

Tesis de Posgrado

Estudios sobre la enzima PBG-Deaminasa en *Saccharomyces cerevisiae* y su rol en la regulación del camino biosintético de las porfirinas

Correa García, Susana Raquel

1992

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:

Correa García, Susana Raquel. (1992). Estudios sobre la enzima PBG-Deaminasa en *Saccharomyces cerevisiae* y su rol en la regulación del camino biosintético de las porfirinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2550_CorreaGarcia.pdf

Cita tipo Chicago:

Correa García, Susana Raquel. "Estudios sobre la enzima PBG-Deaminasa en *Saccharomyces cerevisiae* y su rol en la regulación del camino biosintético de las porfirinas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2550_CorreaGarcia.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS SOBRE LA ENZIMA PBG-DEAMINASA
EN *Saccharomyces cerevisiae* Y SU ROL EN LA
REGULACION DEL CAMINO BIOSINTETICO DE LAS PORFIRINAS

por

SUSANA RAQUEL CORREA GARCIA

Director: Dra. Alcira María del Carmen Batlle
Consejero: Dra. María Victoria Rossetti

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 2

Tesis.
2550
g.e.

a Eduardo

a Dani y a Nico

a mis padres

INDICE GENERAL

Página

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

OBJETIVOS

INTRODUCCION	1
- CAPITULO I: CAMINO METABOLICO DEL HEMO	1
I.1. Porfirinas	1
I.2. Biosíntesis del hemo	7
I.3. Enzimas del camino biosintético del hemo	8
I.4. Control de la biosíntesis del hemo	28
- CAPITULO II: BIOSINTESIS DE PORFIRINAS EN LEVADURAS	35
II.1. Las levaduras como modelo experimental	35
II.2. Características de las levaduras	37
II.3. Enzimas del camino biosintético del hemo	38
II.4. Regulación de la biosíntesis del hemo	49
II.5. Regulación de la biosíntesis de hemoproteínas	52
MATERIALES Y METODOS	58
- CAPITULO I: MATERIALES	58
I.1. Fuente enzimática	58
I.2. Porfobilinógeno	58

	Página
I.3. Geles empleados	61
I.4. Reactivos	61
I.5. Equipos	61
- CAPITULO II: METODOS	63
II.1. Cultivo y crecimiento de las células	63
II.2. Obtención de la proteína enzimática	64
II.3. Sistemas standard de incubación	65
II.4. Determinaciones de porfirinas y precursores	67
II.5. Determinación del contenido proteico	69
II.6. Determinación de las porfirinas formadas y del tipo isomérico	70
II.7. Determinación del ALA intracelular	72
II.8. Determinación de glucosa	72
II.9. Determinación colorimétrica de intermediarios polipirrólicos	72
II.10. Determinación del peso molecular	72
RESULTADOS Y DISCUSION	74
- CAPITULO I: ENSAYOS PRELIMINARES	74
I.1. Curvas de crecimiento	74
I.2. Métodos empleados para la ruptura celular	78
I.3. Condiciones óptimas para la extracción de la proteína enzimática	81
- CAPITULO II: PROPIEDADES DE LA PBG-DEAMINASA EN EXTRACTOS CELULARES CRUDOS	86
II.1. Localización intracelular	86
II.2. Efecto de la atmósfera de incubación	86
II.3. Efecto de la cantidad de proteína	89
II.4. Efecto del tiempo de incubación	89

	Página
II.5. Determinación del pH óptimo de reacción	90
II.6. Efecto de la concentración de sustrato. Estudios cinéticos	94
- CAPITULO III: PURIFICACION DE LA PBG-DEAMINASA DE <i>S. cerevisiae</i>	96
III.1. Ensayos preliminares	96
III.2. Purificación parcial de la PBG-Deaminasa	100
III.3. Formas enzimáticas de la PBG-Deaminasa detectadas mediante filtración por gel	105
III.4. Correlación entre el comportamiento cromatográfico y la presencia de la mutación HEM R ⁺	113
III.5. Determinación del peso molecular	116
- CAPITULO IV: OTRAS PROPIEDADES DE LA PBG-DEAMINASA PARCIALMENTE PURIFICADA	118
IV.1. Efecto de cationes	118
IV.2. Efecto de iones amonio y de hidroxilamina	121
IV.3. Efecto de reactivos de grupos tioles y disulfuros	122
IV.4. Efecto del ácido fólico	128
IV.5. Efecto de la sulfamerazina	128
- CAPITULO V: CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA. DETECCION DE COMPLEJOS INTERMEDIARIOS ENZIMA-SUSTRATO	132
- CAPITULO VI: REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS EN LEVADURAS	151
VI.1. Actividad de ALA-Sintetasa	151
VI.2. Actividad de ALA-Dehidrasa	154

	Página
VI.3. Interrelación entre actividades enzimáticas y ALA intracelular	160
VI.4. Actividad de PBG-Deaminasa	161
CONCLUSIONES	163
REFERENCIAS	169

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

- a la Dra. Alcira M. del C. Batlle, por haber aceptado ser mi Directora de Tesis, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo y por haber hecho posible mi desarrollo en el campo de la investigación con gran independencia, pero sabiendo que en todo momento podía contar con su guía, apoyo e invaluable experiencia;
- al Dr. James Mattoon de la Universidad de Colorado (Colorado Springs, USA), por facilitarme generosamente las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y por sus comentarios y sugerencias;
- a María Victoria, quien siempre me brindó su experiencia y conocimientos y con quien tuve la suerte de iniciarme en la investigación;
- a Mariana, por su amistad y su incondicional y valioso aporte científico en las etapas finales de este trabajo;
- a Eduardo, por ser mi compañero y estímulo permanente, y además por su colaboración en algunos aspectos directamente relacionados con la concreción de esta Tesis;
- a Ana María Buzaleh, por su especial dedicación y esmero en la transcripción del manuscrito; y a Swe, por su valiosa colaboración en la realización de dibujos y gráficos;
- a mis compañeros de laboratorio, mi especial y sincero reconocimiento por todos los momentos compartidos;
- al conjunto de los integrantes del CIPYP quienes hicieron grata mi tarea diaria;
- al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad de Buenos Aires, por las becas y subsidios otorgados.

ABREVIATURAS

ALA	Acido δ -aminolevúlico
ALA-D	Acido δ -aminolevúlico Dehidrasa
ALA _i	Acido δ -aminolevúlico intracelular
ALA-S	Acido δ -aminolevúlico Sintetasa
COPRO	Coproporfirina
COPROGEN	Coproporfirinógeno
CPG-asa	Coproporfirinógeno Oxidasa o Coproporfirino- nogenasa
Da	Daltons
DTNB	Acido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)
E	Enzima
Fe-quel	Ferroquelatasa
fplc	"Fast protein liquid chromatography"
GSH	Glutati3n reducido
HMB	Hidroximetilbilano
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
NEMI	N-Etilmaleimida
PBG	Porfobilinógeno
PBG-asa	Porfobilinogenasa
PCMB	p-Cloromercuribenzoato
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PM/PM's	Peso molecular/pesos moleculares
PROTO	Protoporfirina
PROTOGEN	Protoporfirinógeno
PTG-asa	Protoporfirinógeno Oxidasa o Protoporfiri- nogenasa
SDS	Sodiododecilsulfato
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
TCA	Acido tricloroacético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

URO	Uroporfirina
URO-D	Uroporfirinógeno Decarboxilasa
UROGEN	Uroporfirinógeno
UROGEN III-S	Uroporfirinógeno III Sintetasa
UV	Ultravioleta

OBJETIVOS

La estructura tetrapirrónica de las porfirinas es la base química de una serie de compuestos imprescindibles para la vida, involucrados en los procesos fundamentales de respiración y fotosíntesis, a través del hemo y la clorofila, respectivamente. Los tetrapirroles también participan en otras reacciones metabólicas importantes como transportadores de electrones, energía y gases, oxidaciones biológicas, fijación de nitrógeno, etc.

La secuencia de eventos enzimáticos que conducen a la biosíntesis de estos compuestos está, hoy en día, muy documentada y se ha comprobado que es prácticamente idéntica en todos los organismos y tejidos estudiados.

Sin embargo, ni el mecanismo de acción de las enzimas involucradas en este camino metabólico ni su regulación se encuentran totalmente esclarecidos. Así, el estudio de la biosíntesis de hemo y su control en una célula eucariótica simple y bien conocida como la levadura puede contribuir, sin duda, a un mejor y más profundo conocimiento de esta vía. Además, mutantes de levadura, que presentan mutaciones en la síntesis del hemo, constituyen excelentes modelos experimentales para el esclarecimiento de aspectos concernientes a los mecanismos regulatorios que controlan la formación de las porfirinas y sus precursores.

Se cuenta, entre otras, con dos cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*: la D27, normal para la síntesis de hemo, y su mutante D27/C6 (Hem R⁺) cuya mutación se traduce en una síntesis aumentada de citocromos cuando crece en un medio con una fuente de carbono no fermentable.

Se realizó, en estas cepas, un estudio comparativo de la tercera enzima del camino biosintético de las porfirinas, la Porfobilinógeno Deaminasa. Esta enzima ha sido estudiada en numerosas fuentes; sin embargo, poco se conoce acerca de sus

propiedades y su mecanismo de acción en *Saccharomyces cerevisiae*.

Por otra parte, teniendo en cuenta trabajos previos en los cuales se postula que la regulación de la biosíntesis de las porfirinas en levaduras es compleja ya que involucra varias enzimas, se determinó si la Porfobilinógeno Deaminasa tiene o no capacidad regulatoria.

De esta manera, se espera entonces obtener mayores evidencias experimentales acerca de la biosíntesis de las porfirinas y su regulación en células eucarióticas como las de levadura, que permitirán ampliar nuestro conocimiento sobre esta temática y, en lo posible, hacerlo extensivo al resto de los organismos eucarióticos.

INTRODUCCION

CAPITULO I

CAMINO METABOLICO DEL HEMO

	Página
I.1. Porphirinas	1
I.1.1. Importancia biológica	1
I.1.1. Estructura. Nomenclatura	1
I.1.3. Propiedades	4
I.1.4. Funciones biológicas	5
I.2. Biosíntesis del hemo	7
I.3. Enzimas del camino biosintético del hemo	8
I.3.1. ALA-Sintetasa	8
I.3.2. ALA-Dehidrasa	11
I.3.3. Conversión enzimática de PBG a UROGEN III	13
I.3.3.1. PBG-Deaminasa	13
I.3.3.2. UROGEN III-Sintetasa	20
I.3.4. URO-Decarboxilasa	21
I.3.5. Coproporfirinogenasa	25
I.3.6. Protoporfirinogenasa	26
I.3.7. Ferroquelatasa	27
I.4. Control de la biosíntesis del hemo	28
I.4.1. Rol del ALA-S y su control por hemo	29

	Página
I.4.2. Control por localización tisular y subcelular	32
I.4.3. Control por constituyentes del medio ambiente celular	33
I.4.4. Control por interconexión con otros caminos metabólicos	33

I. CAMINO METABOLICO DEL HEMO

I.1. PORFIRINAS

I.1.1. Importancia biológica

La estructura tetrapirrólica de las porfirinas juega un papel fundamental en la bioquímica de los sistemas biológicos, ya que es la responsable del color rojo de la hemoglobina y del verde de la clorofila, pigmentos que están involucrados en procesos de vital importancia como la respiración y la fotosíntesis.

La amplia distribución y la gran variedad de reacciones biológicas en las cuales participan diferentes derivados de las porfirinas implican que fueron, son y serán fundamentales para la vida, desde sus orígenes sobre la Tierra.

Es así, entonces, que los tetrapirroles participan en un gran número de procesos de importancia biológica, como son: transporte de electrones y energía (citocromos, clorofila), de gases (hemoglobina y mioglobina), oxidaciones biológicas (peroxidasas, catalasas), hidroxilaciones biológicas (mono y dioxigenasas), ciclo biológico del nitrógeno y del azufre (nitrito y sulfito reductasa cuyo grupo prostético es una metalotetrahidroporfirina, sirohemo), metilaciones (la vitamina B₁₂, producida solamente por algunos microorganismos, es una coenzima esencial).

I.1.2. Estructura. Nomenclatura

El núcleo de las porfirinas consiste en 4 anillos pirrólicos (A, B, C y D) unidos por puentes metenos formando un macrociclo denominado porfina o porfirina según se emplee la nomenclatura de Fisher (Fischer y Orth, 1934) o la de IUPAC

(International Union of Pure and Applied Chemistry) (Figura I.1.).

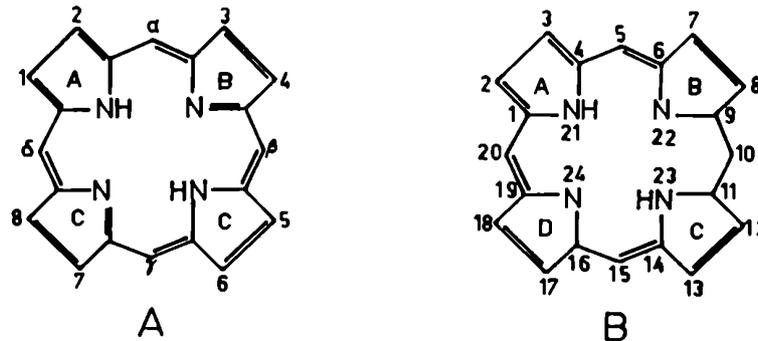


FIGURA I.1.: Estructura y nomenclatura del macrociclo porfirina.
 (A) Porfina (nomenclatura de Fischer)
 (B) Porfirina (nomenclatura de la IUPAC)

El sistema IUPAC continúa empleando 11 nombres triviales ya establecidos, así como también la designación de los isómeros de posición (Tabla I.1.).

Es interesante destacar que los metabolitos biológicamente activos no son las porfirinas sino las hexahidroporfirinas o porfirinógenos, en los cuales los puentes metenos se encuentran reducidos.

El anillo de porfirina es la base del macrociclo conjugado del hemo.

Las 7,8 dihidroporfirinas que tienen el anillo D reducido son el esqueleto de los distintos tipos de clorofilas y se denominan clorinas.

Hay 2 tipos de tetrahidroporfirinas: las bacterioclorofilas, que tienen 2 anillos reducidos, el B y el D, y forman la estructura básica de las bacterioclorofilas; y las isobacterioclorinas, que también tienen 2 anillos reducidos pero son

adyacentes y forman la estructura base del sirohemo.

TABLA I.1.: Estructuras y nombres triviales de las porfirinas

NOMBRE	SUSTITUYENTE							
Numeración de la IUPAC	2	3	7	8	12	13	17	18
Numeración de Fischer	1	2	3	4	5	6	7	8
Etioporfirina I	M	E	M	E	M	E	M	E
Etioporfirina II	M	E	E	M	M	E	E	M
Etioporfirina III	M	E	M	E	M	E	E	M
Etioporfirina IV	M	E	E	M	E	M	M	E
Uroporfirina I	A	P	A	P	A	P	A	P
Uroporfirina III	A	P	A	P	A	P	P	A
Porfirina heptacarboxilada III	M	P	A	P	A	P	P	A
Porfirina hexacarboxilada III	M	P	M	P	A	P	P	A
Porfirina pentacarboxilada III	M	P	M	P	A	P	P	M
Dehidroisocoproporfirina III	M	V	M	P	A	P	P	M
Coproporfirina I	M	P	M	P	M	P	M	P
Coproporfirina III	M	P	M	P	M	P	P	M
Proto porfirina IX	M	V	M	V	M	P	P	M
Mesoporfirina IX	M	E	M	E	M	P	P	M
Hematoporfirina IX	M	HE	M	HE	M	P	P	M
Deuteroporfirina IX	M	H	M	H	M	P	P	M

M: $-\text{CH}_3$; E: $-\text{C}_2\text{H}_5$; A: $-\text{CH}_2\text{COOH}$; P: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$; V: $-\text{CH}=\text{CH}_2$;
 HE: $-\text{CHOHCH}_3$

El núcleo de la vitamina B₁₂ es la corrina, una porfirina reducida a la cual le falta uno de los puentes meteno (δ).

Los esqueletos de los núcleos recién mencionados se pueden ver en la Figura 1.2.

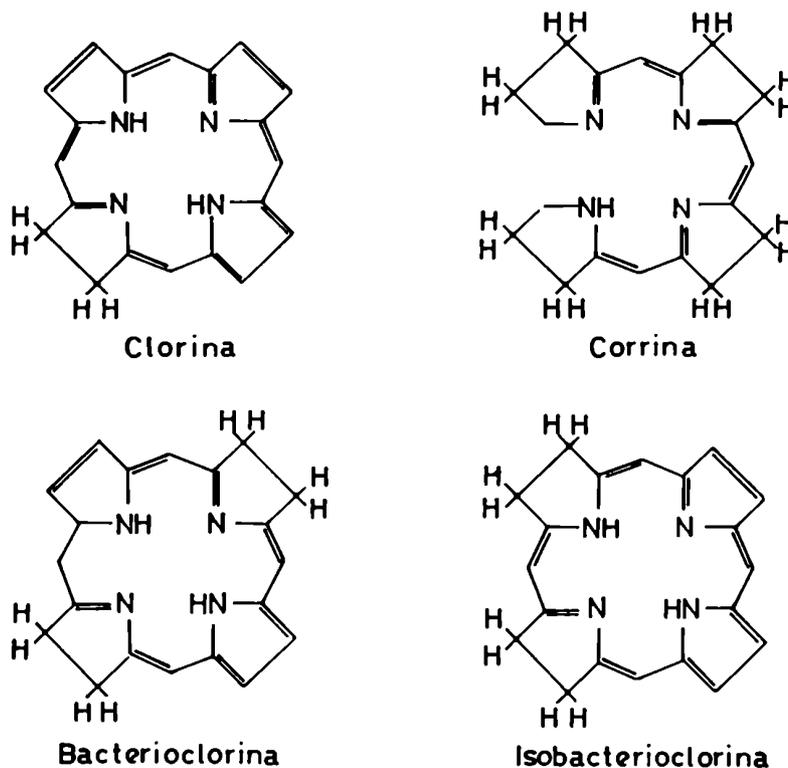


FIGURA 1.2.: Estructura de clorigina, corrina, bacterioclorigina e isobacterioclorigina.

1.1.3. Propiedades

Las porfirinas poseen espectros de absorción típicos que son de fundamental importancia para su identificación y estimación cuantitativa.

El espectro de absorción de las porfirinas consiste en una banda principal en la región de 400 nm, llamada banda de Soret, y 4 bandas de absorción menores a longitudes de onda mayores (500 - 630 nm).

Las porfirinas emiten una intensa fluorescencia roja cuando se excitan con luz ultravioleta (aproximadamente 400 nm). En solución ácida producen 2 fuertes bandas de emisión correspondientes a las 2 bandas de absorción de mayor longitud de onda. El método espectrofluorimétrico es muy sensible, pues permite detectar porfirinas presentes en cantidades del orden de 10^{-8} M- 10^{-10} M. Las porfirinas queladas con metales que no tienen electrones desapareados (por ejemplo magnesio, zinc, estaño) también emiten fluorescencia cuando se iluminan con luz UV, mientras que las porfirinas queladas con metales paramagnéticos no fluorescen.

El núcleo pirrólico de estructura aromática es hidrofóbico, propiedad que se modifica por la presencia de los sustituyentes laterales alifáticos portadores de grupos hidrofílicos. Así, la solubilidad en agua de las porfirinas es mayor a medida que aumenta el número de cadenas carboxílicas.

También son solubles en solventes orgánicos tales como dioxano y éter.

Los puntos isoeléctricos de las porfirinas están situados entre pH 3,0 y 4,5.

Las porfirinas manifiestan una apreciable sensibilidad a la luz, fundamentalmente a las radiaciones UV. Esta fotosensibilidad disminuye con el aumento del número de grupos carboxílicos y es particularmente influenciada por el pH del medio.

I.1.4. Funciones biológicas

Las porfirinas libres se encuentran en la naturaleza sólo en pequeñas cantidades y hasta el presente se desconoce su función. Sin embargo se combinan fácilmente con metales dando lugar a quelatos que luego forman parte de la estructura de compuestos de gran importancia biológica.

El hemo (Fe^{2+} -Protoporfirina IX), por ejemplo, es el

grupo prostético de un gran número de hemoproteínas. Entre ellas se incluyen:

- Mioglobina y hemoglobina: responsables de la reserva y transporte de oxígeno.
- Citocromos mitocondriales: fundamentales en la transferencia reversible de electrones. Se clasifican en grupos a, b, c y d. En el citocromo a el grupo prostético es una hierro-porfirina en la que un grupo formilo reemplaza a un metilo y una cadena hidrocarbonada reemplaza a un grupo vinilo. El citocromo b contiene protohemo que no está unido covalentemente a la proteína. El citocromo c tiene una unión tioéter entre una cadena lateral vinilo y un grupo sulfhidrilo cisteínico de la proteína. El citocromo d contiene hierro-hidroporfirina (clorina) como grupo prostético.
- Citocromo P₄₅₀ microsomal: es una hemoproteína unida a monóxido de carbono que cataliza oxidaciones de función mixta, forma parte de algunas monooxigenasas que hidroxilan, mediante el oxígeno molecular, una gran variedad de compuestos tales como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, ácidos grasos, esteroides y porfirinas.
- Catalasas: descomponen el peróxido de hidrógeno.
- Peroxidasas: activan el peróxido de hidrógeno.
- Triptofano pirrolasa (Triptofano 2,3-dioxigenasa): es una dioxigenasa que contiene protohematina IX como grupo prostético. Cataliza la ruptura oxidativa del anillo pirrólico del triptofano a formilkinurenina.
- Prostaglandina endoperóxido sintetasa e indolamina dioxigenasa.

En la mayoría de las hemoproteínas, el hemo está asociado con su apoproteína a través de la coordinación entre el átomo de hierro y un átomo de nitrógeno de las cadenas laterales básicas de las proteínas. En cambio en otras hemoproteínas,

como el citocromo c, el hemo está covalentemente unido a la proteína.

Asimismo las porfirinas se combinan con otros metales distintos al hierro dando lugar a la formación de otros compuestos fundamentales para la vida como la clorofila y la bacterioclorofila, que poseen magnesio en su estructura, o las corrinas que son derivados de las porfirinas complejadas con cobalto.

I.2. BIOSÍNTESIS DEL HEMO

Los primeros conocimientos de la biosíntesis del hemo provienen de Hans Fischer (Fisher, 1929) quien logró la síntesis química de la hemina. Este trabajo, junto con una serie de importantes investigaciones realizadas con marcadores isotópicos en la década del 50 por varios grupos de investigadores (Shemin y Rittenberg, 1945, 1946; Shemin y Rittenberg, 1951; Dresel y Falk, 1953; Granick y Bogorad, 1953; Neuberger y Scott, 1953; Shemin y Russel, 1953; Cookson y Rimington, 1954; Rimington, 1955; 1958), contribuyeron a la elucidación de este camino biosintético. Estos autores demostraron que los átomos de carbono y nitrógeno de la porfirina se originaban a partir de glicina y ácido succínico.

Hay 8 enzimas involucradas en la biosíntesis del hemo (Figura I.3.). La primera y las tres últimas están localizadas en la mitocondria, mientras que las restantes son citosólicas.

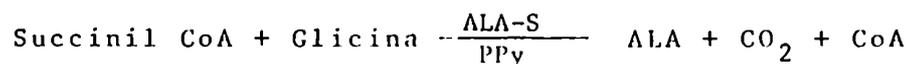
El ácido δ -Aminolevúlico Sintetasa (ALA-S) (E.C. 2.3.1.37), la primera enzima específica del camino, sintetiza ácido δ -aminolevúlico (ALA) a partir de glicina y succinil CoA, moléculas derivadas del ciclo de Krebs. La biosíntesis continúa con la formación del monopirrol porfobilinógeno (PBG) originado por acción de la enzima ácido δ -Aminolevúlico Dehidrasa (ALA-D)

(E.C. 4.2.1.24), a partir de dos moléculas de ALA. Luego se forma uroporfirinógeno (UROGEN) por la acción combinada de dos enzimas. La PBG-Deaminasa (también conocida como Uroporfirinógeno I Sintetasa o Hidroximetilbilano Sintetasa) (E.C. 4.3.1.8) une cuatro moléculas de PBG por condensación secuencial "cabeza-cola" para dar lugar al tetrapirrol de cadena abierta hidroximetilbilano (HMB), el cual en ausencia de la segunda enzima, la Uroporfirinógeno III sintetasa (UROGEN III-S) (también llamada Isomerasa o Cosintetasa) (E.C. 4.2.1.75), se cicla químicamente para formar el UROGEN I. En presencia de UROGEN III-S, los sustituyentes del anillo D se invierten antes de la ciclación, formándose así la estructura asimétrica UROGEN III. De allí en adelante, la Uroporfirinógeno Decarboxilasa (URO-D) (E.C. 4.1.1.37) decarboxila secuencialmente cuatro grupos acetilo del UROGEN III dando lugar finalmente al coproporfirinógeno (COPROGEN) III con cuatro carboxilos. La URO-D también puede actuar sobre el UROGEN I para formar COPROGEN I, pero sólo el COPROGEN III es decarboxilado oxidativamente a protoporfirinógeno (PROTOGEN) IX por la Coproporfirinógeno Oxidasa (CPGasa) (E.C. 1.3.3.3). En el siguiente paso, seis átomos de hidrógeno son eliminados del PROTOGEN IX por la Protoporfirinógeno Oxidasa (PTG-asa) (E.C. 1.3.3.4) formando protoporfirina (PROTO) IX. Por último, la enzima Ferroquelatasa (Fe-quel) (E.C. 4.99.1.1) o Hemosintetasa inserta un ión ferroso en el anillo porfirina para dar hemo.

I.3. ENZIMAS DEL CAMINO BIOSINTETICO DEL HEMO

I.3.1. ALA-Sintetasa

La formación de ALA a partir de glicina y succinil CoA es la primera etapa que conduce específicamente a la biosíntesis de porfirinas, catalizada en la mitocondria por la enzima ALA-S (Reacción 1.1.).



REACCION I.1.

La enzima fue detectada originariamente en extractos de *Rhodospseudomonas spheroides* (Kikuchi y col., 1958) y en eritrocitos de pollo (Gibson y col., 1958). A partir de entonces, ha sido estudiada y medida en una gran variedad de fuentes.

En la mayoría de los tejidos estudiados, el ALA-S está asociada a la fracción mitocondrial, sin embargo se ha detectado baja actividad de esta enzima en otras fracciones subcelulares bajo determinadas condiciones experimentales (Hayashi y col., 1969; Whiting y Elliot, 1972; Patton y Beattie, 1973). Existen evidencias que indican que el ALA-S se sintetiza en los polirribosomas microsomales y que el ALA-S citosólica no es más que la proteína precursora del ALA-S mitocondrial (Whiting y Elliot, 1972; Ohashi y Kikuchi, 1977; Nakakuki y col., 1980; Srivastava y col., 1983 a).

La vida media del ALA-S mitocondrial es corta: 34 minutos en hígado de feto de ratas (Woods, 1974), 70 minutos en hígado de rata adulta (Tschudy y col., 1965) y 180 minutos en cultivo de células de embrión de pollo (Sassa y Granick, 1970).

Es una enzima bastante difícil de purificar ya que se encuentra en pequeña cantidad y es muy inestable. Se caracteriza por formar agregados consigo misma y con otras proteínas. Por tal motivo su peso molecular (PM) varía entre 77.000 y 120.000 (Whiting y Granick, 1976; Paterniti y Beattie, 1979).

El ALA-S es una enzima sulfhidrúlica, altamente

específica para succinil CoA y requiere fosfato de piridoxal y CoA como cofactores.

La actividad del ALA-S, generalmente la más baja del camino del hemo, puede incrementarse marcadamente luego del tratamiento con diversas drogas; es por ello que se le asigna a esta enzima un rol regulatorio en esta vía biosintética (Granick y Sassa, 1971).

I.3.2. ALA-Dehidrasa

La enzima ALA-D, también conocida como Porfobilinógeno Sintetasa, cataliza la condensación en forma asimétrica de 2 moléculas de ALA para dar el primer compuesto cíclico y único monopirrol natural del camino biosintético del hemo, el PBG (Dresel y Falk, 1953; Granick, 1954).

Esta enzima está ampliamente distribuída en la naturaleza y ha sido aislada y estudiada en numerosas fuentes. Es citoplasmática aunque en plantas superiores se ha demostrado actividad de ALA-D en proplástidos y etioplastos (Sluifers-Scholten y col., 1973; Shibata y Ochiai, 1976).

Su pH óptimo varía entre 6,3 para reticulocitos de conejo (Granick y Mauzerall, 1958) y 9,5 para levaduras (Barreiro, 1967).

Es una enzima termoestable, que *in vitro* presenta actividad a temperaturas que van desde 55 °C (Tigier y col., 1970) hasta 65 °C (Batlle y col., 1967).

Los valores de Km reportados se encuentran en el rango $7,7 \times 10^{-5}$ M (Calissano y col., 1965) a $1,0 \times 10^{-3}$ M (Nandi y Waygood, 1967).

Es sulfhidrónica y requiere la presencia de reductores de grupos tioles para manifestar su máxima actividad *in vitro*, siendo una excepción la enzima de callos de soya (Tigier y col., 1970). Los compuestos tiólicos más usados y en general

igualmente efectivos son la cisteína, el glutati6n, el β -mercaptoetanol y el ditiotreit6l, s6los o combinados con zinc (Tsukamoto y col., 1979; Bevan y col., 1980) ya que los grupos sulfhidr6licos se oxidan f6cilmente por exposici6n al aire. Asimismo, la enzima se inactiva por inhibici6n de estos grupos por reactivos de grupos sulfhidrilos, metales pesados o desplazamiento del zinc por plomo o quelaci6n con EDTA (Granick y col., 1973; Finelli y col., 1975; Bevan y col., 1980).

El ALA-D es una enzima oligom6rica de PM 280 KDa con ocho subunidades de 35 KDa que se disponen en los v6rtices de un cubo con una simetría dihedra D₄ (Wu y col., 1974; Kreutzer y col., 1977; Anderson y Desnick, 1979). Batlle y col. (1978) postularon que la estructura m6nima necesaria para la actividad catal6tica es un d6mero funcional.

Estudios realizados con el objeto de caracterizar el sitio activo de la enzima han demostrado que, por subunidad funcional, est6n involucradas una o dos mol6culas de lisina o arginina, 2 grupos cisteicos vecinos altamente reactivos, uno o dos residuos histidina y un 6tomo de zinc. Aparentemente la funci6n de este i6n es proteger a los grupos sulfhidrilos de la enzima de la oxidaci6n (Tsukamoto y col., 1979).

Existen diferentes opiniones en lo concerniente al n6mero de sitios activos por mol6cula, que para algunos autores es 4 y para otros 8, y a la naturaleza del sitio activo, el cual podría estar formado por la uni6n de dos mitades ubicadas en subunidades adyacentes, o ser un sitio completo dentro de una subunidad.

En 1968, el grupo de Shemin (Nandi y Shemin, 1968) propuso un mecanismo de acci6n para el ALA-D que ha sufrido algunas modificaciones. Se ha propuesto que dos mol6culas de ALA se condensan por medio de una s6ntesis de pirroles de Knorr (Batlle y Stella, 1978). M6s recientemente, se demostr6 que la primera mol6cula de sustrato que se une a la enzima es la que

aporta la cadena propiónica del PBG (Jordan y Seehra, 1980); mientras que la segunda molécula de ALA es la que forma la base de Schiff entre el grupo carbonilo en δ del ALA y un ϵ -amino de una lisina del sitio activo de la enzima, dando lugar así al grupo acético del pirrol.

1.3.3. Conversión enzimática de PBG a UROGEN III

Lockwood y Rimington (1957) designaron con el nombre Porfobilinogenasa (PBG-asa) al complejo enzimático que cataliza la ciclotetramerización de PBG para dar UROGEN III, el intermediario fisiológico en la biosíntesis del hemo. Este complejo está formado por dos enzimas, la PBG-Deaminasa y la UROGEN III-S.

