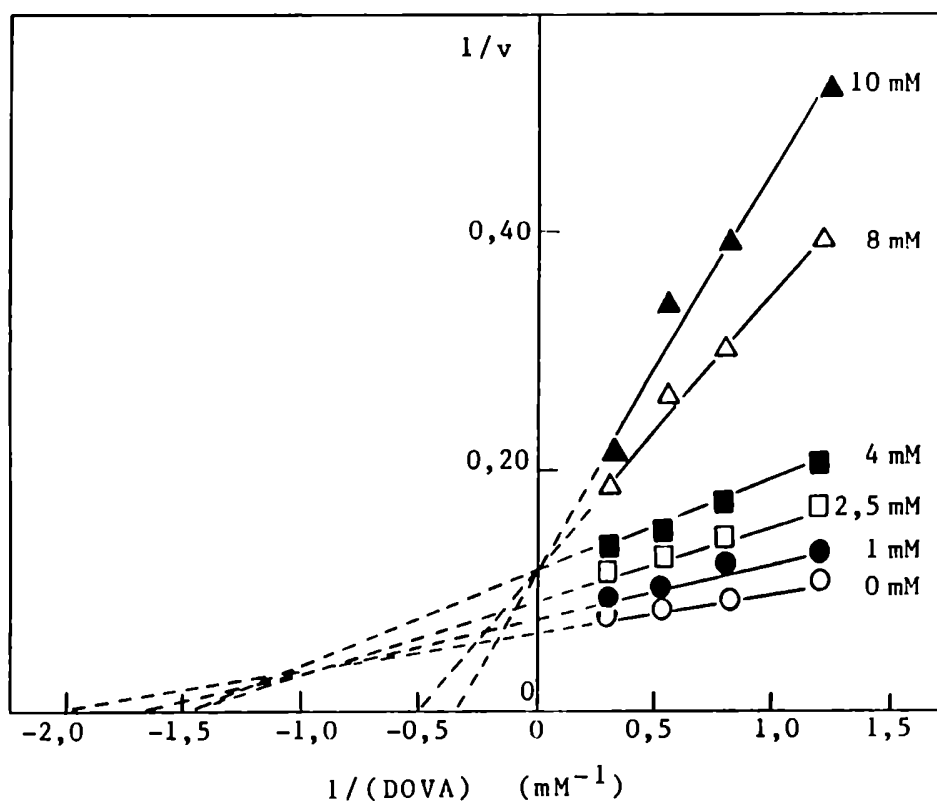


FIGURA 43: Efecto del glioxalato sobre la actividad de DOVA-T.

Se midió actividad de la enzima en presencia de distintas concentraciones de glioxalato, manteniendo fija la concentración de L-glutamato (166,67 mM), variando los niveles de DOVA y empleando la fracción E como extracto enzimático. La metodología utilizada corresponde a la descrita en Métodos.

v: nmoles ALA/30 min. mg

El efecto del inhibidor (Figura 43) sobre la pendiente se debe a su unión a la forma F, mientras que la unión con E sería la responsable de variaciones en la intersección (155).

Al igual que en el estudio de velocidades iniciales, para los estudios de inhibición también se obtuvo una mayor información cuando se graficaron las pendientes y las intersecciones en función de la concentración del inhibidor (Figura 44). Como puede verse ambos parámetros varían en forma lineal con la concentración de glioxalato, por lo cual la inhibición no competitiva se denomina lineal, y se obtienen para las constantes de inhibición valores de 6,20 mM y 2,35 mM que corresponden a la formación de los complejos E-glioxalato y F-glioxalato respectivamente.

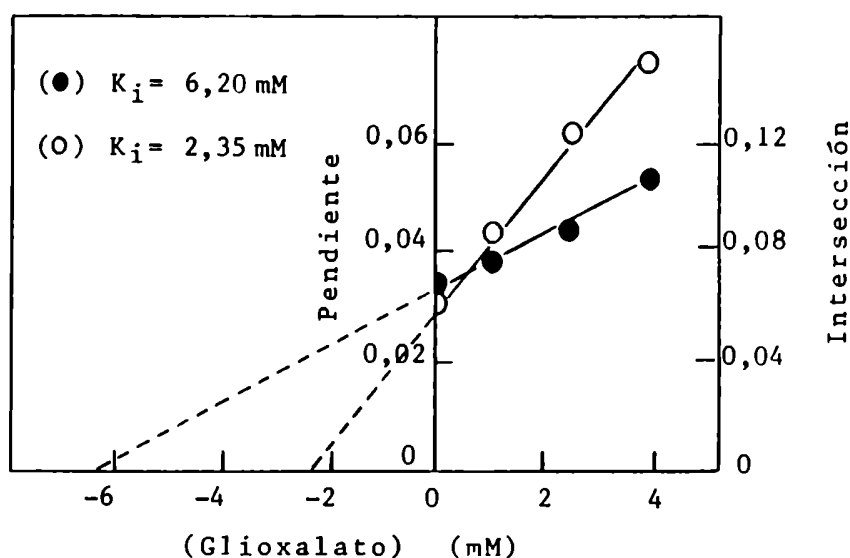
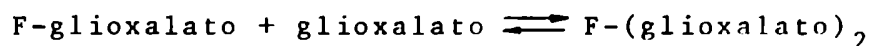


FIGURA 44: Variación de la pendiente (O) e intersección (●) del gráfico de dobles recíprocos (Figura 43) en función de la concentración del inhibidor (hasta 4 mM).

Para concentraciones de glíoxalato mayores de 4 mM (entre 4 y 10 mM) el tipo de inhibición pasa a ser competitivo, sólo se observa variación en la pendiente, por unión a la forma F, mientras que el efecto sobre la intersección se estabiliza. Observando el gráfico de Dixon representado en la Figura 45, e interpretándolo en forma análoga a la inhibición manifestada por el DOVA (Figura 42), el efecto del glíoxalato a concentraciones mayores de 4 mM correspondería a la unión de una segunda molécula de inhibidor a la forma F para dar:



En este caso, altos niveles de DOVA (3,22 mM) impiden esta última combinación, pero no interfieren en la formación del complejo F-glíoxalato. Este cambio de inhibición volverá a analizarse más adelante, luego de caracterizar a la L-glutamato:glíoxalato transaminasa.

El tipo de inhibición pone de manifiesto la propiedad del glíoxalato, como análogo del sustrato, de reproducir el modo de acción del DOVA, ya que ambos compuestos pueden unirse a las formas enzimáticas F y E. Además, los K_i

cuando actúan como inhibidores dead-end por combinación con la forma E son del mismo orden (K_i DOVA = 14,74 mM; K_i glioxalato = 6,20 mM).

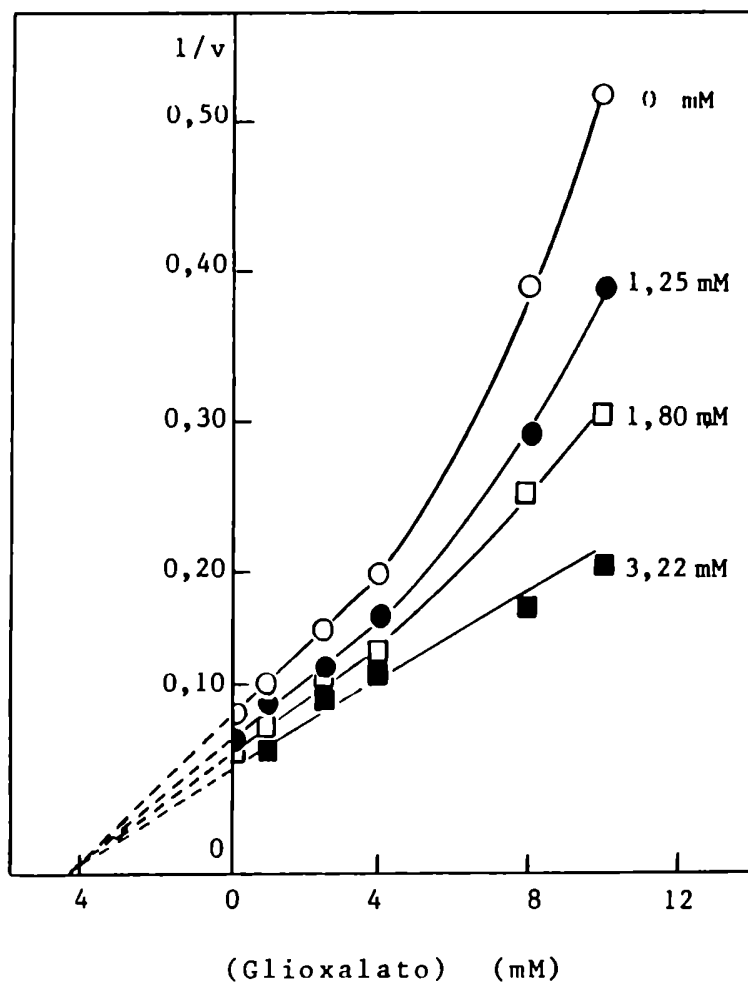


FIGURA 45: Gráfico de Dixon para la inhibición por glioxalato. Las condiciones experimentales son las descritas en la leyenda de la Figura 43.

Respecto al comportamiento del glioxalato como inhibidor descrito por otros autores, algunos le adjudican una inhibición competitiva (115, 119), mientras que otros (156) le atribuyen este tipo de inhibición a bajas concentraciones de alanina (2 mM) cambiando a no competitiva al aumentar los niveles del aminoácido (20 mM).

- Inhibición por producto: Cuando se analizaron distintas concentraciones de ALA (8 - 25 mM) como posible inhibidor de la actividad de DOVA-T, no se observó efecto inhibitorio (Tabla 10). Este resultado concuerda con datos anteriores (93, 116, 118, 119, 156) según los cuáles la reacción de transaminación del DOVA en ALA es irreversible, manifestando un comportamiento singular y atípico para esta familia de enzimas.

TABLA 10: Efecto del ALA sobre la actividad de DOVA-T

ALA (mM)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (%)
0	100
8,3	99
12,5	95
16,7	97
20,8	95
25,0	92

Se midió actividad de DOVA-T de la manera descrita en Métodos, adicionando distintas cantidades de ALA y empleando la fracción E como extracto enzimático.

VII.2.3. Estabilidad de la enzima

Preincubando el sobrenadante S y la fracción E a 37 °C durante distintos intervalos de tiempo (Figura 46) observamos que con sólo 15 minutos de preincubación se inactiva el 50 % de la enzima libre mientras que el complejo E-glutamato retiene el 75 % de la actividad inicial. A los 45 minutos aproximadamente ambos extractos alcanzan el valor máximo de inactivación de 60 % y 38 % para la fracción E y el sobrenadante S respectivamente.

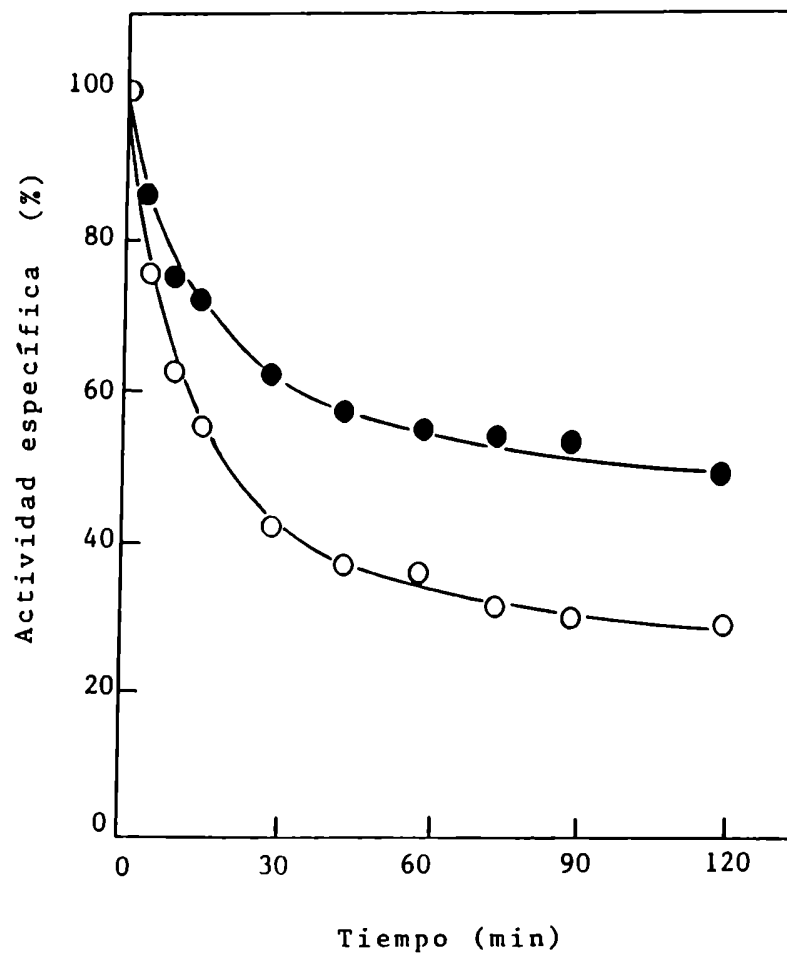


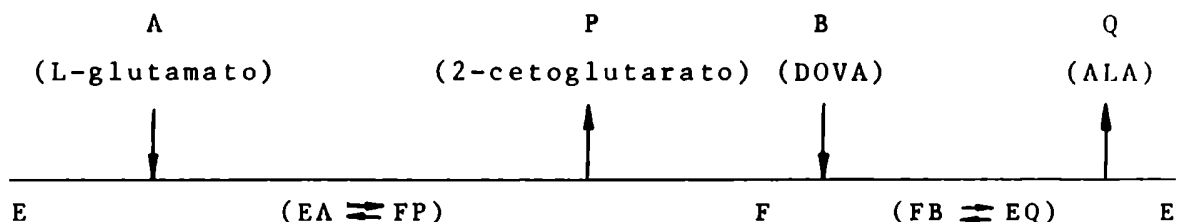
FIGURA 46: Estabilidad de la DOVA-T a 37 °C. Luego de preincubar a 37 °C a los tiempos que se indican, se midió actividad de DOVA-T de la manera descrita en Métodos, empleando como extractos enzimáticos el sobrenadante S (●) y la fracción E (○).

Teniendo en cuenta que el complejo E-glutamato al ser preincubado origina la forma enzimática F, de este gráfico surge la inestabilidad tanto de E como de F, y además, vuelve a ponerse de manifiesto el efecto protector de los sustratos sobre la enzima.

VII.3. CONCLUSIONES PARCIALES

Para la L-glutamato:4,5 dioxoaléxico transaminasa de *Euglena gracilis*:

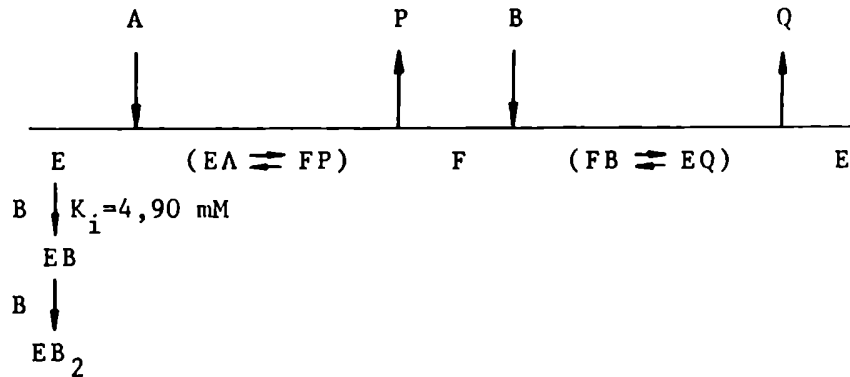
- Establecimos las condiciones óptimas para medir actividad *in vitro*, empleando el sobrenadante S como extracto enzimático:
 - a) (DOVA) entre 4,0 - 5,5 mM; valores más altos producen una marcada inhibición.
 - b) (L-Glutamato) entre 150 - 200 mM.
 - c) No se requiere el agregado de fosfato de piridoxal (0 - 166,67 μ M) como cofactor.
 - d) Tiempo de incubación: 30 minutos, con lo cual estamos dentro del intervalo en que la velocidad de formación de producto es constante.
 - e) Concentración de proteína entre 2 - 10 mg/ml, en este rango la actividad específica no varía.
 - f) pH óptimo oscila entre 6,8 - 7,4; se obtiene al emplear buffer fosfato de sodio pH 7,4 a una concentración final de 0,1 M.
- Observamos que la mayor parte de la proteína, contenida en el sobrenadante S, capaz de transaminar el DOVA en ALA, estaría como complejo enzima-glutamato. El aumento de fuerza iónica por el agregado de sulfato de amonio (40-75 % de saturación) constituyó un tratamiento adecuado para obtener la enzima libre (Fracción E).
- A través de los estudios de velocidades iniciales confirmamos un mecanismo cinético tipo ping-pong que según la notación de Cleland (155) se representa:



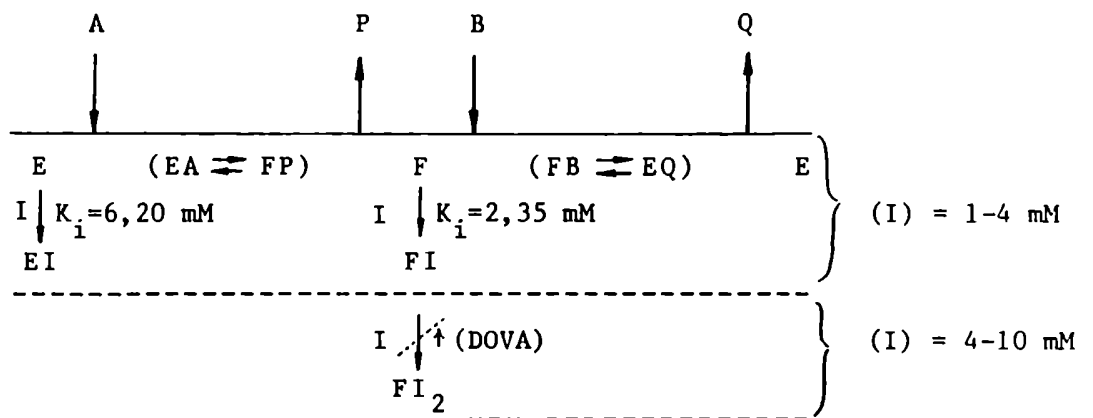
Los valores de las constantes de afinidad para el L-glutamato (K_a) y DOVA (K_b) fueron 2,06 mM y 0,52 mM respectivamente.

- Analizando el efecto de distintos inhibidores observamos que:

- a) Concentraciones de DOVA mayores de 3,5 mM producen una inhibición competitiva parabólica debido a la formación de complejos dead-end con la forma enzimática E:



- b) El glioxalato entre 1 y 10 mM inhibe la actividad de la enzima. Concentraciones de glioxalato comprendidas entre 1 y 4 mM producen una inhibición no competitiva lineal, debido a que el inhibidor es capaz de unirse tanto a la forma enzimática E como a la F. Para concentraciones de glioxalato mayores de 4 mM (entre 4 y 10 mM) el tipo de inhibición cambia, se transforma en competitiva, una segunda molécula de inhibidor se une a F. Observamos que altas concentraciones de DOVA (3,22 mM) impiden esta última combinación, pero no la formación de FI.



siendo I: glioxalato

c) Concentraciones variables de ALA (8 - 25 mM) no producen inhibición sobre la actividad de la enzima, probablemente por falta de reversibilidad de la reacción.

Como vemos, todos los tipos de inhibición observados fueron compatibles con el modelo de velocidades iniciales.

CAPITULO VIII

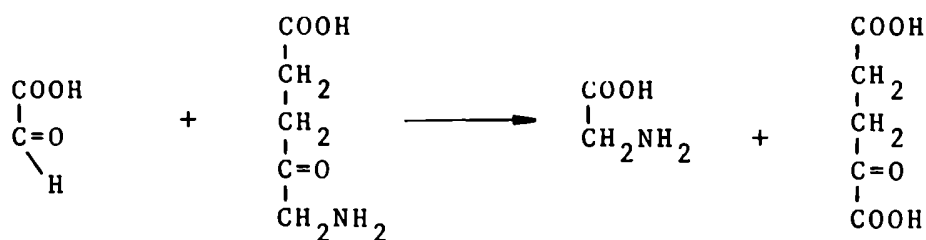
POSIBLE IDENTIDAD DE LA L-GLUTAMATO:DOVA Y L GLUTAMATO:GLIOXA-
LATO TRANSAMINASAS

	Página
VIII.1. L-Glutamato:glioxalato-transaminasa	111
VIII.1.1. Cuantificación del producto de la reacción	111
A) Cuantificación de glicina en ausencia de glutamato	111
B) Posible interferencia del glutamato	112
C) Cuantificación de glicina en presencia de altas concentra- ciones de glutamato	116
VIII.1.2. Determinación de las condiciones óptimas para la medición de la actividad.	119
A) Efecto de distintas concentra- ciones de sustrato	120
B) Variación en la concentración de proteína	122
C) Efecto del tiempo de incubación	123
VIII.1.3. Propiedades y caracterización de la L-glutamato:glioxalato transami- nasa	124
A) Efecto del fraccionamiento salino	124
B) Cinética de la reacción	125
VIII.2. Estudios comparativos entre la L-glutamato:DOVA y L-glutamato:glioxalato transaminasas	131
VIII.2.1. Cromatografía por tamices moleculares	131

VIII.2.2. Estudios de competencia por
sustratos

133

Sabiendo que las transaminasas pueden o no ser bastante específicas para un dado par de sustratos y teniendo en cuenta la posibilidad sugerida por algunos investigadores (115-117, 119) de que la enzima capaz de transaminar *in vitro* el DOVA en ALA fuese la misma que *in vivo* convierte el glioxalato en glicina (Figura 47), nos interesó en primer lugar, caracterizar la L-glutamato:glioxalato transaminasa (glioxalato-T) de *Euglena gracilis* para establecer luego, mediante estudios comparativos, su posible identidad con la DOVA-T de esta misma fuente.



glioxalato + L-glutamato \longrightarrow glicina + 2-cetoglutarato

FIGURA 47: Reacción catalizada por la L-glutamato:glioxalato transaminasa

VIII.1. L-GLUTAMATO:GLIOXALATO TRANSAMINASA

La reacción catalizada por la L-glutamato:glioxalato transaminasa rinde como productos 2-cetoglutarato y glicina. Para analizar el comportamiento de esta enzima, cuya actividad se evaluó determinando la cantidad de glicina formada, en primer lugar debimos adaptar un método de cuantificación de este aminoácido a nuestras necesidades experimentales; para establecer luego las condiciones óptimas a utilizar en la medición de actividad y así poder proceder finalmente a caracterizar la proteína, fundamentalmente desde el punto de vista cinético.

VII.1.1. Cuantificación del producto de la reacción

Cuando el ensayo de cuantificación de glicina se emplee para medir actividad de L-glutamato:glioxalato transaminasa, la glicina que es el producto de la reacción estará en presencia de una concentración 10 a 100 veces mayor de L-glutamato. Nuestro objetivo fue ajustar el método de determinación de glicina reportado por Klein y Limer (148) a nuestras condiciones experimentales; los autores en su trabajo original descartan toda posible interferencia por glutamato siempre y cuando se tengan concentraciones similares de ambos aminoácidos.

A) Cuantificación de glicina en ausencia de glutamato: El método de Klein y Linser (148), que consiste en llevar a cabo una reacción cuantitativa entre la glicina y el o-ftaldialdehído (OFDA), ya había sido utilizado por Foley y Beale (115) para evaluar la actividad de glioxalato-T en *Euglena gracilis*, por tal razón comenzamos nuestras experiencias utilizando la adaptación del trabajo original descrita por estos últimos investigadores.

En un tubo de ensayo colocamos 0,9 ml de la solución standard de glicina; 0,35 ml de fosfato de potasio 1 M; 65 µl de hidróxido de potasio 5 M (para ajustar el pH a alrededor de 8) y 0,35 ml de OFDA 100 mM (disuelto en etanol). Se deja reaccionar durante 2 minutos a temperatura ambiente y se adiciona 1,35 ml de etanol acidificado (etanol:ácido sulfúrico en relación 30:5). El derivado coloreado se extrae con 1,35 ml de cloroformo, se separa 1 ml de esta última

fase se agregan 0,2 ml de etanol para evitar posible turbidez. Al cabo de 20 minutos se mide absorbancia a 570 nm. Teniendo en cuenta que este ensayo será utilizado para calcular la concentración de glicina en un sobrenadante que proviene de desproteínizar un sistema enzimático con TCA 10 % en la relación 1:1 (ver Métodos), la solución standard de glicina se preparó en TCA 5%.

Observando la Figura 48, vemos que existe una buena correlación lineal (coeficiente de regresión: $r = 0,99$) entre la absorbancia y concentración de glicina en el rango de 1,0-2,8 mM (esta concentración corresponde a la solución original del aminoácido, sin considerar dilución por reactivos). De la repetición de este ensayo, pudimos ver que si bien el método empleado era preciso ($r: 0,98-1,00$) no mostró buena reproducibilidad, los parámetros de la recta presentaban una desviación del 25 al 30 %, razón por la cual de utilizarlo debería corroborarse en cada experiencia la curva de calibración.

- B) Posible interferencia del glutamato: El glutamato podía interferir en la cuantificación espectrofotométrica de la glicina, debido a su similitud en cuanto a grupos funcionales y a la mayor concentración relativa del mismo en el sistema que nos interesa analizar.

Comenzamos a estudiar la posible interferencia registrando los espectros de absorción de los compuestos coloreados obtenidos al emplear glicina, glutamato y ambos aminoácidos juntos como sustratos de la reacción detallada anteriormente (Figura 49). Previamente se verificó que para la formación del complejo con glutamato se requerían concentraciones de este aminoácido superiores a 20 mM, mientras que para la glicina con 1 mM había sido suficiente.

La glicina formaba con el OFDA un complejo (OFDA-Gli) de color azul violáceo que presentaba un máximo de absorción a 560 nm, mientras que con glutamato, el complejo obtenido (OFDA-Glu) era de color rosa y manifestaba una absorción máxima a 500 nm. En presencia de ambos aminoácidos se originó un derivado de coloración similar al de la glicina, pero con un máximo a 540 nm, y el espectro no correspondía a la suma de los obtenidos con glicina y glutamato separadamente,

sino que mostraba valores de absorbancia significativamente mayores.

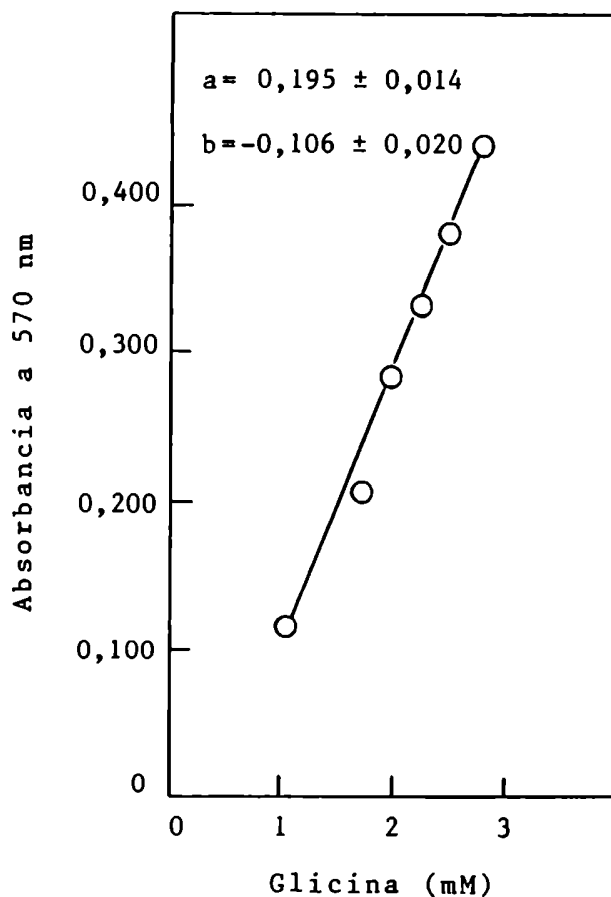


FIGURA 48: Curva de calibración de glicina. La metodología utilizada corresponde a la descrita por Foley y Beale (115). La recta se obtiene por el método de cuadrados mínimos (a: pendiente, b: ordenada al origen).

En consecuencia, el sistema en el cual se hacen reaccionar juntos los dos aminoácidos no puede ser analizado como una mezcla de los complejos que se forman con cada uno de ellos por separado, sino que más bien debe pensarse en la formación de un nuevo complejo (OFDA-Gli-Glu). Considerando que el OFDA posee dos grupos reactivos por molécula con posibilidad de unirse cada uno de ellos a una molécula de aminoácido, es muy probable la existencia del último complejo propuesto.

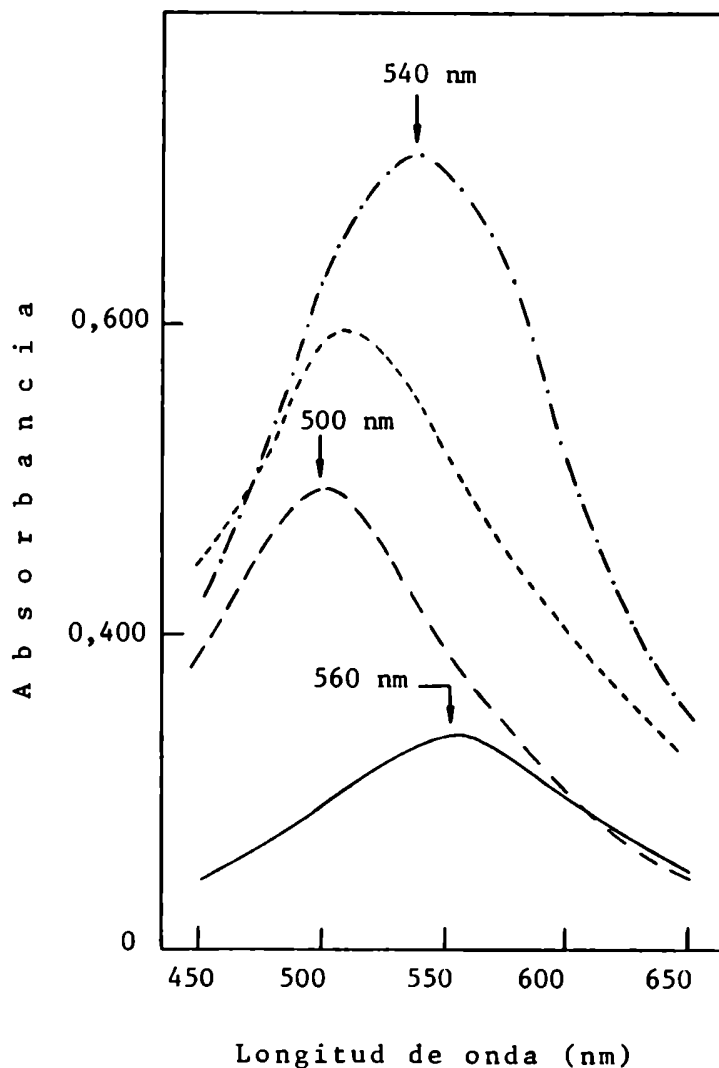


FIGURA 49: Espectros de absorción correspondientes a los complejos coloreados formados por la glicina (—), glutamato (— —) y ambos aminoácidos (-·-·-), al reaccionar con OFDA. (---) Representa la suma aritmética de los espectros de la glicina (—) y glutamato (— —) actuando separadamente. Las soluciones de glicina (1,75 mM) y glutamato (150 mM) se prepararon en TCA al 5 %.