1.3.3.1. PBG-Deaminasa

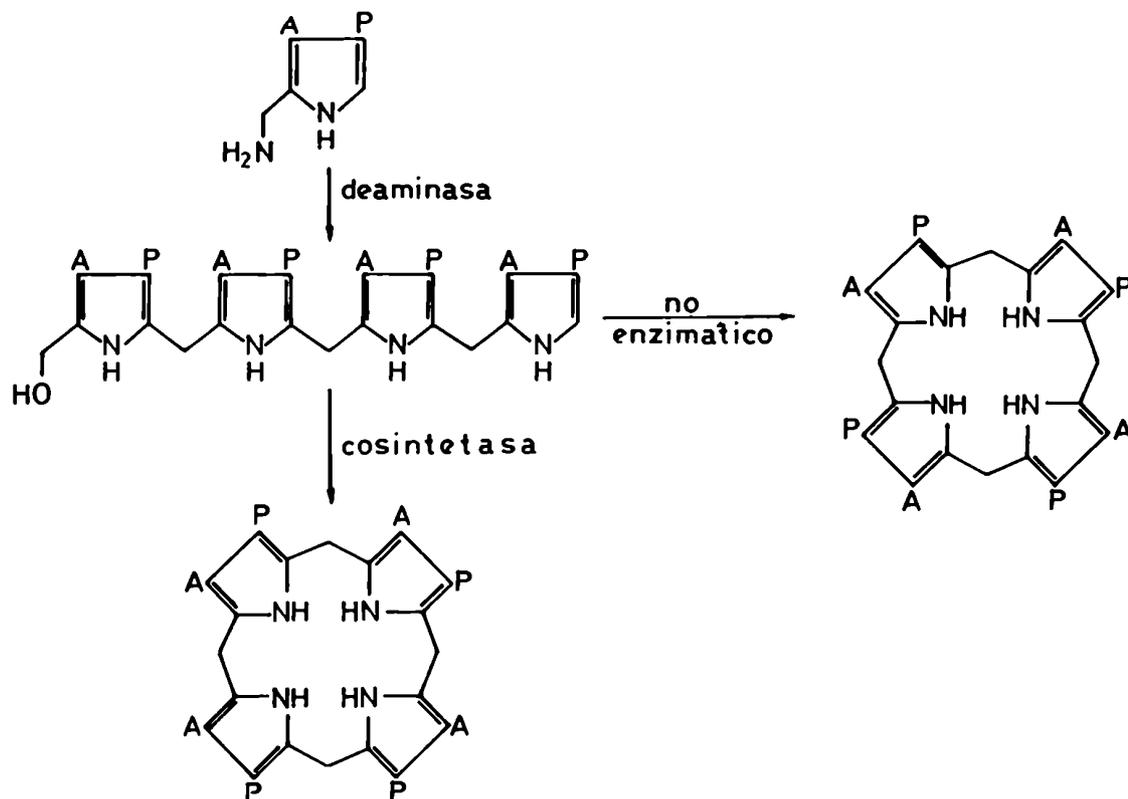
La PBG-Deaminasa cataliza la condensación cabeza-cola de 4 moléculas de PBG, con eliminación de amoníaco, para formar un tetrapirrol lineal e inestable, el HMB. Este intermediario, en ausencia de la UROGEN III-S, se cicla no enzimáticamente dando el UROGEN I (Esquema I.1.).

Esta enzima ha sido purificada de numerosas fuentes tales como: *Rhodopseudomonas spheroides* (Davies y Neuberger, 1973; Jordan y Shemin, 1973), espinaca (Higuchi y Bogorad, 1975), eritrocitos humanos (Frydman y Feinstein, 1974; Anderson y Desnick, 1980; Fumagalli y col., 1985), *Euglena gracilis* (Rossetti y col., 1980; Williams y col., 1981; Battersby y col., 1983 a), hígado de rata (Williams, 1984) y *E. coli* (Hart y col., 1986; Jordan y col., 1988 a).

La PBG-Deaminasa es una enzima citoplasmática, termoes table y generalmente sulfhidrónica.

Para la mayor parte de las fuentes estudiadas, esta

enzima resultó ser una proteína monomérica con un PM de aproximadamente 40 KDa.



ESQUEMA I.1.

La PBG-Deaminasa es capaz de formar complejos estables con PBG (Anderson y Desnick, 1980; Berry y Jordan, 1981; Williams, 1984). Se han separado por electroforesis complejos en los cuales una, dos, tres y cuatro (para la enzima de eritrocitos humanos) moléculas de PBG están unidas a una molécula de enzima (E), siendo esta unión covalente (Jordan y Berry, 1981;

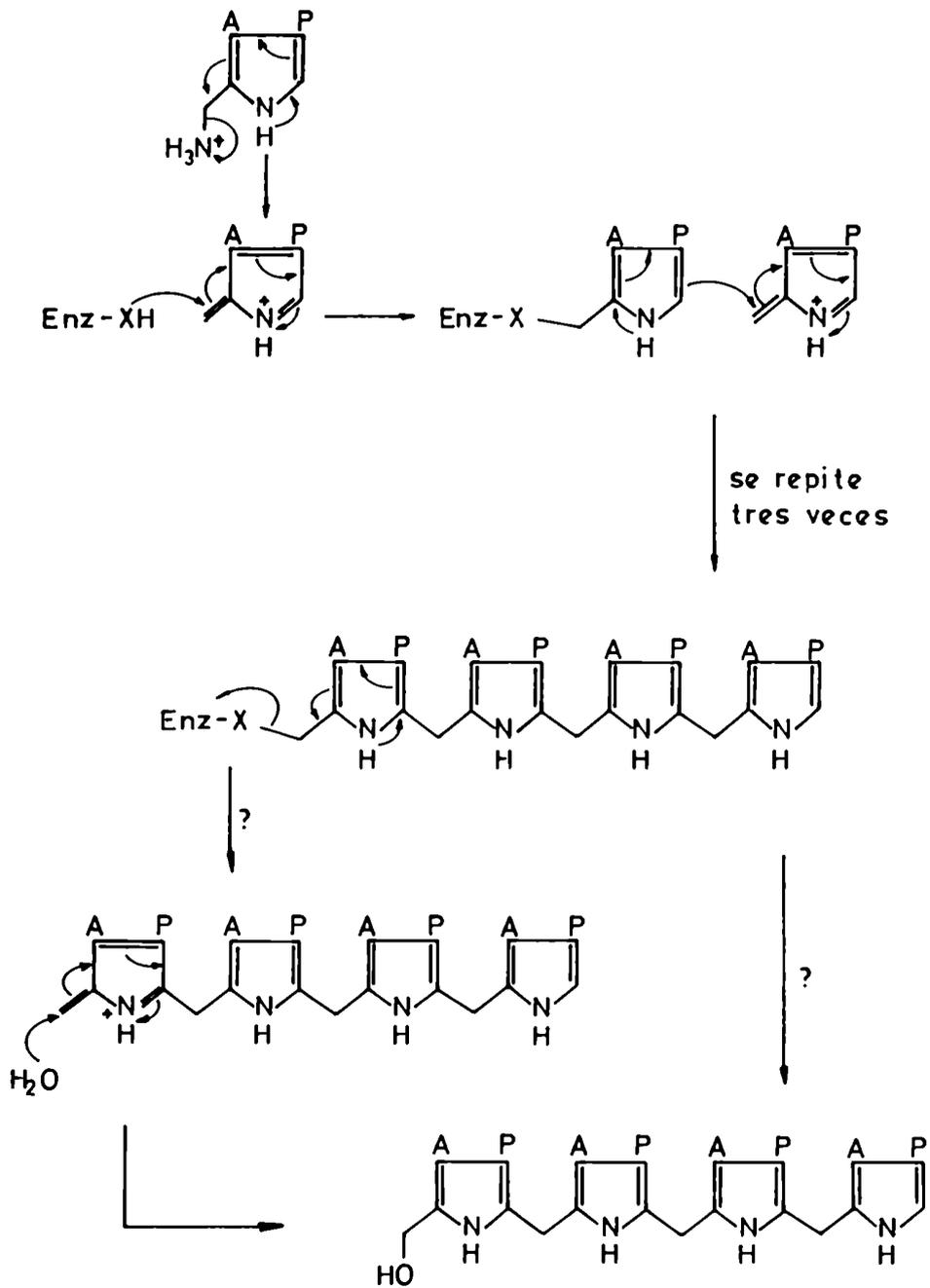
Battersby y col., 1983 a). Además, se demostró que la unión de un mol de PBG con un mol de enzima libera un mol de amonio (Battersby y col., 1983 b) (Esquema 1.2.); es decir que la primera molécula de PBG se une a la enzima por un grupo X con la pérdida de un grupo amino dando E-PBG, vía un azafulveno protonado, el cual podría ser un intermediario de la reacción. La unión subsiguiente de otras tres moléculas de PBG, a cada sucesiva posición α libre, lleva a la formación del complejo E-(PBG)₄. Finalmente, el desplazamiento del grupo X por el agua, probablemente vía un azafulveno protonado (Rosé y col., 1988; Scott y col., 1988) lleva a la formación del HMB. Alternativamente, si otros nucleófilos están presentes, tales como amoníaco o hidroxilamina, pueden también producir la eliminación del grupo X, formándose aminometil o hidroxiaminometil bilanos.

El grupo X en la enzima debía corresponderse con un átomo nucleofílico tal como oxígeno, nitrógeno o azufre. Sin embargo, los primeros trabajos tendientes a clarificar este aspecto no fueron sencillos (Evans y col., 1984, 1986; Jordan y col., 1988 a) y tampoco se obtuvieron resultados concluyentes respecto a la naturaleza exacta de dicho grupo. Posteriormente, la introducción de nuevas técnicas de biología molecular permitió dilucidar este problema. En primer lugar, el gen de la PBG-Deaminasa de *E. coli* fue clonado y sobreexpresado (Jordan y Warren, 1987; Hart y col., 1987, 1990). Los estudios de secuenciación de los grupos de Jordan, Sasarman y Abell (Thomas y Jordan, 1986; Sasarman y col., 1987; Alefounder y col., 1988) revelaron que la proteína de *E. coli* consta de 313 residuos con un PM de 33.857 Da. Por otra parte, la introducción de las técnicas de fplc (fast protein liquid chromatography) y sobreexpresión de genes clonados no sólo permitió una más rápida y mejor purificación de la enzima sino también la separación de los complejos E-(PBG)₁₋₄ en escala preparativa. Así, empleando estas técnicas conjuntamente con la espectroscopía ¹³C-RMN, el grupo de

Battersby (Hart y col., 1987, 1990; Miller y col., 1989 a) confirmó la presencia de un nuevo e inesperado cofactor pirrólico covalentemente unido a la PBG-Deaminasa, al cual se unía la primera molécula de sustrato. También otros experimentos tales como el tratamiento de la enzima nativa con ácido fórmico o con el reactivo de Ehrlich, llevaron a postular la existencia de un cofactor dipirrometano para la PBG-Deaminasa (Hart y col., 1987, 1990). Resultados similares fueron hallados por el grupo de Jordan y Scott (Jordan y Warren, 1987; Jordan y col., 1988 b; Scott y col., 1988; Warren y Jordan, 1988 a, b; Scott y col., 1989).

El mecanismo de acción completo para la PBG-Deaminasa podría ahora ser descripto como se muestra en la Figura 1.4. El cofactor dipirrometano se mantendría a través del ciclo catalítico y no se reciclaría ni se intercambiaría con las moléculas de sustrato. Tampoco sería necesaria la presencia de una enzima adicional para unir el cofactor a la apo-PBG-Deaminasa. Además, por ^{13}C -RMN, se concluyó que el cofactor está unido al residuo cisteína 242 de la enzima (Hart y col., 1988; Jordan y col., 1988 b; Miller y col., 1988; Scott y col., 1988).

A pesar de conocer las secuencias aminoacídicas de la PBG-Deaminasa de diversas fuentes (*E. coli*, *E. gracilis*, rata, humanos), aun no ha sido posible asignar con exactitud cuáles residuos están involucrados en el sitio activo. Una observación importante es que hay 12 residuos arginina que se conservan, un número sorpresivamente elevado. Se especulaba que estos residuos básicos, que ya en 1978 (Pollack y Russell, 1978) habían sido detectados empleando butanodiona, podrían estar involucrados en la unión de las cadenas carboxílicas del cofactor y las cuatro moléculas de sustrato que, coincidentemente suman 12. En trabajos recientes (Jordan y Woodcock, 1991; Lander y col., 1991) se ha comprobado la interacción de algunos de estos residuos arginina con el cofactor dipirrometano y los cuatro anillos pirrólicos que formarían el HNB.



ESQUEMA I.2.

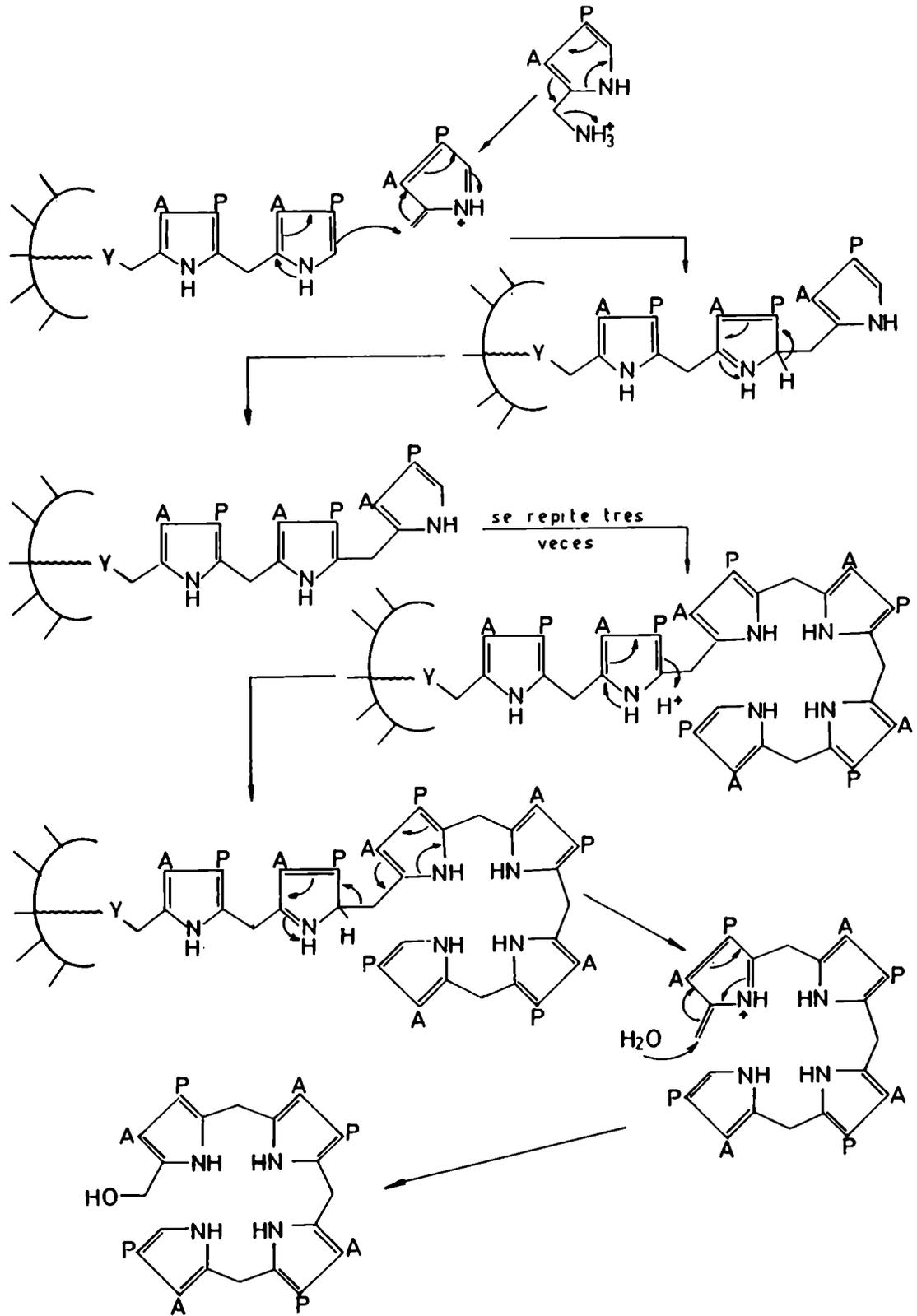


FIGURA 1.4.: Mecanismo de acción de la PBG-Deaminasa

Además, estudios tempranos indican la presencia de residuos lisina en o cerca del sitio activo de la PBG-Deaminasa (Hart y col., 1984, 1986; Russell y col., 1984; Miller y col., 1989 b). Recientemente empleando la técnica de mutagénesis dirigida (Hädener y col., 1990), se encontró que la lisina 59 estaría más involucrada en la unión del sustrato que en el mecanismo catalítico.

En algunas fuentes ha sido observada la inactivación de la enzima por modificación de los residuos cisteína (Jordan y Shemin, 1973; Russell y Rockwell, 1980) aunque en otras no (Russell y col., 1984; Mazzetti y Tomio, 1988).

Otros experimentos de modificación química de residuos indicaron que tanto los residuos arginina como los residuos que contienen carboxilos son importantes para la actividad de la PBG-Deaminasa (Russell y col., 1984; Mazzetti y Tomio, 1988).

Por otra parte, se deben destacar los estudios genético-moleculares sobre la PBG-Deaminasa humana. El gen de esta enzima ha sido asignado al cromosoma 11 en la región 11q23-11qter (Meisler y col., 1980; Wang y col., 1981). En 1986, Raich y col. clonaron y secuenciaron el cDNA de este gen y por análisis de Southern se demostró que está presente en una copia única. Además se han caracterizado dos isoenzimas de la PBG-Deaminasa a partir de células eritropoiéticas y no eritropoiéticas que difieren en 2.000 Da (Grandchamp, y col., 1987). El único gen de la PBG-Deaminasa es, por lo tanto, transcrito a partir de dos promotores diferentes formando dos RNA mensajeros que difieren en su extremo 5' y que están distribuidos en tejidos específicos.

El DNA genómico de la PBG-Deaminasa comprende aproximadamente 10 Kb y contiene 15 exones (Figura I.5.). Se han identificado los dos promotores, uno para la forma no eritroide y otro para la forma eritroide, y están separados por 3 Kb (Chrétien y col., 1988). El promotor no eritroide es rico en

G+C pero no contiene ni el clásico TATA box ni el CAAT box. El promotor eritropoiético tiene una estructura semejante al promotor del gen de la β globina que incluye TATA box, CAAT box y CAAC box. En trabajos más recientes, se describen diferentes elementos que actúan en cis o en trans sobre estos promotores (Mignotte y col., 1989; Beaupain y col., 1990) afectando así la expresión de la PBG-Deaminasa.

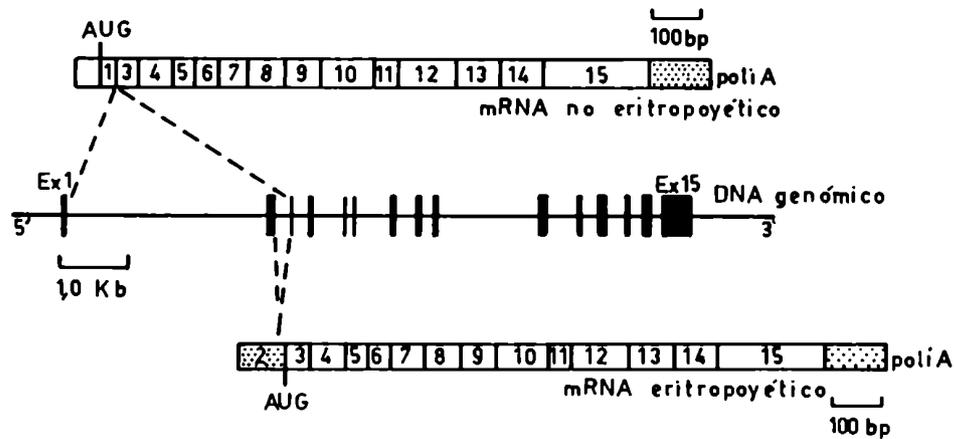


FIGURA I.5.: Estructura del gen de la PBG-Deaminasa humana.

I.3.3.2. UROGEN III-Sintetasa

Esta enzima convierte al HMB en UROGEN III, siendo incapaz de isomerizar al UROGEN I.

Los estudios sobre la Cosintetasa se han visto demorados por las siguientes razones: su verdadero sustrato se conoció recién en 1979 (Battersby y col., 1979 a; Burton y col., 1979; Jordan y col., 1979; Jordan y Berry, 1980), es inestable y difícil de preparar. Hasta ese momento las propiedades de esta enzima se habían estudiado casi totalmente en forma indirecta

ya que para poder medir su actividad se la incubaba en presencia de PBG-Deaminasa.

La Cosintetasa es una proteína termolábil, se inactiva rápidamente con un breve tratamiento con calor o por dejarla a temperatura ambiente durante cortos períodos de tiempo. Sólo recientemente ha sido purificada en alto grado a partir de: hígado de rata (Clement y col., 1982; Kohashi y col., 1984), *E. gracilis* (Hart y Battersby, 1985), eritrocitos humanos (Tsai y col., 1987) y *E. coli* (Alwan y Jordan, 1988). Es una proteína monomérica y su PM varía entre 26 KDa y 30 KDa según la fuente y la metodología que se emplee para su determinación.

El gen que codifica para la Cosintetasa (hem D) en *E. coli* se encuentra adyacente al de la PBG-Deaminasa (hem C); el primer par de bases del gen hem D es el último del hem C (Alefounder y col., 1988; Jordan y col., 1988 c). También se secuenció la enzima humana (Tsai y col., 1988).

El mecanismo de acción de esta enzima no se encuentra totalmente dilucidado. Se han postulado varios (Mathewson y col., 1961; Battersby y col., 1983 c; Juknat y col., 1981, 1988 a, b; Stark y col., 1985, 1986, 1988; Jackson y col., 1989), siendo el más probable el mecanismo spiro según el cual se forma como intermediario una spiropirrolenina (Figura I.6.).

I.3.4. URO-Decarboxilasa

La URO-D es una enzima citosólica que cataliza la pérdida secuencial de cuatro grupos carboxilos de los sustituyentes acetilo del UROGEN para dar el COPROGEN, con la formación de intermediarios hepta, hexa y pentacarboxílicos (Figura I.7.).

Esta enzima ha sido estudiada en numerosas fuentes (Mauzerall y Granick, 1958; Romeo y Levin, 1971; Aragonés y col., 1972; San Martín de Viale y col., 1976 a, b; Ríos de Molina y col., 1980, 1984; Taira y San Martín de Viale, 1984;

Afonso y col., 1985; Koopmann y col., 1986; Navone y col., 1992).

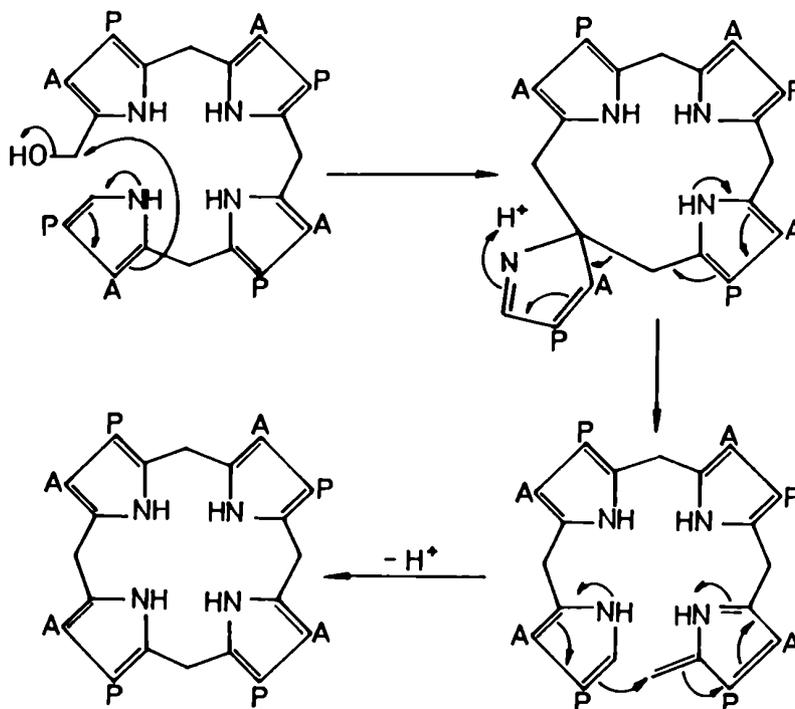


FIGURA I.6.: Mecanismo spiro de la UROGEN III-S

La URO-D decarboxila un gran número de porfirinógenos naturales o sintéticos, pero no decarboxila las correspondientes porfirinas (Jackson y col., 1976 a; Smith y Francis, 1979). Los isómeros de la serie III son decarboxilados más rápidamente, seguidos en orden decreciente de velocidad por los isómeros IV II y I (Granick y Mauzerall, 1958; Cornford, 1964). Se demostró que los porfirinógenos con 7 a 5 carboxilos son los verdaderos intermediarios de esta reacción (Mauzerall y Granick, 1958; Hoare y Heath, 1959; Battle y Grinstein, 1964 a, b; San Martín

y Grinstein, 1968), sugiriendo que la decarboxilación de UROGEN es un proceso secuencial.

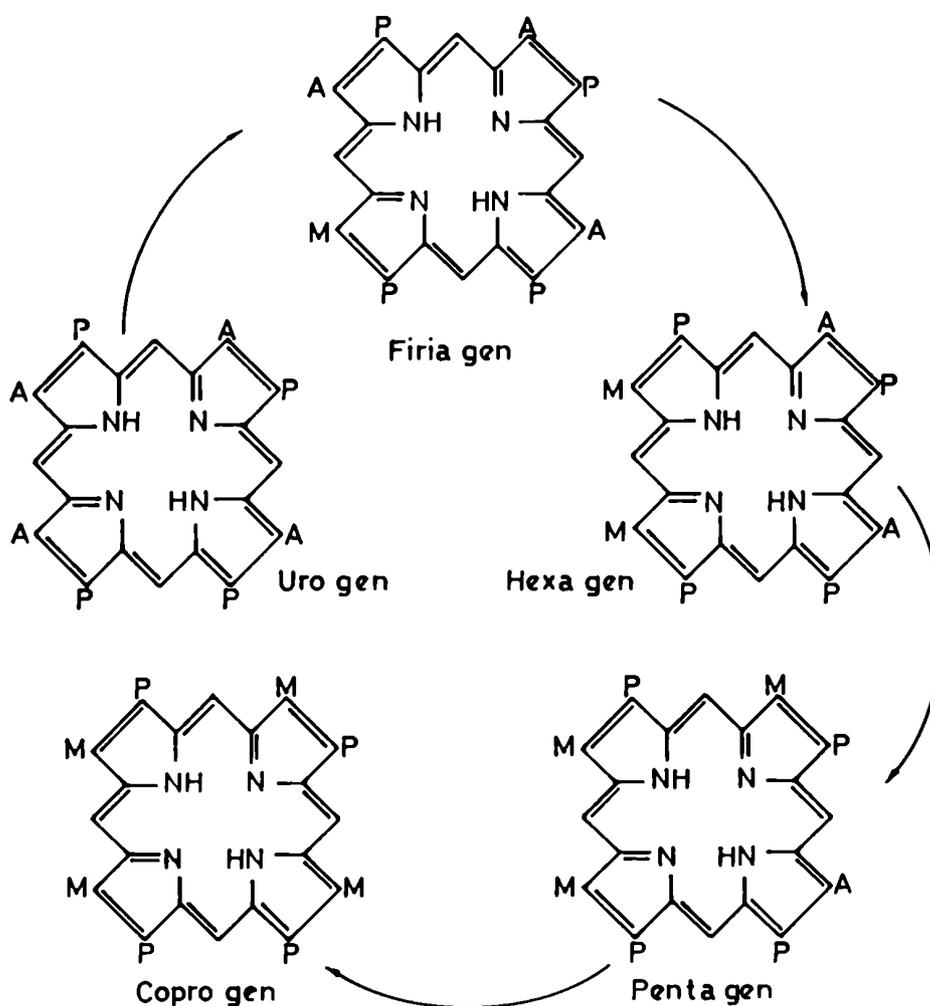


FIGURA 1.7.: Decarboxilación de UROGEN a COPROGEN catalizada por URO-D.

A: Metilo; M: metilo; P: propionilo

In vitro, la actividad enzimática se inhibe por la presencia de mercurio (II), cobre (II), iodoacetamida y

p-cloromercuribenzoato (PCMB), pudiendo revertirse este efecto por el agregado de glutatión reducido (GSH), lo cual confirma que la URO-D es una enzima sulfhidrúlica (Mauzerall y Granick, 1958; Tomio y col., 1970). También el oxígeno inactiva a la enzima y si bien este efecto podría deberse a la oxidación de los sustratos no puede descartarse un efecto directo sobre la enzima.

A partir de estudios cinéticos se ha propuesto que la reacción ocurre en dos etapas, la primera de las cuales involucraría una rápida pérdida del primer carboxilo del resto acetilo del anillo D del UROGEN III, seguida por una eliminación más lenta de los restantes residuos acetilo de los anillos A, B y C hasta formar COPROGEN III (Figura 1.7.) (Mauzerall y Granick, 1958; Battle y Grinstein, 1964 b; Tomio y col., 1970; García y col., 1973; Smith y Francis, 1979; De Verneuil y col., 1980; Kardish y Woods, 1980).

Aún no se ha establecido el mecanismo de acción de la URO-D pero se ha postulado que, cuando el sustrato es UROGEN III, la eliminación de los carboxilos comienza en el anillo D y continúa en el sentido horario según la estructura de Fischer (Jackson y col., 1976 b); sin embargo recientemente se presentaron evidencias de que esta decarboxilación es al azar (Luo y Lim, 1990). Por otra parte, la decarboxilación del isómero I parece seguir cualquiera de las dos rutas posibles (Jackson y col., 1977).

Se ha reportado que la URO-D es una enzima monomérica con dos (De Verneuil y col., 1983 y Elder y col., 1983) o más (De Verneuil y col., 1980) sitios activos, o una enzima dimérica (Kawanishi y col., 1983). Los PM's encontrados para esta enzima varían notablemente: 37 a 42 KDa por SDS-PAGE (Elder y col., 1983; Romeo y col., 1986) y 50-64 KDa por filtración por gel (De Verneuil y col., 1983; Elder y col., 1983). Esta variación se atribuyó inicialmente a la metodología empleada. Sin

embargo, recientemente han sido aisladas dos isoformas de la URO-D con PM's de 52-54 KDa y 35 KDa (Mukerji y Pimstone, 1992).

I.3.5. Coproporfirinogenasa

Esta enzima cataliza la conversión de COPROGEN III en PROTOGEN IX. La reacción involucra la decarboxilación oxidativa de dos grupos propiónicos en los anillos A y B del núcleo tetrapirrólico a dos residuos vinilo, para formar el PROTOGEN IX.

La enzima ha sido detectada en numerosas fuentes, pero la mayor información sobre sus propiedades proviene de trabajos realizados con la enzima purificada de mitocondrias de hígado de rata.

La CPG-asa es una enzima ubicada en el espacio intermembrana en mitocondria (Sano y Granick, 1961; Batlle y col., 1965; Elder y Evans, 1978). Es altamente específica para los isómeros III y IV (Porra y Falk, 1964).

Requiere la presencia de oxígeno molecular para su actividad y ningún otro aceptor de electrones puede reemplazarlo.

Es una enzima monomérica con un PM de 80 KDa (Batlle y col., 1965; Poulson y Polglase, 1974; Yoshinaga y Sano, 1980). El estudio de su estructura primaria indicó que es una proteína rica en residuos aromáticos. Su actividad no se altera significativamente cuando están presentes reactivos sulfhidrúlicos.

La reacción catalizada por la CPG-asa tiene lugar en etapas. Durante esta reacción se detectó un intermediario tricarbóxico (harderoporfirina) (Tomio y Grinstein, 1968) que desaparece a medida que aquella progresa. La decarboxilación de los residuos propiónicos es independiente y secuencial, y comienza en el carbono β de la cadena lateral del anillo A, siguiendo por el del anillo B. La pérdida de uno de los átomos

de hidrógeno es estereoespecífica (Battersby y col., 1972; Zaman y col., 1972). Batlle y Rimington (1965) propusieron que las cadenas de ácido propiónico son convertidas en ácido β -hidroxipropiónico. La deshidratación de estos residuos produce ácido acrílico, probablemente el isómero *cis*, y su decarboxilación conduce a la formación de los grupos vinilo (Batlle y col., 1965; Sano, 1966).

Más recientemente, se obtuvieron evidencias acerca de la formación de intermediarios hidroxilados (Jackson y col., 1980) y además se demostró que la conversión enzimática de las cadenas laterales ácido propiónico del COPROGEN a vinilo ocurre en dos etapas, de la posición 2 a 4, a través de la formación de un intermediario porfirinógeno β -hidroxipropionato (Yoshinaga y Sano, 1980) (Figura I.8.).

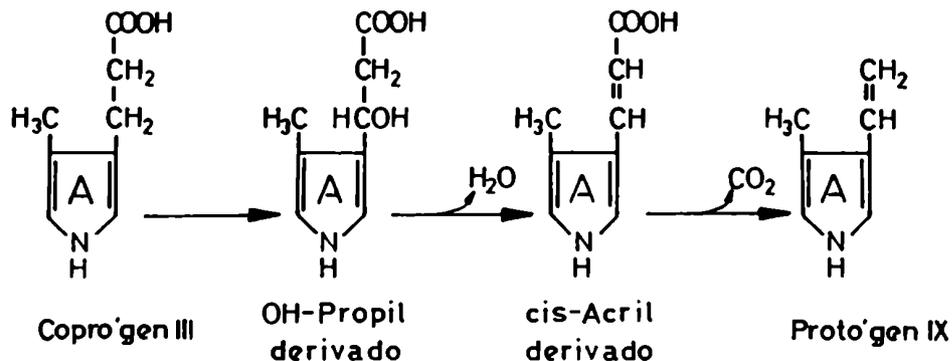


FIGURA I.8.: Decarboxilación de COPROGEN a PROTOGEN catalizada por la CPG-asa.

I.3.6. Protoporfirinogenasa

La PTG-asa cataliza la conversión del PROTOGEN IX en PROTO IX, con la eliminación de 6 átomos de hidrógeno.

Esta enzima ha sido aislada de numerosas fuentes (Poulson y Polglase, 1975; Poulson, 1976; Jackson y col., 1978; Brenner y Bloomer, 1980) y requiere oxígeno como único aceptor de hidrógeno aunque en *Escherichia coli*, fumarato y nitrato pueden reemplazar al oxígeno bajo condiciones anaeróbicas (Jacobs y Jacobs, 1975, 1976).

La PTG-asa es una enzima mitocondrial y estaría ubicada dentro de la membrana interna de la organela (Deybach y col., 1985). Es altamente específica para el PROTOGEN IX, es termolábil y sulfhidrónica.

El PM de la enzima de hígado de rata, de hígado humano y de levaduras es de 35, 32 y 180 KDa respectivamente (Poulson y Polglase, 1975; Poulson, 1976; Camadro y col., 1985).

Su mecanismo de acción no ha sido totalmente esclarecido, sin embargo se ha postulado que los grupos sulfhidrilos del sitio activo serían importantes para la unión del sustrato a través de los residuos vinilo (Jackson y Games, 1975). El grupo de Jackson demostró además que el proceso de oxidación es estereoespecífico. Se produce la pérdida de los átomos de hidrógeno ubicados en sólo uno de los lados del plano de la porfirina (Jackson y col., 1974; Smith y col., 1976). Más recientemente, Jones y col. (1984) sugirieron que, de los cuatro átomos de hidrógeno en posiciones meso que se pierden, tres son removidos como hidruros y el restante como protón.

1.3.7 Ferroquelatasa

Finalmente, el último paso en la ruta biosintética del hemo es la inserción de un átomo de hierro (II) en la PROTO IX. Esta reacción es catalizada por la Fe-quel (Rimington, 1958), aunque puede también ocurrir no enzimáticamente.

Esta enzima se ha estudiado en numerosas fuentes (Lascelles, 1964; Labbe y col., 1968; Jones y Jones, 1969).

La Fe-quel es una enzima mitocondrial firmemente unida a la membrana interna (Mc Kay y col., 1969; Harbin y Dailey, 1985). Es una lipoproteína, siendo el agregado de fracciones fosfolipídicas esencial para su actividad *in vitro* (Sawada y col., 1969; Taketani y Tokunaga, 1981; Dailey y Fleming, 1983; Hanson y Dailey, 1984). Es sulfhidrónica (Porra y col., 1967; Llambías, 1976; Taketani y Tokunaga, 1981) y parecería, en algunos casos, requerir fosfato de piridoxal (Labbe y Nielsen, 1976; Taketani y Tokunaga, 1981; Dailey, 1982). Es inhibida por oxígeno e inactivada por manganeso y plomo (Porra y Jones, 1963 a; Mazanowska y col., 1966).

Esta enzima es altamente específica para el hierro (II), lo cual es de suma importancia ya que *in vivo* la Fe-quel debe seleccionar a este metal de entre una gran variedad de cationes divalentes (Labbe y Hubbard, 1961); sin embargo otros metales tales como zinc (II) y cobalto (II) también se pueden incorporar a la PROTO IX (Jones y Jones, 1969; Sinclair y col., 1979; Camadro y col., 1984; Cánepa, 1987).

En cuanto a su especificidad por las porfirinas, se comprobó que además de PROTO IX, pueden actuar como sustrato *in vivo* la mesoporfirina y la deuteroporfirina (Porra y Jones, 1963 b; Taketani y Tokunaga, 1982).

1.4. CONTROL DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO

Los procesos metabólicos ocurren en las células vivas en perfecto equilibrio y coordinados de tal manera que aseguran la utilización adecuada de los sustratos necesarios para la síntesis celular. El camino biosintético del hemo también responde a esta regla general. Por ejemplo, en condiciones normales, la cantidad de porfirinas libres y/o de precursores (ALA y PBG) que se acumulan o excretan es muy pequeña, indicando que la biosíntesis del hemo se lleva a cabo con un alto grado de

eficiencia y además está sujeta a una serie de controles estrechamente ligados.

I.4.1. Rol del ALA-S y su control por hemo

El punto de control primario de este camino se encuentra en la mayoría de los sistemas estudiados a nivel de la primera enzima, el ALA-S. Su capacidad para controlar la velocidad de la vía metabólica se debe a su baja actividad endógena y a su corta vida media (Bishop y Desnick, 1982).

En principio, el ALA-S está sujeta a un mecanismo de control por retroinhibición o "feedback", es decir que el producto final (hemo) ejerce un efecto inhibitorio sobre la enzima (Lascelles, 1964; Sassa y Granick, 1970; Whiting, 1976). Además de la inhibición por producto final, existe regulación de la síntesis del ALA-S a nivel de la transcripción y traducción de esta proteína. El mecanismo, que se postuló para explicar la síntesis de ALA-S y su control, se basa en la conocida hipótesis de Jacob y Monod (Jacob y Monod, 1961; Tyrell y Marks, 1972; Whiting, 1976) (Figura I.9.).

El ALA-S tiene la capacidad de responder rápidamente a un aumento en el requerimiento de hemo y su síntesis es reprimida a concentraciones de hemo de 10^{-7} M, mientras que la inhibición de su actividad se logra a concentraciones de 10^{-5} M (Wolfson y col., 1979). Estos resultados sugieren que el control del ALA-S ejercido por el hemo es muy importante a nivel de la síntesis *de novo*, aunque también se debe tener en cuenta la retroinhibición por producto final, ya que el hemo se sintetiza en la mitocondria, el mismo compartimiento en el que desarrolla su actividad catalítica el ALA-S (Wolfson y col., 1979; Kappas y col., 1983).

Estudios en cultivos de hígado de embrión de pollo sugieren que la hemina (la forma oxidada del hemo) actúa

acortando la vida media del RNAm del ALA-S, o bien interfiriendo específicamente con su síntesis a nivel post-transcripcional (Sassa y Granick, 1970; Tyrell y Marks, 1972). Luego se encontró que la hemina puede reprimir la síntesis del RNAm del ALA-S (Whiting, 1976; Yamamoto y col., 1988).

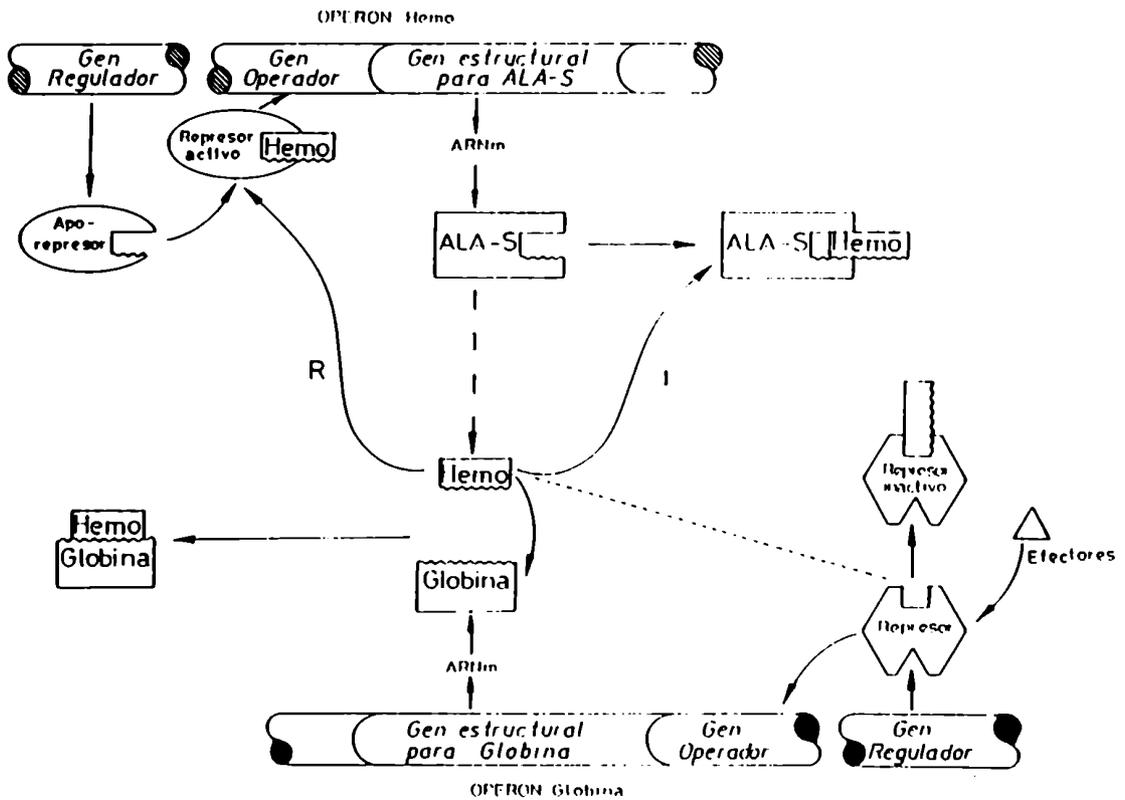


FIGURA I.9.: Mecanismo de regulación de la biosíntesis del hemo.

I: Inhibición del ALA-S por producto final; R: represión de la síntesis de ALA-S

La administración exógena de hemo también reduce la actividad de ALA-S disminuyendo la velocidad de transferencia de la enzima citosólica a la mitocondria (Hayashi y col., 1983; Srivastava y col., 1983 b). El rol que juega el hemo en estas circunstancias puede explicarse aceptando la existencia de un pool de hemo libre formado por hemo recién sintetizado o proveniente de fuentes exógenas, no unido a proteínas. Este pool debe ser pequeño y con una muy rápida velocidad de recambio (Figura 1.10.). El reservorio de hemo libre puede afectar la biosíntesis y el metabolismo del hemo en varias formas (Kappas y col., 1983): a) el hemo libre en mitocondria puede regular la velocidad de síntesis de las subunidades de Citocromo Oxidasa que son sintetizadas en los ribosomas mitocondriales (Trueblood y col., 1988; Hodge y col., 1989); b) el hemo libre citosólico puede reprimir la velocidad de síntesis del ALA-S e inducir a la Hemo Oxigenasa (enzima que cataboliza el hemo); esta fracción del hemo podría considerarse como el "hemo regulatorio" y c) el hemo libre microsomal puede regular la actividad de la Hemo Oxigenasa además de actuar como sustrato.

Sin embargo, el efecto de la hemina sobre la actividad del ALA-S es diferente en tejido hepático que en extrahepáticos. Así, la hemina no inactiva el ALA-S en la glándula de Harder de ratón (Margolis, 1971), corazón (Briggs y col., 1976), glándula adrenal (Condie y col., 1976) y testículo (Tefilon y Piper, 1980).

El control de la biosíntesis de hemo en otras fuentes ha sido poco estudiado. La función regulatoria del hemo sobre el ALA-S no es conocida en bacterias excepto en bacterias fotosintéticas donde el hemo reprime e inhibe la actividad del ALA-S. Un efecto similar fue observado en *Micrococcus denitrificans* (Granick y Beale, 1978). En levaduras, el ALA-D es la enzima limitante, sujeta a regulación, en lugar de ser el ALA-S. Sobre este aspecto nos extenderemos en el siguiente capítulo.

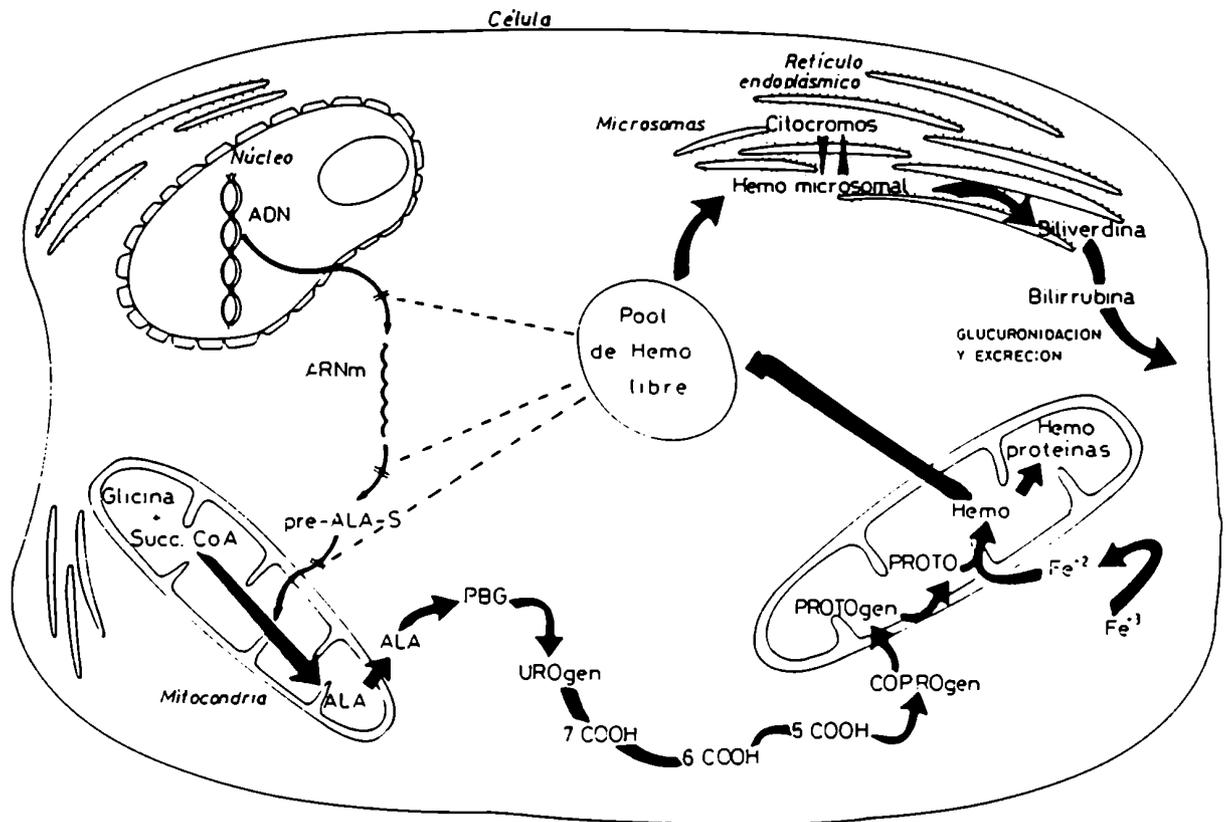


FIGURA 1.10.: Pool de hemo regulatorio

La utilización del hemo para la síntesis de distintas hemoproteínas debe estar muy bien coordinada con la formación de sus componentes proteicos específicos (Marks y col., 1988).

I.4.2. Control por localización tisular y subcelular

Los niveles de hemoproteínas varían considerablemente en los distintos tejidos y las células de cada tejido son capaces de sintetizar sus propias hemoproteínas según sus necesidades (citado por Batlle y col., 1981). Parece existir una

correlación simple y directa entre los niveles de actividad de las enzimas de este camino y su capacidad para formar sus hemo proteínas (Sassa y Kappas, 1981).

Por otra parte, llama la atención el hecho de que determinadas etapas tengan lugar dentro de la mitocondria, mientras que otras ocurren en el citoplasma (Figura 1.3.). Entonces, los metabolitos deben pasar necesariamente a través de la membrana mitocondrial, lo cual podría constituir un mecanismo regulatorio *per se*. Así, la concentración de ALA dentro de la mitocondria y su pasaje al citosol jugarían un papel relevante en la regulación de la síntesis de los tetrapirroles.

I.4.3. Control por constituyentes del medio ambiente celular

Existen numerosos constituyentes del medio ambiente celular que podrían influir sobre la síntesis de los tetrapirroles; sin embargo sólo dos de ellos, el oxígeno y la iluminación, han sido objeto de importantes estudios debido a su acción regulatoria (Batlle y col., 1981).

I.4.4. Control por interconexión con otros caminos metabólicos

Los mecanismos de regulación del hemo se encuentran muy bien coordinados con los de formación de proteínas específicas que constituyen las distintas hemoproteínas. Asimismo, existe una estrecha correlación entre la concentración de ALA intracelular y los niveles de glicina y de succinil CoA que es generado por el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Piper y col., 1973; Neuberger, 1980).

También, se demostró que en ciertos organismos la actividad de ALA-S está controlada por las actividades relativas de enzimas, Cistationasa y Rodenasa, involucradas en el metabolismo de compuestos sulfurados y en la formación y degradación, respectivamente, de una trisulfocistina que actúa como activador

del ALA-S (Wider de Xifra, 1976; Vázquez y col., 1980; Vázquez, 1984).

Hay además, evidencias sobre la importancia de la concentración intracelular de ATP en el control de la biosíntesis de porfirinas, aunque se han postulado efectos contradictorios (Gajdos y Gajdos-Török, 1969; Ohashi y Sinohara, 1978).

CAPITULO II

BIOSINTESIS DE PORFIRINAS EN LEVADURAS

	Página
II.1. Las levaduras como modelo experimental	35
II.2. Características de las levaduras	37
II.3. Enzimas del camino biosintético del hemo	38
II.3.1. ALA-Sintetasa	40
II.3.2. ALA-Dehidrasa	42
II.3.3. PBG-Deaminasa y UROGEN III Cosintetasa	44
II.3.4. UROGEN Decarboxilasa	44
II.3.5. Coproporfirinógeno III oxidasa	45
II.3.6. Protoporfirinógeno oxidasa	47
II.3.7. Ferroquelatasa	48
II.4. Regulación de la biosíntesis del hemo	49
II.5. Regulación de la biosíntesis de hemoproteínas	52
II.5.1. A nivel transcripcional	52
II.5.2. A nivel traduccional	56
II.5.3. A nivel de transporte y ensamblamiento	56

II. BIOSINTESIS DE PORFIRINAS EN LEVADURAS

II.1. LAS LEVADURAS COMO MODELO EXPERIMENTAL

Las levaduras han sido "amigas" del hombre durante por lo menos 8.000 años, proveyéndolo del pan diario, la cerveza y el vino. Ningún otro grupo de microorganismos ha estado más íntimamente asociado con el progreso y el bienestar humano que las levaduras (Rose y Harrison, 1989). Su contribución al progreso del hombre se basó en la capacidad de ciertas levaduras de producir una rápida y eficiente conversión de azúcares en alcohol y dióxido de carbono. Durante mucho tiempo se consideró a las levaduras como cuerpos inertes. Fue Louis Pasteur quien finalmente probó que la fermentación era producida por células vivas.

Otra importante contribución que las levaduras han hecho al progreso humano ha sido, y aún lo es, permitir la elucidación de distintos procesos bioquímicos y metabólicos en células vivas. Fueron los hermanos Buchner en 1897 quienes comenzaron con el estudio bioquímico en las levaduras.

En la actualidad, las levaduras constituyen uno de los organismos más valiosos y usados en la bioquímica, la biología molecular y la genética. Además, el caudal de conocimientos científicos acerca de las levaduras que se ha ido acumulando durante muchos años de experiencia práctica con este organismo, lo han convertido en una de las herramientas más adecuadas y útiles para el desarrollo de la biotecnología moderna.

En términos de utilidad experimental, las levaduras son para los organismos eucarióticos equivalentes a lo que es *Escherichia coli* para los procariotes.

Por lo tanto se describirán algunas de las

características que hacen que las levaduras sean excelentes mo
delos experimentales.

La levadura es un organismo unicelular eucariótico. Estas células crecen con facilidad en medios de cultivo simples en presencia o ausencia de oxígeno y son capaces de duplicar su masa en 90 minutos. La modificación de los medios o de las con
diciones de cultivo puede permitir la expresión selectiva de un determinado fenotipo. De esta forma, se obtienen poblaciones homogéneas de células muy fácilmente y en cortos intervalos de tiempo, posibilitando el estudio de sus características bioquímicas y genéticas.

Además, la cantidad de DNA nuclear en una célula de levadura es de aproximadamente 13.500 Kb, cantidad cuatro veces mayor que la de *E. coli* y 200 veces menor que la de células de mamíferos. La levadura tiene 16 cromosomas y el tamaño promedio de los mismos es de 800 Kb, siendo el cromosoma I el más pequeño (250 Kb) y el XII el mayor (2.500 Kb). Tiene un genoma muy compacto con pocos intrones o secuencias repetitivas. Este hecho implica que se puede obtener mucha información de este organismo en poco tiempo. En la actualidad, se encuentra en mar
cha un proyecto europeo para la secuenciación del genoma de le
vadura (Goffeau y Vassarotti, 1991).

Otro importante argumento biológico en favor de la le
vadura como modelo experimental es esencialmente que la levadu
ra es un organismo eucariótico ampliamente utilizado. Se inten
ta, por último, poder transferir la información biomolecular, bioquímica o genética obtenida a partir de la levadura a otros eucariotes incluyendo al hombre, aunque por supuesto que cada conclusión deberá ser eventualmente comprobada en el organismo superior.

Además, se están implementando técnicas con el objeto de introducir genes heterólogos en levaduras para lograr final
mente la expresión de los mismos.

De las diferentes especies de levaduras, la más estudiada y conocida, desde el punto de vista bioquímico y genético, es la *Saccharomyces cerevisiae*.

II.2. CARACTERISTICAS DE LAS LEVADURAS

Las células de levadura son esféricas u ovales, con un diámetro de 3 a 7 μ dependiendo de la ploidía. Presentan las características de compartimentalización interna de las células eucariotes: poseen 16 cromosomas diferentes en un núcleo bien definido, mitocondrias, vacuolas y retículo endoplásmico. Rodeando la membrana citoplasmática, se encuentra la pared celular. La existencia de esta barrera representa un inconveniente para trabajar con levaduras ya que se necesitan tratamientos bastante drásticos para romperla. Los principales componentes de la pared celular son: polisacáridos, proteínas, lípidos y fosfatos. Los polisacáridos, que constituyen más del 80 % del peso seco de la pared, están formados fundamentalmente en base a glucosa y son los principales responsables de la formación de una tupida malla de microfibrillas. Los polisacáridos de manosa y glucosamina son asimismo importantes y, junto con las proteínas y los lípidos constituyen los compuestos cementantes.

La digestión de la pared celular con enzimas líticas da lugar a la producción de protoplastos viables, que son células sin pared. Cuando las células tratadas conservan restos de pared se llaman esferoplastos.

Cada célula de levadura puede contener entre 10 y 50 mitocondrias distribuidas en su citoplasma y éstas representan el 10 % del peso celular. Las cepas de levaduras deficientes en mitocondrias se llaman ρ^- y las que carecen totalmente de ellas son conocidas como ρ^0 . Las mitocondrias formadas en mutantes deficientes respiratorias y en células crecidas en presencia de altas concentraciones de glucosa (Polakis y col., 1964,

1965) son similares pero muy diferentes a las mitocondrias normales (Yotsuyanagi, 1962). Asimismo las mitocondrias de células crecidas en anaerobiosis se conocen como "promitocondrias" (Marquardt, 1962) o mitocondrias "degeneradas" que vuelven a tener una apariencia normal cuando esas células crecen en condiciones aeróbicas.

Las levaduras son organismos heterótrofos capaces de utilizar carbohidratos y una amplia variedad de otros compuestos orgánicos como nutrientes. De todos estos compuestos derivan los esqueletos carbonados, necesarios para sintetizar los constituyentes celulares y para proveer la energía requerida por las reacciones biosintéticas. El nitrógeno es también un elemento esencial para el metabolismo celular y compuestos tales como glutamina, glutamato o amonio sirven principalmente como fuentes de nitrógeno.

Las células de levadura son aerobitas facultativas aunque el rendimiento de células crecidas aeróbicamente es 10 veces mayor que el alcanzado en condiciones anaeróbicas con la misma cantidad de glucosa disponible.

Las levaduras se reproducen tanto asexual como sexualmente. La reproducción asexual es conocida como gemación. Durante el ciclo de vida sexual, las células alternan entre una fase haploide y una diploide, y ambos tipos de células son estables (Figura II.1.). El proceso sexual está controlado por el locus MAT que tiene 2 alelos α y a , y está localizado en el cromosoma III.

II.3. ENZIMAS DEL CAMINO BIOSINTETICO DEL HEMO

La importancia del hemo en las levaduras es debida a que este compuesto es el grupo prostético no sólo de los citocromos mitocondriales sino también de otras hemoproteínas

incluyendo citocromos microsomales y dos tipos de catalasas. La formación de estas proteínas exige una síntesis coordinada tanto de las apoproteínas como del grupo hemo. Por lo tanto, la formación de porfirinas así como su regulación juegan un rol clave no sólo en la biogénesis mitocondrial sino también en los procesos de detoxificación celular.

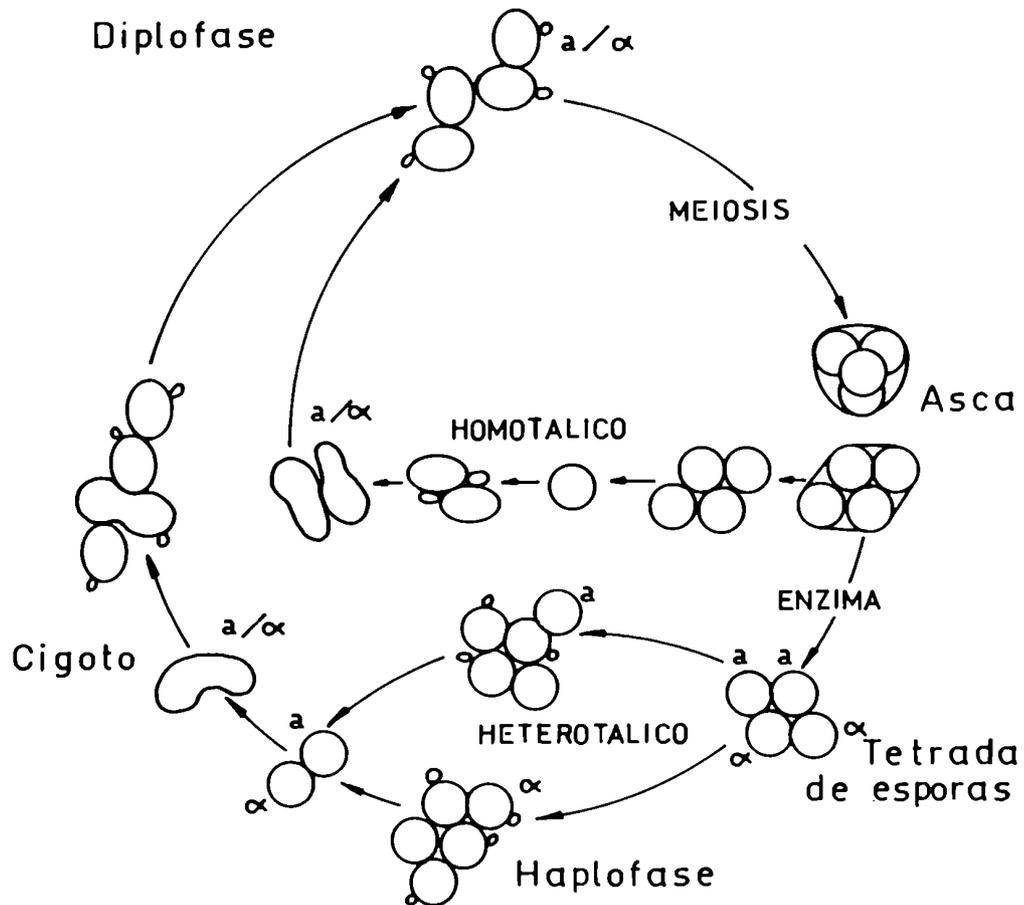


FIGURA II.1.: Ciclo de vida sexual de la levadura

Los primeros trabajos en los cuales se pusieron en evidencia las diferentes etapas de la síntesis del hemo a partir de glicina y succinato en levaduras provienen del grupo de Labbe (Labbe, 1971; Labbe y col., 1972).

A partir de la década del 70 y hasta la actualidad, han sido publicados numerosos trabajos tendientes a esclarecer tanto aspectos enzimáticos como genéticos de la vía biosintética de las porfirinas así como su regulación, en un organismo eucariótico simple como es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se han empleado células de cepas salvajes y de cepas mutadas a diferentes niveles de esta vía biosintética (Sanders y col., 1973; Woods y col., 1975; Gollub y col., 1977; Grimal y Labbe-Bois, 1980, 1981; Kurlandzka y Rytka, 1985), crecidas en diversas condiciones.

El mejor conocimiento del funcionamiento y la regulación del camino metabólico del hemo en levaduras será, sin dudas, un gran aporte al conocimiento de los mecanismos que operan en eucariotes superiores.

Las etapas enzimáticas son las mismas que las descritas en el Capítulo I, ítem 1.2., siendo su compartimentalización también similar, excepto que la CPG-asa de levaduras se encuentra en el citosol (Camadro y col., 1986).

II.3.1. ALA-Sintetasa

En 1983 se aisló y se clonó el gen estructural del ALA-S en plásmidos recombinantes (Arrese y col., 1983), estando la enzima codificada por el gen nuclear HEM 1. Las transformantes obtenidas tenían una actividad elevada de ALA-S y un contenido alto de ALA intracelular. Sin embargo, las cepas transformadas no presentaron alto contenido de hemo o citocromos ya sea en medios con glucosa o con glicerol, indicando que la producción de ALA no sería la etapa limitante de la velocidad en

la biosíntesis del hemo en levaduras.