Los resultados que se muestran en la Figura 50 estarían en concordancia con la formación de un nuevo producto y además ponen de manifiesto el efecto de distintas concentraciones de glutamato sobre la reacción de cuantificación de la glicina. Restando la absorbancia aportada por el glutamato a la obtenida en presencia de ambos aminoácidos, no se

obtiene la correspondiente a la glicina sola, sino que resultan valores de alrededor de 5 a 3 veces mayores dependiendo de la cantidad de glutamato. El efecto potenciador del glutamato, inversamente relacionado con su concentración podría deberse a una competencia por el OFDA entre ambos aminoácidos. A altas concentraciones de glutamato se vería favorecida la formación del complejo OFDA-Glu disminuyendo la disponibilidad del reactivo para formar OFDA-Gli-Glu.

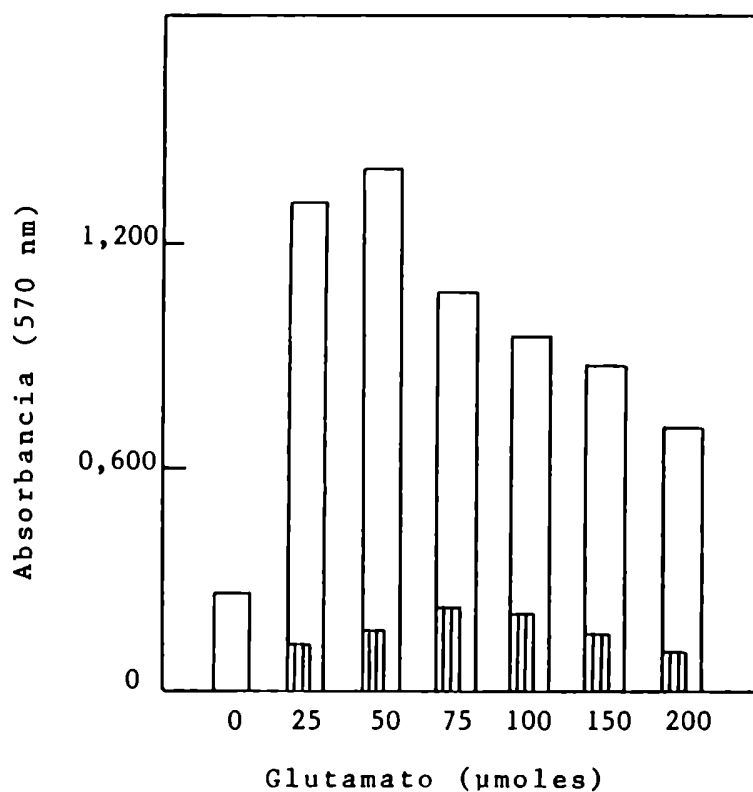


FIGURA 50: Efecto de distintas cantidades de glutamato sobre la cuantificación de glicina. Las distintas barras corresponden a las absorbancias a 570 nm de los complejos coloreados formados por: (□) glicina (1,75 moles) + glutamato y (▨) glutamato (las cantidades de este último aminoácido son variables y corresponden a los indicados en abscisas).

Establecida la interferencia del glutamato, nuestro objetivo fue modificar el sistema de medición descrito anteriormente de forma tal de asegurar que toda la glicina estuviese como complejo OFDA-Gli-Glu a través del cual se lograría su cuantificación. Para ello, volvimos al trabajo original

reportado por Klein y Linser (148) y en base al mismo tratamos de establecer las modificaciones a realizar. Cabe aclarar que este último trabajo además de descartar la interferencia por glutamato, debido a la fecha de su publicación, no especifica por ejemplo la concentración de OFDA, ya que este compuesto era sintetizado como una fracción proveniente de destilación; tampoco se sabe en qué proporción de etanol:agua se encontraba disuelto, lo cual podía modificar considerablemente la miscibilidad de las fases; estos y otros parámetros fueron variados en diferentes ensayos, de los cuáles surge como óptimo el sistema descrito en el próximo ítem.

- C) Cuantificación de glicina en presencia de altas concentraciones de glutamato: Trabajando con concentraciones de glicina comprendidas entre 1 y 3 mM y variando la concentración de glutamato desde 25 hasta 75 mM, observamos que con el sistema que detallamos a continuación se podría convertir cuantitativamente toda la glicina en el complejo OFDA-Gli-Glu, sin que se manifestara competencia del glutamato por el reactivo colorimétrico.

En un tubo de ensayo colocamos 1 ml de la solución que contiene los aminoácidos (glicina y glutamato); 0,4 ml de buffer fosfato de sodio 1 M pH 8,0; 0,1 ml de hidróxido de sodio 3 N (para ajustar el pH a alrededor de 7) y 0,35 ml de OFDA 150 mM disuelto en etanol:agua (2:1). Se deja reaccionar durante 2 minutos a temperatura ambiente y se adiciona 2,5 ml de etanol acidificado (etanol:ácido sulfúrico en relación 30:5). El derivado coloreado se extrae con 2 ml de cloroformo, se separa 1 ml de esta última fase y se agrega 0,2 ml de etanol. Al cabo de 20 minutos el complejo coloreado se cuantifica espectrofotométricamente.

Tomando la absorbancia a 540 nm (longitud de onda de máxima absorción) como parámetro proporcional a la concentración de glicina, observamos mala reproducibilidad en el método de cuantificación. Trabajando con duplicados y triplicados era muy difícil obtener valores comparables.

Dado que en la técnica utilizada había una extracción con cloroformo del complejo formado en fase acuosa, pensamos que una posible turbidez de la fase orgánica podía ser un factor que justificara en parte la mala reproducibilidad

del método. Si bien el agregado de etanol a la fase cloro-fórmica antes de la lectura espectrofotométrica tenía por objeto eliminar esta interferencia, la cantidad de alcohol podría ser insuficiente.

Registrando los espectros de los ensayos que mostraban mala reproducibilidad, pudimos ver que esto obedecía a un desplazamiento de la curva hacia mayores o menores valores de absorbancia, por variación de la línea de base. Con el objeto de delimitar en cuanto a longitudes de onda la banda de absorción del complejo formado, graficamos la derivada primera del espectro. Cuando la derivada primera vale cero, la longitud de onda correspondiente es la de máxima absorción; mientras que las longitudes de onda de los puntos de inflexión acotan el intervalo en el cual aparece la señal espectral debida al complejo.

Con fines comparativos en la Figura 51 se representan las derivadas primeras de los espectros correspondientes a los complejos formados entre el OFDA y la glicina y/o glutamato. Dicha representación se correlaciona y exalta las variaciones espectrales observadas anteriormente (Figura 49). Para el derivado que nos interesa, OFDA-Gli-Glu, la banda de absorción comienza a 480 nm, aparece el máximo a 540 nm y finaliza a los 600 nm. Por analogía con la fórmula de corrección propuesta, frente a situaciones similares de interferencia, por Rimington y Sveinsson (157) para cuantificar porfirinas y por Allen (158) para determinar esteroides, analizamos qué tipo de relación existía entre la concentración de glicina y el valor de absorbancia obtenido a partir de la siguiente ecuación:

$$A_c = 2 A_{\max} - (A_{600} + A_{480})$$

donde A_c representa la absorbancia corregida; A_{\max} es el máximo valor de absorbancia que aparece aproximadamente a 540 nm (se busca entre 530 y 550 nm) y obviamente A_{600} y A_{480} corresponden a los valores de absorbancia medidos a 600 y 480 nm respectivamente.

Graficando la absorbancia corregida en función de la concentración de glicina (Figura 52) se observa una muy buena correlación lineal entre ambos parámetros ($r: 0,98-1,00$), mejoró considerablemente la reproducibilidad del ensayo y se

obtuvieron rectas casi superponibles para concentraciones de glutamato variables entre 25 y 75 mM (a 100 mM se hace evidente la competencia por el OFDA).

Comparando con la medición de absorbancia únicamente a 540 nm, la sensibilidad del método aumentó casi 3 veces y disminuyó considerablemente la dispersión de los datos.

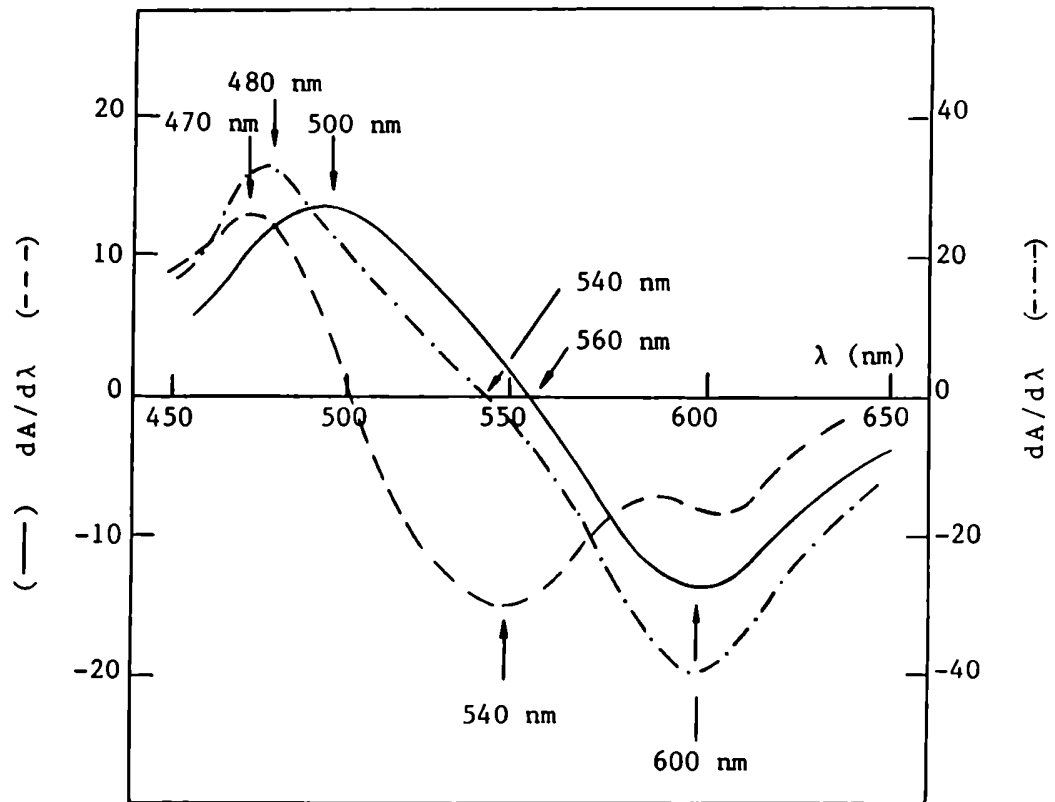


FIGURA 51: Derivada primera ($dA/d\lambda$) de los espectros de absorción correspondientes a los complejos coloreados formados por la glicina (—), glutamato (---) y ambos (-.-) con el OFDA.

Finalmente, aplicando tratamiento estadístico a los parámetros de las rectas de la Figura 52 se obtiene como valor más probable para la pendiente $0,178 \pm 0,011$ y para la ordenada al origen $0,123 \pm 0,043$; resultando para la formación del complejo OFDA-Gli-Glu un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $7,0 \times 10^2 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Queda así establecido el método de cuantificación de glicina que nos permitió medir actividad de L-glutamato:glioxalato transaminasa.

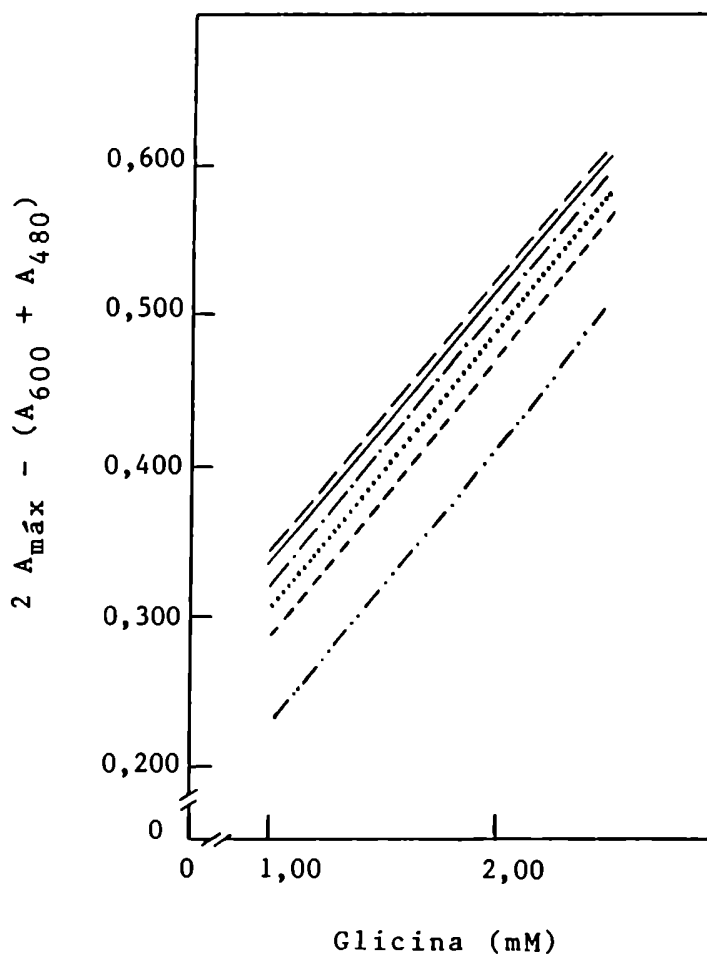


FIGURA 52: Cuantificación de glicina en presencia de altas concentraciones de glutamato. Las distintas rectas se obtienen variando la concentración de glicina y manteniendo constante la concentración de glutamato en los siguientes valores: (—) 25 mM; (— —) 30 mM; (- - -) 40 mM; (· · ·) 50 mM; (- - -) 75 mM y (- · · -) 100 mM. Las condiciones experimentales corresponden a las descritas en el texto. Las rectas se ajustan por el método de cuadrados mínimos y cada una corresponde al promedio de 5 a 10 determinaciones.

VIII.1.2. Determinación de las condiciones óptimas para la medición de actividad

La actividad de glioxalato-T en *Euglena gracilis* fue medida anteriormente por Foley y Beale (115), pero el método

que utilizó para determinar la cantidad de glicina (148) no consideraba la notable interferencia aportada por el glutamato presente en el sistema. Nosotros logramos corregir dicha cuantificación y establecimos las condiciones óptimas a emplear en la medición de actividad de esta enzima.

A) Efecto de distintas concentraciones de sustrato

- Concentración óptima de glioxalato: Empleando el sobrenadante S proveniente de células cultivadas en oscuridad hasta fase exponencial tardía, se midió actividad de glioxalato-T variando la concentración de glioxalato y manteniendo constante la de L-glutamato (Figura 53). La actividad óptima se alcanza al utilizar concentraciones de glioxalato comprendidas entre 10 y 20 mM; concentraciones más altas producían una marcada inhibición.

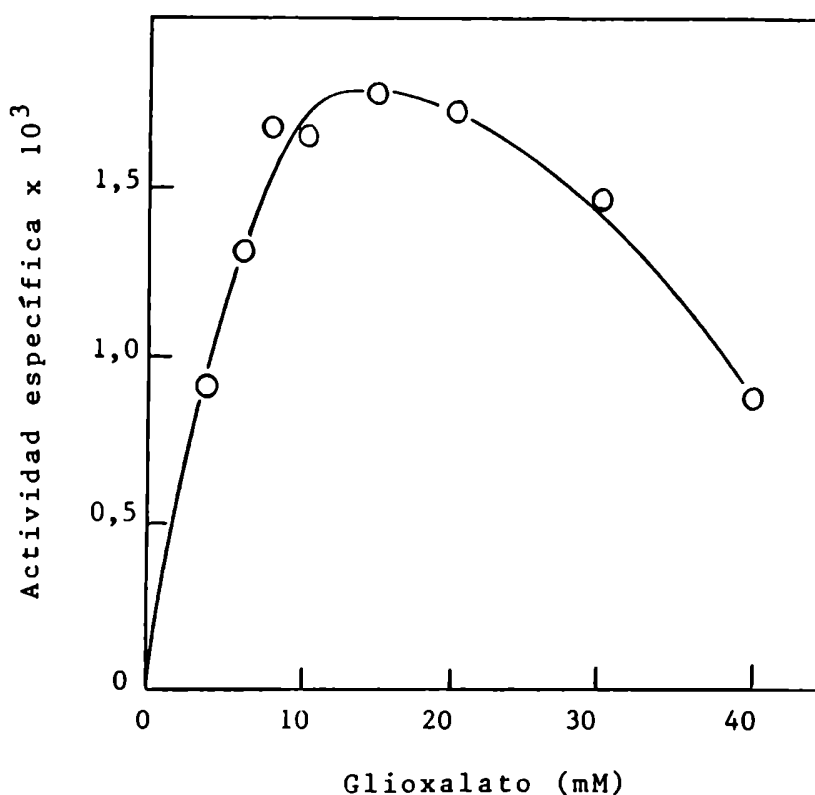


FIGURA 53: Efecto de distintas concentraciones de glioxalato sobre la actividad de glioxalato-T. Se mide actividad de la manera descrita en Métodos, empleando el sobrenadante S como extracto enzimático, L-glutamato a una concentración constante (166,67 mM) y distintas concentraciones de glioxalato.

- Especificidad por el aminoácido: Al estudiar la actividad de glioxalato-T en presencia de distintos aminoácidos, encontramos que la mayor parte de ellos interfería en la cuantificación del producto de la reacción, originando complejos con diferente coloración y señal espectral. Sólo la alanina y el glutamato, que según trabajos anteriores eran los amino-donores más probables, pudieron ser evaluados empleando el sistema de determinación de glicina descrito anteriormente. En base a los valores de actividad obtenidos (Tabla 11) el L-glutamato resultó ser de los dos aminoácidos ensayados, el mejor sustrato para la reacción, observándose además un requerimiento absoluto por el agregado del mismo.

TABLA 11: Actividad de glioxalato-T empleando L-alanina o L-glutamato como sustratos amino-donores.

AMINOACIDO UTILIZADO (mM)	ACTIVIDAD (%)
Ninguno	0
L-Glutamato 50	61
100	100
L-Alanina 50	6
100	10

El 100 % de actividad corresponde al valor más alto obtenido. La medición de actividad se realizó de la manera descrita en Métodos, empleando una concentración de glioxalato 20 mM.

- Concentración óptima de L-glutamato: Utilizando como extracto enzimático el sobrenadante S y la concentración óptima de glioxalato (20 mM) medimos actividad de glioxalato-T en función de distintas cantidades de L-glutamato (Figura 54). De acuerdo con los valores obtenidos la concentración óptima de este sustrato se establece entre 150 y 200 mM.

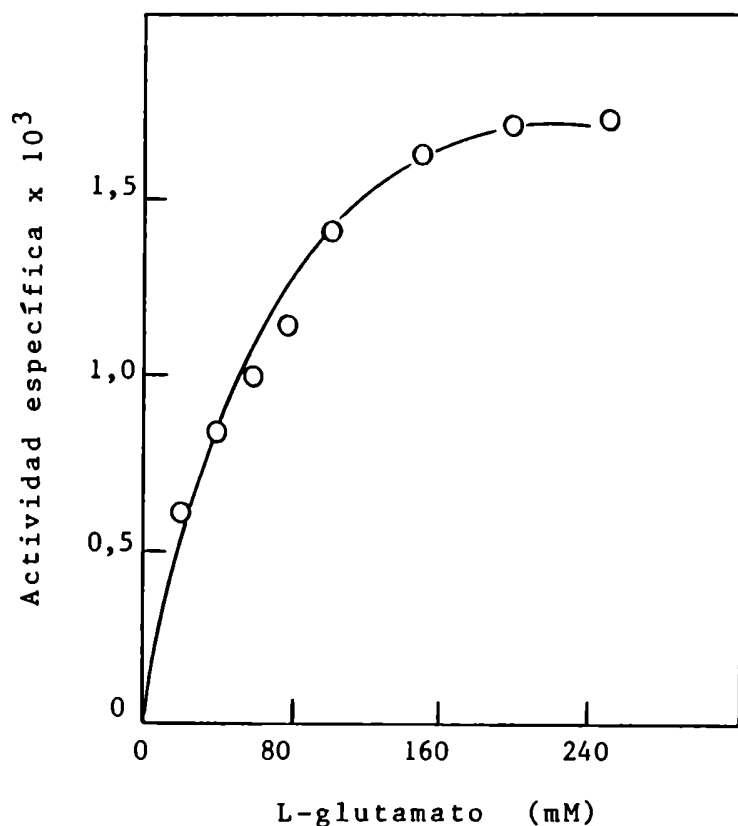


FIGURA 54: Efecto de distintas concentraciones de L-glutamato sobre la actividad de glioxalato-T. Se mide actividad de la manera descrita en Métodos, empleando el sobrenadante S como extracto enzimático, glioxalato a una concentración de 20 mM y cantidades variables de L-glutamato.

- B) Variación en la concentración de proteína: Empleando como extracto enzimático el sobrenadante S proveniente de células crecidas en oscuridad, una concentración de glioxalato 20 mM y de L-glutamato 166,67 mM, medimos formación de glicina al variar la cantidad de proteína (Figura 55). Al utilizar concentraciones de 2,0 a 5,1 mg/ml los valores de

actividad se ajustaron a una recta, lo que significa que la actividad específica, representada por la pendiente de la misma, permanece constante.

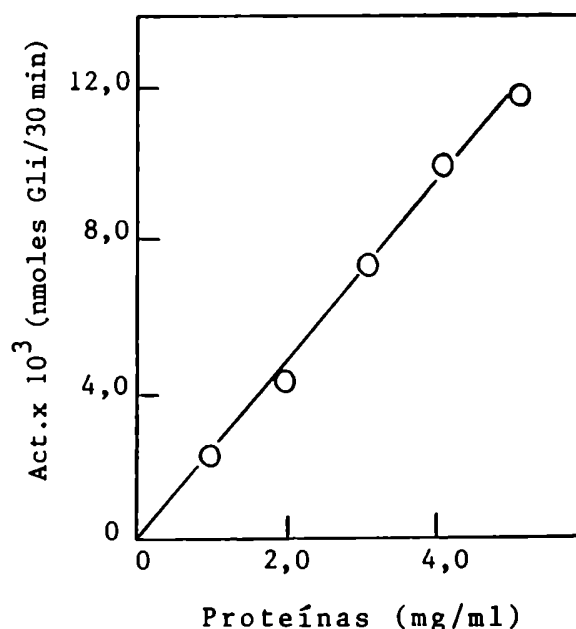


FIGURA 55: Efecto de distintas concentraciones de proteína sobre la actividad de glioxalato-T. La medición de actividad se efectuó de la manera descrita en Métodos.

- C) Efecto del tiempo de incubación: A continuación, en presencia de una concentración óptima de ambos sustratos, analizamos el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de glioxalato-T presente en el sobrenadante S (Figura 56). Incubando entre 0 y 90 minutos observamos que la velocidad de formación de producto no se modifica dentro de este intervalo. En base a estos resultados se establece como tiempo standard de incubación 30 minutos, ya que la cantidad de glicina sintetizada en este lapso es suficiente para su correcta cuantificación.

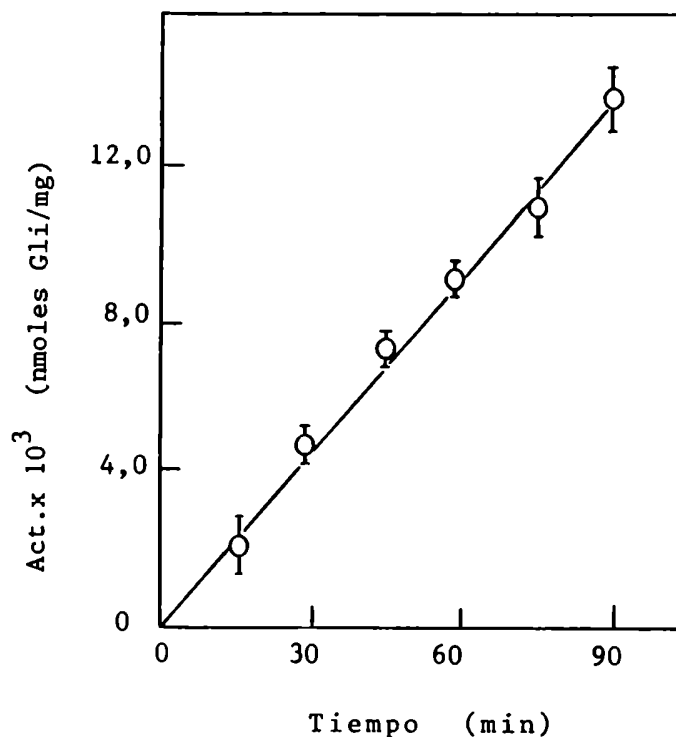


FIGURA 56: Variación de la actividad de glioxalato-T en función del tiempo de incubación. La medición de actividad se efectuó de la manera descrita en Métodos. (Glioxalato) = 20 mM, (L-glutamato) = 166,67 mM.

VIII.1.3. Propiedades y caracterización de la L-glutamato:glioxalato transaminasa

- A) Efecto del fraccionamiento salino: Teniendo en cuenta que las experiencias para la caracterización de la DOVA-T se llevaron a cabo empleando como extracto enzimático la proteína que precipita en el rango 40-75 % de saturación con sulfato de amonio (Fracción E), con fines comparativos analizamos el efecto del fraccionamiento salino sobre la actividad de glioxalato-T (Tabla 12). Precipitando en los rangos 0-40, 40-75 y 75-90 % (de este último intervalo no se muestran resultados puesto que no precipitó proteína) observamos que alrededor del 70 % de la actividad de glioxalato-T, con un grado de purificación de casi 3 veces, se

concentra en la fracción que precipita en el intervalo 40-75 % de saturación.

TABLA 12: Efecto del fraccionamiento con sulfato de amonio sobre la actividad de glioxalato-T

FRACCION	PROTEINAS (mg)	ACTIVIDAD (UE x 10 ³)	ACT. ESP. (UE x 10 ³ /mg)	REND. (%)	PURIF.
Sobrenadante S	505	941	1,87	100	1,0
SO ₄ (NH ₄) ₂					
0-40 %	198	52	0,26	6	0,1
40-75 %	119	622	5,23	66	2,8

El sobrenadante S se fracciona con sulfato de amonio, la proteína precipitada en los distintos rangos se resuspende en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4; se desala a través de una columna de Sephadex G-25 y se mide actividad de la manera descrita en métodos.

B) Cinética de la reacción:

- Estudios de velocidades iniciales: En la reacción de la glioxalato-T intervienen dos sustratos (A: L-glutamato y B: glioxalato) y se generan dos productos (P: 2-cetoglutarato y Q: glicina). Los gráficos de dobles recíprocos (Figuras 57 y 58) mostraron para esta enzima, al igual que para la DOVA-T, un modelo de velocidades iniciales paralelo, correspondiente a un mecanismo ping-pong, característico de las transaminasas (Figura 59).

Observando los valores de K_a y K_b vemos que, independientemente del extracto enzimático utilizado, la constante de afinidad del glioxalato es siempre menor a la del L-glutamato.

Los gráficos de Hill (Figura 60) corroboran para esta enzima una cinética michaeliana, indicando la presencia de un sólo tipo (o población) de sitios de unión para cada

sustrato. Este comportamiento difiere del reportado anteriormente para la glioxalato-T de esta misma fuente (115) ya que no se habían podido obtener gráficos de dobles recíprocas lineales.

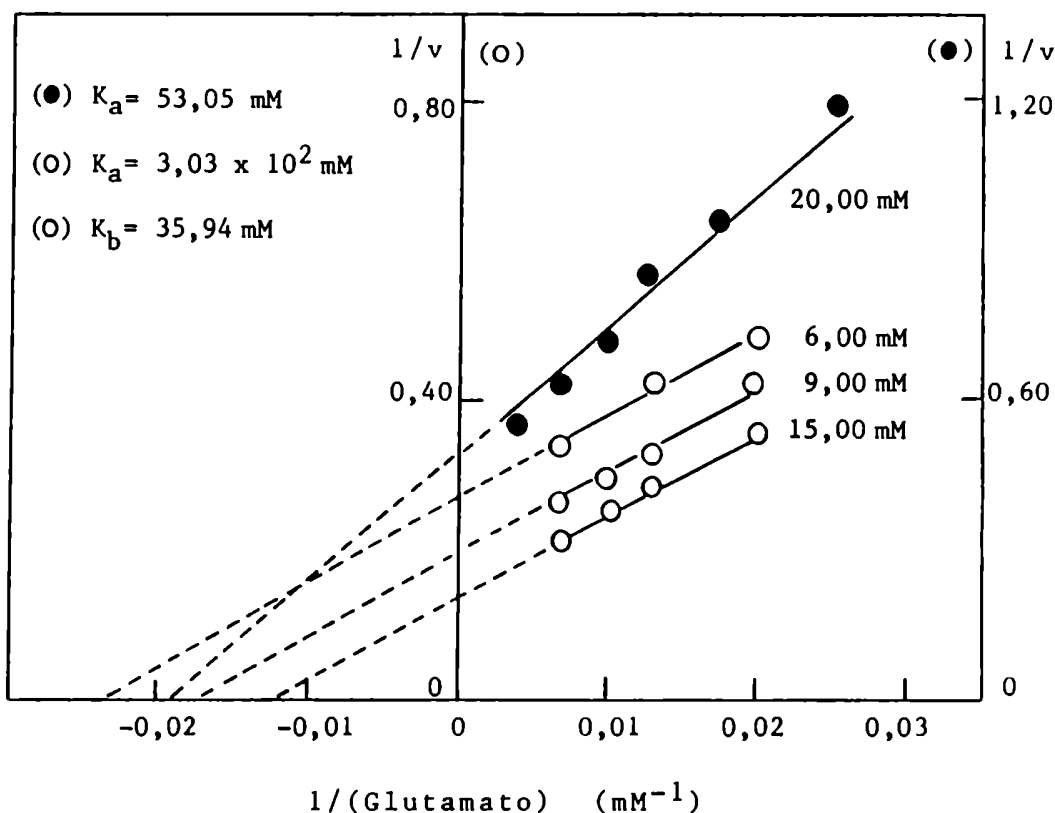


FIGURA 57: Gráficos de Lineweaver-Burk para el L-glutamato como sustrato variable y el glioxalato como sustrato fijo.

Se midió actividad de glioxalato-T de la manera descrita en Métodos, empleando como extracto enzimático la fracción E (○) o el sobrenadante S (●). El ajuste de las rectas se efectuó por el método de cuadrados mínimos.

v: $\mu\text{moles Gli/30 min. mg}$

- Estudios de inhibición: Sólo investigaremos la inhibición por sustrato y por análogos del sustrato (DOVA).

a) Inhibición por sustrato: Como ya anticipáramos (Figura 53), concentraciones de glioxalato mayores de 20 mM producían una marcada inhibición sobre la actividad de la enzima, mientras que concentraciones de L-glutamato de hasta 300 mM no mostraron efecto inhibitorio.