Asimismo, esta enzima se purificó y caracterizó (Volland y Felix, 1984). Es una enzima mitocondrial y dimérica, formada por dos subunidades idénticas (PM 53 KDa). Sus propiedades catalíticas incluyendo pH óptimo, constantes de Michaelis-Menten para glicina y para succinil CoA, sensibilidad frente a agentes sulfhidrúlicos, requerimiento por fosfato de piridoxal, son muy similares a las descritas para el ALA-S proveniente de otras fuentes (Whiting y Granick, 1976). La enzima se inhibe un 50 % por bajas concentraciones de hemina (6 μ M) pero no por hemo. El significado fisiológico de esta inhibición es desconocido ya que no se encuentra protohemina dentro de las células. Wolfson y col. (1979) encontraron resultados similares para el ALA-S de mitocondrias de hígado de rata.

El ALA-S, al igual que la mayoría de las proteínas mitocondriales (Schatz y Butow, 1984), es sintetizada tanto *in vitro* como *in vivo* con una secuencia adicional de 3,5 KDa en el extremo amino terminal que se pierde durante el transporte de la enzima a la mitocondria (Yamauchi y col., 1980; Ades y Harpe, 1981; Srivastava y col., 1983 a; Watanabe y col., 1983). El hemo no parece interferir en la translocación del ALA-S en levaduras (Urban-Grimal y col., 1986), a diferencia de lo que ocurre para el ALA-S de hígado de pollo (Hayashi y col., 1983; Srivastava y col., 1983 b).

La secuenciación del ALA-S de levadura (Urban-Grimal y col., 1986) mostró que una subunidad de esta enzima consiste en 548 aminoácidos, valor compatible con el valor de 56,5 KDa estimado por SDS-PAGE. La pre-secuencia tiene aproximadamente 35 residuos aminoacídicos y su composición rica en serina, treonina, aminoácidos básicos y carente de aminoácidos ácidos (3 argininas, 1 lisina, 1 histidina) es típica de una proteína de matriz mitocondrial sintetizada en el citosol como un precursor más grande (Hay y col., 1984). Se encontró un 41 % de

homología entre las secuencias aminoacídicas del ALA-S de levadura y la de hígado de pollo (Borthwick y col., 1985). Las regiones de mayor homología son 114-187 y 408-469 y por lo tanto probablemente sean importantes para la actividad catalítica de la enzima.

Existen varios trabajos en los cuales se investiga la importancia de la pre-secuencia. Volland y Urban-Grimal (1988) empleando un ALA-S sin la pre-secuencia amino terminal y sin 40 residuos de la proteína madura, encontraron que esta forma del ALA-S, si bien es capaz del "targeting" mitocondrial, no llega hasta la matriz. Por otra parte, el grupo de Guarente (Keng y col., 1986; Haldi y Guarente, 1989) demostró que la información para el "targeting" mitocondrial está repetida, siendo los primeros 9 aminoácidos del extremo amino terminal particularmente importantes.

II.3.2. ALA-Dehidrasa

El ALA-D es una enzima clave en el camino biosintético de las porfirinas en levaduras. Su importancia creció a partir de trabajos realizados principalmente en la década del 70, de los cuales surgieron evidencias que asignaban un rol regulatorio a esta enzima en *Neurospora crassa* (Muthukrishnan y col., 1969, 1972) y en *Saccharomyces cerevisiae* (Jayaraman y col., 1971; Mahler y Lin, 1974; Labbe-Bois y Volland, 1977). Además, bajo condiciones fisiológicas apropiadas, estos organismos acumulan ALA intracelular, indicando que la actividad relativa de ALA-D es menor que la del ALA-S (Muthukrishnan y col., 1972; Mattoon y col., 1978; Labbe-Bois y col., 1986).

Una propiedad ampliamente estudiada de las levaduras es su respuesta a la fuente de carbono disponible. Los citocromos (Polakis y Bartley, 1965; Perlman y Mahler, 1974) y una variedad de otras enzimas están sujetas a una marcada represión por catabolito cuando las células crecen en un medio de cultivo

con glucosa. Respecto al ALA-D, varios laboratorios han reportado su represión por catabolito (Jayaraman y col., 1971; Labbe-Bois y Volland, 1977; Mahler y Lin, 1978; Borralho y col., 1983).

Se ha determinado actividad de ALA-D en levaduras en varios laboratorios, ya sea en extractos crudos (Jayaraman y col., 1971; Mahler y Lin, 1974; Labbe-Bois y Volland, 1977; Borralho y col., 1983) o *in situ* en células permeabilizadas (Borralho y col., 1983). Los sistemas de incubación empleados difirieron de un laboratorio a otro, sin embargo en todos los casos se encontró una muy baja actividad de ALA-D.

El primer intento para purificar el ALA-D de levadura fue descrito por Clara de Barreiro (1967) quien obtuvo una enzima parcialmente purificada. Recientemente, Borralho y col. (1990), luego de aumentar la concentración del ALA-D en células de levadura, la purificaron y caracterizaron. Para ello transformaron células con un plásmido multicopia que contiene el gen estructural de esta enzima HEM 2 logrando incrementar su concentración 20 veces. Mediante los distintos procedimientos de purificación empleados obtuvieron una enzima casi homogénea y sus propiedades fueron muy similares a las de las enzimas aisladas de hígado de vaca (Wilson y col., 1972; Cheh y Neilands, 1973; Bevan y col., 1980) y eritrocitos humanos (Anderson y Desnick, 1979; Despaux y col., 1979; Gibbs y col., 1985).

Las secuencias primarias deducidas de las secuencias de DNA para las ALA-D's humana (Wetmur y col., 1986) y de levaduras (Myers y col., 1987) mostraron regiones altamente conservadas incluyendo un dominio propuesto como el sitio de unión de zinc a la enzima.

La principal diferencia hallada entre la enzima de mamíferos y la de levaduras es que esta última posee un pH óptimo muy alcalino, 9,6-9,8.

II.3.3. PBG-Deaminasa y UROGEN III Cosintetasa

Es sumamente escasa la información referente a las propiedades, mecanismo de acción y purificación de estas enzimas en un organismo eucariótico simple como la levadura, pese a que existen numerosos trabajos de estas enzimas en otras fuentes (ver Capítulo I, ítem I.3.3.).

Sin embargo, cabe destacar que se han aislado varias mutantes deficientes en la PBG-Deaminasa (hem 3) (Resnick y Mortimer, 1966; Karst y Lacroute, 1973; Bard y col., 1974; Gollub y col., 1977; Kurtz y Marrinan, 1989).

En 1986, Gellefors y col. clonaron un gen que complementa la mutación hem 3 y que sobreexpresa actividad de PBG-Deaminasa en un plásmido multicopia. La traducción *in vitro* del RNAm seleccionado del plásmido que contiene el gen estructural o regulador para la actividad de PBG-Deaminasa (HEM 3) dio un producto de 43 KDa, similar al ya encontrado para la enzima de mamíferos, plantas y bacterias.

Recientemente se han descrito algunas propiedades físicas y cinéticas de la Porfobilinogenasa (complejo enzimático: PBG-Deaminasa - UROGEN III Cosintetasa) en *Saccharomyces cerevisiae* (Araujo y col., 1987, 1989).

II.3.4. UROGEN Decarboxilasa

La actividad de URO-D ha sido determinada en numerosos casos, fundamentalmente en aquellos donde se aislaron mutantes deficientes en la actividad de esta enzima (Rytka y col., 1984; Kurlandzka y Rytka, 1985; Kurlandzka y col., 1988). Estas mutantes acumulan y excretan cantidades importantes de intermediarios de la decarboxilación del UROGEN, junto con dehidroisocoproporfirina. En un trabajo reciente, donde se emplearon dichas cepas, se demostró que la síntesis de dehidroisocoproporfirina depende de la presencia de una COPROGEN Oxidasa

activa acompañada de una cantidad aumentada de pentacarboxiporfirinógeno y de una decarboxilasa disminuída. Estos resultados indicarían que la ruta alternativa del metabolismo de pentacarboxiporfirinógeno postulada por Elder (1977) en humanos también funcionaría en ciertas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (Kurlandzka y col., 1991).

La medición de las velocidades de acumulación de los diferentes productos de la reacción catalizada por la enzima proveniente tanto de cepas normales como mutantes, mostró la gran complejidad de esta reacción (Rytka y col., 1984; Kurlandzka y col., 1988), que ya ha sido descrita para la misma enzima en otras fuentes (ver Capítulo I, ítem I.3.4.).

Recientemente, se describió (Felix y Brouillet, 1990) la purificación hasta homogeneidad de la URO-D de *Saccharomyces cerevisiae*. Asimismo se determinaron varias de sus propiedades, incluyendo PM, constantes cinéticas, inhibición por agentes sulfhídricos e iones metálicos divalentes, requerimiento de cofactores. Tales propiedades fueron muy similares a las ya reportadas para la URO-D aislada de otras fuentes (Capítulo I, ítem I.3.4.).

11.3.5. Coproporfirinógeno III oxidasa

El primer trabajo donde se midió actividad de CPG-asa en levaduras fue realizado por Miyaki y Sugimura en 1968. Trabajaron con cepas normales y mutantes cyt que acumulan coproporfirina cuando crecen a 35 °C y caracterizaron la enzima en ambas cepas. Encontraron el 70 - 100 % de la actividad total de CPG-asa en la fracción soluble de extractos libres de células. Obtuvieron actividad alta de esta enzima en células de la mutante cyt crecidas a temperatura elevada, lo cual podría ser el resultado de la ausencia de un producto final, tal como hemo, que reprimiría a esta enzima. Trabajos más recientes confirmarán esta primera hipótesis.

Por su parte, Poulson y Polglase (1974) quienes purificaron parcialmente la CPG-asa de levadura a partir de mitocondrias, reportaron que la actividad específica de la enzima fue levemente más alta en mitocondrias que en la fracción citoplasmática. El PM se estimó en 75 KDa por filtración por gel. La enzima exhibió la inusual propiedad de tener igual actividad anaeróbica que aeróbica, si ATP, manganeso y metionina están presentes junto con NADP^+ como aceptor de electrones, como previamente había descrito Tait (1972) para la enzima de *Rhodospseudomonas spheroides*.

Sin embargo, también se ha observado que en *Saccharomyces cerevisiae* el nivel de actividad de CPG-asa está aumentada en mutantes deficientes en hemo y en células salvajes crecidas en condiciones anaeróbicas (Miyake y Sugimura, 1968; Urban-Grimal y Labbe-Bois, 1981; Labbe-Bois y col., 1983).

Asimismo han sido aisladas mutantes de *S. cerevisiae* parcial o totalmente deficientes en actividad de CPG-asa (Bilinski y col., 1981).

La CPG-asa de levadura ha sido purificada hasta homogeneidad (Camadro y col., 1986). La enzima nativa es un dímero formado por dos subunidades idénticas de 35 KDa. Su localización es citoplasmática, lo que implica que el PROTOGEN, de características lipofílicas, debe cruzar las dos membranas mitocondriales para alcanzar su sitio final de oxidación. El análisis del contenido de metales sobre la enzima reveló la presencia de un átomo de hierro por subunidad.

Por lo tanto, las principales diferencias entre la CPG-asa de levadura y la enzima bovina son la localización intracelular, la composición de subunidades y el contenido de metales (Camadro y col., 1986).

También se ha observado que la síntesis de la CPG-asa en *S. cerevisiae* está sujeta a un control negativo por hemo y oxígeno y esta regulación opera a nivel pretraduccional: la

actividad de la enzima, junto con la cantidad de proteína inmunodetectable en estado estacionario y de RNAm específico a traducir están aumentados 5-40 veces (dependiendo de la cepa) en mutantes deficientes en hemo y en células crecidas anaeróbicamente (Zagorec y Labbe-Bois, 1986).

En un trabajo reciente (Zagorec y col., 1988), se aisló y se determinó la secuencia nucleotídica del gen de la CPG-asa de levadura. El análisis por deleciones de las secuencias 5' cercanas reveló la presencia de una región regulatoria requerida para la de-represión de la expresión del gen bajo condiciones anaeróbicas.

II.3.6. Protoporfirinógeno oxidasa

La información disponible concerniente al funcionamiento y la síntesis de esta enzima es bastante escasa, quizás debido a las dificultades encontradas para medir su actividad. Teóricamente, estas mediciones son simples. Sin embargo, la dificultad está en que el sustrato PROTOGEN se autooxida fácilmente, se generan durante la reacción de reducción del sustrato productos de degradación que interfieren en el espectro de la PROTO e incluso la concentración alta de detergentes necesaria en los ensayos hace que las determinaciones sean dudosas. Por todos estos motivos es que se han publicado varios trabajos tendientes a encontrar el mejor método para medir actividad de PTG-asa (Camadro y col., 1982; Labbe y col., 1985).

Esta enzima no ha sido aún ni bien caracterizada ni purificada en levaduras. Poulson y Polglase reportaron en 1975 algunas características de la reacción enzimática de conversión de PROTOGEN en PROTO.

En trabajos recientemente publicados se estudia la inhibición de la PTG-asa por distintos herbicidas en levaduras (Matringe y col., 1989 a, b; Camadro y col., 1991), así como en

otras fuentes, encontrándose que la enzima de levadura presenta un comportamiento particular.

II.3.7. Ferroquelatasa

La Ferroquelatasa ha sido estudiada en diversas cepas de levaduras con actividad normal de esta enzima o deficientes en ella. Estas últimas cepas (hem 15) fueron aisladas por Urban-Grimal y Labbe (1981) y Kurlandzka y Rytka (1985).

En 1981, Camadro y Labbe describieron un método simple para la determinación de la actividad de Fe-quel en levaduras, que ha sido ampliamente usado.

Se han establecido muchas características tanto de la Fe-quel unida a membrana (Camadro y Labbe, 1982) como de la enzima purificada a homogeneidad (Camadro y Labbe, 1988). En varios aspectos, que incluyen importancia de los lípidos para la actividad enzimática, especificidad de sustrato, mecanismo cinético, entorno hidrofóbico del sitio activo, la enzima de levaduras es similar a la de eucariotes superiores.

Camadro y Labbe (1988) mostraron que la Fe-quel de levaduras se sintetiza como un precursor de alto PM (44 KDa) el cual se convierte rápidamente en la forma madura de la enzima (PM 40 KDa) durante la translocación a la mitocondria. También sugieren que la Fe-quel de levadura formaría parte de un complejo multienzimático, semejante a lo reportado por Taketani y col. (1986) para la enzima bovina.

Recientemente, el gen HEM 15, que codifica para la Fe-quel en *S. cerevisiae*, ha sido aislado por complementación funcional de una mutante hem 15 (Labbe-Bois, 1990).

La secuencia con marco de lectura abierto codifica para una forma precursora de la proteína que contiene una presecuencia de 31 aminoácidos. Esta presecuencia es rica en aminoácidos básicos e hidroxilados y carece de aminoácidos ácidos,

composición característica de las proteínas destinadas a las mitocondrias. El procesamiento que lleva a la formación de la proteína madura de 362 aminoácidos (PM 40,9 KDa) parecería ocurrir en dos etapas. La lisina y los aminoácidos hidroxilados son abundantes en la proteína madura de levadura, al igual que para la Fe-quel de otras fuentes, sugiriendo, por lo tanto, que son importantes para la actividad enzimática.

La secuencia nucleotídica de la Fe-quel de *S. cerevisiae* también ha sido determinada por Gokhman y Zamir (1990).

II.4. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO

La biogénesis mitocondrial depende, en gran medida, de la regulación del camino biosintético del hemo ya que éste es el grupo prostético de los citocromos de la cadena respiratoria, la Citocromo c oxidasa y citocromo b_2 , las Catalasas A y T, los citocromos microsomales b_5 y P-450 y quizás de otras hemoproteínas aún no identificadas.

Como ya se vió en el Capítulo I, ítem 1.4., en la mayoría de los organismos (Burnham y Lascelles, 1963; Clark-Walker y col., 1967; Granick y Sassa, 1971; Sinclair y Granick, 1975) la regulación de la biosíntesis de porfirinas es fundamentalmente a nivel de la primera enzima, el ALA-S. En tales organismos se descartó un rol regulatorio para el ALA-D ya que esta enzima está presente en cantidades no limitantes.

Por el contrario, en levaduras existen en la literatura numerosas evidencias que avalan la hipótesis de que el ALA-D modula este camino biosintético. Se ha demostrado que esta enzima está fuertemente reprimida por glucosa (Jayaraman y col., 1971; Labbe-Bois y Volland, 1977; Labbe-Bois y Labbe, 1978; Mahler y Lin, 1978; Mattoon y col., 1978). Así, el control por catabolito de la síntesis de citocromos sería ejercido

principalmente a través del ALA-D (Mahler y Lin, 1978). En ciertas mutantes regulatorias, también se observó que el ALA-D y los citocromos exhiben una resistencia coordinada a la represión por catabolito (Borrvalho y col., 1983, 1989).

Asimismo, Arrese y col. (1983) clonaron el gen HEM 1 que codifica para el ALA-S en un plásmido multicopia y con él transformaron una mutante hem 1. Las células transformadas mostraron una actividad de ALA-S 20 veces mayor que la cepa normal mientras que el nivel de citocromos se restauró sólo hasta valores normales, tanto en un medio con glucosa como en etanol. Este resultado indicó que la producción de ALA no sería limitante en la producción de citocromos. En cambio, la función regulatoria fue atribuída al ALA-D ya que las células transformadas acumularon entre 5 y 8 veces más ALA que las normales.

Es de hacer notar que también se ha establecido un rol regulatorio para el ALA-D en otros organismos tales como *Propionibacterium shermanii* (Menon y Shemin, 1967), *Neurospora crassa* (Muthukrishnan y col., 1972), *Ustilago sphaerogena* (Komai y Neilands, 1968), *Euglena gracilis* (Ebbon y Tait, 1969; Stella, 1977), *Mucor rouxii* (Paveto y col., 1989) y en varias especies de *Rhizobium* (De Bonis y col., 1992).

Por otra parte, si bien el ALA-S no sería la enzima regulatoria por excelencia en la biosíntesis de los citocromos en levaduras, varios trabajos realizados con distintas mutantes han indicado que es una enzima altamente regulada y que su rol es aparentemente muy complejo.

Así, se observó que cepas bloqueadas en la conversión de UROGEN a COPROGEN (Gollub y col., 1977; Malamud y col., 1983) o de COPROGEN a PROTOGEN (Gunge y col., 1967; Miyake y col., 1972) acumulan ALA en grandes cantidades. Asimismo, Rytka y col. (1984) demostraron, por primera vez, que mutantes parcialmente deficientes en URO-D poseen una actividad significativamente aumentada de ALA-S. Estos resultados sugieren que la

actividad y/o síntesis del ALA-S están sujetas a un control negativo por hemo. Por su parte, Borralho y col. (1989) encontraron que la glucosa ejerce un control regulatorio sobre la actividad del ALA-S pero este control no implica necesariamente represión de los citocromos mitocondriales.

En 1987, Keng y Guarente demostraron que la expresión del gen que codifica para el ALA-S (HEM 1) es constitutiva, bajo todas las condiciones de crecimiento, y está regulada por un par de sitios regulatorios opuestos: uno positivo y otro negativo. El sitio positivo UAS (upstream activator site) es activado por el sistema HAP2-HAP3 que, como se verá en el próximo ítem, controla globalmente la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo respiratorio. Este sistema mantendría la expresión de HEM 1 en ausencia de hemo. Sin embargo, la expresión de este gen no se de-reprime por una fuente de carbono no fermentable (Mahler y Lin, 1974) como sucede con otros genes regulados por HAP2-HAP3 (Guarente y col., 1984). Aparentemente, la de-represión está impedida por la presencia de un segundo sitio negativo que está localizado levemente "downstream" de la secuencia UAS y que está controlado por hemo.

Por otra parte, también se ha sugerido un importante rol regulatorio para la CPG-asa ya que ha sido claramente demostrado que la síntesis de esta enzima está sujeta a un control negativo por oxígeno y hemo. Esta regulación opera a nivel transcripcional (Zagorec y Labbe-Bois, 1986; Zagorec y col., 1988).

Asimismo, existen evidencias de una leve represión por glucosa de la expresión del gen de la Fe-quel (Labbe-Bois, 1990). Se propone también la posibilidad de que el funcionamiento de esta enzima está regulado por el aporte de sus sustratos (hierro y PROTO) y, quizás de manera más importante, por la demanda de hemo por parte de las distintas apoproteínas sintetizadas a diferentes velocidades, dependiendo de las condiciones fisiológicas de las células.

II.5. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE HEMOPROTEINAS

El hemo participa en la regulación de la biosíntesis de muchas hemoproteínas de levadura, que están involucradas en procesos conectados con la presencia y utilización del oxígeno molecular en las células vivas. El grupo prostético hemo ejerce su efecto en diferentes etapas, fundamentalmente en la transcripción, pero también durante la traducción, el transporte y el ensamblamiento.

II.5.1. A nivel transcripcional

En *S. cerevisiae*, así como en otros eucariotes, la transcripción de genes específicos está frecuentemente regulada por determinadas regiones de DNA localizadas en el extremo 5' de un dado gen, a cierta distancia del sitio de iniciación de la transcripción. Los promotores en levaduras son elementos "upstream" (UAS) (Guarente y Ptashne, 1981; Guarente y Mason, 1983; Guarente, 1984, 1988; Struhl, 1987). Estos elementos activan la transcripción cuando a ellos se unen factores regulatorios específicos los cuales, a su vez, son activados por agentes inductores en respuesta a señales fisiológicas particulares.

Por otra parte, en los genes que están regulados negativamente, se localiza cerca del UAS otro sitio regulatorio "upstream", represor (URS, upstream represor site) que controla la acción del UAS (Guarente, 1984; Brent, 1985; Mehta y Smith, 1989).

La familia de genes del citocromo c en levaduras está compuesta por los genes CYC1 y CYC7 que codifican para el iso-1-citocromo c y el iso-2-citocromo c respectivamente. Bajo condiciones aeróbicas el iso-1-citocromo c es la isoenzima dominante (Sherman y Stewart, 1971; Laz y col., 1984). Ambas formas son reguladas por oxígeno, represión por catabolito y hemo.

Guarente y Mason (1983) demostraron que la regulación de la transcripción del gen *CYCl* por hemo ocurre a nivel de la iniciación y está mediado por un sitio UAS, localizado 275 pares de bases "upstream" de la región de iniciación de la transcripción. Posteriormente, este mismo grupo de investigación (Guarente y col., 1984) determinó que el gen *CYCl* contiene 2 sitios UAS: UAS1 y UAS2 que regulan la transcripción en respuesta al hemo y a la fuente de carbono. En condiciones anaeróbicas o en ausencia de hemo ambos sitios son inactivos. En presencia de glucosa, la actividad de UAS1 es 10 veces mayor que la de UAS2. En condiciones de de-represión el UAS1 se de-reprime 10 veces mientras que el UAS2 lo hace 100 veces. Por lo tanto, en medio con glucosa, la transcripción del *CYCl* es controlada fundamentalmente por UAS1, mientras que ambos, UAS1 y UAS2 contribuirían igualmente a la transcripción en condiciones de de-represión. Los autores demostraron que UAS1 es inducible por hemo, aún en medio con glucosa, mientras que UAS2 no lo es en las mismas condiciones.

Ambos sitios, UAS1 y UAS2 están regulados de manera diferente a nivel molecular, siendo activados por la unión de una proteína regulatoria codificada por el gen nuclear HAP (heme activator protein) (también conocido como CYP). HAP1 se une a la secuencia de activación "upstream" tanto del gen *CYCl* (Guarente y col., 1984; Pfeifer y col., 1987 a, b) como de *CYC7* (Pfeifer y col., 1987 a, b; Prezant y col., 1987; Zitomer y col., 1987) aunque las secuencias UAS1 de ambos genes no son idénticas. Mutaciones en el locus HAP1 dan lugar a un UAS1 inactivo, convirtiendo el sitio en no inducible por hemo, tanto en condiciones de represión como de de-represión. Por lo tanto, la represión por catabolito y el control por hemo operarían sobre UAS1 por un sólo y único mecanismo (Guarente y col., 1984).

El análisis de secuenciación del DNA que codifica para HAP1 fue realizado por Pfeifer y col. (1989) y reveló la

presencia de tres dominios importantes en la proteína final: 1) un único dominio rico en cisteína (residuos 1 - 148) especifica la unión a los diferentes sitios blanco en las secuencias UAS de CYC1 y CYC7; 2) una región distinta (residuos 245 - 445) media la inducción por hemo enmascarando el dominio de unión al DNA en ausencia de hemo. El desenmascaramiento podría involucrar la unión directa del tetrapirrol a las secuencias repetidas del HAP1 ricas en cisteína e histidina; 3) un extremo C-terminal altamente acídico mediaría la activación transcripcional por HAP1.

El HAP1 o CYP1 también fue secuenciado por Creusot y col. (1988). Se ha postulado (Verdière y col., 1991) que uno o más de estos dominios podrían interactuar con un "sensor" fisiológico, como por ejemplo hemo o un átomo metálico, que pueden existir en forma oxidada o reducida de acuerdo al estado redox de las células.

A su vez la actividad de UAS2 requiere los productos de dos genes HAP2 y HAP3. El sistema HAP2-HAP3 parece regular genes de proteínas involucradas en la respiración, ya que mutaciones en estos locus producen células incapaces de crecer en medios con fuentes de carbono no fermentable.

Como vimos, el hemo también regula la transcripción del gen CYC7 (Pfeifer y col., 1987 a, b) a través de la interacción de HAP1 con el UAS del CYC7. Sin embargo este gen está sujeto a una regulación más compleja con la participación de elementos regulatorios positivos y negativos (Wright y Zitomer, 1984).

El efecto represor del hemo sobre la transcripción del CYC7 y de otro gen anaeróbico ANB1 es mediado por el gen ROX1 que codifica un factor de represión inducido por hemo (Lowry y Zitomer, 1984, 1988; Lowry y Lieber, 1986). El sitio represor "upstream" (URS) del gen ANB1 ya ha sido caracterizado pero aún se desconoce el mecanismo por el cual el URS silencia la

actividad del promotor "upstream" en presencia de oxígeno o hemo (Mehta y Smith, 1989).

El hemo también regula la transcripción de la subunidad V de la Citocromo c oxidasa. Esta subunidad está codificada por dos genes COX5a y COX5b (Cumsky y col., 1987). Ambos genes están regulados de manera opuesta por hemo: en su presencia la expresión de COX5a aumenta mientras que la de COX5b disminuye. Además, los genes HAP2 y REO1 están involucrados en la regulación positiva de COX5a y en la regulación negativa de COX5b, respectivamente. De esta forma el hemo regularía cuál isoforma de la subunidad V está disponible para el ensamblamiento de la Citocromo c oxidasa bajo condiciones de alta o baja tensión de oxígeno (Trueblood y col., 1988). El agregado de hemo a células anaeróbicas restaura el modelo aeróbico de transcripción, mientras que mutaciones en el camino metabólico del hemo en células aeróbicas conducen a un modelo anaeróbico de transcripción (Hodge y col., 1989).

La transcripción del gen COX4 que codifica para la subunidad 4 de la Citocromo c oxidasa está también regulada por hemo y la fuente de carbono, a través de los productos del sistema HAP2-HAP3 que activan al UAS2 (Hodge y col., 1989; Mattoon y col., 1990).

La regulación de la transcripción de otras hemoproteínas como Catalasa A (vacuolar) y Catalasa T (citoplasmática) también está mediada por hemo, glucosa y oxígeno (Hörtner y col., 1982; Spevak y col., 1986; Winkler y col., 1988).

Las hemoproteínas tienen un amplio espectro de funciones catalíticas, entre ellas: unión a oxígeno, transporte de electrones, peroxidación u oxigenación; resumiendo y como ya se dijo antes, todas estarían involucradas en procesos conectados con la presencia y utilización de oxígeno en células vivas. Estas proteínas están localizadas en diferentes compartimientos

subcelulares: mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplásmico, citoplasma.

Teniendo en cuenta las funciones y la ubicación intracelular de las hemoproteínas, es evidente que debe existir estricto control y coordinación en la síntesis de cada una de ellas. Winkler y col. (1988) propusieron a HAP1 como regulador de la síntesis de cada hemoproteína y como coordinador de la actividad de los genes que codifican para proteínas involucradas en varios aspectos del metabolismo del oxígeno, en diferentes compartimientos subcelulares.

HAP1 actuaría mediando el efecto del hemo que funciona como una señal metabólica de muchos promotores.

II.5.2. A nivel traduccional

La regulación de la expresión genética a nivel transcripcional parecería ser la más importante tanto en eucariotes como en procariotes; sin embargo, hay evidencias de que el control a nivel traduccional también tendría un rol significativo. En levaduras se ha demostrado que el hemo controla la síntesis de las Catalasas T y A a nivel postranscripcional (Sledziewski y col., 1981; Hamilton y col., 1982).

II.5.3. A nivel de transporte y ensamblamiento

El hemo está involucrado en el procesamiento y maduración del citocromo c_1 como regulador positivo. La etapa que conduce a la localización de la proteína madura sobre la superficie externa de la membrana interna de la mitocondria, es dependiente de hemo. Un mecanismo similar se ha propuesto para el procesamiento de la Citocromo c peroxidasa y del citocromo b_2 (Ohashi y col., 1982).

El hemo a, o uno de sus precursores, controla la

acumulación y el ensamblamiento de la Citocromo c Oxidasa (Saltzgaber-Müller y Schatz, 1978).

En estos casos el hemo podría estar directamente involucrado como un componente estructural, protegiendo selectivamente de la acción de las proteasas. Alternativamente, el hemo podría inhibir directamente la actividad de enzimas tales como proteasas, RNA y DNA polimerasas y nucleasas (Padmanaban y col., 1989).

MATERIALES
Y
METODOS

CAPITULO I

MATERIALES

	Página
I.1. Fuente enzimática	58
I.2. Porfobilinógeno	58
I.3. Geles empleados	61
I.4. Reactivos	61
I.5. Equipos	61

I. MATERIALES

I.1. FUENTE ENZIMÁTICA

Todas las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo fueron generosamente provistas por el Profesor Dr. J. Mattoon de la Universidad de Colorado, Colorado Springs, USA. La cepa D27 deriva de la cepa normal D273-10B, es auxótrofa para metionina y normal para la síntesis de hemo. La cepa D27/C6 deriva de la D27 y es portadora del gen recesivo HEM R⁺. Los espectros de células enteras (realizados y facilitados por el Dr. Mattoon y su equipo) muestran que las células de la mutante HEM R⁺ contienen 2 veces más citocromos por unidad de peso seco que las de la cepa normal D27, cuando crecen en un medio con una fuente de carbono no fermentable (YPAG: extracto de levadura 1 %, peptona 2 %, sulfato de adenina 40 mg/ml, glicerol 3 %) (Figura I.1.). Todos los citocromos se vieron afectados en igual grado.

También se emplearon 2 segregantes de la tetrada DW10-2 provenientes del "mating" entre las cepas CC14-8C y D27/C6:DW10-2C y DW10-2A (HEM R⁺). Se debe aclarar que la cepa CC14-8C es isogénica en un 98,4 % con la cepa D27. En la Figura I.2. se muestran los espectros de citocromos de estos 2 segregantes crecidos en medio YPAG.

I.2. PORFOBILINOGENO

El PBG se obtuvo enzimáticamente según la metodología descrita por Sancovich y col. (1970), a partir de ALA-D de hígado bovino y ALA procedente de Sigma Chemical Co., USA.

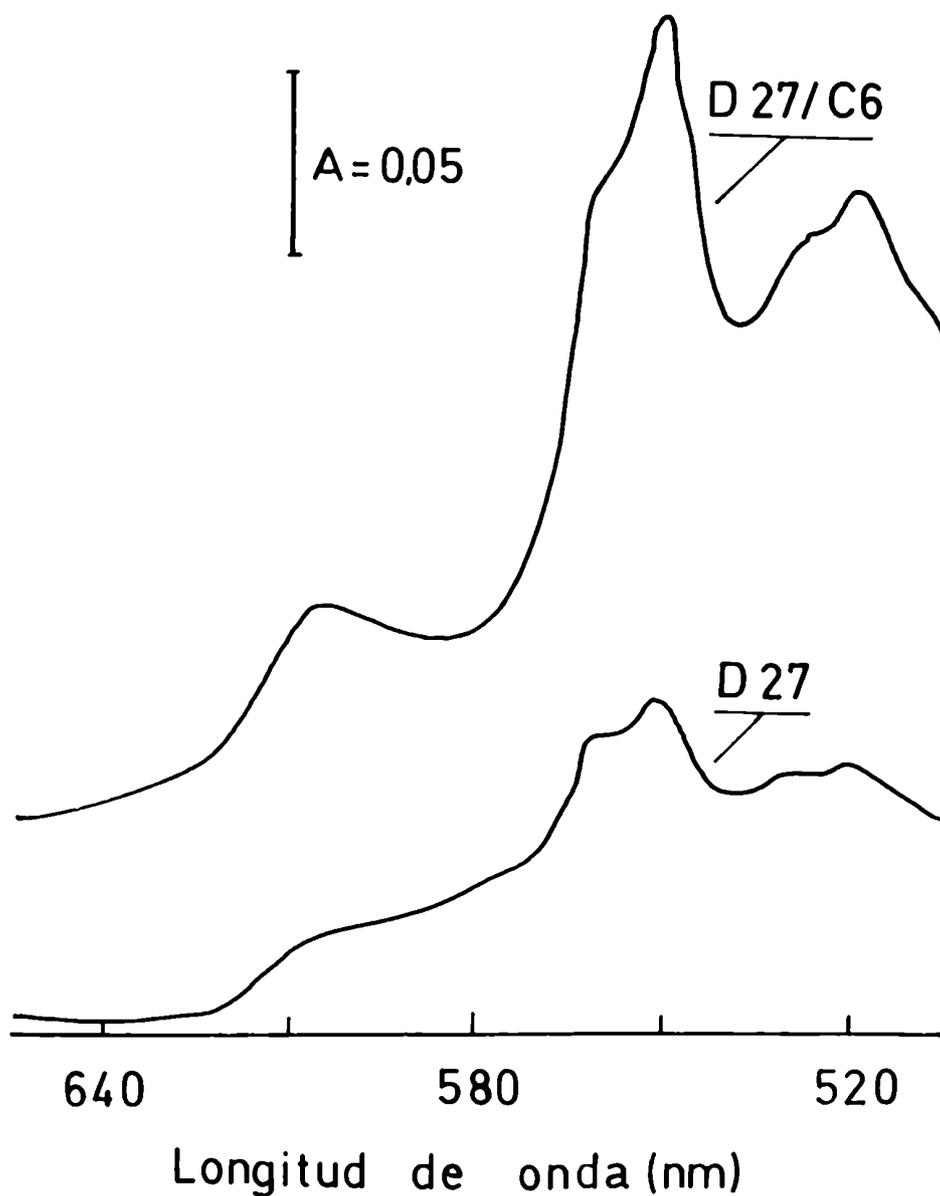


FIGURA 1.1.: Espectros de las células enteras de las cepas *D27* y *D27/C6*.

Las células se dejaron crecer 48 horas en medio con glicerol. Se empleó una suspensión celular de 25 mg peso seco/ml y una solución de leche 20 % como referencia de turbidez. Esta figura fue gentilmente provista por el Dr. J. Mattoon.

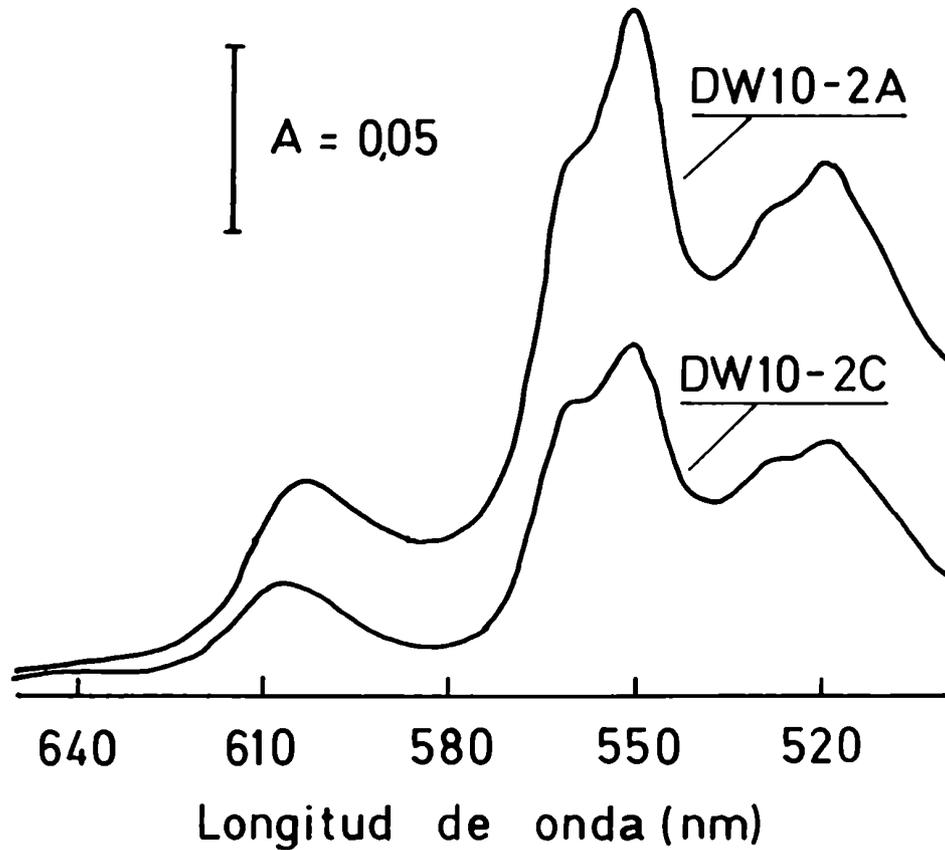


FIGURA 1.2.: Espectros de las células enteras de las cepas DW10-2C y DW10-2A. Las células se dejaron crecer 48 horas en medio con glicerol. Se empleó una suspensión celular de 25 mg peso seco/ml y una solución de leche 20 % como referencia de turbidez. Esta figura fue gentilmente provista por el Dr. J. Mattoon.

I.3. GELES EMPLEADOS

Los geles de Sephadex G-25 (grueso) y G-100 (superfino) se adquirieron en Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia. Además, se empleó DEAE-celulosa proveniente de Merck, AG-Darmstadt, Alemania.

Las dimensiones de las columnas fueron las siguientes:

- Sephadex G-25 grueso: volumen de cama: 15 ml; diámetro: 0,8 ml; longitud: 20 cm.
- Sephadex G-100 superfino: volumen de cama: 180 ml; diámetro: 1,7 ml; longitud: 80 cm.
- DEAE-celulosa: volumen de cama: 25 ml; diámetro: 0,8 ml; longitud: 30 cm.

I.4. REACTIVOS

El extracto de levadura, la peptona y el agar fueron obtenidos de Difco, la dextrosa de Mallinckrodt y los demás reactivos utilizados provenían de Merck o de Sigma Chem. Co., USA.

I.5. EQUIPOS

Las células se rompieron usando un sonicador Soniprep 150 MSE. Las centrifugaciones se realizaron en centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B y en centrífuga de mesa Rolco CM-36.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en espectrofotómetros Beckman modelo 35, Shimadzu modelo UV-210 A o Metrolab modelo RC 325BD.

Los espectros de absorción de intermediarios se

realizaron en el espectrofotómetro Beckman modelo 35 adosado a un registrador Beckman.

Durante todas las corridas cromatográficas se utilizó un colector de fracciones modelo Frac-300 (Pharmacia Fine Chemicals).

Las cromatografías para la caracterización y cuantificación de las porfirinas esterificadas se realizaron en un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) Varian modelo 5000, con un detector de longitud de onda variable Varian modelo 50, un registrador Varian modelo 9176 y un integrador Varian CDS 111L.

Los medios de cultivo y todo el material empleado en las siembras se esterilizaron en autoclave a 1,1 atmósferas durante 20 minutos.

Las condiciones de esterilidad durante los repiques se lograron y mantuvieron utilizando luz UV y un flujo laminar (LABCONCO PURIFIER, CLASS II safety cabinet).

El crecimiento de los cultivos se realizó en un shaker (LAB-LINE incubator-shaker).

CAPITULO II

METODOS

	Página
II.1. Cultivo y crecimiento de las células	63
II.2. Obtención de la proteína enzimática	64
II.3. Sistemas standard de incubación	65
II.3.1. ALA-Sintetasa	65
II.3.2. ALA-Dehidrasa	65
II.3.3. PBG-Deaminasa	66
II.3.4. Unidad enzimática	67
II.4. Determinaciones de porfirinas y precursores	67
II.4.1. Determinación de ALA	67
II.4.2. Determinación de PBG	68
II.4.3. Determinación de porfirinas	68
II.5. Determinación del contenido proteico	69
II.5.1. Método de Bradford	69
II.5.2. Método de Warburg y Christian	69
II.6. Determinación de las porfirinas formadas y del tipo isomérico	70

	Página
II.6.1. Esterificación de las porfirinas formadas	70
II.6.2. Determinación cuantitativa de las porfirinas totales esterificadas	70
II.6.3. Determinación de las porfirinas formadas y del tipo isomérico	71
II.7. Determinación de ALA intracelular	72
II.8. Determinación de glucosa	72
II.9. Determinación colorimétrica de intermediarios polipirrólicos	72
II.10. Determinación del peso molecular	72

II. METODOS

II.1. CULTIVO Y CRECIMIENTO DE LAS CELULAS

Se emplearon los siguientes medios de crecimiento celular:

- 1) YPD: extracto de levadura 1%, peptona 2 % y dextrosa 2 % en agua destilada.
- 2) YPEt: extracto de levadura 1%, peptona 2 % y etanol absoluto 3 % en agua destilada.
- 3) YPGli: extracto de levadura 1 %, peptona 2 % y glicerol 3 % en agua destilada.

Para el mantenimiento de las cepas se realizaron repiques periódicos. Las células se dejaron crecer en estufa a 28-30 °C durante 40 - 48 horas en tubos de YPD agar (2 %) inclinado y luego se guardaron a 4 °C hasta el momento de su uso.

Para realizar las curvas de crecimiento, se repicaron inóculos de medio sólido a un erlenmeyer con medio líquido y las células crecieron con agitación constante (160 rpm) durante 24 horas a 28 - 30 °C y en oscuridad. Posteriormente, se sembraron 2 ml de este precultivo en un erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio y las células se dejaron crecer durante 50 - 60 horas, sacando alícuotas cada hora para determinar la densidad del cultivo a 570 nm. Los tiempos de generación (G) se calcularon a partir de las curvas de crecimiento, usando los valores de densidad como medida del número de células. Se aplicó la siguiente ecuación:

$$G = \frac{0,69315 t}{\ln(D/D_0)}$$

siendo G: Tiempo de generación

t: tiempo

D: densidad a 570 nm a tiempo t

D₀: densidad a 570 nm a tiempo cero

En las experiencias donde era necesario obtener una gran cantidad de células se procedió de la siguiente manera: inóculos de medio YPD sólido se sembraron en erlenmeyers con medio líquido y se dejaron 24 horas en las condiciones antes mencionadas. Transcurrido dicho tiempo, 20 ml del precultivo se sembró en un erlenmeyer de 1000 ml con 300 ml de medio. Las células se dejaron crecer en la forma ya descrita, y a menos que se indique lo contrario, el tiempo de crecimiento fue entre 24 y 26 horas, que corresponde a la fase de crecimiento exponencial tardía en medio YPD.

Las células se cosecharon por centrifugación a 13.000 x g durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada y se lavaron 2 veces con agua destilada, obteniéndose así las células de levadura, que se guardaron a -20 °C hasta el momento de su empleo.

II.2. OBTENCION DE LA PROTEINA ENZIMATICA

A menos que se indique lo contrario, la metodología standard utilizada para la extracción de la proteína enzimática fue la siguiente: Las células lavadas se suspendieron en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 (g peso húmedo de células:ml buffer, 1:1), se sonicaron en amplitud 12 μ durante 2 minutos en presencia de arena (g peso húmedo de células:g arena, 1:3) y luego la relación g peso húmedo de células:ml buffer se llevó a 1:2. El homogenato (H) resultante se centrifugó a 23.000 x g 20 minutos obteniéndose un sobrenadante (S) y un precipitado (P). La fracción S se empleó como fuente enzimática de PBG-Deaminasa y de ALA-D.

La fracción S en la que se determinó actividad de ALA-S se obtuvo por centrifugación del homogenato (H) a 2.300 x g 10 minutos; el buffer de suspensión empleado fue Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

La fracción S se usó inmediatamente para realizar las determinaciones enzimáticas.

II.3. SISTEMAS STANDARD DE INCUBACION

II.3.1. ALA-Sintetasa

La actividad de ALA-S se midió de acuerdo al método de Marver y col. (1966). La mezcla de incubación contenía: 0,5 ml de preparación enzimática, glicina 100 mM, EDTA 10 mM, buffer Tris-HCl 75 mM pH 7,4 y agua destilada hasta completar un volumen final de 2 ml. La incubación se realizó aeróbicamente, en oscuridad, con agitación, a 37 °C durante 1 hora. La reacción se detuvo por agregado de 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 25 %. Las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación y en el sobrenadante se cuantificó el ALA formado.

Los resultados de actividad fueron corregidos por la presencia de ALA intracelular.

II.3.2. ALA-Dehidrasa

El sistema de incubación standard contenía, salvo que se indique lo contrario: 0,5 ml de preparación enzimática, ALA 5 mM y buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 hasta completar un volumen final de 1 ml. Las incubaciones se realizaron en oscuridad y aerobiosis a 30 °C durante 1 hora. Luego se agregó TCA hasta una concentración final de 5 % (v/v). El precipitado proteico se descartó y el PBG formado se determinó en el sobrenadante.

Se hicieron blancos de enzima, sin agregar ALA al sistema de incubación, los cuales se emplearon para corregir los resultados.

II.3.3. PBG-Deaminasa

A menos que se indique lo contrario, el sistema de incubación contenía: 2 ml de preparación enzimática, 80 μ g de PBG (118 μ M) y buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 en un volumen final de 3 ml.

Se hicieron blancos de sustrato, en los cuales la preparación enzimática se reemplazó por el buffer de incubación, corrigiendo los datos de actividad por las porfirinas formadas no enzimáticamente. Los blancos de enzima, sin PBG en el medio de incubación, fueron siempre despreciables.

La incubación se efectuó con agitación constante, en aerobiosis y oscuridad, a 37 °C durante 2 horas.

La reacción se detuvo por desproteínización con TCA 50 % que se agregó hasta alcanzar una concentración final en el incubado de 5 %. Posteriormente la mezcla se expuso a luz blanca durante 20 minutos con el objeto de oxidar los porfirinógenos a porfirinas.

Las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación, lavando el precipitado con 1 ml de TCA 5 %. Los sobrenadantes se reunieron y en ellos se determinaron las porfirinas formadas y, en algunas ocasiones, el PBG remanente.

II.3.4. Unidad enzimática

Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de producto en las condiciones standard de incubación.

La actividad específica se expresa como el número de unidades enzimáticas por mg de proteína.

II.4. DETERMINACIONES DE PORFIRINAS Y PRECURSORES

II.4.1. Determinación de ALA

La cuantificación de ALA se realizó por el método de Mauzerall y Granick (1956) como describen Moore y Labbe (1964). A una alícuota del sobrenadante de incubación se le agregó buffer acético-acetato 1 M pH 4,6 y acetilacetona, y se realizó la condensación a 80 °C durante 10 minutos para obtener el ALA-pirrol. Luego de enfriar, se agregó igual volumen de reactivo de Ehrlich modificado (p-dimetilaminobenzaldehído 2 % (p/v), 84 ml de ácido acético glacial y 16 ml de ácido perclórico), se dejó reaccionar durante 8 minutos y se leyó la absorbancia a 553 nm. La cantidad de ALA se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles ALA/ml enzima} = \frac{A_{553} \times 10^3 \times V_f \times d}{\epsilon \times \text{Venz}}$$

donde A_{553} : absorbancia a 553 nm

d : factor de dilución por agregado de buffer para condensación

V_f volumen después de desproteínizar la mezcla de incubación

ϵ $7,2 \times 10^6$ = coeficiente de extinción molar

Venz: volumen de enzima incubado

II.4.2. Determinación de PBG

La cantidad de PBG se determinó espectrofotométricamente empleando el reactivo de Ehrlich modificado (Mauzerall y Granick, 1956). A una alícuota del sobrenadante se le agregó igual cantidad del reactivo y a los 8 minutos se leyó la absorbanuncia a 553 nm. El contenido de PBG se calculó aplicando la siguiente expresión:

$$\text{nmoles PBG/ml enzima} = \frac{A_{553} \times V_f \times 10^6}{\epsilon \times \text{PM} \times \text{Venz}}$$

donde A_{553} : absorbancia a 553 nm

V_f : volumen final de incubación

ϵ 116 (absorbancia de una solución de PBG de concentración 1 mg/ml)

PM 226 (peso molecular del PBG)

Venz: volumen de enzima incubado

II.4.3. Determinación de porfirinas

La cantidad de porfirinas formadas se determinó espectrofotométricamente en solución ácida (Rimington, 1960). Se leyó la absorbancia a 380 nm, 430 nm y en el máximo de la banda de Soret (A_{max}) y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{nmoles porfirinas/ml enzima} = \frac{(2 A_{\text{max}} - A_{380} - A_{430}) \times f \times V_f}{\text{Venz}}$$

donde A absorbancias a las longitudes de onda indicadas en los subíndices

V_f : volumen final de incubación

Venz: volumen de enzima incubado

f 1,008 para uroporfirina en solución ácida al 5 %

II.5. DETERMINACION DEL CONTENIDO PROTEICO

II.5.1. Método de Bradford

El contenido proteico de las preparaciones enzimáticas se determinó empleando la metodología de Bradford (1976). A 0,1 ml de una dilución apropiada de la proteína en buffer Tris-HCl se le agregan 2,5 ml de una solución compuesta por 0,01 % (p/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7 % de etanol (95 %) y 8,5 % (p/v) de ácido fosfórico (85 %). Se puede medir la absorbancia a 595 nm, luego de transcurridos 10 minutos, contra un blanco preparado con 0,1 ml del buffer correspondiente y 2,5 ml del reactivo. El color se mantiene durante 60 minutos.

La cantidad de proteína se calcula aplicando la siguiente expresión:

$$\text{mg proteína/ml} = A_{595} \times f \times \text{dilución}$$

donde f se determina por medio de una curva de calibración realizada empleando soluciones en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 de seroalbúmina bovina como standard.

II.5.2. Método de Warburg y Christian

Las proteínas presentes en los eluídos de las diferentes columnas se cuantificaron directamente empleando el método de Warburg y Christian (1941).

El contenido proteico se calculó usando la siguiente e

$$\text{mg proteína/ml} = (1,45 A_{280} - 0,74 A_{260}) \times \text{dilución}$$

donde A_{280} y A_{260} : absorbancias a 280 nm y 260 nm respectivamente

II.6. DETERMINACION DE LAS PORFIRINAS FORMADAS Y DEL TIPO ISOMERICO

II.6.1. Esterificación de las porfirinas formadas

Se siguió la metodología descrita por Batlle y Grinstein (1964) que consiste en evaporar hasta sequedad, en va cío, la solución ácida desproteïnizada proveniente de la incuba ción. El residuo resultante se disuelve en una mezcla esterifi- cante constituída por ácido sulfúrico:metanol 5 % (v/v) y se la deja en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 24 a 36 ho- ras.

II.6.2. Determinación cuantitativa de las porfirinas totales esterificadas

La extracción y determinación cuantitativa de las por- firinas esterificadas se realizó según la técnica de Batlle y Grinstein (1962). Las porfirinas esterificadas se extrajeron con cloroformo, lavándose con exceso de agua hasta acidez nega- tiva. Ocasionalmente, se formaba una emulsión que se destruía mediante un lavado con cloruro de sodio 7 %. La solución cloro- fórmica se filtró a través de papel plegado embebido en el mis- mo solvente, determinándose la cantidad de porfirinas esterifi- cadas presente en el filtrado mediante la siguiente expresión:

$$\mu\text{g porfirinas} = (2 \Lambda_{\text{max}} - \Lambda_{380} - \Lambda_{430}) \times 2,721 \times V$$

donde V es el volumen de la solución y 2,721 es el factor calcu- lado para la uroporfirina esterificada (Cornford y Benson, 1963).

II.6.3. Determinación de las porfirinas formadas y del tipo isomérico

La solución clorofórmica que contiene las porfirinas totales esterificadas se llevó a sequedad en baño de agua a 100 °C. El residuo se disolvió en un pequeño volumen de cloroformo de manera de obtener una concentración de 5 - 10 µg/ml. Luego las porfirinas esterificadas se filtraron a través de un filtro Millepore de 0,22 µ.

A continuación se determinó el tipo isomérico de la uroporfirina (trabajo no publicado) y además se separaron las porfirinas formadas (Polo y col., 1983).

En la obtención del tipo isomérico se emplearon las siguientes condiciones:

- Solventes: acetato de etilo:n-hexano (40:60, v/v)
- Flujo: 1 ml/min
- Presión: 25 atm
- Tiempo de retención: 32 - 34 minutos
- Volumen de muestra inyectada: 10 µl
- Columna empleada: Spherisorb S5W (Spectra Physics) con relleno de sílica de 5 mµ, provista de una pre-columna con relleno de sílica de 10 mµ SI 10 de Varian.

Para la separación de los ésteres metílicos de las porfirinas formadas, las condiciones empleadas fueron las siguientes:

- Solventes: acetato de etilo:n-hexano (55:45, v/v)
- Flujo: 2 ml/minuto
- Presión: 42 - 50 atm
- Tiempo de retención: 2 a 8 minutos
- Volumen de muestra inyectada: 10 µl
- Columna utilizada: Spherisorb S5 W (Spectra Physics) (longitud: 25 cm; diámetro: 4,6 mm).

II.7. DETERMINACION DE ALA INTRACELULAR

El ALA intracelular se determinó empleando la metodología descrita por Malamud y col. (1979). A 25 mg peso seco de células se le agregaron 1,55 ml de TCA 5 % y la suspensión se agitó en vortex durante 5 minutos. El precipitado se descartó luego de centrifugar a 1.000 x g 20 minutos y en una alícuota del sobrenadante se determinó el contenido de ALA intracelular por el método de Mauzerall y Granick (1956) modificado por Moore y Labbe (1964).

II.8. DETERMINACION DE GLUCOSA

La concentración de glucosa en el medio de crecimiento se determinó usando el reactivo cromogénico o-toluidina (Kit Wiener).

II.9. DETERMINACION COLORIMETRICA DE INTERMEDIARIOS POLIPIRROLICOS

Los pirrilmétanos se ensayaron con el reactivo de Ehrlich modificado. Los espectros se registraron entre 600 y 450 nm.

II.10. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

El armado de las columnas así como el tratamiento previo de los geles fue el descrito por Batlle (1968). Se emplearon geles de dextrano (Sephadex), calculándose el PM según la metodología de Andrews (1964, 1965).

En el caso de proteínas globulares, las determinaciones

están afectadas por un error aproximado del 10 %. Las causas de error más comunes son diferencias en la conformación de las proteínas, incorrecta determinación del volumen de elución y diferencias de densidad de las soluciones proteicas.

La calibración de las columnas se realizó con proteínas de PM conocido, graficándose en escala semilogarítmica, PM en función de V_e/V_o (siendo V_e el volumen de elución) (Figura II.1.).

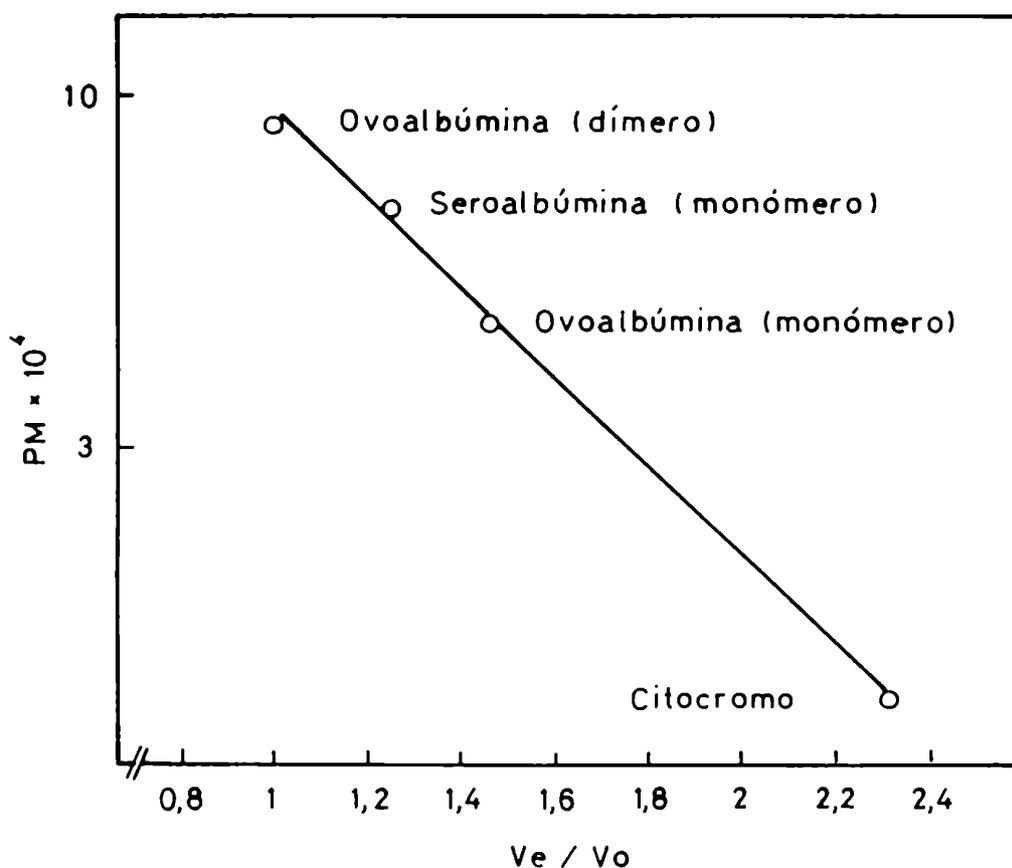


FIGURA II.1.: Curva de calibración para la determinación de pesos moleculares. Se empleó una columna de Sephadex G-100 en la cual se sembraron proteínas patrones.

RESULTADOS
Y
DISCUSION

CAPITULO I

ENSAYOS PRELIMINARES

	Página
I.1. Curvas de crecimiento	74
I.2. Métodos empleados para la ruptura celular	78
I.3. Condiciones óptimas para la extracción de la proteína enzimática	81
I.3.1. Amplitud de sonicación	81
I.3.2. Tiempo de sonicación	81
I.3.3. Selección del buffer de extracción y de incubación	82
I.3.4. Cantidad de arena	83
I.3.5. Relación entre masa celular y volumen de buffer	84

I. ENSAYOS PRELIMINARES

I.1. CURVAS DE CRECIMIENTO

Las células de cepas normales de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* son aeróbicas facultativas, es decir que pueden fermentar glucosa u otros carbohidratos anaeróbicamente hasta etanol (fermentación alcohólica) o pueden crecer aeróbicamente utilizando varias fuentes de carbono; en este último caso obtienen su energía a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Es importante conocer la curva de crecimiento de una cepa dada, ya que el estado fisiológico de las células varía con la etapa y el medio de crecimiento.

En las Figuras I.1., I.2. y I.3. se muestran las curvas de crecimiento de las cepas *D27* (normal en la síntesis de hemo) y *D27/C6* (HEM R⁺) en los medios YPD, YPGli y YPet, respectivamente.

En ambas cepas crecidas en medio YPD se observan las tres fases típicas de crecimiento: una fase inicial lag, una fase exponencial log y una fase estacionaria. En cambio, cuando las células crecieron en los medios YPGli e YPet, no se detecta una fase lag definida.

Las células de las cepas *D27* y *D27/C6* muestran bajas velocidades de crecimiento en los medios YPGli e YPet (Tabla I.1.) comparadas con los valores encontrados en YPD, en concordancia con el metabolismo típicamente fermentativo de *S. cerevisiae*.

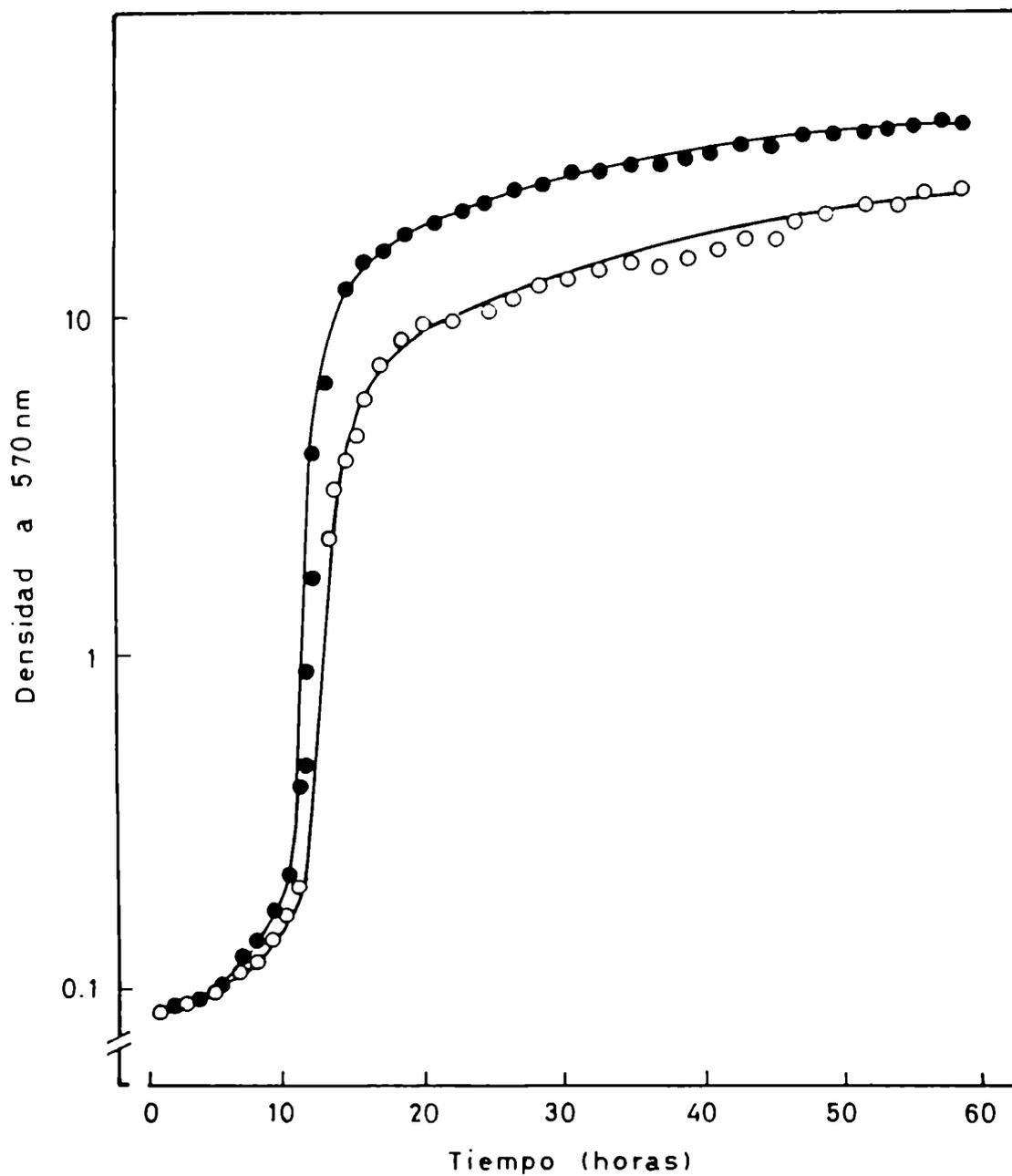


FIGURA I.1.: Curvas de crecimiento de células crecidas en medio YPD.
(○) D27; (●) D27/C6. La metodología es la descrita en Materiales y Métodos.