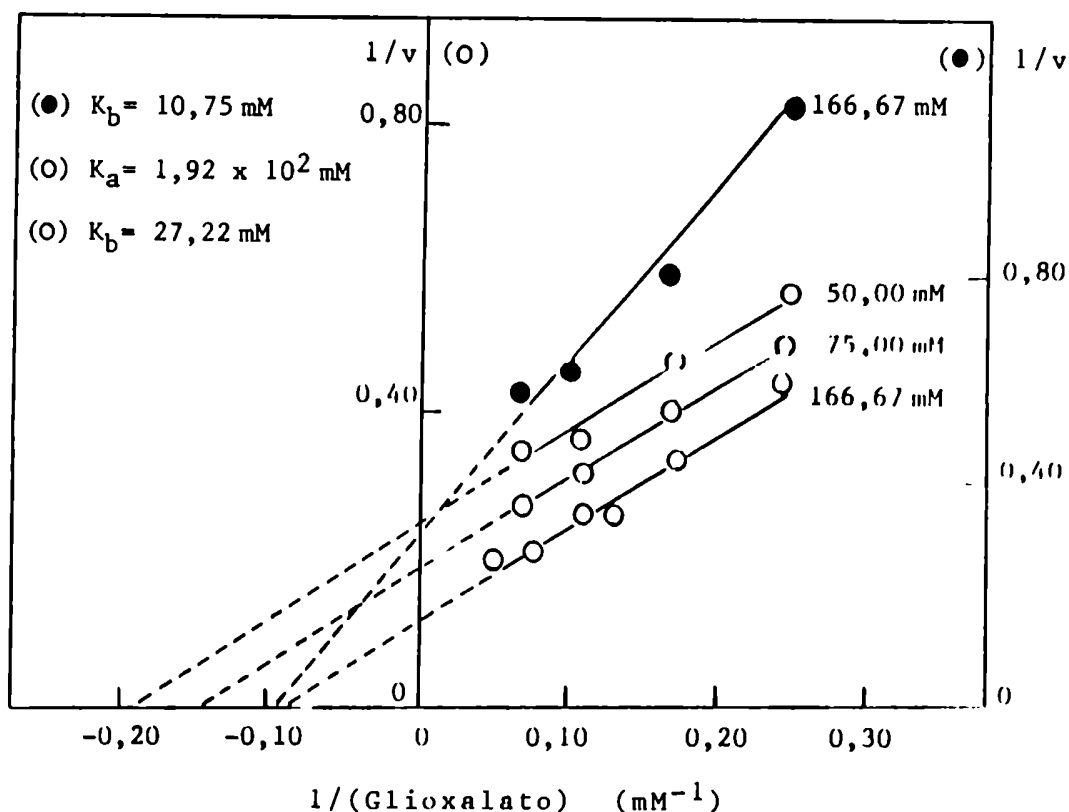


FIGURA 58: Gráficos de Lineweaver-Burk para el glioxalato como sustrato variable y el L-glutamato como sustrato fijo. Se midió actividad de glioxalato-T de la manera habitual, empleando como extractos enzimáticos la fracción E (O) y el sobrenadante S (●). El ajuste de las rectas se efectuó por el método de cuadrados mínimos. v_i $\mu\text{moles GII/30 min. mg}$

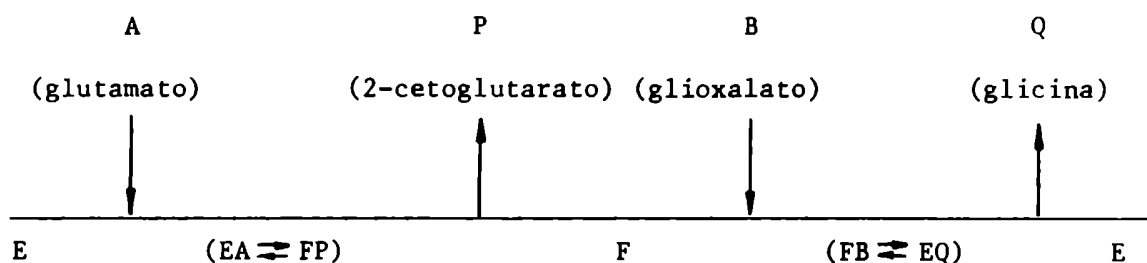


FIGURA 59: Mecanismo de acción de la glioxalato-T. La representación se efectuó según la notación de Cleland (155).

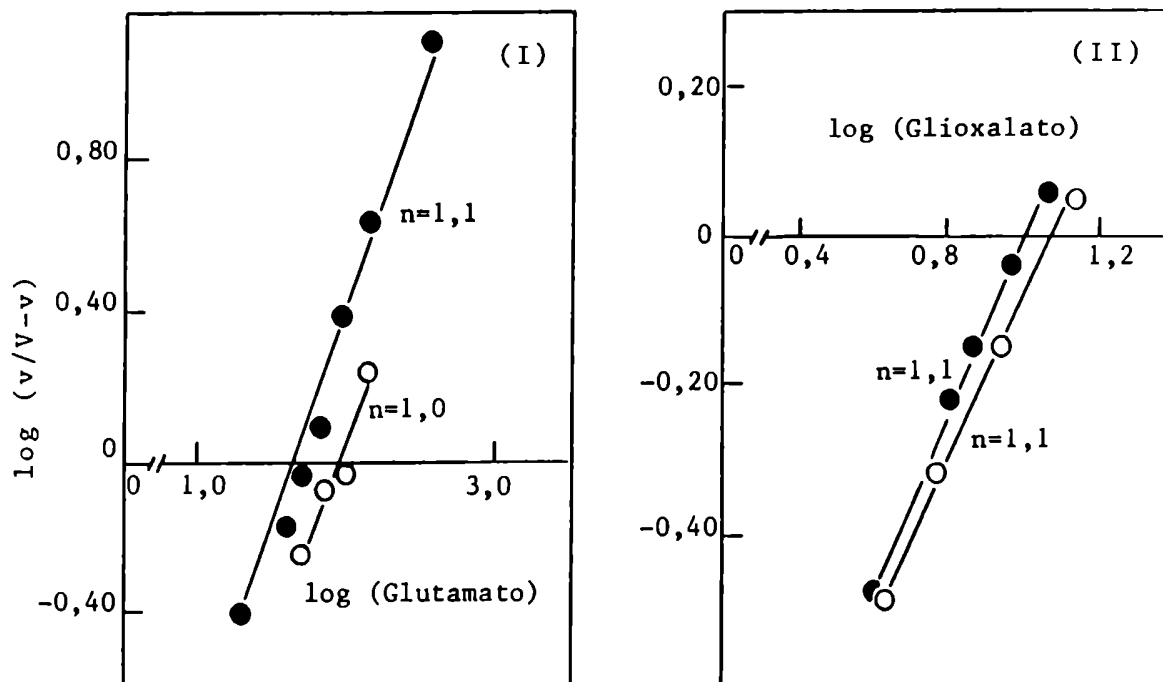
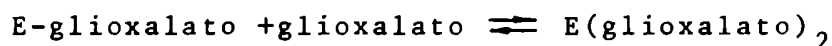
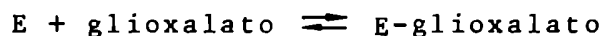


FIGURA 60: Gráficos de Hill para ambos sustratos. Los valores representados corresponden a las velocidades iniciales y velocidad máxima obtenidos para: I) concentraciones variables de L-glutamato y constante de glioxalato (O, ● : 15 mM) y II) concentraciones variables de glioxalato y constante de L-glutamato (O, ● : 166,67 mM). En ambos casos se analizó el comportamiento de la fracción E (O) y sobrenadante S (●).

La inhibición por glioxalato desaparece si se satura con L-glutamato (300 mM). De los gráficos de Dixon (Figura 61) surge que dicha inhibición es de tipo competitiva parabólica, lo que implica la unión de dos moléculas de glioxalato a la forma enzimática E:



Los valores de K_i para la formación del primer complejo (E-glioxalato) fueron 66,50 mM y 38,20 mM, para la enzima presente en el sobrenadante S y la fracción E respectivamente. La inhibición por glioxalato se

manifestó en ambos extractos a concentraciones similares de sustrato.

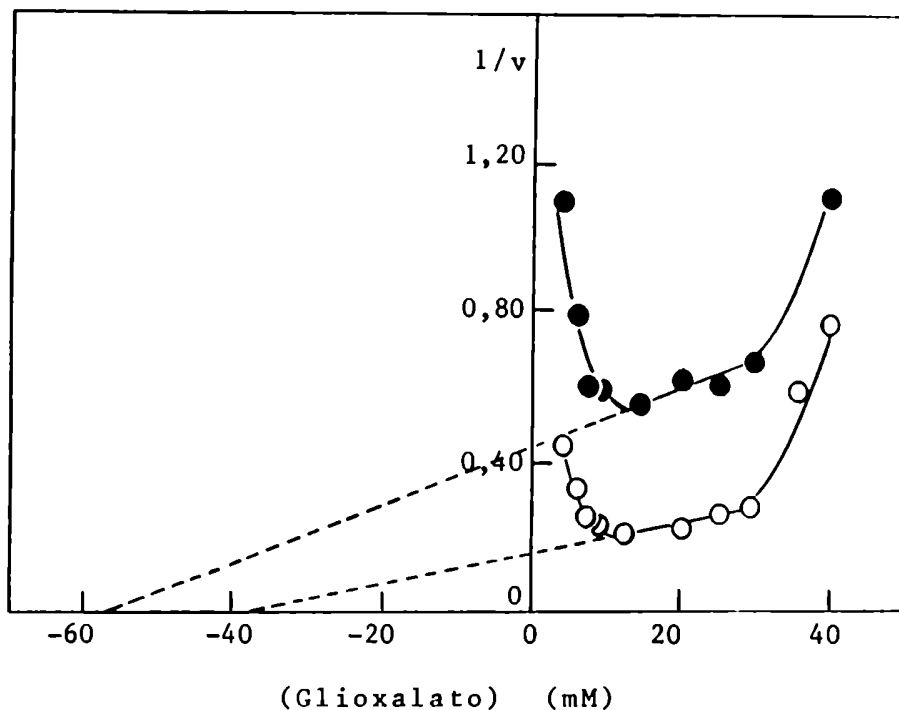
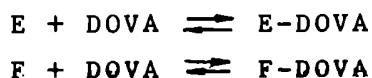


FIGURA 61: Gráficos de Dixon para la inhibición por sustrato (glioxalato). Empleando como extracto enzimático el sobrenadante S (●) y la fracción E (○), se midió actividad de glioxalato-T según Métodos, variando la concentración de glioxalato y manteniendo constante la de L-glutamato (166,67 m). Las rectas se ajustaron por el método de cuadrados mínimos.
v: $\mu\text{moles Gli}/30 \text{ min. mg}$

- b) Inhibición por análogos de sustrato: De todos los posibles análogos del glioxalato, el que nos interesó investigar como inhibidor, obviamente, fue el DOVA. En la Figura 62 se representa el gráfico de inversas ($1/v$ vs $1/(\text{glioxalato})$) obtenido al variar los niveles de DOVA entre 0 y 2,8 mM. El comportamiento observado corresponde a un tipo de inhibición competitiva, lo que indica que el DOVA puede unirse tanto a la forma enzimática E como a la F, dando origen a los siguientes complejos:



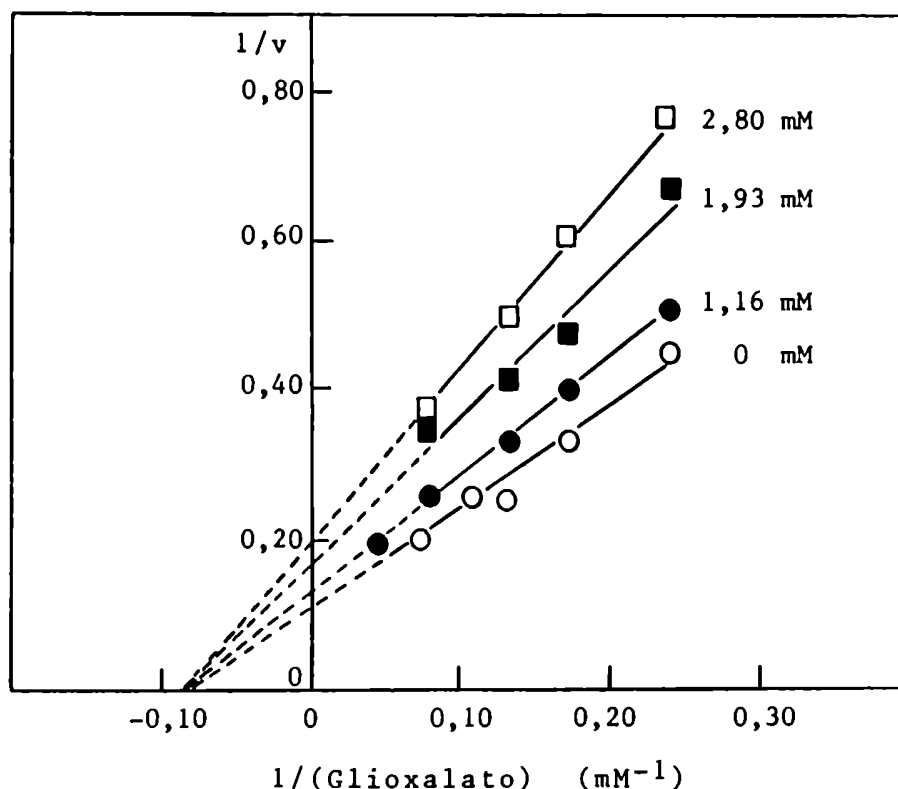


FIGURA 62: Efecto del DOVA sobre la actividad de glioxalato-T.

Empleando la fracción E como extracto proteico se midió actividad de la enzima en presencia de distintas concentraciones de DOVA, manteniendo constante la concentración de L-glutamato (166,67 mM) y variando los niveles de glioxalato. La metodología utilizada corresponde a la descrita en Métodos.
v: μ moles Gli/30 min. mg

Representando las distintas pendientes e intersecciones en función de la concentración del inhibidor (Figura 63), pudimos ver que ambos parámetros varían linealmente con la concentración de DOVA, por lo cual la inhibición no competitiva se denomina lineal. Del mismo gráfico se obtienen las constantes de inhibición correspondientes a la formación de los complejos E-DOVA y F-DOVA, cuyos valores fueron 3,80 mM y 3,15 mM respectivamente. El hecho de que todas las rectas de la Figura 62 se corten en un mismo punto sobre el eje negativo de las abscisas, se debe precisamente a que ambas constantes de inhibición son iguales, pero además está indicando que la unión del inhibidor a la enzima no

modifica la afinidad de la misma por el glioxalato (inhibición no competitiva lineal pura).

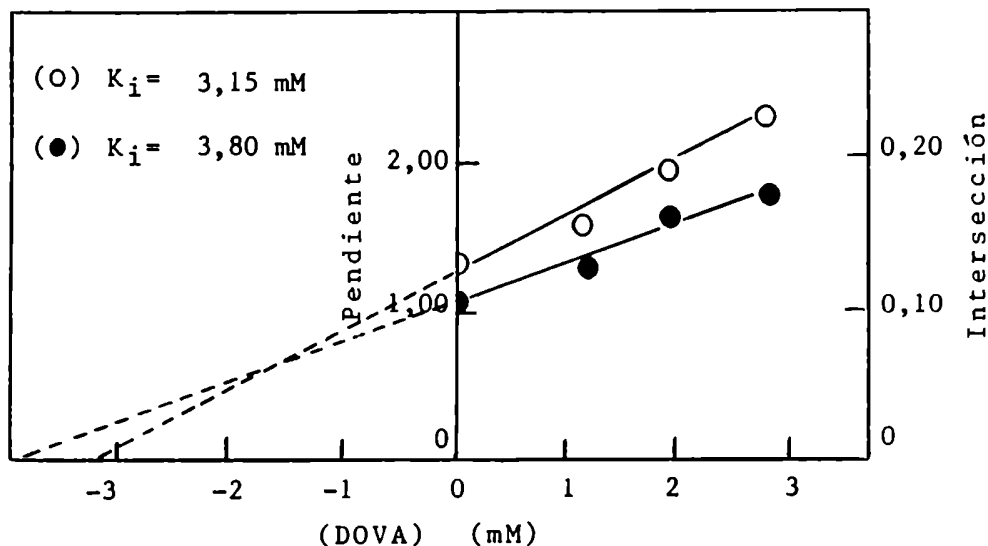


FIGURA 63: Variación de la pendiente (O) e intersección (●) del gráfico de dobles recíprocos (Figura 62) en función de la concentración de inhibidor.