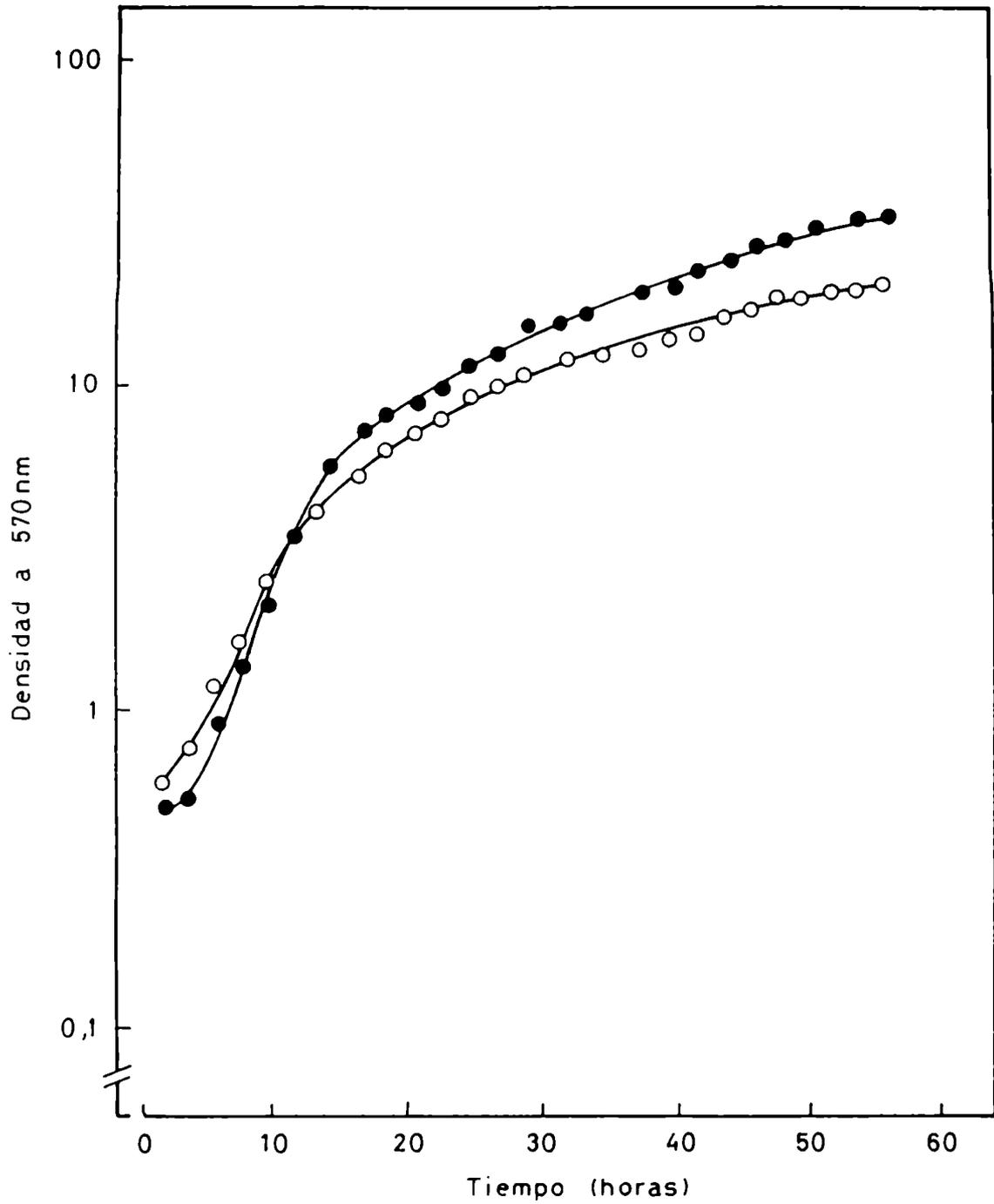


FIGURA I.2.: Curvas de crecimiento de células crecidas en medio YPGli.
(○) D27; (●) D27/C6. La metodología es la descrita en Materiales y Métodos.

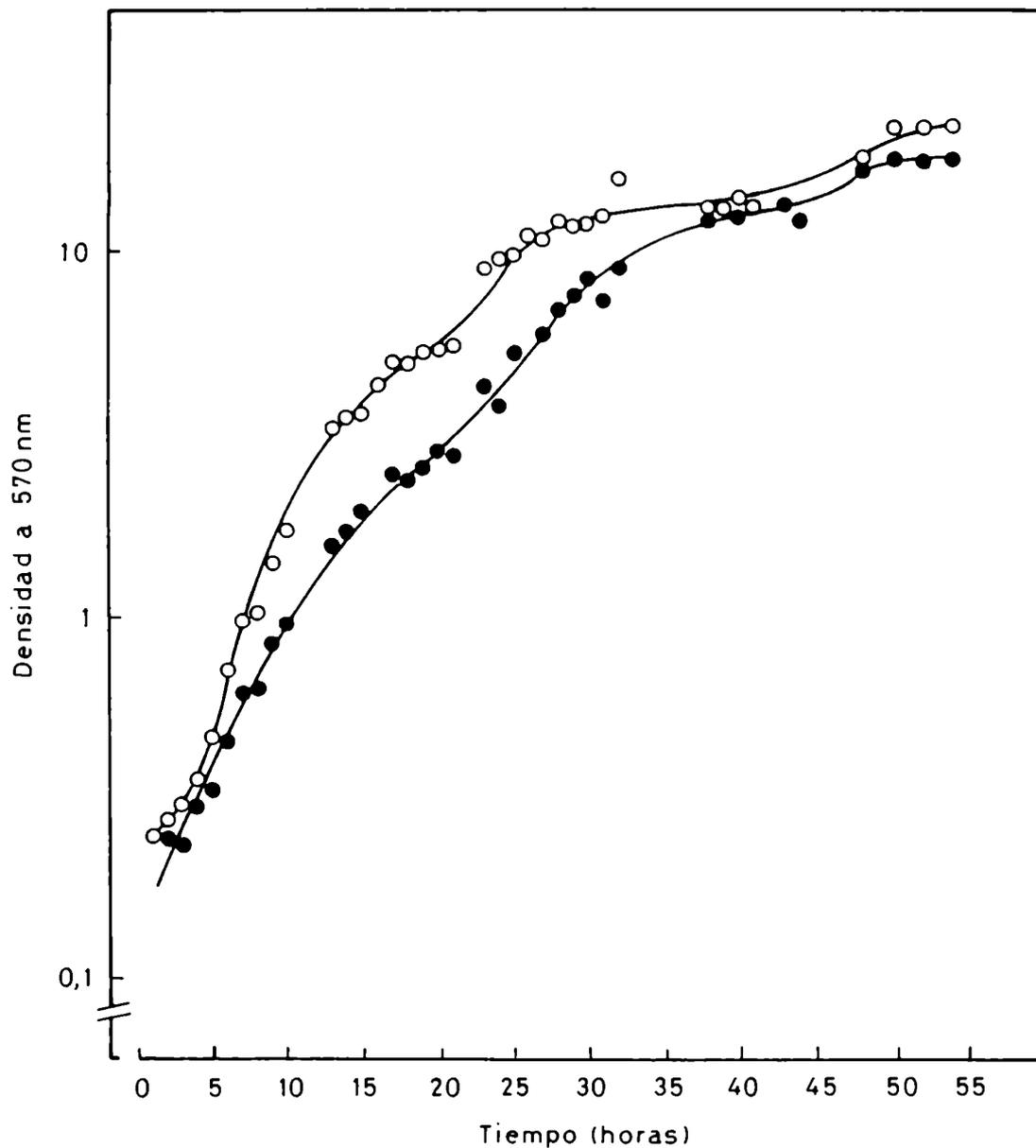


FIGURA I.3.: Curvas de crecimiento de células crecidas en medio YPet.
(○) D27; (●) D27/C6. La metodología es la descrita en Materiales y Métodos.

TABLA I.1.: Tiempos de generación

CEPAS	TIEMPOS DE GENERACION (min)		
	YPD	YPG1i	YPEt
D27	160	280	240
D27/C6	140	260	300

Los tiempos de generación fueron calculados según se indica en Materiales y Métodos.

I.2. METODOS EMPLEADOS PARA LA RUPTURA CELULAR

Se sabe que las células de levadura poseen una pared celular rígida, compuesta por microfibrillas de polisacáridos y polisacáridos asociados a proteínas. Esta pared confiere a las células una gran resistencia a la ruptura mecánica. Se han desarrollado numerosos métodos, más o menos efectivos, y en general bastante drásticos para romper esta pared celular.

Por lo tanto, con el objeto de obtener una eficiente extracción de proteína activa, en este trabajo se ensayaron diferentes métodos de ruptura, incluyendo:

- Trituración de las células en mortero con perlas de vidrio de 150 - 200 μ (SIGMA Chem. Co.) o arena.

- Sonicación de las células suspendidas en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8.
- Sonicación de las células suspendidas en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 con perlas de vidrio (500 μ) o arena.
- Sonicación de las células suspendidas en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 en presencia de Tritón X-100 (0,5 %).

Empleando cualquiera de estos métodos de ruptura, se obtuvo una fracción homogenato (H) que se centrifugó a 23.000 x g durante 20 minutos, se separaron así una fracción sobrenadante (S) y un precipitado (P). En la Figura I.4. se ilustran los resultados obtenidos al determinar la actividad de la enzima PBG-Deaminasa en la fracción S.

Se observa que la presencia de perlas de vidrio durante la sonicación aumenta entre un 10 - 20 % la actividad en todos los casos, y este incremento es aún mayor con el agregado de arena (25 - 40 %). El agente tensioactivo Tritón X-100 no tiene un efecto importante.

El agregado de perlas de vidrio (150 - 200 μ) durante la trituración de las células en mortero es más efectivo que el uso de arena, obteniéndose valores de actividad específica para la PBG-Deaminasa de 0,28 y 0,22 nmoles porfirinas/mg proteína, respectivamente.

En consecuencia, de los métodos de ruptura empleados, los más apropiados para obtener la mayor liberación de proteína activa, fueron: sonicación en presencia de arena (12 μ , 2 minutos) y mortero con perlas de vidrio de 150 - 200 μ .

Paralelamente, se determinó el tipo isomérico de las porfirinas formadas por los sobrenadantes resultantes de los diferentes métodos de ruptura. Se encontró un 100 % de URO I, excepto en el caso de usar mortero con perlas de vidrio (150 - 200 μ) cuyo sobrenadante produjo un 55 % de URO III.

Por lo tanto, el único método que serviría para medir

la actividad del complejo enzimático PBG-asa (PBG-Deaminasa-Co-sintetasa), es el que emplea mortero con perlas de vidrio; en los demás sólo se detecta actividad de PBG-Deaminasa y de ellos la sonicación con arena es el más conveniente para la extracción de esta última enzima.

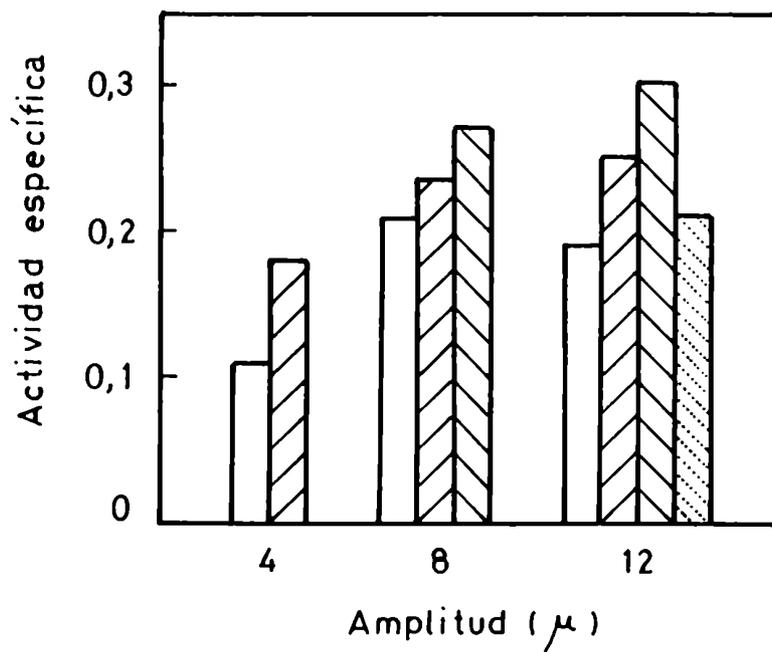


FIGURA 1.4.: Métodos de ruptura celular. En todos los casos se sonicó durante 2 minutos, la relación g peso húmedo de células:ml de buffer fue 1:2 y la relación g peso húmedo de células:g de perlas de vidrio o arena fue 1:3. (□) Sonicación, (▨) Sonicación con perlas de vidrio (500 μ), (▩) Sonicación con arena, (▩) Sonicación con Tritón X-100 (0,5 %). Las demás condiciones experimentales se detallan en el texto.

I.3. CONDICIONES OPTIMAS PARA LA EXTRACCION DE LA PROTEINA ENZIMATICA

Luego de la elección del método de ruptura celular, se continuó con la búsqueda de las condiciones óptimas para lograr la mayor extracción de proteína enzimática activa. En todos los casos, se emplearon únicamente células de la cepa normal 027 y la actividad de PBG-Deaminasa se determinó en la fracción sobrenadante (S) proveniente de la centrifugación del homogenato a 23.000 x g por 20 minutos.

I.3.1. Amplitud de sonicación

Las células de levadura suspendidas en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 (1:2, g peso húmedo de células:ml de buffer) se sonicaron en presencia de arena (1:3, g peso húmedo de células:g de arena) durante 2 minutos a las amplitudes indicadas en la Figura I.5. La formación de porfirinas, así como también la liberación de proteínas, aumenta cuando la amplitud se incrementa de 8 a 12 μ ; para este último valor se obtiene la máxima actividad específica, por lo cual se adoptó como amplitud óptima.

I.3.2. Tiempo de sonicación

En la Figura I.6. se muestran los resultados obtenidos al sonicar las células suspendidas en buffer Tris-HCl (1:2) en presencia de arena (1:3) en una amplitud de 12 μ , durante distintos tiempos. Si bien la formación de porfirinas totales es máxima a los 2 minutos, el pico de actividad específica se obtiene luego de 1 minuto de sonicación.

Sin embargo, dado que la actividad específica a los 2 minutos es de sólo un 13 - 15 % menor que al minuto y que es conveniente disponer de la mayor cantidad posible de porfirinas

para su posterior identificación, se resolvió emplear 2 minutos como tiempo óptimo de sonicación.

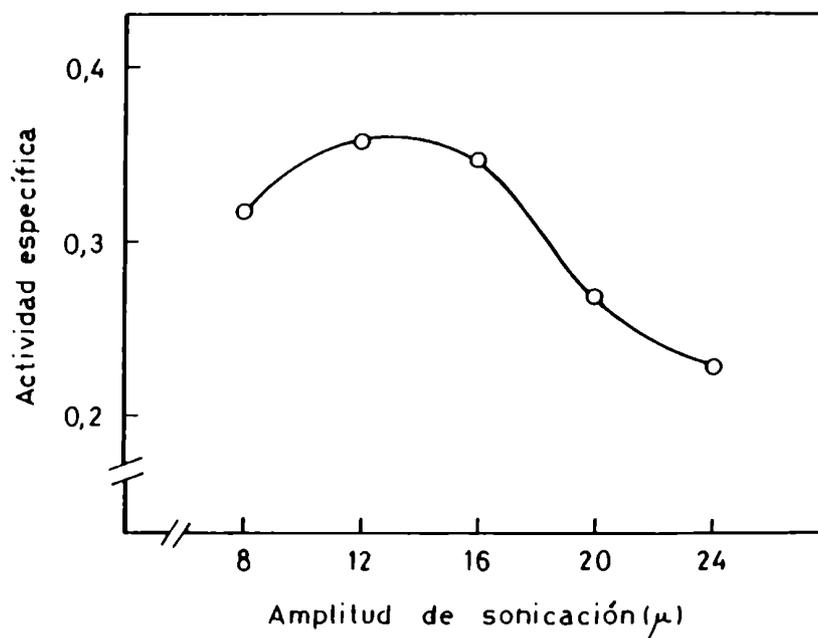


FIGURA 1.5.: Amplitud de sonicación.
Las condiciones experimentales se detallan en el texto y la metodología en Materiales y Métodos.

I.3.3. Selección del buffer de extracción y de incubación

Utilizando las condiciones recién descritas para la ruptura de las células, se variaron ahora los buffers de extracción y de incubación como se muestra en la Tabla 1.2.

No se observan diferencias apreciables entre los valores de actividad hallados; por consiguiente se continuó empleando el buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 como buffer de extracción y de incubación.

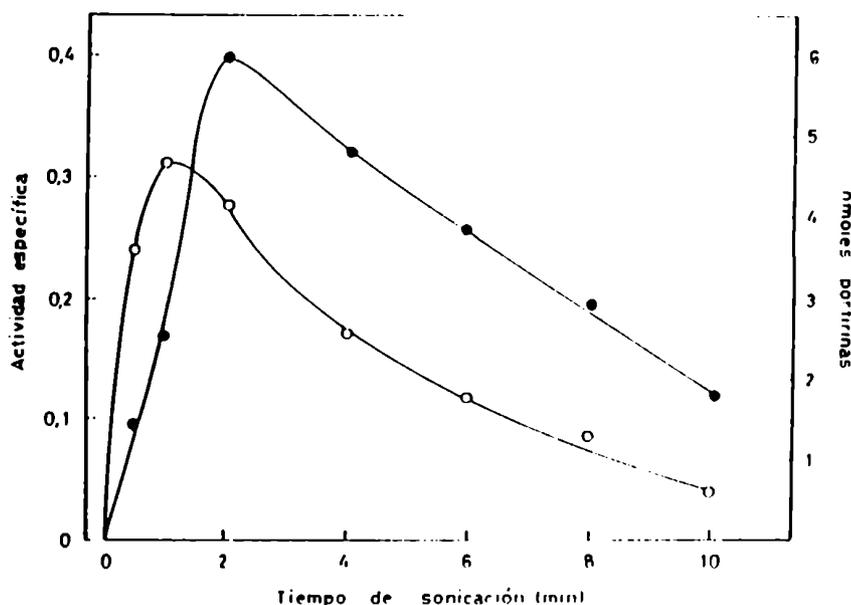


FIGURA 1.6.: Tiempo de sonicación.

(○) Actividad específica (nmoles porfirinas/mg proteína), (●) nmoles porfirinas formadas.

Las condiciones experimentales se detallan en el texto y la metodología en Materiales y Métodos.

1.3.4. Cantidad de arena

Las células de levadura suspendidas en buffer Tris-HCl (1:2) se sonicaron durante 2 minutos en amplitud de 12μ en presencia de cantidades variables de arena (1:1, 1:3 y 1:5; g peso húmedo de células:g de arena). La actividad específica no varía significativamente con la relación empleada durante la sonicación (Tabla 1.3.). Sin embargo, para la relación 1:1 tanto la liberación de proteína como la formación de porfirinas son un 40 - 50 % menores que los valores encontrados para las otras dos relaciones utilizadas. Por lo tanto, se decidió emplear en lo sucesivo la relación 1:3 (g peso húmedo de células:g arena).

TABLA 1.2.: Efecto de los buffers de extracción e incubación

BUFFER DE EXTRACCION	BUFFER DE INCUBACION	nmoles PORF. FORMADAS	mg PROT/ml	ACTIVIDAD ESPECIFICA
Fosfato	Fosfato	5,4	9,2	0,29
Fosfato	Tris-HCl	5,7	10,0	0,28
Tris-HCl	Fosfato	5,3	8,6	0,31
Tris-HCl	Tris-HCl	5,5	8,7	0,32

Se emplearon los buffers fosfato de sodio 50 mM pH 7,6 y Tris-HCl 50 mM pH 7,8. La metodología es la descrita en Materiales y Métodos, excepto que se variaron los buffers de extracción e incubación.

1.3.5. Relación entre masa celular y volumen de buffer

La relación g peso húmedo de células:ml de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 se varió durante la sonicación y la incubación como se indica en la Tabla 1.4.

La actividad específica es máxima cuando las células de levadura se sonicaron con arena (1:3) durante 2 minutos en amplitud 12 μ en la relación g peso húmedo de células:ml de buffer 1:1 y posteriormente dicha relación se llevó a 1:2 para la determinación de actividad enzimática.

TABLA 1.3.: Efecto de la relación entre el peso de células y el de arena

g CELULAS:g ARENA	nmoles PORF. FORMADAS	mg PROT/ml	ACTIVIDAD ESPECIFICA
1:1	3,0	5,3	0,28
1:3	5,2	8,8	0,30
1:5	5,1	8,9	0,29

Las condiciones experimentales se detallan en el texto y la metodología en Materiales y Métodos.

TABLA 1.4.: Influencia de la relación entre el peso de células y el volumen de buffer

g CELULAS:ml BUFFER		nmoles PORF. FORMADAS	mg PROT/ml	ACTIVIDAD ESPECIFICA
Sonicación	Incubación			
1:1	1:1	8,4	15,7	0,27
1:1	1:2	7,9	11,7	0,34
1:2	1:2	6,2	10,2	0,30
1:2	1:3	6,5	11,9	0,27
1:3	1:3	2,4	5,5	0,22

Se variaron las relaciones g células:ml buffer tanto durante la sonicación como durante la incubación. Las demás condiciones son las standard descritas en Materiales y Métodos.

CAPITULO II

PROPIEDADES DE LA PBG-DEAMINASA EN EXTRACTOS CELULARES CRUDOS

	Página
II.1. Localización intracelular	86
II.2. Efecto de la atmósfera de incubación	86
II.3. Efecto de la cantidad de proteína	89
II.4. Efecto del tiempo de incubación	89
II.5. Determinación del pH óptimo de reacción	90
II.6. Efecto de la concentración de sustrato. Estudios cinéticos	94

II. PROPIEDADES DE LA PBG-DEAMINASA EN EXTRACTOS CELULARES CRUDOS

Se determinaron diferentes propiedades de la PBG-Deaminasa en extractos celulares crudos de las cepas D27 y D27/C6 con el fin de tener un conocimiento aproximado de su comportamiento *in vivo*, y además determinar las condiciones óptimas para medir su actividad *in vitro*. Se hizo entonces un estudio comparativo de las características de la enzima en ambas cepas, empleando la fracción sobrenadante (S) como fuente enzimática, excepto se indique lo contrario.

II.1. LOCALIZACION INTRACELULAR

Se midió actividad de PBG-Deaminasa en la fracción homogenato (H) obtenida luego de la sonicación con arena, y en las fracciones precipitado (P) y sobrenadante (S) provenientes de la centrifugación de H a 23.000 x g 20 minutos.

Como se observa en la Figura II.1., prácticamente el 100 % de la actividad de PBG-Deaminasa se encuentra en la fracción citosólica (S) de las células de levadura. Se han descrito resultados similares para la misma enzima en la mayoría de las fuentes examinadas, excepto en *Euglena gracilis* donde también se detectó actividad en la fracción cloroplástica (Rossetti y col., 1989; Sharif y col., 1989).

II.2. EFFECTO DE LA ATMOSFERA DE INCUBACION

Debido a que existen divergencias en cuanto al requerimiento de oxígeno durante la condensación enzimática de PBG a uroporfirinógenos, se examinó el efecto de la atmósfera de

incubación sobre la PBG-Deaminasa de las dos cepas de *S. cerevisiae* en estudio. En la Figura II.2. se muestra que esta enzima en levaduras es igualmente activa en presencia o ausencia de oxígeno. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Bogorad (1958 a, b), Lockwood y Benson (1960), Sancovich y col. (1969 a), Llambías y Batlle (1971 b); y difieren de los descritos para la enzima de callos de soya (Llambías y Batlle, 1971 a), *E. gracilis* (Rossetti y Batlle, 1977) y eritrocitos humanos (Fumagalli y col., 1985).

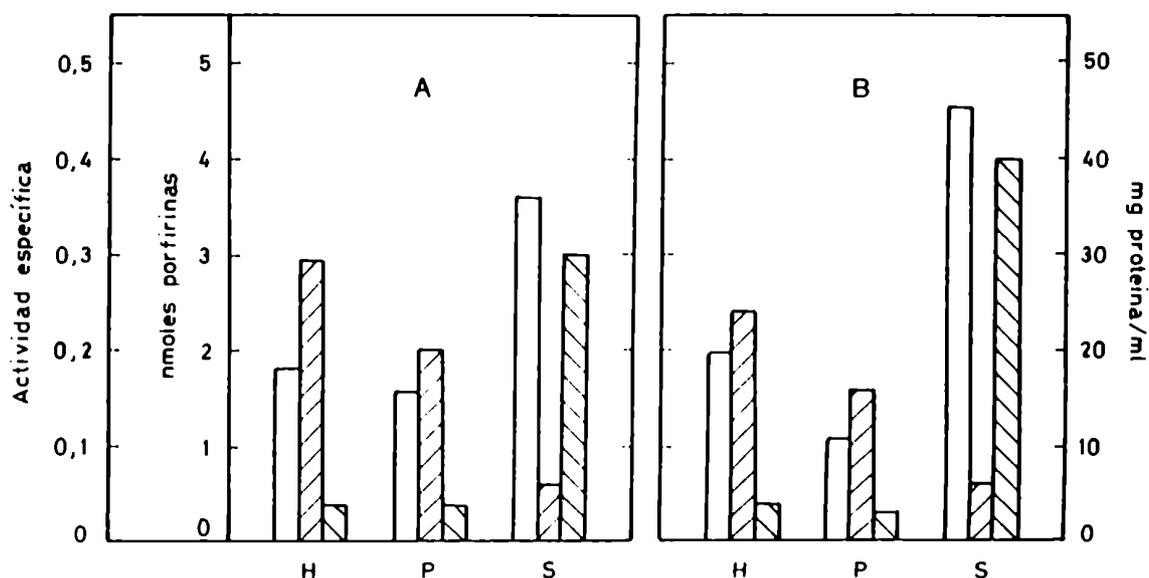


FIGURA II.1.: Actividad de PBG-Deaminasa en las distintas fracciones subcelulares de las cepas D27 (A) y D27/C6 (B). Se emplearon las fracciones homogenato (H), sobrenadante (S) y precipitado (P). (□) nmol porfirinas formadas, (▨) mg proteína/ml, (■) actividad específica. Se siguió la metodología descrita en Materiales y Métodos.

Por razones prácticas se resolvió emplear atmósfera aeróbica para determinar actividad de PBG-Deaminasa.

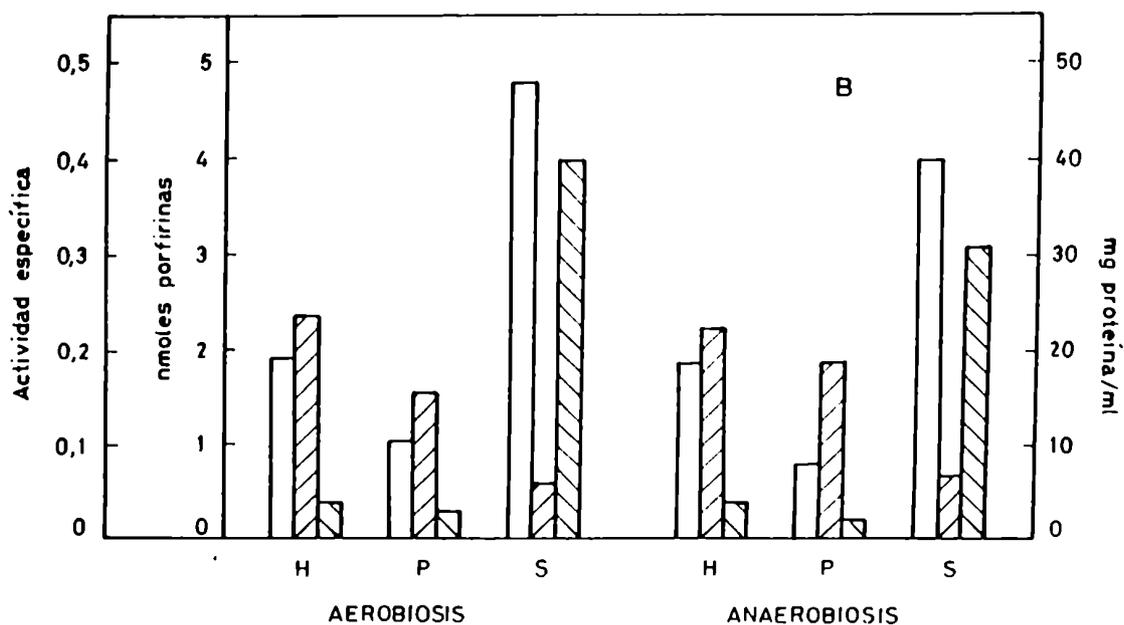
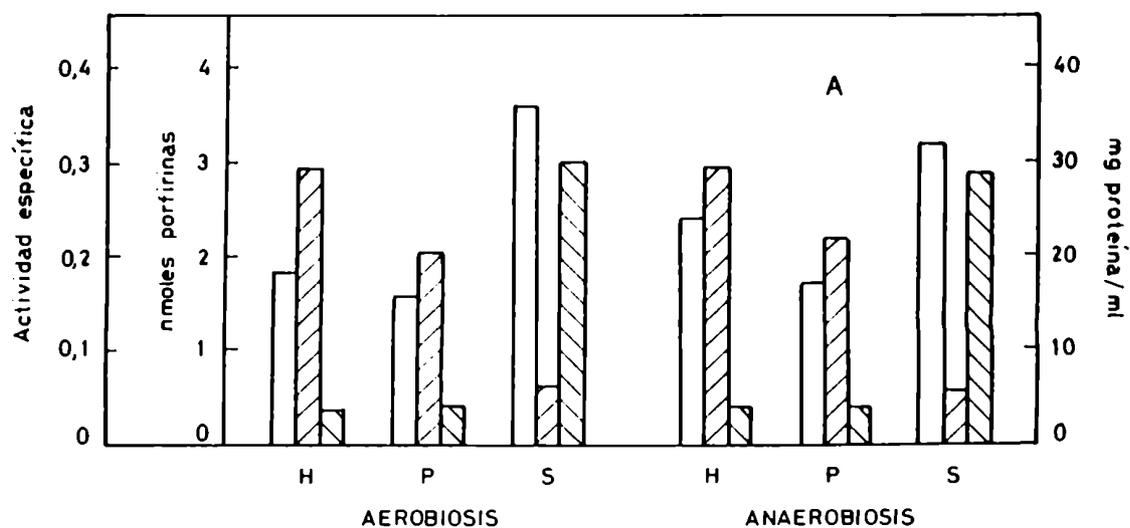


FIGURA III.2.: Efecto de la atmósfera de incubación sobre la actividad de PBG-Deaminasa de las cepas D27 (A) y D27/C6 (B).

La actividad enzimática se determinó en las fracciones homogenato (H), sobrenadante (S) y precipitado (P).
 (□) nmoles porfirinas formadas, (▨) mg proteína/ml,
 (▤) actividad específica. Se siguió la metodología descrita en Materiales y Métodos.

II.3. EFEECTO DE LA CANTIDAD DE PROTEINA

Se estudió el efecto de la cantidad de proteína sobre la actividad de PBG-Deaminasa de la fracción S de las cepas D27 y D27/C6, empleando concentraciones saturantes de sustrato (118 μ M) (Figura II.3.). Las porfirinas formadas en ambas cepas aumentan linealmente con la concentración proteica hasta los 18 mg, sin síntesis adicional de producto en la cepa mutante HEM R⁺. En la cepa normal, a mayores concentraciones de proteínas, se observa una inhibición de un 25 %. En cambio, el consumo de sustrato aumenta linealmente hasta los 7 - 10 mg de proteína permaneciendo luego invariable.