VIII.2. ESTUDIOS COMPARATIVOS ENTRE LA L-GLUTAMATO:DOVA Y L-GLUTAMATO:GLIOXALATO TRANSAMINASAS

VIII.2.1. Cromatografía por tamices moleculares

Establecidas las condiciones óptimas para medir actividad de ambas transaminasa, realizamos una cromatografía de la fracción enzimática E a través de una columna de Sephadex G-150. Observando los perfiles de elución (Figura 64) vemos que la proteína con actividad de glioxalato-T eluye como una banda ancha, semejante a la superposición de dos o más picos, uno de los cuales podría adjudicarse con bastante certeza (P_{e} molecular (PM) = 92.000 ± 3.000), pero el resto de la curva quedaría sin resolver y representaría, según el área, alrededor del 45-50 % de la actividad total. La DOVA-T en cambio, presentó un pico bien definido (PM = 66.000 ± 3.000) y un pequeño hombro, que eluyen conjuntamente con la actividad de glioxalato-T no resuelta y la proteína de PM 92.000, respectivamente.

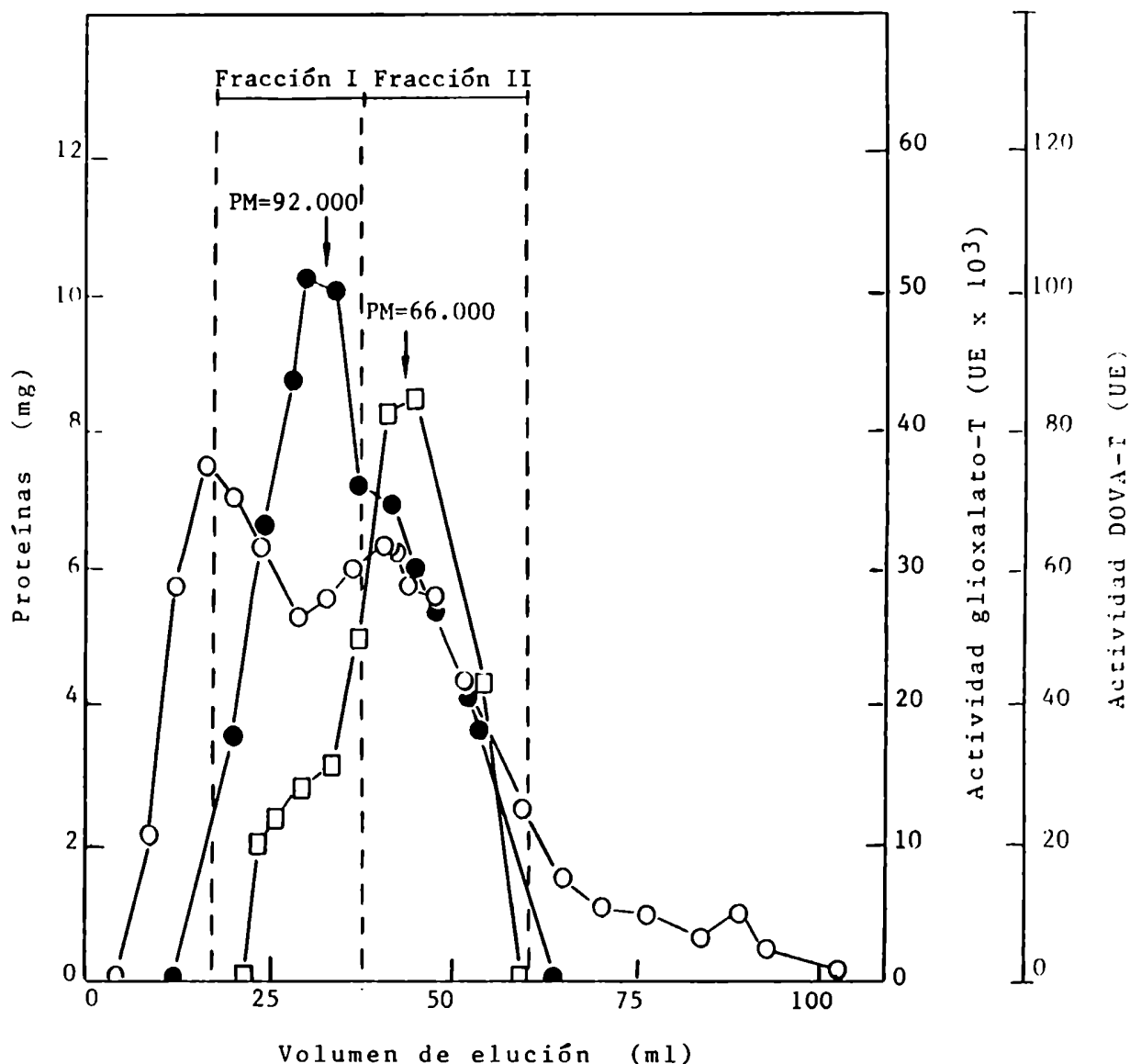


FIGURA 64: Curvas de elución para la DOVA-T y glicoxalato-T de

La fracción enzimática E se resuspendió en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 y se cromatografió a través de una columna de Sephadex G-150. Las distintas curvas representan el perfil de elución de proteínas (O) y actividades de glicoxalato-T (●) y DOVA-T (□). Las condiciones de elución y el resto de la metodología empleada en las diferentes determinaciones, corresponde a la descrita en Métodos. Los pesos moleculares se adjudicaron empleando la curva de calibración representada en la Figura 23.

La curva de elución de la glicoxalato-T era predecible ya que se sabe de la existencia de distintas isoenzimas (119). El perfil obtenido para la DOVA-T estaría indicando que

la misma no forma agregados moleculares ni se disocia en subunidades, además el peso molecular adjudicado concuerda con los reportados por otros autores en distintas fuentes (Tabla 3). Foley y Beale (115) postularon que las reacciones de transaminación del DOVA en ALA y del glioxalato en glicina eran catalizadas por una misma enzima, razón por la cual le atribuyeron a la DOVA-T de *Euglena gracilis* un peso molecular de 98.000 que según nuestros resultados correspondería a la glioxalato-T.

Si la proteína con actividad de ambas transaminasas se reúne en dos fracciones, I y II según se indica en la Figura 64, la distribución de actividades sería:

- Fracción I: 47 % glioxalato-T
18 % DOVA-T
- Fracción II: 53 % glioxalato-T
82 % DOVA-T

Considerando estos valores, es lógico pensar que la fracción I corresponda a una isoenzima de la glioxalato-T que dada la similitud estructural entre el DOVA y el glioxalato, puede presentar además actividad de DOVA-T, mientras que la fracción II estaría constituida por una mezcla de las dos enzimas, o bien por una proteína específica para el DOVA o glioxalato como sustratos. Para esclarecer la composición de esta última fracción se realizaron los estudios de competencia que se describen a continuación.

VIII.2.2. Estudios de competencia por sustratos

Con fines comparativos las experiencias de competencia entre el DOVA y glioxalato como sustratos, se realizaron empleando la fracción E (proteína que precipita en el rango 40-75 % de saturación con sulfato de amonio) y la fracción II (ver Figura 64) como extractos enzimáticos.

Utilizando una concentración fija de L-glutamato, se midió: 1) actividad de glioxalato-T en ausencia de DOVA y 2) actividad de ambas enzimas en presencia de una concentración de DOVA constante y de glioxalato variable (Figura 65). La concentración de DOVA fue la adecuada para asegurar la saturación de la DOVA-T sin que se manifieste la inhibición por sustrato, las concentraciones de glioxalato también se

seleccionaron a fin de evitar este último efecto.

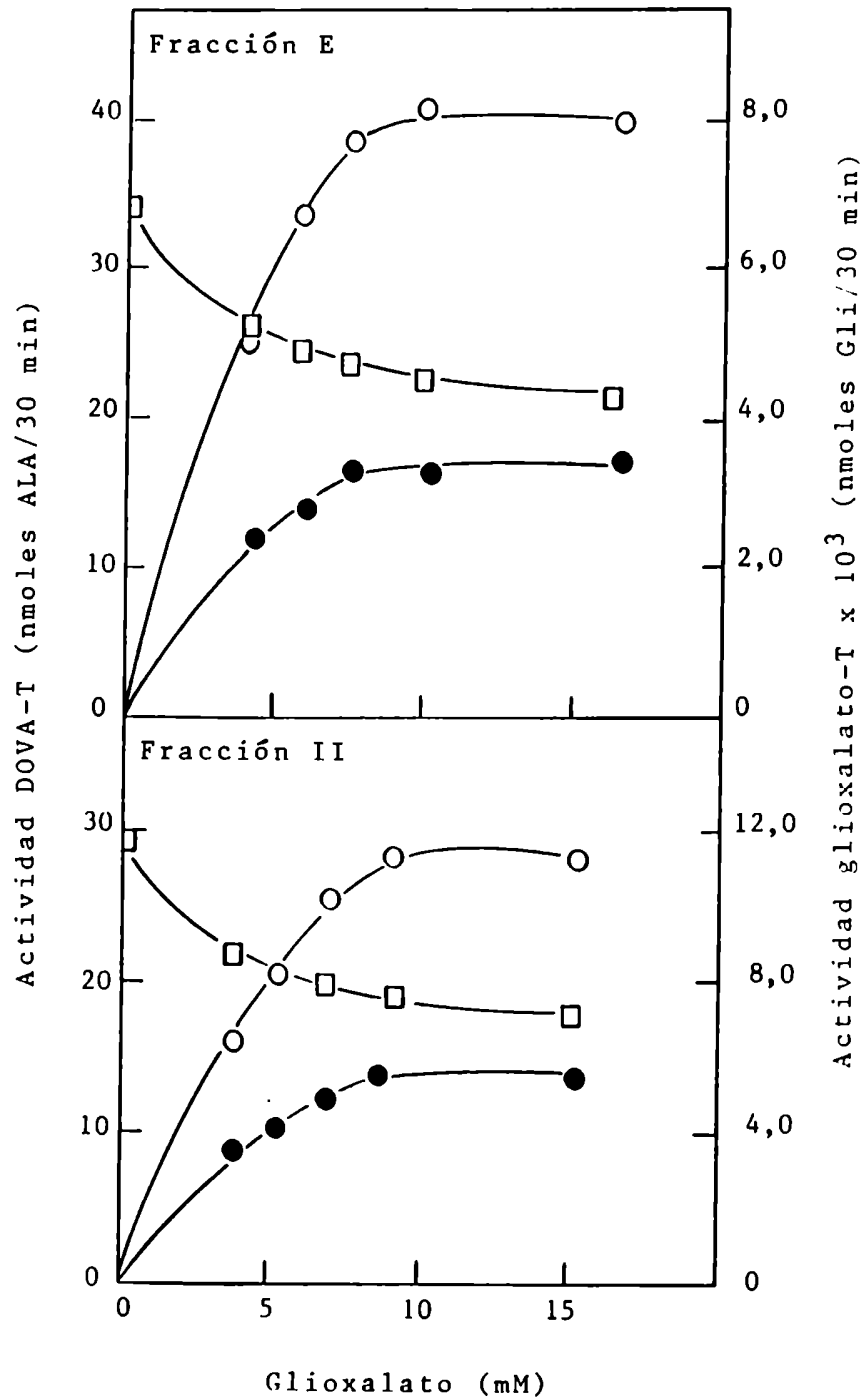


FIGURA 65: Competencia entre el DOVA y glioxalato como sustratos. Empleando las fracciones E y II como extracto enzimático y una concentración fija de L-glutamato (150 mM) se midió: actividad de glioxalato-T en ausencia de DOVA (○) y actividades de glioxalato-T (●) y DOVA-T (□) en presencia de una concentración constante de DOVA (2,80-3,00 mM) y de glioxalato variable. Las determinaciones de actividad se efectuaron de la manera descrita en Métodos.

Los resultados obtenidos corroboran para la fracción E los tipos de inhibición observados al emplear como inhibidores análogos del sustrato (Figuras 43 y 62). Para el caso de la DOVA-T las actividades que se evalúan representan velocidades máximas, sólo dependen de la concentración de enzima. Incrementando los niveles de glioxalato hasta 4 mM la velocidad disminuye un 40 %, manteniéndose luego constante aunque la concentración de glioxalato siga aumentando hasta 16 mM. Este comportamiento concuerda con las variaciones que muestran las ordenadas al origen de las rectas de la Figura 43. Para la glioxalato-T vemos que, concentraciones saturantes de sustrato no son capaces de revertir la inhibición de alrededor del 60% producida por el DOVA. El gráfico de dobles recíprocos (FIGURA 66) corrobora para esta enzima la inhibición no competitiva lineal pura obtenida anteriormente (Figura 62).

La fracción II presentó, para ambas transaminasas, variaciones de actividad análogas a las descritas para la fracción E. Para concentraciones de glioxalato de hasta 4 mM la DOVA-T disminuye su velocidad máxima en un 25 %, este valor no se modifica aunque los niveles de glioxalato se incrementen hasta 15 mM. Para la glioxalato-T, el efecto inhibitorio del DOVA llegó a ser de un 50 %; los gráficos de dobles recíprocos (Figura 66) también indicarían para esta fracción un tipo de inhibición no competitiva.

Estos estudios nos permitirían descartar la posibilidad de que sea una misma enzima la que catalice la transaminación del DOVA en ALA y del glioxalato en glicina.

VIII.3. CONCLUSIONES PARCIALES

A) Para la L-glutamato:glioxalato transaminasa de *Euglena gracilis*:

- Para medir su actividad mediante la cantidad de glicina formada, adaptamos el método de Klein y Linser (148) a nuestras condiciones experimentales.
- Establecimos las condiciones óptimas para evaluar su actividad *in vitro*, empleando el sobrenadante S como extracto

enzimático:

- a) (Glioxalato) entre 10 - 20 mM, valores más altos producen una marcada inhibición.
- b) (L-Glutamato) entre 150 - 200 mM.
- c) Tiempo de incubación: 30 minutos, obteniéndose velocidad de formación de producto constante en todo el intervalo ensayado (0 - 90 minutos).
- d) Concentración de proteína entre 2 - 5 mg/ml, en este rango la actividad específica no varía.