Es sabido que en la mayoría de los tejidos, la variación de la actividad enzimática con la concentración proteica es lineal (Sancovich y col., 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Araujo y col., 1987; Kotler y col., 1987 a; Rossetti y col., 1987; Anderson y Desnick, 1980).

II.4. EFEECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION

En 1971, Llambías y Batlle (a) encontraron para la PBG-Deaminasa y la PBG-asa de callos de soya una fase lag prolongada (3 - 4 horas), al estudiar el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática. Asimismo, Rossetti y Batlle (1977) observaron un comportamiento similar para las mismas enzimas de *E. gracilis*, siendo esta fase lag sólo de 60 minutos. La presencia de fase lag también fue demostrada más tarde por Battersby y col. (1982) y por Smythe y Williams (1988) para la PBG-Deaminasa de *E. gracilis* y de eritrocitos humanos, respectivamente. Estos hallazgos apoyaban la formación de intermediarios polipirrólicos durante la reacción de condensación enzimática del PBG. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió analizar la variación de la formación de producto o

del consumo de sustrato con el tiempo de incubación. En la Figura II.4. se observa que los perfiles para las dos cepas en estudio son muy similares. Las porfirinas formadas aumentan linealmente con el tiempo hasta los 240 minutos; en cambio, el PBG se consume rápidamente (60 - 70 %) dentro de los primeros 10 - 20 minutos, probablemente debido a una síntesis de intermediarios polipirrólicos que luego conducirá a una formación lineal de uroporfirinógenos. Similares resultados ya fueron reportados por Sancovich y col. (1969 a), Llambías y Batlle (1971 b), Anderson y Desnick (1980), Kotler y col. (1987 a) y Araujo y col. (1987).

II.5. DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE REACCION

En la Figura II.5. se muestra el efecto del pH sobre la actividad enzimática de las cepas *D27* y *D27/C6*. Se encuentra una máxima formación de porfirinas en un amplio rango de pH que fue de 7,5 a 7,9 en buffer Tris-HCl. A valores de pH menores que 6,5 y mayores que 8,5 la actividad de PBG-Deaminasa es casi nula.

Cuando se determinó el consumo de PBG, el perfil de la curva de pH fue similar al descrito para la formación de porfirinas (datos no ilustrados).

El rango de pH óptimo hallado es semejante al ya observado para la enzima de *Rp. spheroides* (Davies y Neuberger, 1973; Jordan y Shemin, 1973), de germen de trigo (Frydman y Feinstein, 1970) y de *Rp. palustris* (Kotler y col., 1987 a); levemente superior al de la enzima de eritrocitos humanos (Frydman y Feinstein, 1974; Fumagalli y col., 1985), de hígado de vaca (Sancovich y col., 1969 a) y de *Chlorella regularis* (Shioi y col., 1980); y algo inferior al hallado para la enzima de *E. coli* (Jordan y col., 1988 a) y de eritrocitos humanos (Anderson y Desnick, 1980).

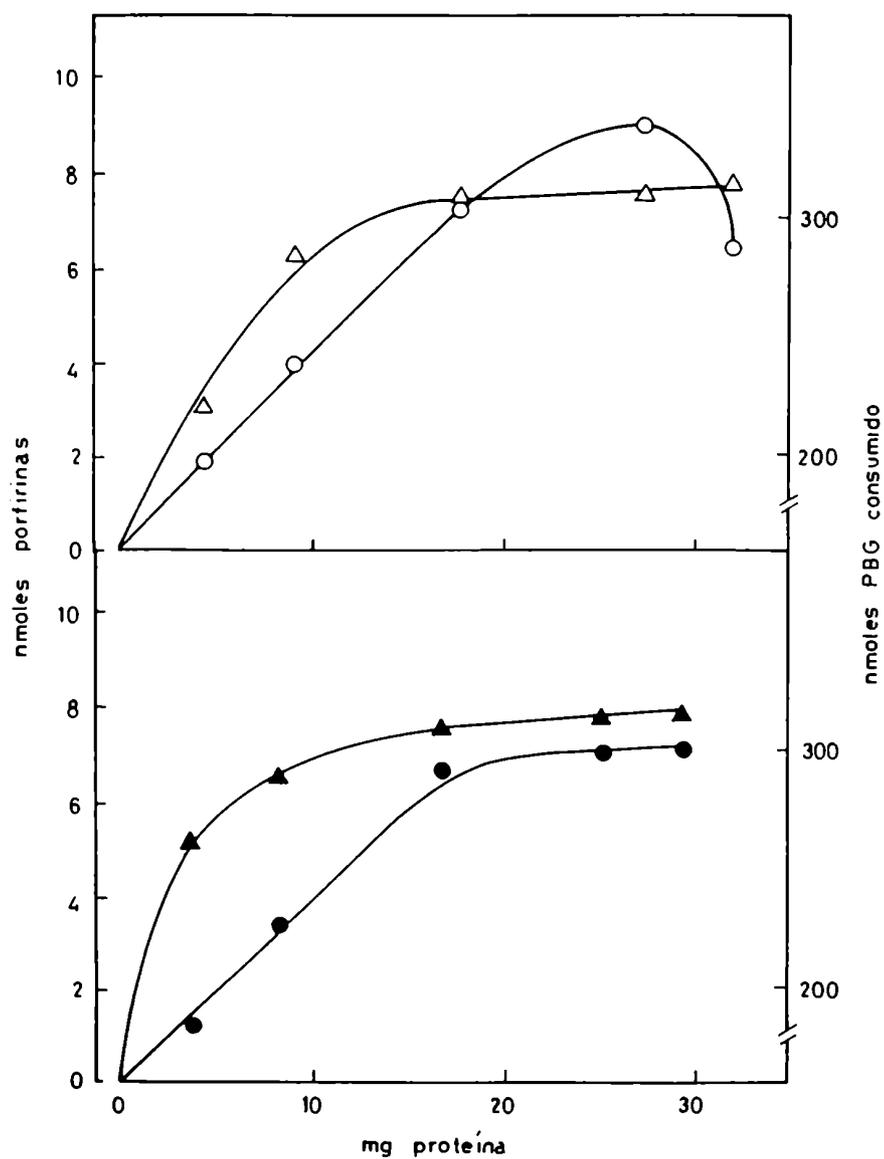


FIGURA II.3.: Efecto de la cantidad de proteína sobre la actividad de PBG-Deaminasa.
 (○, △) Cepa D27; (●, ▲) cepa D27/C6
 (○, ●) nmoles porfirinas formadas; (△, ▲) nmoles PBG consumido. El sistema de incubación y la metodología fueron los descritos en Materiales y Métodos.

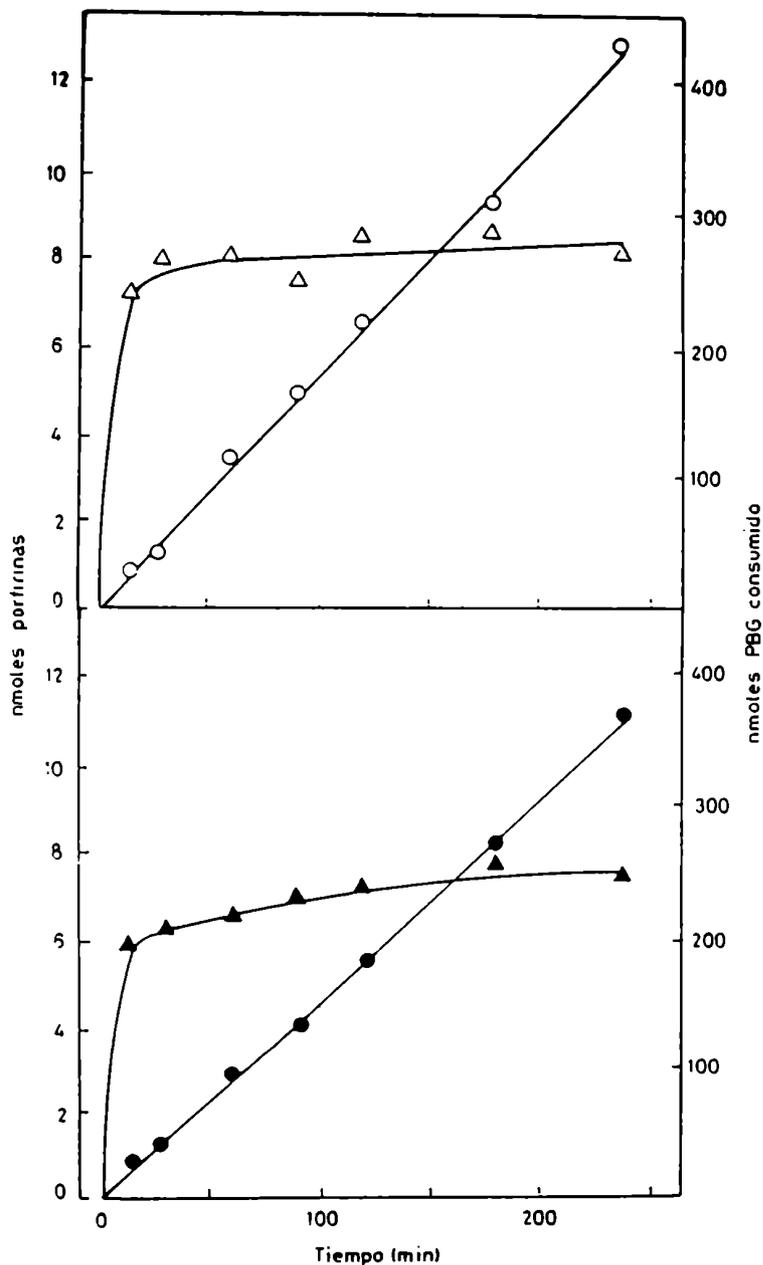


FIGURA II.4.: Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de PBG-Deaminasa.

(○, △) Ceba D27; (●, ▲) cepa D27/C6

(○, ●) nmoles porfirinas formadas

(△, ▲) nmoles PBG consumido

El sistema de incubación y la metodología fueron los descritos en Materiales y Métodos.

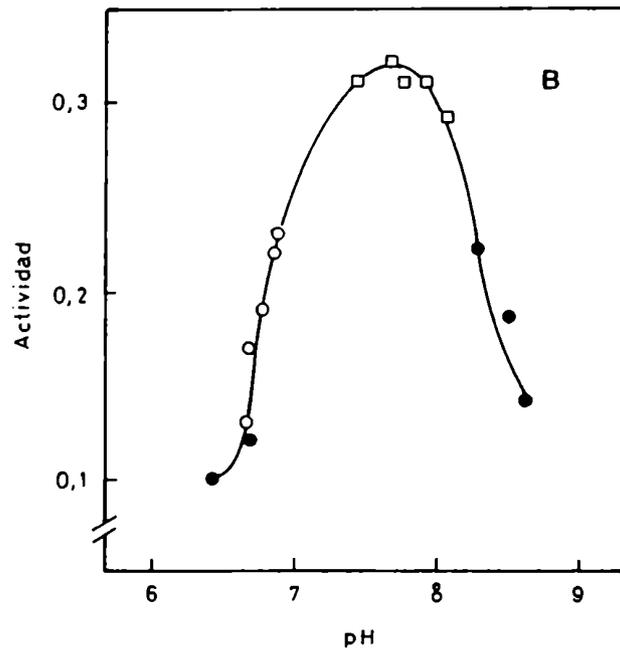
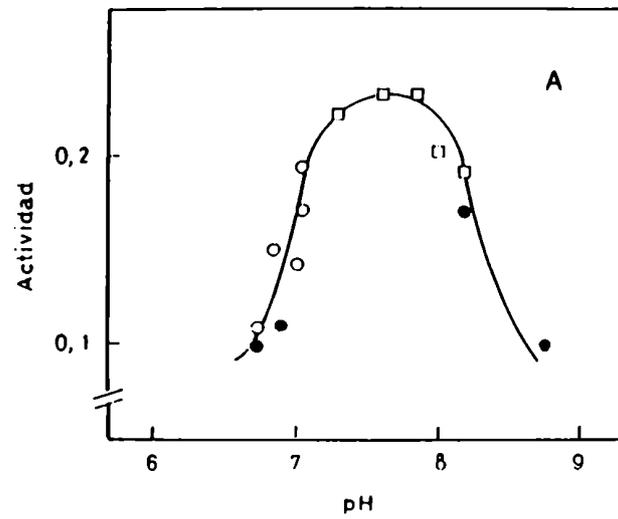


FIGURA II.5.: Determinación del pH óptimo.

(A) Ceba D27, (B) cepa D27/C6

El sistema de incubación fue el descrito en Materiales y Métodos empleando los siguientes buffers de incubación: (O) fosfato de sodio 50 mM, (□) Tris-HCl 50 mM, (●) glicina-NaOH 50 mM.

II.6. EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO. ESTUDIOS CINETICOS

Existen numerosos trabajos donde se ha descrito que la PBG-Deaminasa de muy diversas fuentes se comporta como una enzima típicamente michaeliana (Sancovich y col., 1969 a, b; Frydman y Frydman, 1970; Llambías y col., 1971; Jordan y Shemin, 1973; Frydman y Feinstein, 1974; Williams y col., 1981; Kotler y col., 1987 a; Smythe y Williams, 1988).

Cuando se investigó el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la PBG-Deaminasa de *S. cerevisiae* (Figura II.6.), se encontró que también exhibe un comportamiento clásico de Michaelis-Menten con curvas de saturación hiperbólicas, gráficos de dobles recíprocas lineales y n de Hill de 1. Los valores de K_m se estimaron a partir de los gráficos de Lineweaver-Burk (Figura II.6., Inset) y son $19 \mu M$ y $17 \mu M$ para las cepas D27 y D27/C6 respectivamente; valores muy similares a los ya reportados para la misma enzima de otras fuentes (Jordan y Shemin, 1973; Hart y col., 1986; Kotler y col., 1987 a; Jordan y col., 1988 a). Estos hallazgos están de acuerdo con la hipótesis de Seehra y Jordan (1980), quienes postularon la existencia de un sólo sitio catalítico en la enzima, al cual se unen consecutivamente cuatro moléculas de PBG formando los intermediarios mono-, di-, tri- y tetrapirrólicos. Asimismo, Williams y col. (1981) demostraron que la velocidad presenta una dependencia hiperbólica con la concentración de sustrato, a pesar de que se esperaba una ecuación de velocidades iniciales más compleja por tratarse de una enzima que utiliza cuatro moléculas del mismo sustrato. El comportamiento michaeliano, observado para la PBG-Deaminasa, se explica al considerar un mecanismo secuencial de desplazamiento con liberación de una molécula de amonio antes de la unión de la siguiente molécula de sustrato (Elliot y Tipton, 1974).

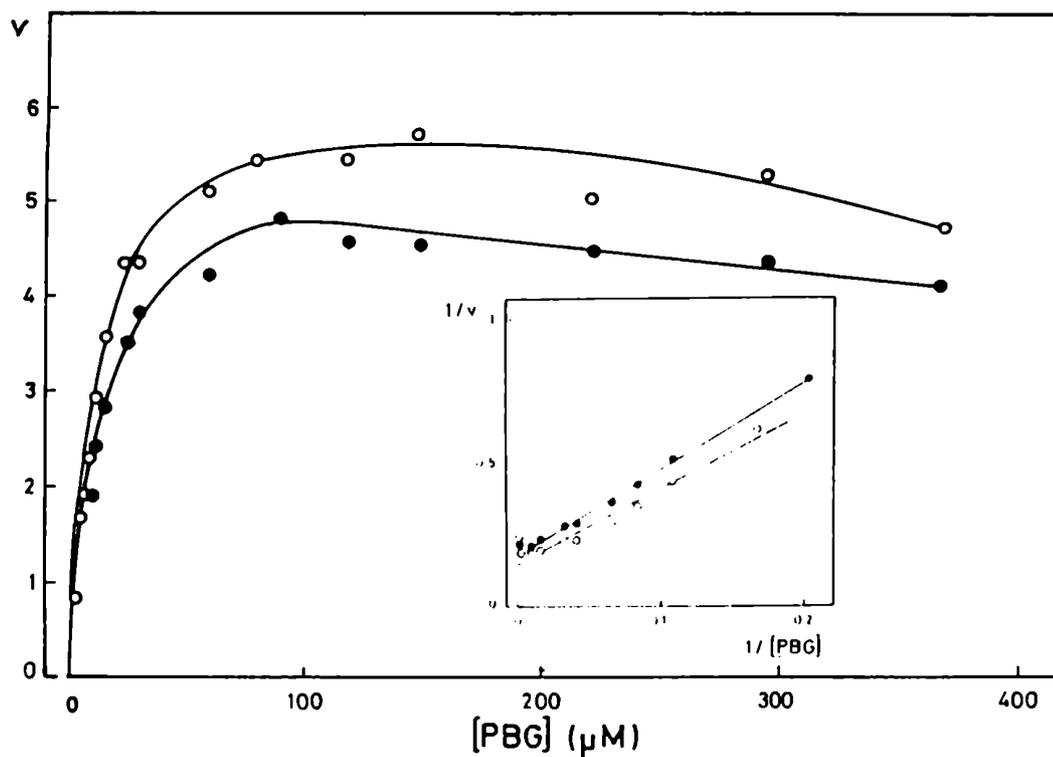


FIGURA II.6.: Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de formación de porfirinas. Inset: representación de Lineweaver-Burk para la velocidad de formación de porfirinas a distintas concentraciones de sustrato. (○) Cepa D27, (●) cepa D27/C6. El sistema de incubación y la metodología fueron los descritos en Materiales y Métodos.

CAPITULO III

PURIFICACION DE LA PBG-DEAMINASA DE *S. cerevisiae*

	Página
III.1. Ensayos preliminares	96
III.2. Purificación parcial de la PBG-Deaminasa	100
III.3. Formas enzimáticas de la PBG-Deaminasa detectadas mediante filtración por gel	105
III.4. Correlación entre el comportamiento cromatográfico y la presencia de la mutación HEM R ⁺	113
III.5. Determinación del peso molecular	116

III. PURIFICACION DE LA PBG-DEAMINASA DE *S. cerevisiae*

III.1. ENSAYOS PRELIMINARES

En primer término, se investigó el efecto de la temperatura y del tiempo de calentamiento sobre la actividad enzimática en ambas cepas. El tratamiento por calor es uno de los procedimientos más frecuentemente utilizados para la purificación de la PBG-Deaminasa porque permite separar la Cosintetasa que es una proteína termolábil. Hay que tener en cuenta que en estas cepas la Cosintetasa se inactiva ya en la etapa de ruptura de las células.

La fracción citosólica (S) se calentó, en baños de agua con agitación constante, a distintas temperaturas durante períodos de tiempo variables, como se ilustra en las Figuras III.1. y III.2. Al cabo de cada período de calentamiento se enfrió inmediatamente la preparación en baño de hielo, se centrifugó a 23.000 x g durante 20 minutos para separar la proteína desnaturalizada y se determinó actividad enzimática en los sobrenadantes.

Para ambas cepas se observa que las proteínas totales disminuyen al aumentar la temperatura y el descenso más importante se produce a los 5 minutos.

En la cepa *D27* (Figura III.1.), el calentamiento a 50 °C provoca un incremento importante en la actividad específica (60 - 70 %) ya que si bien no hay un aumento en la formación de porfirinas, las proteínas disminuyen marcadamente. Con esta sola excepción, las porfirinas disminuyen paulatinamente a las demás temperaturas y tiempos ensayados. El aumento de actividad específica que se produce a 55 °C es el resultado de la marcada disminución de las proteínas totales.

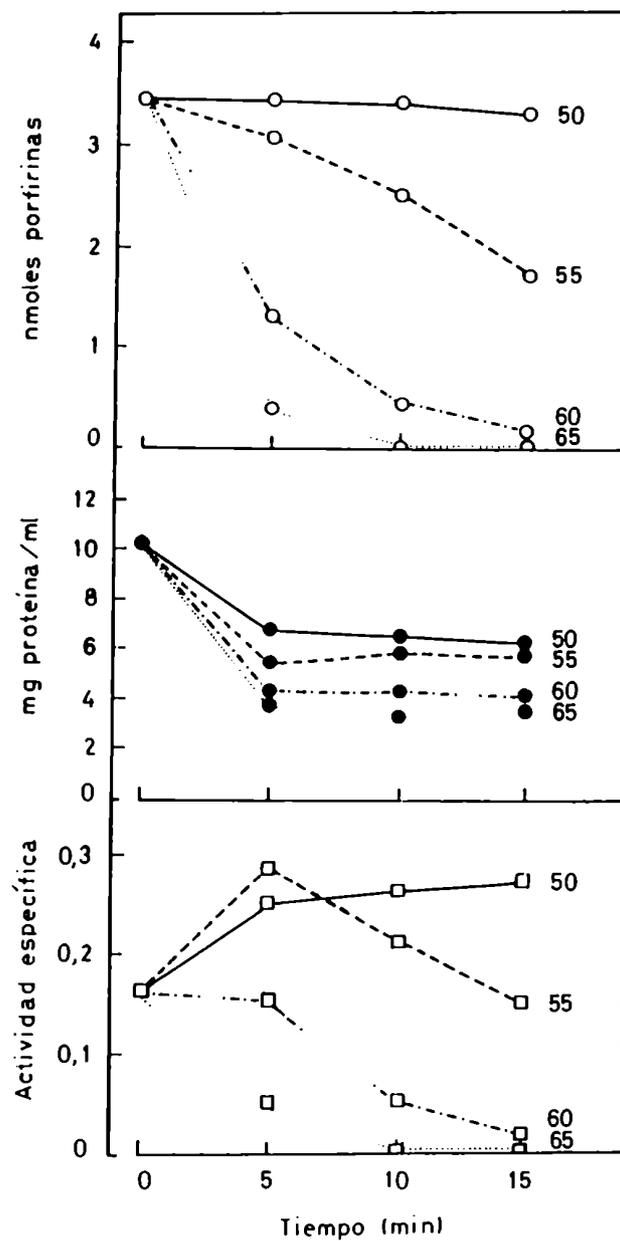


FIGURA III.1.: Efecto de la temperatura y del tiempo de calentamiento sobre la PBG-Deaminasa de la cepa 027. Las determinaciones se llevaron a cabo en sobrenadantes previamente calentados como se detalla en el texto.

En la cepa *D27/C6* (Figura III.2.), el calentamiento tiene un efecto diferente sobre la actividad de PBG-Deaminasa. Se observa una activación importante al calentar durante 5 y 10 minutos a 50 °C y durante 5 minutos a 55 °C (40 %, 90 % y 100 % respectivamente). Para el resto de las temperaturas y tiempos estudiados, el aumento que se encuentra en la actividad específica es nuevamente producto de una pérdida en las proteínas totales.

Además, si bien los perfiles de las curvas son similares para las dos cepas, las pendientes son más suaves para la mutante, sugiriendo que ésta tiene una mayor resistencia frente al calentamiento que la cepa *D27*.

Por lo tanto, el tratamiento por calor durante 5 minutos a 55 °C es el óptimo, ya que en este punto la actividad específica aumenta entre 2 y 3 veces sin pérdida importante de unidades enzimáticas.

Se debe destacar la relativa inestabilidad frente al calor de la PBG-Deaminasa de levadura así como también el hecho de que sólo para la cepa *D27/C6* se observa la típica activación de la enzima por calentamiento (Lockwood y Benson, 1960; Sancovich y col., 1969 a, 1976; Frydman y Frydman, 1970; Llambías y Battle, 1971 a; Jordan y Shemin, 1973; Williams y col., 1981; Fumagalli y col., 1985; Kotler y col., 1987 a).

Además, se decidió establecer el rango óptimo de saturación con sulfato de amonio. Para ello se realizaron precipitaciones dentro de los rangos 0-30, 30-45, 45-60, 60-75 y 75-90 % de dicha sal (Tablas III.1 y III.2). Se encontró que prácticamente el total de la proteína con actividad de PBG-Deaminasa se concentra en la fracción 45-60 %, tanto para la cepa normal como para la mutante, lográndose una purificación de aproximadamente 4-5 veces.

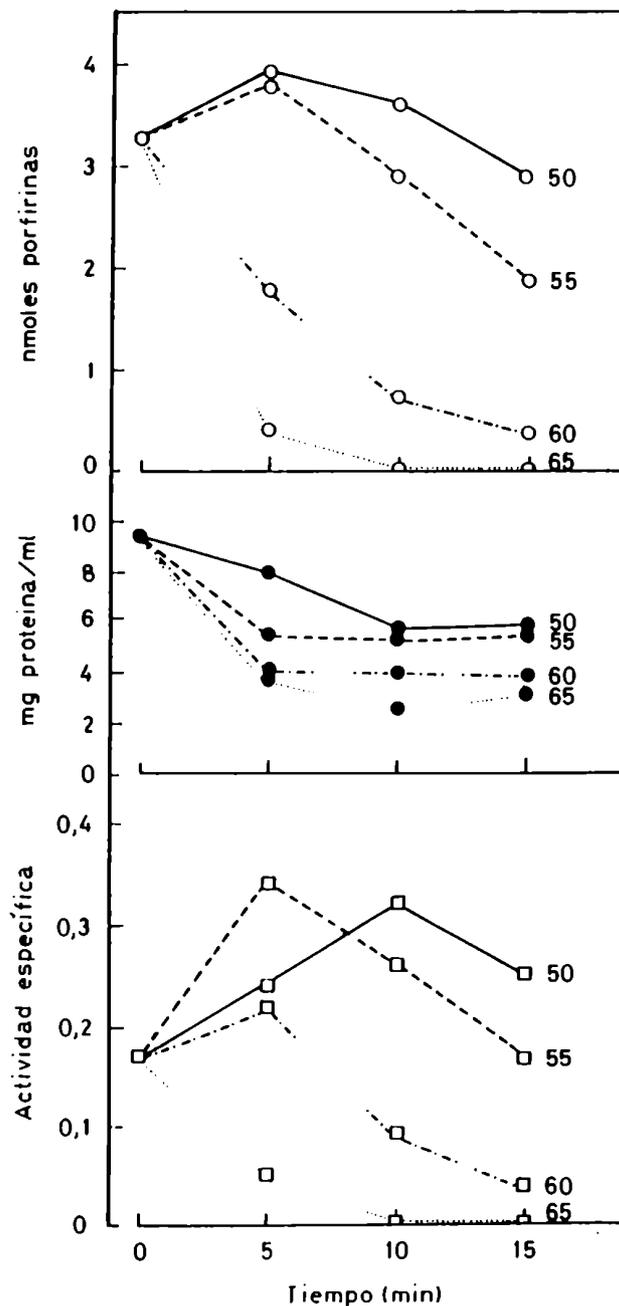


FIGURA III.2.: Efecto de la temperatura y del tiempo de calentamiento sobre la PBG-Deaminasa de la cepa *D27/C6*. Las determinaciones se llevaron a cabo en sobrenadantes previamente calentados como se detalla en el texto.

TABLA III.1.: Fraccionamiento con sulfato de amonio en la cepa D27.

FRACCION	nmoles PORF. TOTALES	mg PROT/ml	ACTIVIDAD ESPECIFICA
S ₀	6,77	1,83	1,84
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)			
0-30	0,13	0,05	1,25
30-45	1,61	0,80	1,00
45-60	39,88	4,04	4,94
60-75	2,99	5,87	0,26
75-90	0,12	0,55	0,11

El S₀ es el sobrenadante (S) obtenido como se indica en Materiales y Métodos, calentado a 55 °C durante 5 minutos. Sobre el mismo se realizaron las sucesivas precipitaciones con sulfato de amonio.

III.2. PURIFICACION PARCIAL DE LA PBG-DEAMINASA

Para el aislamiento y la purificación de la PBG-Deaminasa de las cepas D27 y D27/C6 se siguió una metodología sencilla.

Los pasos empleados para purificar esta enzima de dichas cepas de levadura (Tablas III.3. y III.4.) se describen a continuación. A menos que se indique lo contrario, todas las etapas de la purificación se realizaron a 4 °C.

TABLA III.2.: Fraccionamiento con sulfato de amonio en la cepa D27/C6

FRACCION	nmoles PORF. TOTALES	mg PROT/ml	ACTIVIDAD ESPECIFICA
S ₀	4,76	1,72	1,38
(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)			
0-30	0,26	0,05	2,61
30-45	1,17	0,54	1,08
45-60	38,99	3,50	5,57
60-75	2,81	5,76	0,24
75-90	0,09	0,30	0,15

El S₀ es el sobrenadante (S) obtenido como se indica en Materiales y Métodos y calentado a 55 °C durante 5 minutos. Sobre el mismo se realizaron las sucesivas precipitaciones con sulfato de amonio.

- Etapa 1: Sobrenadante citosólico (S): Se obtuvo por centrifugación del homogenato (H) a 23.000 x g durante 20 minutos. Dicha fracción H proviene de la sonicación de las células suspendidas en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 en presencia de arena (1:2:3, g peso húmedo de células:ml de buffer:g de arena). Esta centrifugación diferencial constituye ya un paso de purificación donde se separa un precipitado formado por células sin romper, fragmentos de pared y membranas celulares, mitocondrias, lisosomas, peroxisomas.

TABLA III.3.: Cuadro de purificación de la PBG-Deaminasa de la cepa D27

ETAPA	FRACCION	ACTIVIDAD ESPECIFICA	UNIDADES TOTALES	PURIFICACION PARCIAL	PURIFICACION TOTAL
1	S	0,42	237	1	1
2	S ₀	1,12	275	2,7	2,7
3	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%) 45-60	6,76	187	6,0	16,1
4	Sephadex				
	Banda I (Ve=100 ml)	32,8	31	4,9	78,2
	Banda II (Ve=120 ml)	30,7	25	4,1	81,5

Las distintas fracciones se obtuvieron como se indica en el texto. El sistema y las condiciones de incubación, así como la metodología empleada, fueron los detallados en Materiales y Métodos. La actividad específica se expresa como nmoles por firinas/mg proteína.

- Etapa 2: Calentamiento: El sobrenadante (S) se calentó a 55 °C durante 5 minutos con agitación constante. Luego de este período, se enfrió inmediatamente en baño de hielo y se centrifugó a 23.000 x g 20 minutos para eliminar las proteínas precipitadas, obteniendo un sobrenadante con actividad de PBG-Deaminasa (S₀).
- Etapa 3: Fraccionamiento salino: Con el objeto de concentrar la preparación enzimática proveniente de la etapa anterior,

se realizó un fraccionamiento con sulfato de amonio sólido, reuniendo las proteínas precipitadas entre 45 - 60 % de saturación, que contienen toda la actividad enzimática. La fracción así obtenida se puede guardar entre 30 y 40 días a -20 °C sin pérdida de actividad.

TABLA III.4.: Cuadro de purificación de la PBG-Deaminasa de la cepa D27/C6

ETAFA	FRACCION	ACTIVIDAD ESPECIFICA	UNIDADES TOTALES	PURIFICACION PARCIAL	PURIFICACION TOTAL
1	S	0,47	137	1	1
2	S ₀	1,80	126	4,3	4,3
3	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%) 45-60	9,87	64	5,5	21,0
4	Sephadex (Ve=104 ml)	15,60	19	1,6	33,2

Las distintas fracciones se obtuvieron como se indica en el texto. El sistema y las condiciones de incubación, así como la metodología empleada, fueron los detallados en Materiales y Métodos. La actividad específica se expresa como nmoles por firinas/mg proteína.

- Etapa 4: El precipitado salino se disolvió en un pequeño volumen de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 y se sembró en una columna de Sephadex G-100 (1,7 x 80 cm), previamente equilibrada

con el mismo buffer. Para la elución de las proteínas también se empleó el buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 y la velocidad de flujo fue de 18 ml/hora.

De los datos presentados en las Tablas III.3 y III.4 para las cepas *D27* y *D27/C6* respectivamente, se concluye que el fraccionamiento salino produce la mayor purificación de la PBG-Deaminasa en ambas cepas. Por otra parte, el pasaje por Sephadex G-100 produce una purificación parcial de 5 veces para la enzima de la cepa normal y de 1,6 veces para la de la cepa mutante. Los valores alcanzados de purificación parcial con este tipo de columnas no difiere marcadamente de los hallados por otros autores (Frydman y Feinstein, 1974; Anderson y Desnick, 1980; Fumagalli y col., 1985; Kotler y col., 1987 a).