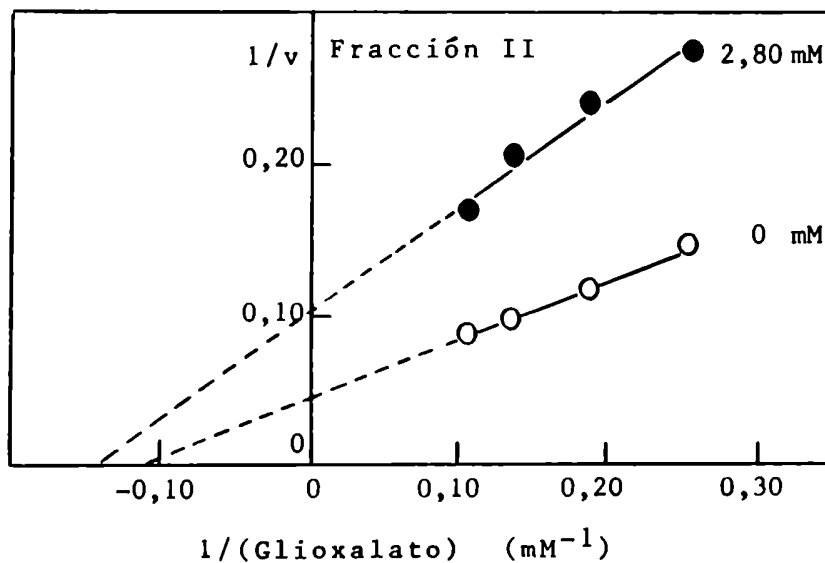
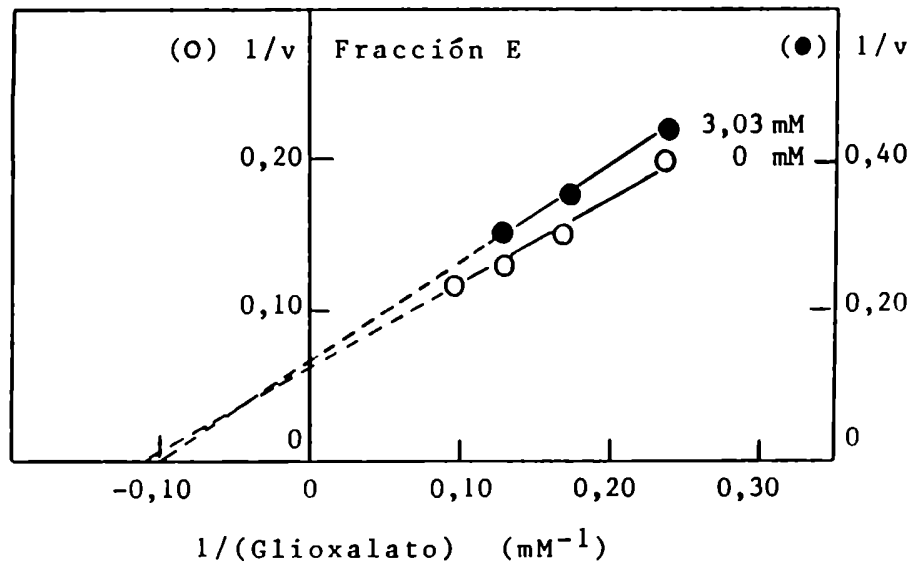
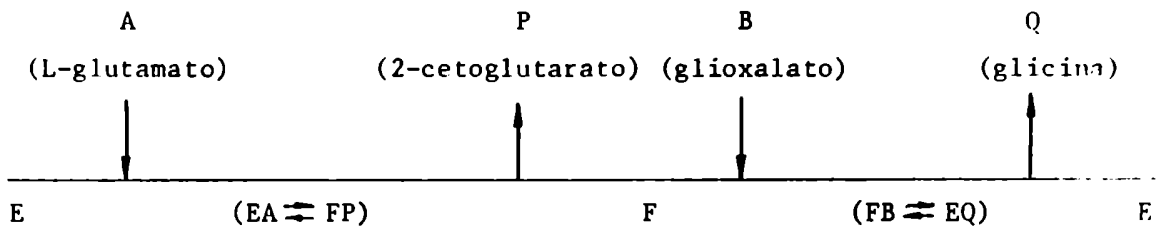


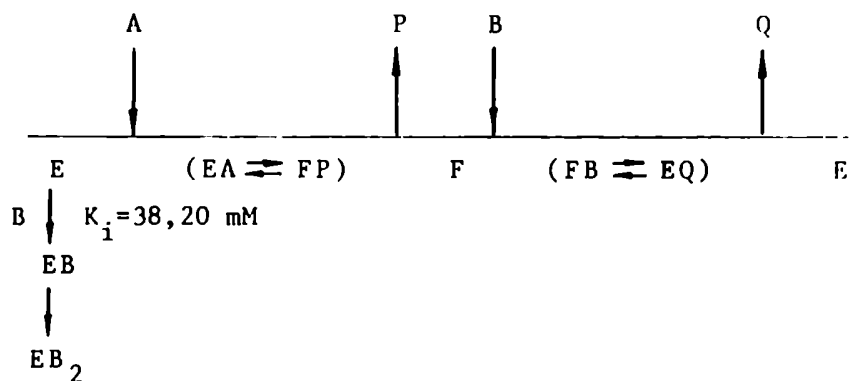
FIGURA 66: Gráfico de dobles recíprocas para la actividad de glioxalato-T evaluada en los estudios de competencia representados en la Figura 65.
 v: $\mu\text{moles Gli}/30 \text{ min.}$

- Observamos que alrededor del 70 % de la enzima precipita, con un grado de purificación de casi 3 veces, en el intervalo 40 - 75 % de saturación con sulfato de amonio (Fracción E).
- A través de los estudios de velocidades iniciales, confirmamos un mecanismo cinético tipo ping-pong, cuya representación sería:



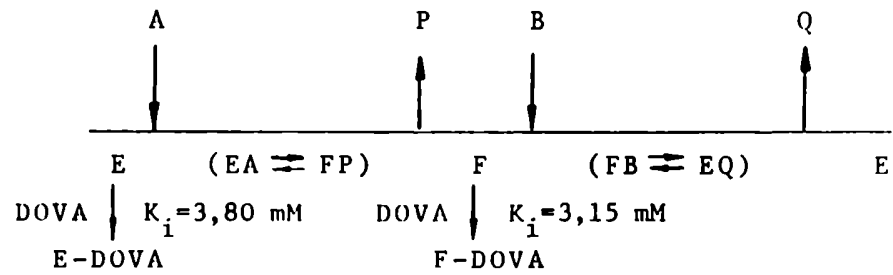
Los valores de las constantes de afinidad para el L-glutamato (K_a) y glioxalato (K_b) fueron $2,48 \times 10^2$ mM y 31,58 mM respectivamente.

- Analizando el efecto de distintos inhibidores observamos que:
 - a) Concentraciones de glioxalato mayores de 20 mM producen una inhibición competitiva parabólica, debido a la formación de complejos dead-end con la forma enzimática E:



- b) Concentraciones de DOVA entre 1 y 2,8 mM producen una inhibición no competitiva lineal pura, lo que indica que el DOVA puede unirse tanto a la forma enzimática E como a la F, con iguales valores para las constantes de inhibición correspondientes a la formación de los complejos E-DOVA y F-DOVA, y sin modificar la afinidad

de la enzima por el glioxalato.



B) De un estudio comparativo entre la L-glutamato:DOVA y L-glutamato:glioxalato transaminasas, observamos que:

- Mediante la cromatografía por Sephadex G-150 de la proteína que precipita en el rango 40 - 75 % de saturación con sulfato de amonio, la actividad de ambas transaminasas se distribuyó en dos fracciones, de la siguiente forma:

Fracción I: 47 % glioxalato-T (PM 92.000 ± 3.000)
18 % DOVA-T

Fracción II: 53 % glioxalato-T
82 % DOVA-T (PM 66.000 ± 3.000)

- Mientras que la actividad observada en la fracción I se atribuye a una isoenzima de la glioxalato-T, para la fracción II, estudios de competencia entre el DOVA-T y glioxalato como sustratos, demostraron que ambas actividades se identificarían con dos enzimas diferentes.

CAPITULO IX

CONCLUSIONES FINALES

Página

139

Respecto a la participación del ácido 4,5-dioxovalé-rico como intermediario en la vía de síntesis de ALA que utiliza precursores de 5 átomos de carbono, empleando *Euglena gracilis* como fuente experimental:

- Se detectó *in vitro* la presencia de una transaminasa capaz de convertir el DOVA en ALA (DOVA-T), cuya actividad se estimulaba al inducir la síntesis de clorofila y era siempre mayor (alrededor de 10 a 15 veces) a la del ALA-S.
- Teniendo en cuenta la similitud estructural entre el DOVA y glioxalato, se llevaron a cabo estudios comparativos de propiedades y caracterización para las transaminasas capaces de convertir el DOVA en ALA y el glioxalato en glicina (glioxalato-T), ya que existía la posibilidad de que ambas reacciones sean catalizadas por la misma enzima. A continuación se resumen los resultados obtenidos:

ESTUDIOS REALIZADOS	DOVA-T	GLIOXALATO-T
Concentración óptima de cetoácido	(DOVA) entre 4,0-5,5 mM; valores más altos producen inhibición.	(Glioxalato) entre 10-20 mM, valores más altos producen inhibición.
Concentración óptima de aminoácido	(Glutamato) entre 150-200 mM	(Glutamato) entre 150-200 mM
Actividad medida en ausencia de aminoácido agregado*.	70 % de la actividad óptima medida con ambos sustratos a saturación.	0 % de la actividad óptima medida con ambos sustratos a saturación.
Efecto del tiempo de incubación	Velocidad de formación de producto constante hasta los 45 minutos Tiempo standard de incubación: 30 minutos	Velocidad de formación de producto constante en todo el intervalo ensayado (0-90 minutos). Tiempo standard de incubación: 30 minutos.
Efecto de la concentración de proteínas	Rango ensayado: 2-10 mg/ml dentro del cual la actividad específica permanece constante: 5,66 nmoles ALA/30 minutos.mg proteína	Rango ensayado: 2-5 mg/ml dentro del cual la actividad específica permanece constante: 2,04 moles glicina/30 minutos.mg proteína.

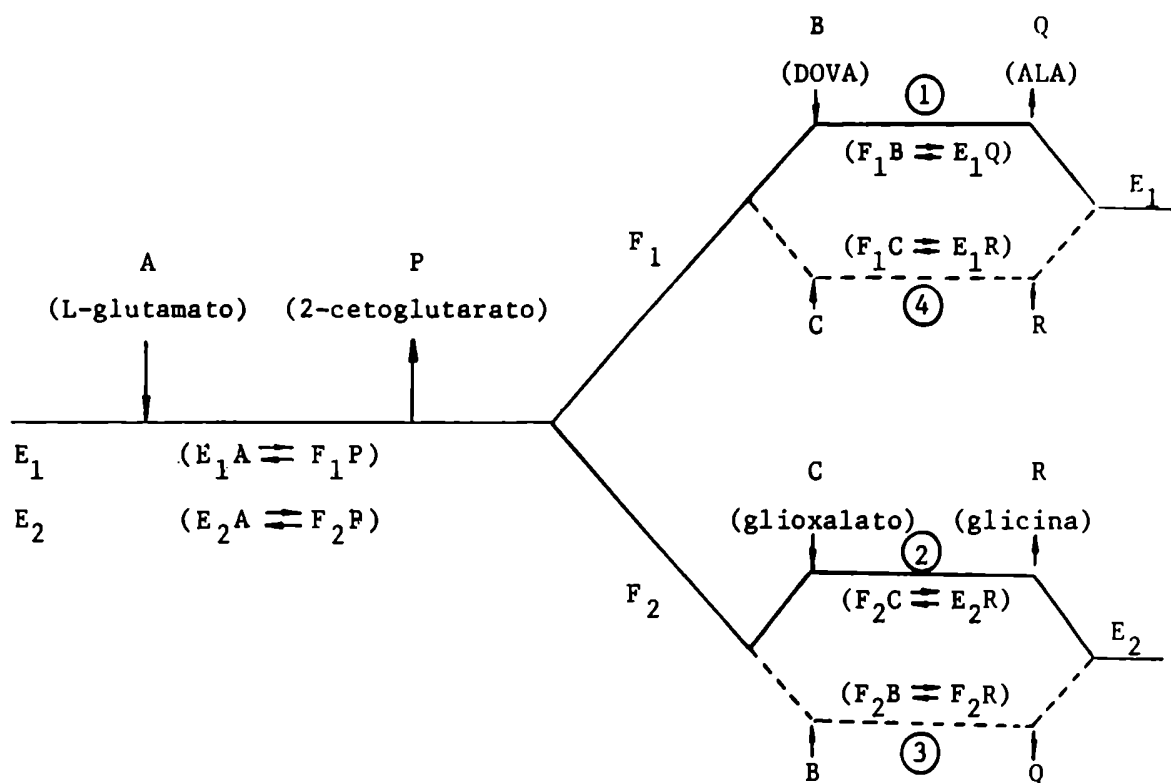
ESTUDIOS REALIZADOS	DOVA-T	GLIOXALATO-T
Fraccionamiento con sulfato de amonio	Precipita entre 40-75 % de saturación. Rendimiento = 70 % (referido al sobrenadante S). Grado de purificación: 3 veces	Precipita entre 40-75 % de saturación. Rendimiento = 70 % (referido al sobrenadante S). Grado de purificación = 3 veces.
Estudios de velocidades iniciales**	Mecanismo ping-pong. Km (L-glutamato) = 2,06 mM Km (DOVA) = 0,52 mM	Mecanismo ping-pong. Km (L-glutamato) = 2,48 x 10 ² mM Km (glioxalato) = 31, 58 mM
Inhibición por sustrato**	Inhibición por DOVA de tipo competitivo parabólica	Inhibición por glioxalato de tipo competitiva parabólica
Inhibición por análogos del sustrato**	Inhibidor: glioxalato (Glioxalato) 1-4 mM: inhibición no competitiva lineal (Glioxalato) 4-10 mM: inhibición competitiva	Inhibidor: DOVA (DOVA) entre 1 y 2,8 mM: inhibición no competitiva lineal pura.
Inhibición por producto**	Inhibidor: ALA. No existe inhibición, probablemente por falta de reversibilidad de la reacción	No se estudió

ESTUDIOS REALIZADOS	DOVA-T	GLIOXALATO-T
Cromatografía por Sephadex G-150**	Fracción I: 18 % actividad Fracción II: 82 % actividad (PM = 66.000 ± 3.000)	Fracción I: 47 % actividad (PM = 92.000 ± 3.000) Fracción II: 53 % actividad

(*) La diferencia entre ambas enzimas podía deberse a la distinta sensibilidad de los métodos de determinación de actividad, el producto de la DOVA-T se mide en el orden de los nmoles mientras que el de la glioxalato-T se detecta en μ moles. La cantidad de glicina que podría formarse a partir del glutamato endógeno no alcanzaría el límite de detección del método de cuantificación de glicina.

(**) Estos estudios se llevaron a cabo empleando como extracto enzimático la proteína que precipita en el rango 40-75 % de saturación con sulfato de amonio (Fracción E).

En base a los resultados anteriores y de los estudios de competencia entre el DOVA y glioxalato sobre la actividad de ambas transaminasas en la fracción II, se concluye que existen dos enzimas diferentes, E_1 y E_2 , encargadas de catalizar la formación de ALA y glicina respectivamente, que actuarían según el siguiente mecanismo:



Al medir actividad de DOVA-T en ausencia de glioxalato, el ALA se sintetiza por las vías 1 y 3, en una proporción del 75 y 25 % respectivamente. Al adicionar glioxalato la velocidad de formación de ALA va disminuyendo, originando en primer lugar una inhibición de tipo no competitivo, por unión del glioxalato a las formas E y F. Cuando la concentración de glioxalato alcanza valores de 4 mM, la vía 3 deja de participar en la formación de ALA y sólo se obtiene producto por la ruta 1; niveles de glioxalato mayores de 4 mM (entre 4 y 10 mM) pueden unirse a F_1 pero concentraciones saturantes de DOVA, que es el verdadero sustrato de la enzima, podrán desplazarlo modificando el tipo de inhibición de no competitiva a competitiva.

Para la glioxalato-T, la formación de glicina se llevaría a cabo por las vías 4 y 2. Utilizando al DOVA como análogo

del sustrato, se produce una inhibición no competitiva debido a que se une a las formas E y F. Dado que las concentraciones de glioxalato empleadas para medir actividad de glioxalato-T son superiores a 4 mM, de las formas F es muy poco probable que el DOVA se una a la F₂, sino más bien lo haría con la F₁.

Cabe aclarar que si bien el mecanismo descrito corresponde a las transaminasas presentes en la fracción II, es válido para interpretar el comportamiento de la fracción E que sólo difiere de la anterior en la presencia adicional de una isoenzima de la glioxalato-T de PM 92.000, que no posee prácticamente actividad de DOVA-T.

Establecida la existencia de una transaminasa específica para sintetizar ALA a partir de DOVA, nuestros próximos objetivos son aislarla, purificarla e investigar además su participación en la biosíntesis de porfirinas en otros tipos de organismos.

CAPITULO X

REFERENCIAS

Página

145

1. Brock, T.D. (1978) en *Biología de los microorganismos*, Cap. 15, p. 532. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
2. Shemin, D. & Russell, C.S. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4873.
3. Shemin, D. & Bray, R.C. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 112, 165.
4. Castelfranco, P.A. & Jones, O.T.G. (1975) *Plant Physiol.* 55, 485.
5. Manetas, Y. & Akoyunoglu, G. (1975) *Plant Sci. Lett.* 5, 375.
6. Troxler, R.F. & Lester, R. (1967) *Biochemistry* 6, 3840.
7. Kappas, A.; Sassa, S. & Anderson, K.E. (1983) en *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Eds. J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson, J.L. Goldstein y M.S. Brown). Parte 9, cap. 60, p. 1301. Mc Grow-Hill Book Company, Publications Minneapolis, M.N., USA.
8. Batlle, A.M. del C. & Magnin, P.H. (1988) en *Porfirias Humanas y Experimentales. Aspectos clínicos y bioquímicos*. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam. Sup. Nro. 2*, Cap. I, p. 3.
9. Lehninger, A.L. (1978) en *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Cap. 6, p. 127. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
10. Bohinski, R.C. (1978) en *Bioquímica*. Cap. 14, p. 423. Fondo Educativo Interamericano S.A.

11. Ochoa, E.L.M. (1985) en Química Biológica, Cap. 12. Ediciones Ciencias Médicas.
12. Pelczar, M.J. & Reid, R.D. (1979) en Microbiología, Cap. 18, p. 273. Ed. Mc Graw-Hill.
13. Brock, T.D. (1978) en Biología de los Microorganismos, Cap. 16, p. 562. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
14. Pfennig, N. (1967) Ann. Rev. Microbiol. 21, 285.
15. Jones, O.T.G. (1976) Phil. Trans. R. Soc. London B 273, 207.
16. Scott, A.J. (1978) J. Am. Chem. Soc. 11, 29.
17. Maines, M.D. (1988) FASEB. J. 2, 2557.
18. Brock, T.D. (1978) en Biología de los Microorganismos, Cap. 6, p. 182. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
19. Kikuchi, G.; Kumar, A.; Talmage, P. & Shemin, D. (1958) J. Biol. Chem. 233, 1214.
20. Gibson, K.D.; Larver, W.G. & Neuberger, A. (1958) Biochem. J. 70, 71.
21. Granick, S. & Urata, G. (1963) J. Biol. Chem. 238, 821.
22. Marver, H.S.; Tschudy, D.P.; Perlroth, M.G. & Collins, A. (1966) 241, 2803.
23. Takaku, F.; Wada, O.; Sassa, S. & Nakao, K. (1968) Cancer Res. 28, 1250.
24. Margolis, F.L. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 145, 373.
25. Sardesai, V.M.; Lenaghan, R. & Rosenberg, J.C. (1972) Biochem. Med. 6, 366.
26. Paterniti, J.R.; Simone, J.J. & Beattie, D.S. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 189, 86.
27. Porra, R.J.; Barnes, R. & Jones, O.T.G. (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1365.
28. Labbe-Bois, R. & Volland, C. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 179, 565.
29. Brattsten, L.B. & Wilkinson, C.F. (1975) Biochem. J. 150, 97.
30. Klein, O. & Senger, H. (1978) Photochem. Photobiol. 27, 203.

31. Beale, S.I.; Foley, T. & Dzelzkalns, V. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1666.
32. Wider de Xifra, E.A.; Batlle, A. & Tigier, H.A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 235, 511.
33. Ramaswamy, N.K. & Nair, P.N. (1973) Biochim. Biophys. Acta 293, 269.
34. Lascelles, J. (1964) en *Tetrapyrroles Biosynthesis and its Regulation*, p. 84. Benjamin, New York.
35. Marks, G.S. (1966) Bot. Rev. 32, 56.
36. De Matteis, F. (1967) Pharmac. Rev. 19, 523.
37. Sassa, S. & Granick, S. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, 517.
38. Marver, H.S. (1969) en *Microsomes and Drug Oxidation*, p. 495. Academic Press, New York.
39. Burnham, B. & Lascelles, J. (1963) Biochem. J. 87, 462.
40. Bottomley, S.S. & Smithee, G.A. (1968) Biochim. Biophys. Acta 159, 27.
41. Igarashi, J.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1976) J. Biol. Chem. 80, 1091.
42. Barnes, R.; Jones, M.S.; Jones, O.T.G. & Porra, R.J. (1971) Biochem. J. 124, 633.
43. Nakakuki, M.; Yamauchi, K.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1980) J. Biol. Chem. 225, 1738.
44. Yamauchi, K.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1980) J. Biol. Chem. 225, 1746.
45. Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Brooker, J.D.; May, B.P. & Elliott, W.H. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 110, 23.
46. Woods, J.S. (1974) Mol. Pharmacol. 10, 389.
47. Hayashi, N.; Yoda, B. & Kikuchi, G. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 131, 83.
48. Kaplan, B.H. (1971) Biochim. Biophys. Acta 235, 381.
49. Scholnick, P.L.; Hammaker, L.E. & Marver, H.S. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4126.

50. Woods, J.S. & Murthy, V.V. (1975) *Mol. Pharmacol.* 11, 70.
51. Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Maguirre, D.J.; Elferink, C.J.; Bawden, M.J.; Mercer, J.F.B. & May, B.K. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 5202.
52. Ohashi, A. & Kikuchi, G. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 607.
53. Hayashi, N.; Yoda, B. & Kikuchi, G. (1970) *J. Biochem. (Tokyo)* 67, 859.
54. Whiting, M.J. & Elliott, W.H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6818.
55. Paterniti, J.R. & Beattie, D.S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6112.
56. Ohashi, A. & Kikuchi, G. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 153, 34.
Whiting, M.J. & Granick, S. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 1340.
58. Borthwick, I.A.; Srivastava, G.; Brooker, J.D.; May, B.K. & Elliott, W.H. (1983) *Eur. J. Biochem.* 129, 615.
59. Borthwick, I.A.; Srivastava, G.; Hobbs, A.A.; Pirola, B.A.; Brooker, J.D.; May, B.K. & Elliott, W.H. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 95.
60. Yamamoto, M.; Yew, N.S.; Federspiel, M.; Dogson, J.B.; Hayashi, N. & Engel, J.D. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3702.
61. Schoenhaut, D.S. & Curtis, P.J. (1986) *Gene (Amst.)* 48, 55.
62. Leong, S.A.; Williams, O.H. & Duta, G.S. (1985) *Nucleic Acid Research.* 13, 5965.
63. Urban-Grimal, D.; Reves, U. & Labbe-Bois, R. (1984) *Curr. Genet.* 8, 327.
64. Borthwick, I.A.; Srivastava, G.; Day, A.R.; Pirola, B.A.; Snoswell, M.A.; May, B.K. & Elliott, W.H. (1985) *Eur. J. Biochem.* 150, 481.
65. Hay, R.; Bohni, P. & Gasser, S. (1984) *Biochem. Biophys. Acta* 779, 65.

66. Horwich, A.L.; Fenton, W.A.; Williams, K.R.; Kalousek, F.; Kraus, J.P.; Doolittle, R.F.; Kongisberg, W. & Rosenberg, L.E. (1984) *Science (Wash D.C.)* 224, 1068.
67. Elferink, C.J.; Srivastava, G.; Maguire, D.J.; Borthwick, I.A.; May, B.K. & Elliott, W.H. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 3988.
68. Bishop, D.F.; Kitchen, H. & Wood, W.A. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 206, 380.
69. Watanabe, N.; Hayashi, H. & Kikuchi, G. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 377.
70. Zaman, Z.; Jordan, P.M. & Akhtar, M. (1973) *Biochem. J.* 135, 257.
71. Akhtar, M.; Abboud, M.M.; Barnard, G.; Jordan, P. & Zaman, Z. (1976) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.) B.* 273, 117.
72. Nandi, D.L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 8872.
73. Della Rosa, R.J.; Altman, K.I. & Salomon, K. (1953) *J. Biol. Chem.* 202, 771.
74. Brzeski, W. & Rücker, W. (1960) *Nature* 185, 922.
75. Roberts, D.W.A. * Perkins, H.J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 127, 42.
76. Wellburn, F.A.M. & Wellburn, A.R. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 747.
77. Hendry, G.A.F. & Stobart, A.K. (1977) *Phytochemistry* 16, 1567.
78. Beale, S.I. & Castelfranco, P.A. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 143.
79. Beale, S.I. & Castelfranco, P.A. (1974) *Plant Physiol.* 53, 297.
80. Beale, S.I.; Gough, S.P. & Granick, S. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2719.
81. Meller, E.; Belkin, S. & Harel, E. (1975) *Phytochemistry* 14, 2399.
82. Jurgenson, J.E.; Beale, S.I. & Troxler, R.F. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 149.

83. Gough, S.P. & Kannangara, C.G. (1976) *Carlsberg Res. Commun.* 41, 183.
84. Weinstein, J.D. & Castelfranco, P.A. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 671.
85. Klein, O. & Senger, H. (1978) *Plant Physiol.* 62, 10.
86. Troxler, R.F. & Offner, G.D. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 53.
87. Kipe-Nolt, J.A. & Stevens Jr., E.S. (1980) *Plant Physiol.* 65, 126.
88. Meller, E. & Gassman, M.L. (1982) *Plant Sci. Lett.* 26, 23.
89. Gilles, H.; Jaenchen, R. & Thauer, R.K. (1983) *Arch. Microbiol.* 135, 237.
90. Harel, E. & Ne'eman, E. (1983) *Plant Physiol.* 72, 1062.
91. Weinstein, J.D. & Beale, S.I. (1984) *Plant Physiol.* 74, 146.
92. Gomez-Silva, B.; Timko, M.P. & Schiff, J.A. (1985) *Planta* 165, 12.
93. Neuberger, A. & Turner, J.M. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 342.
94. Gassman, M.; Pluscec, J. & Bogorad, L. (1968) *Plant Physiol.* 43, 1411.
95. Lohr, J.B. & Friedmann, H.C. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 908.
96. Jerzykowski, T.; Winter, R. & Matuszewski, W. (1973) *Biochem. J.* 135, 713.
97. Okuyama, M.; Tsuiki, S. & Kikuchi, G. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 110, 66.
98. Kannangara, C.G. & Gough, S.P. (1978) *Carlsberg Res. Commun.* 43, 185.
99. Wang, F.K.; Koch, J. & Stokstad, E.L.R. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 576.
100. Schlossberg, M.A.; Richert, D.A.; Bloom, R.J. & Wester Westerfield, W.W. (1968) *Biochemistry* 7, 333.
101. Huang D.D.; Wang, W.Y.; Gough, S.P. & Kannangara, C.G. (1984) *Science* 225, 1482.

102. Schön, A.; Krupp, G.; Gough, S.; Berry-Lowe, S.; Kannangara, C.G. & Söll, D. (1986) *Nature* 322, 281.
103. Weinstein, J.D.; Mayer, S.M. & Beale, S.I. (1987) *Plant Physiol.* 84, 244.
104. Schneegurt, M.A. & Beale, S.I. (1988) *Plant Physiol.* 86, 497.
105. Rieble, S.; Ormerod, J.G. & Beale, S.I. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 3782.
106. Nemeth, A.M.; Russell, C.S. & Shemin, D. (1958) *J. Biol. Chem.* 229, 415.
107. Braunstein, A.E.; Poznanskaya, A.A.; Spryshkova, R.A. & Gnuchev, N.V. (1964) *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* 157, 982.
108. Shigesada, K. (1972) *J. Biochem. Tokyo* 71, 961.
109. Kowalski, E.; Dancewicz, A.M. & Szot, Z. (1957) *Bull. Acad. Polon. Sci.* II 5, 223.
110. Bagdasarian, M. (1958) *Nature* 181, 1399.
111. Gibson, K.D.; Mattew, M.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1961) *Nature* 192, 204.
112. Chen, J.; Miller, G.W. & Takemoto, J.Y. (1981) *J. Bacteriol.* 208, 221.
113. Bajkowski, A. & Friedmann, H.C. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2207.
114. Salvador, F.G. (1978) *Plant Sci. Lett.* 13, 351.
115. Foley, T. & Beale, S.I. (1982) *Plant Physiol.* 70, 1495.
116. Meisch, H.U.; Hoffmann, H. & Reinle, W. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 743, 281.
117. Shiöi, Y.; Nagamine, M. & Sasa, T. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 234, 117.
118. Varticovski, L.; Kushner, J.P. & Burnham, B.F. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3742.
119. Noguchi, T. & Mori, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 10335.
120. Hayashi, S. & Noguchi, T. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 13693.
121. Harel, E.; Ne'eman, E. & Meller, E. (1983) *Plant Physiol.* 72, 1056.

122. Duggan, J. & Gassman, M. (1974) *Plant Physiol.* 53, 206.
123. Dörnemann, D.; Senger, H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 628, 35.
124. Weinstein, J.D. & Beale, S.I. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 6799.
125. Neuberger, A. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 787.
126. Piper, W.N.; Condie, L.W. & Tephly, T.R. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 671.
127. Lascelles, J. (1960) *J. Gen. Microbiol.* 23, 487.
128. Yamamoto, M.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 225.
129. Hayashi, N.; Watanabe, N. & Kikuchi, G. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 700.
130. Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Brooker, J.D.; Wallace, J.C.; May, B.K. & Elliott, W.H. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 344.
131. Moore, M.R. & Disler, P.B. (1985) en *Porphyria. Clinics in Dermatology* (Eds. P.B. Disler y M.R. Moore), Vol. 3, Nro. 2, Cap. III, p. 7.
132. Wolfson, S.J.; Bartcsak, A. & Bloomer, J.R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 3543.
133. Batlle, A.M. del C.; Magnin, P.H. & Wider, E.A. (1981) en *Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, Clínica y Tratamiento*, Cap. V, p. 71. Ed. Universitaria de Buenos Aires.
134. Marks, G.S.; MacCluskey, S.A.; Mackie, J.E.; Riddick, D.S. & James, C.A. (1988) *FASEB J.* 2, 2774.
135. Wider de Xifra, E.; Sandy, J.; Davies, R.; & Neuberger, A. (1976) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 273, 79.
136. Vázquez, E.; Wider de Xifra, E. & Batlle, A. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 721.
137. Viale, A.; Wider de Xifra, E. & Batlle, A. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 729.
138. Vázquez, E.; Buzaleh, A.; Wider, E. & Batlle, A. (1987) *Int. J. Biochem.* 19, 217.

139. Batlle, A.M. del C.; Magnin, P.H. & Wider, E.A. (1981) en *Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, Clínica y Tratamiento*, Cap. IV, p. 59. Ed. Universitaria de Buenos Aires.
140. Stobart, A.K. & Ameen-Bukhari, I. (1984) *Biochem. J.* 222, 419.
141. Leedale, G.F. (1982) en *The Biology of Euglena* (Ed. E. Dennis), Vol. III, Cap. 1, p. 1. BUETOW.
142. Tell, G. & Conforti, U. (1986) en *Euglenophytas pigmentadas de la Argentina. Bibl. Phycol. Band 75* (Ed. J. Cramer) Gebrüder Borntraeger, Verlagsbuchhandlung, Berlín, Stuttgart.
143. Viale, A. (1978) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires (UBA).
144. Gnuchev, N.V.; Neiman, L.A. & Poznanskaya, A. (1965) *Biochemistry (USSR)* 30, 138.
145. Mauzerall, D. & Granick, S. (1956) *J. Biol. Chem.* 219, 435.
146. Moore, D. & Labba, R. (1964) *Clin. Chem.* 10, 1105.
147. Milligan, L.P. & Baldwin, R.L. (1967) 242, 1095.
148. Klein, G. & Linser, H. (1932) *Z. Physiol. Chem.* 205, 251.
149. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
150. Mackinney, G. (1941) *J. Biol. Chem.* 140, 315.
151. Corriveau, J.L. & Beale, S.I. (1986) *Plant Science* 45, 9.
152. Rosenberg, G. & Pecker, H. (1964) *Biochemistry* 3, 254.
153. Brody, M.; Brody, S. & Levine, J.H. (1965) *J. Protozool.* 12, 465.
154. Stern, A.I.; Schiff, J.A. & Epstein, H.T. (1964) *Plant Physiol.* 39, 220.
155. Cleland, W.W. (1970) en *The Enzymes* (Ed. P.D. Boyer), Vol. II, p.1.
156. Shioi, Y.; Doi, M. & Sasa, T. (1984) *Plant Cell Physiol.* 25, 1487.
157. Rimington, C. & Sveinsson, S.L. (1950) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2, 209.
158. Allen, W.M. (1950) *J. Clin. Endocrinol.* 10, 71.