La PBG-Deaminasa de la cepa *D27* fue purificada aproximadamente 80 veces con una actividad específica de 33 unidades/mg de proteína y un rendimiento del 25 %. En cambio, la purificación de la enzima de la cepa *D27/C6* fue de sólo 30 veces con una actividad específica de 16 unidades/mg de proteína y un rendimiento del 15 %.

Los valores de actividad específica y el grado de pureza alcanzados para la PBG-Deaminasa de *S. cerevisiae* son menores que los logrados por otros autores para la misma enzima de otras fuentes (Davies y Neuberger, 1973; Jordan y Shemin, 1973; Anderson y Desnick, 1980; Williams y col., 1981; Brown y col., 1984; Fumagalli y col., 1985; Hart y col., 1986; Jordan y col., 1988; Smythe y Williams, 1988) pero debe destacarse que este es el primer trabajo de purificación de esta enzima en levaduras. De hecho, hasta el presente su actividad sólo ha sido determinada en extractos celulares crudos (Gollub y col., 1977; Labbe-Bois y col., 1986) y los valores hallados han sido siempre muy bajos en comparación con los encontrados en otros tejidos. Incluso esto ha llevado a postular un posible rol regulatorio para la PBG-Deaminasa en levaduras (Labbe-Bois y col.,

1986) o bien una probable inactivación producida durante la ruptura celular (Rytka y col., 1984).

Las Figuras III.3. y III.8. muestran los perfiles de elución de la columna de Sephadex G-100 de la PBG-Deaminasa de las cepas *D27* y *D27/C6* respectivamente.

III.3. FORMAS ENZIMATICAS DE LA PBG-DEAMINASA DETECTADAS MEDIANTE FILTRACION POR GEL

En las Figuras III.3, III.4, III.5 y III.6. se ilustra un comportamiento muy llamativo de la enzima de la cepa *D27*. Se seleccionaron 4 pasajes a través de la columna de Sephadex G-100 en los cuales se observa que en algunos casos aparecen dos picos con actividad enzimática (A y B) y en otros uno solo (A ó B). Se determinaron sus pesos moleculares empleando una columna de Sephadex G-100 previamente calibrada con proteínas patrones. Al pico A le corresponde un PM de 30 ± 3 KDa y al B un PM de 20 ± 2 KDa. Es importante tener en cuenta que los valores de porfirinas formados obtenidos en cada uno de los pasajes no son comparables ya que no siempre se sembró la misma cantidad de proteína.

Para tratar de explicar las causas que pueden haber dado lugar a la obtención de estos diferentes perfiles cromatográficos, debe considerarse que, a pesar de tratar de reproducirse exactamente las condiciones experimentales en todos los ensayos realizados, podrían haber ocurrido algunas ligeras modificaciones, tales como el tiempo transcurrido entre la cosecha y el procesamiento de las células, el tiempo necesario para alcanzar la temperatura de calentamiento o para llevar a 4°C la preparación. Con relación a estos hallazgos, notemos que Miyagi y col. (1979) trabajando con la PBG-Deaminasa de eritrocitos humanos, también observaron la ocasional presencia de dos formas enzimáticas diferentes por cromatografía en DEAE-Sephadex A-50, una

de las cuales estaba ausente en algunos casos. Estos autores atribuyeron este fenómeno a que en ciertos casos los eritrocitos habían sido almacenados durante mucho más tiempo que en otros.

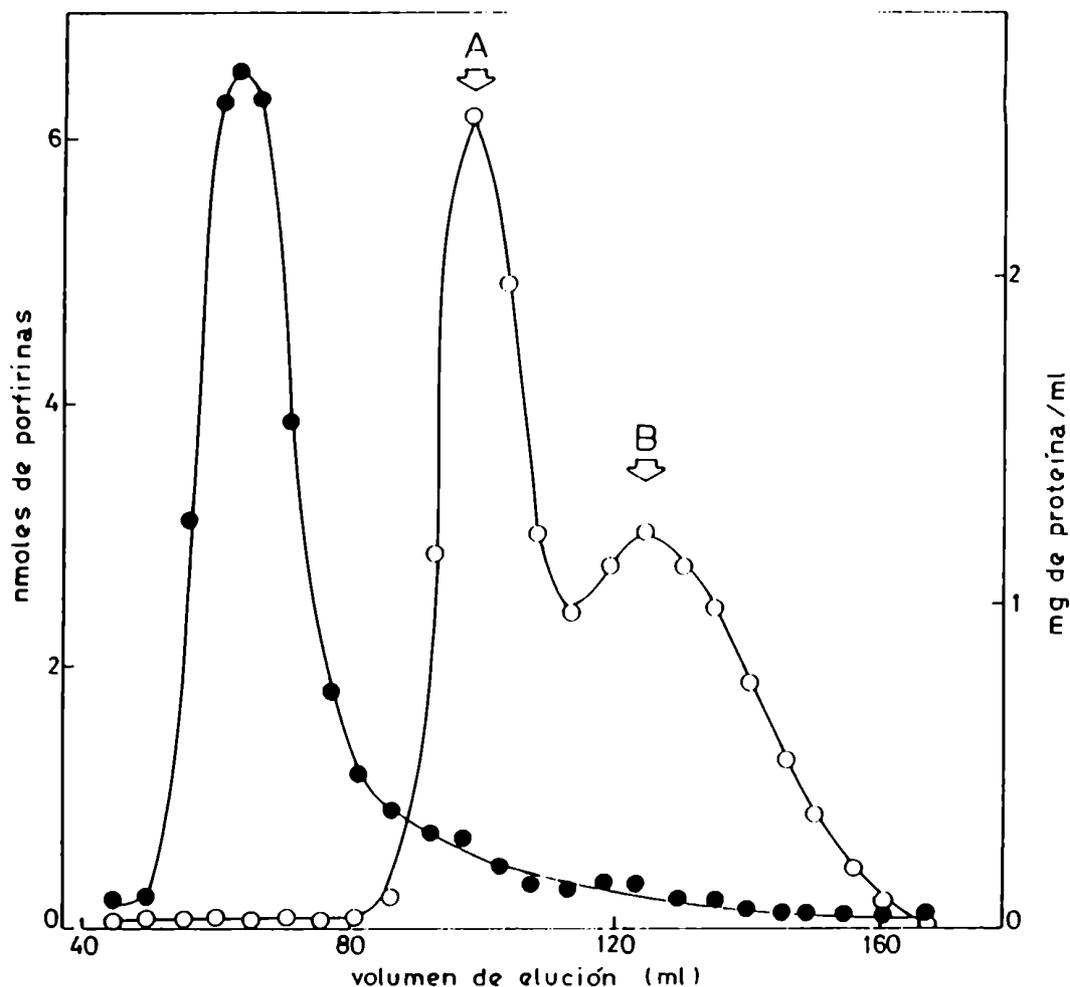


FIGURA III.3.: Perfil de elución de la PBG-Deaminasa de la cepa *D27* en Sephadex G-100. (O) nmoles porfirinas formadas; (●) mg proteína/ml. Se sembró la fracción 45 - 60 % proveniente del fraccionamiento con sulfato de amonio. Las condiciones de incubación fueron las descritas en Materiales y Métodos. Se recogieron fracciones de aproximadamente 3 ml.

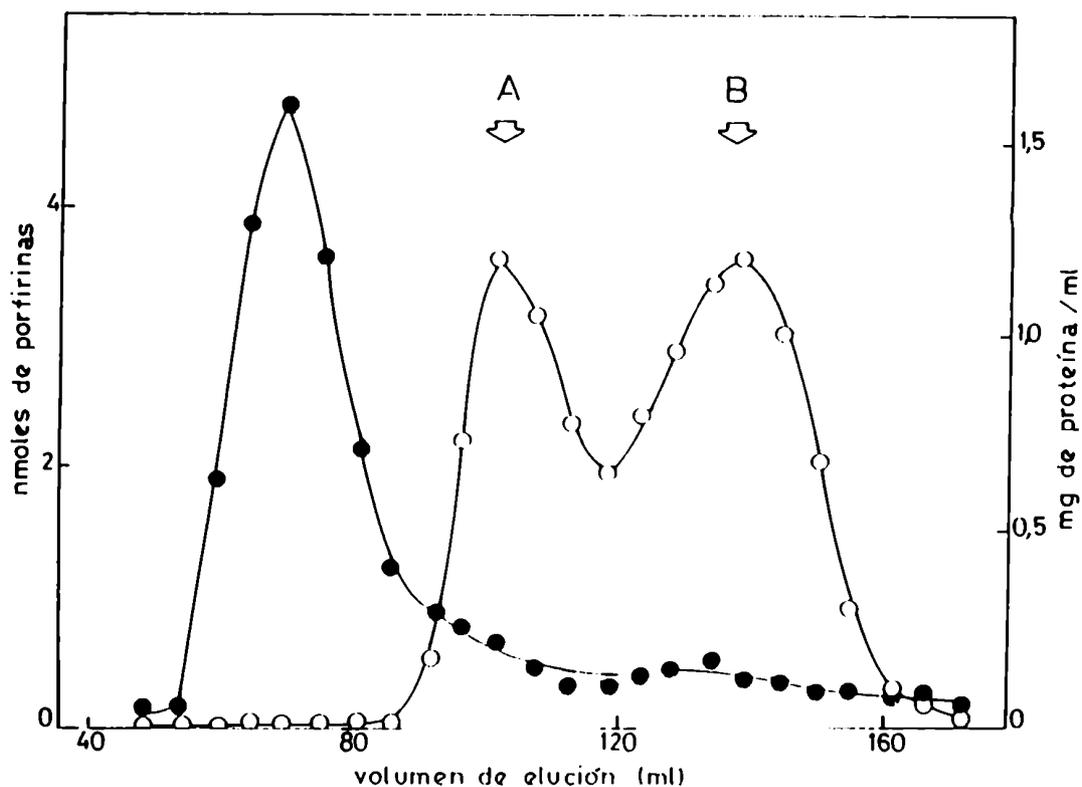


FIGURA III.4.: Perfil de elución de la PBG-Deaminasa de la cepa D27 en Sephadex G-100. (○) nmoles porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml. Se sembró la fracción 45 - 60 % proveniente del fraccionamiento con sulfato de amonio. Las condiciones de incubación fueron las descritas en Materiales y Métodos. Se recogieron fracciones de aproximadamente 3 ml.

Estos resultados podrían indicar que, o bien la PBG-Deaminasa de la cepa D27 existe en dos formas enzimáticas activas o que, simplemente la presencia ocasional de dos picos de actividad es el producto de la acción de proteasas durante la extracción de la enzima. Así, pequeñas variaciones en las condiciones experimentales podrían ser las responsables de una

acción diferencial de las proteasas en las distintas etapas de la purificación de la PBG-Deaminasa. Esto es muy factible ya que las células de levadura son ricas en proteasas (Schwencke, 1989).

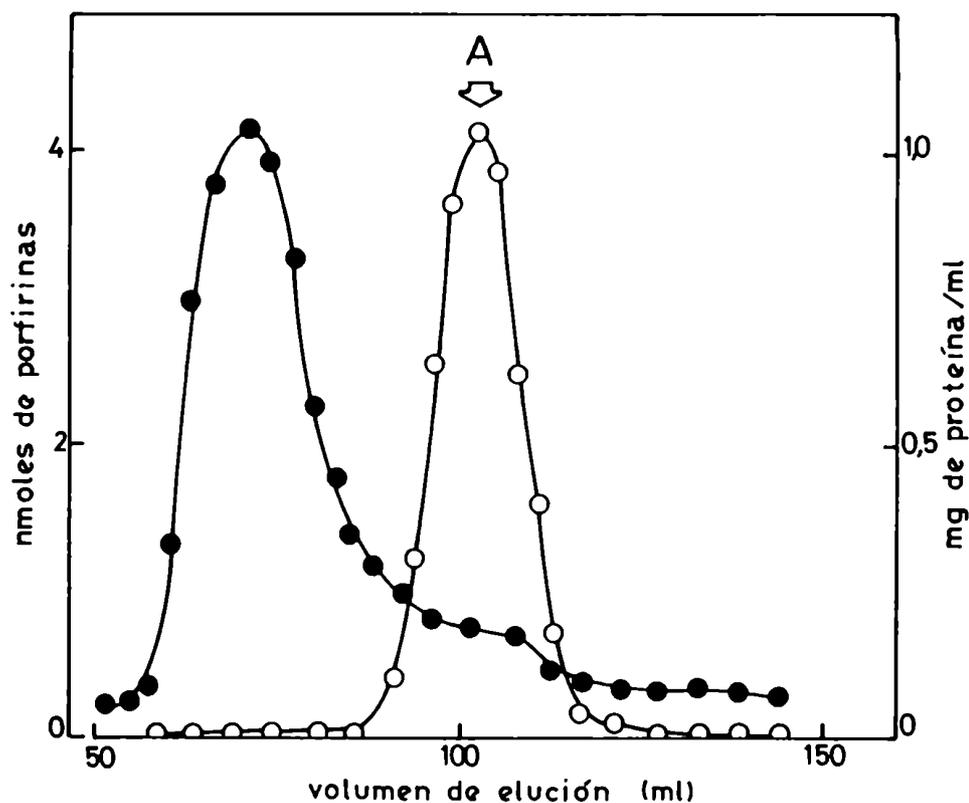


FIGURA III.5.: Perfil de elución de la PBG-Deaminasa de la cepa D27 en Sephadex G-100. (O) nmoles porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml. Se sembró la fracción 45 - 60 % proveniente del fraccionamiento con sulfato de amonio. Las condiciones de incubación fueron las descritas en Materiales y Métodos. Se recogieron fracciones de aproximadamente 3 ml.

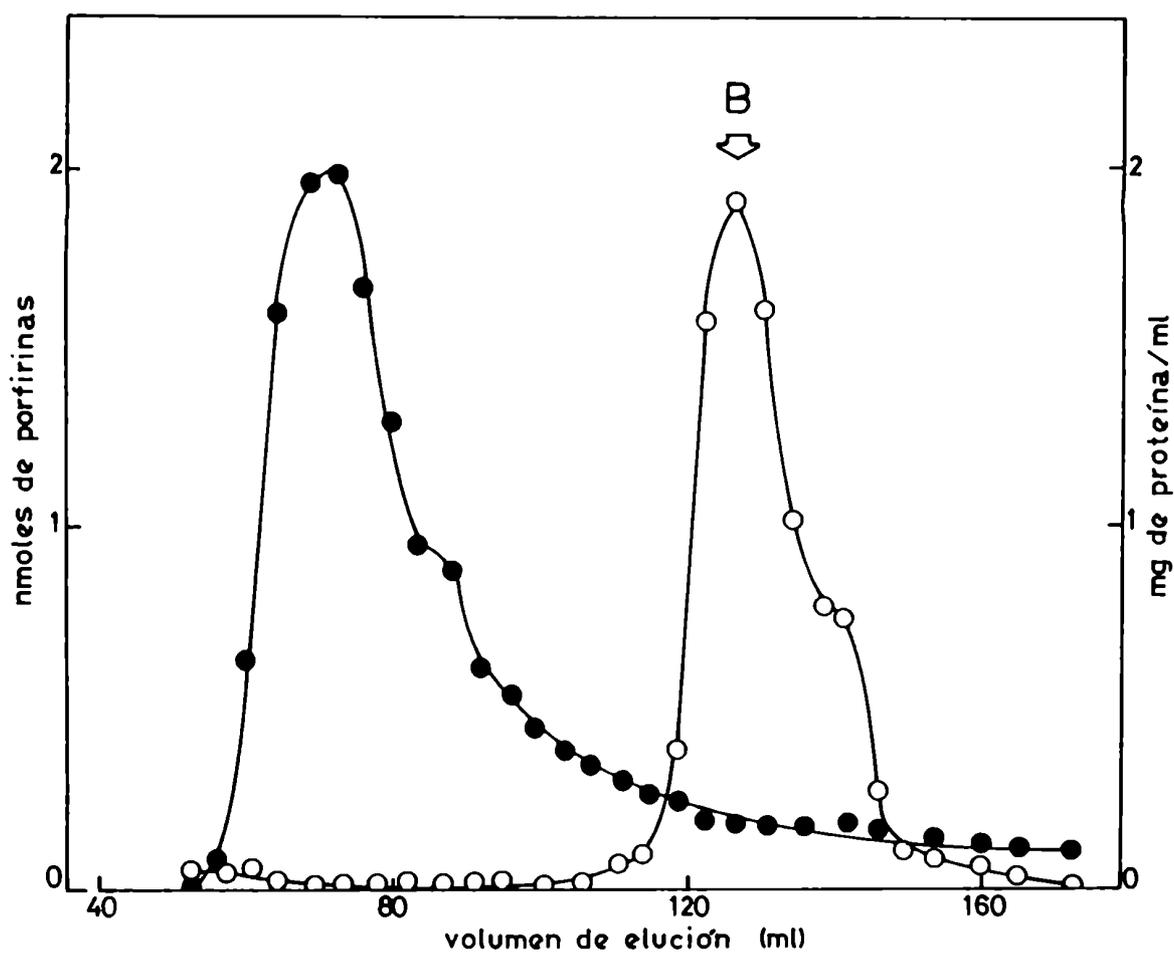


FIGURA III.6.: Perfil de elución de la PBG-Deaminasa de la cepa *D27* en Sephadex G-100.

(○) nmoles porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml
 Se sembró la fracción 45 - 60 % proveniente del fraccionamiento con sulfato de amonio. Las condiciones de incubación fueron las descritas en Materiales y Métodos. Se recogieron fracciones de aproximadamente 3 ml.

Por lo tanto, se decidió estudiar el comportamiento de la PBG-Deaminasa de la cepa *D27* extraída y purificada en

presencia de un conocido inhibidor de proteasas, el fenilmetil sulfonilfluoruro (PMSF). Se siguieron los pasos de purificación ya descritos, agregándose PMSF 1 mM al buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 que se usó para resuspender las células durante su ruptura. También se añadió PMSF 0,5 mM al sobrenadante obtenido después del calentamiento, y PMSF 1 mM al buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 usado para disolver el precipitado de sulfato de amonio 45 - 60 % que se aplicó en la columna de Sephadex G-100 previamente equilibrada con el mismo buffer conteniendo PMSF 0,1 mM.

En la Figura III.7. se observa, que en estas condiciones, se obtuvo siempre un único pico activo de PM 30 ± 3 KDa. Estos resultados indicarían que la PBG-Deaminasa de la cepa normal existe como una única forma molecular, la cual por efecto de las proteasas da lugar a la aparición de una especie activa de menor PM (20 ± 2 KDa). La acción proteolítica no siempre fue uniforme, dependiendo probablemente de ligeras modificaciones no controlables en las condiciones experimentales; por consiguiente la relación entre ambas formas enzimáticas varió de una experiencia a otra.

Se debe destacar que la actividad específica enzimática asociada al pico de PM 30 KDa obtenido en presencia de PMSF es 6 veces más alta que la actividad específica de cualquiera de los picos encontrados en ausencia del inhibidor. Estos hallazgos podrían deberse a que por proteólisis uno o varios fragmentos peptídicos pequeños, esenciales para la actividad máxima, se separan de la enzima. También podría postularse la existencia de una proteína activadora, independiente de la enzima, que aparentemente se comporta como buen sustrato para las proteasas y no expresa su función regulatoria en ausencia de PMSF.

El comportamiento de la PBG-Deaminasa de la cepa mutante *D27/C6* en la columna de Sephadex G-100 fue muy distinto del descrito recién para la cepa normal.

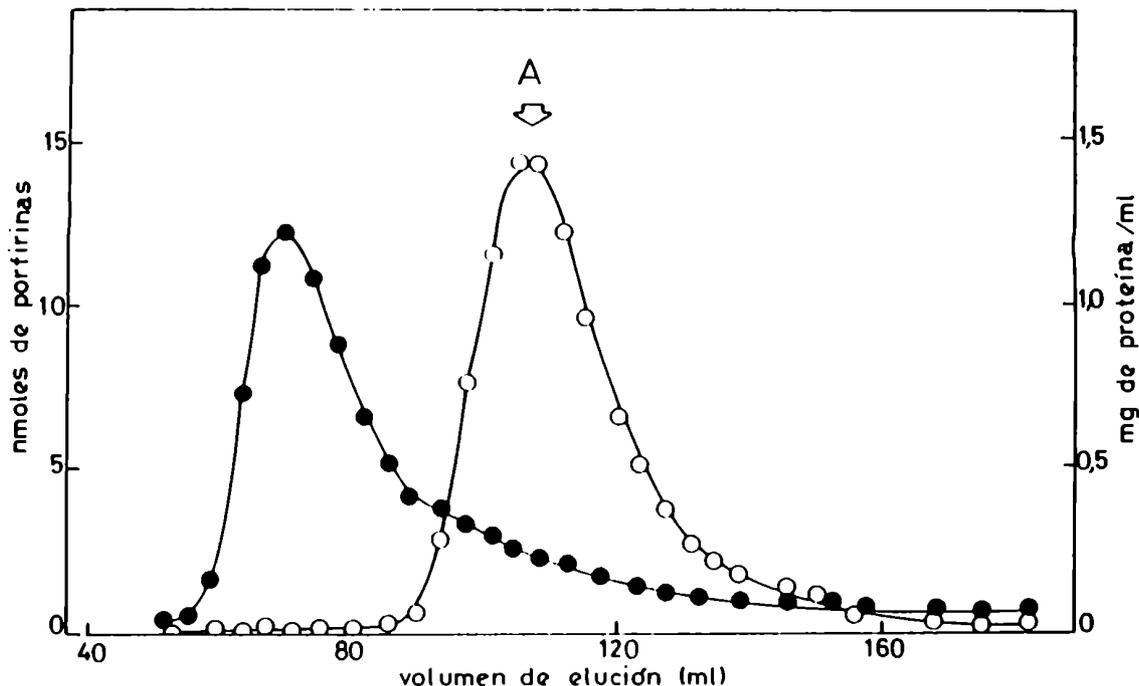


FIGURA III.7.: Perfil de elución de la PBG-Deaminasa de la cepa D27 en Sephadex G-100 en presencia de PMSF.

(O) nmoles porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml

Como se detalla en el texto, el PMSF se incluyó tanto durante la purificación como durante la elución de la enzima. Se sembró la fracción 45 - 60 % proveniente del fraccionamiento con sulfato de amonio. Las condiciones de incubación fueron las descritas en Materiales y Métodos. Se recogieron fracciones de aproximadamente 3 ml.

En las Figuras III.8. y III.9. se ilustran los perfiles de elución obtenidos para la enzima de la cepa D27/C6. Se observa siempre un único pico activo de PM $28 \pm 2,8$ KDa cuando la purificación de la enzima se realizó en ausencia de PMSF (Figura III.8.). Llamativamente, cuando la misma se hizo en presencia del inhibidor, el perfil de elución por Sephadex G-100 muestra dos picos activos, uno de PM 30 KDa y el otro de PM 10 KDa (Figura III.9.).

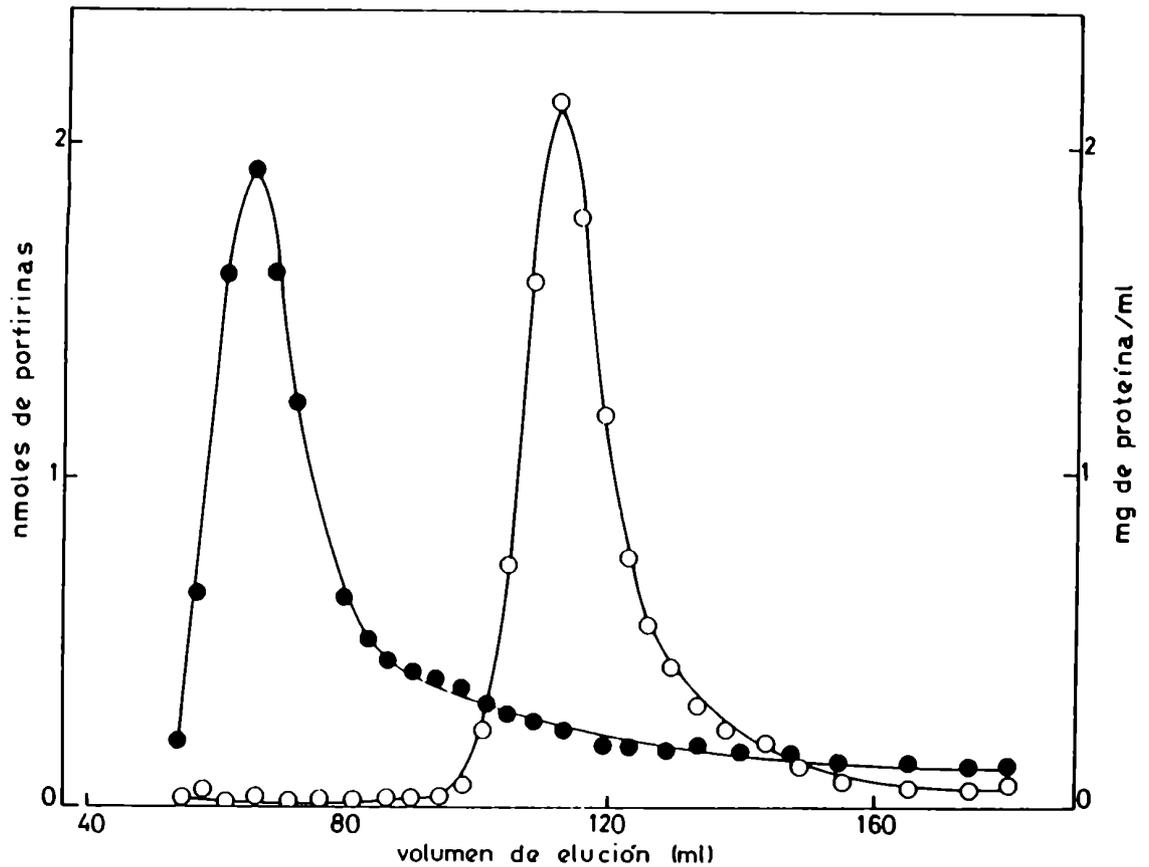


FIGURA III.8.: Perfil de elución de la PBG-Deaminasa de la cepa D27/C6 en Sephadex G-100.

(○) nmoles porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml
 Se sembró la fracción 45 - 60 % proveniente del fraccionamiento con sulfato de amonio. Las condiciones de incubación fueron las descritas en Materiales y Métodos. Se recogieron fracciones de aproximadamente 3 ml.

Según estos resultados, podría ser que la PBG-Deaminasa de la cepa mutante exista en dos formas enzimáticas activas siendo la especie de bajo PM mucho más susceptible a la acción de proteasas.

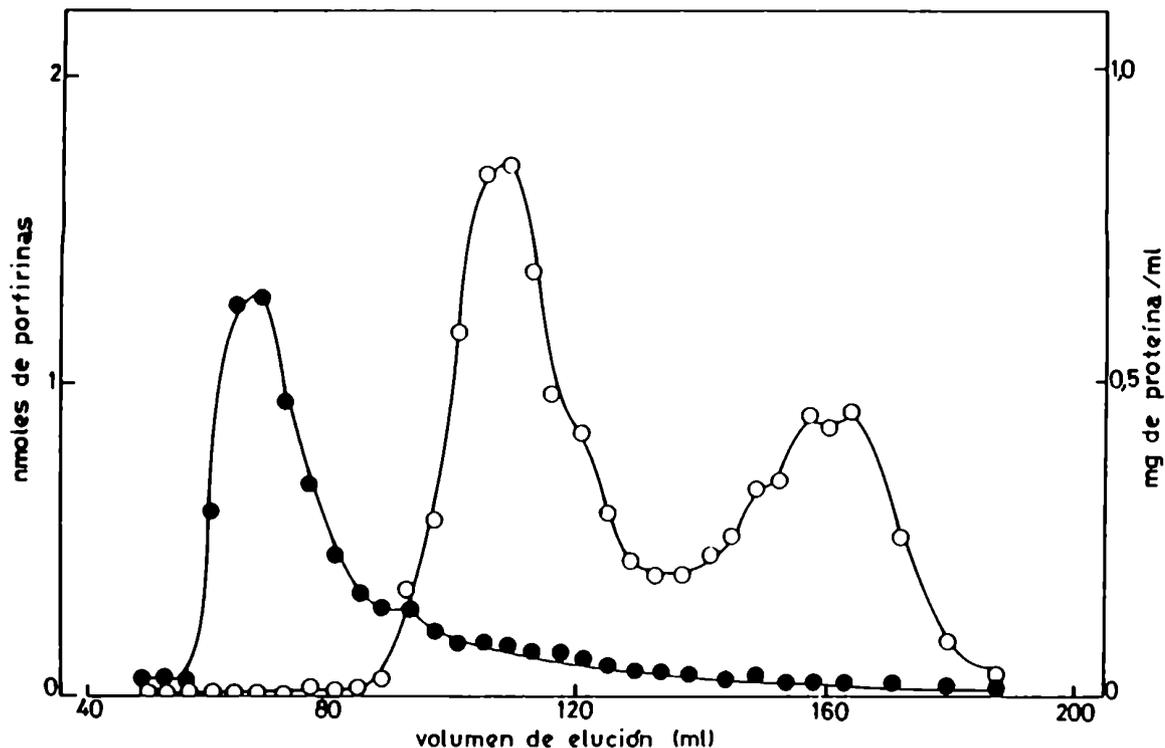


FIGURA III.9.: Perfil de elución de la PBG-Deaminasa de la cepa *D27/C6* en Sephadex G-100 en presencia de PMSF.

(○) nmoles porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml
 Como se detalla en el texto, el PMSF se incluyó tanto durante la purificación como durante la elución de la enzima. Se sembró la fracción 45 - 60 % proveniente del fraccionamiento con sulfato de amonio. Las condiciones de incubación fueron las descritas en Materiales y Métodos. Se recogieron fracciones de aproximadamente 3 ml.

III.4. CORRELACION ENTRE EL COMPORTAMIENTO CROMATOGRAFICO Y LA PRESENCIA DE LA MUTACION HEM R⁺

Para establecer si los perfiles de elución obtenidos en la columna de Sephadex G-100 para la PBG-Deaminasa de las dos cepas en estudio se correlacionan con la presencia de la

mutación HEM R⁺ en la cepa *D27/C6*, se decidió investigar el comportamiento cromatográfico de la enzima en las cepas *DW10-2A* (HEM R⁺) y *DW10-2C*. Estas cepas son dos segregantes de la tetrada *DW10* (tetrada 2) proveniente del "mating" de las cepas *CC14-8C* y *D27/C6*. Se debe tener en cuenta que la cepa *CC14-8C* es isogénica en un 98,4 % con la cepa *D27* y que la cepa *DW10-2A* es portadora de la mutación HEM R⁺.

Por cromatografía en Sephadex G-100, se obtiene un solo pico activo cuando la PBG-Deaminasa de la cepa *DW10-2C* se purificó en ausencia o presencia de PMSF (Figura III.10.); y al igual que en la cepa normal *D27*, en presencia del inhibidor de proteasas, la forma enzimática de PM 20 ± 2 KDa cambia a una forma de PM 30 ± 3 KDa, 3 veces más activa.

Al examinar el comportamiento cromatográfico de la PBG-Deaminasa de la cepa *DW10-2A*, se observa un perfil de elución similar al encontrado para la enzima de la cepa *D27/C6*, aunque la especie de menor PM molecular también aparece en ausencia del inhibidor (Figura III.11.)

Por lo tanto, diferentes formas enzimáticas parecen estar presentes en las cepas *D27* y *D27/C6* y este mismo patrón se repitió en las segregantes *DW10-2C* y *DW10-2A* sugiriendo que el comportamiento observado en la cromatografía por Sephadex G-100 puede correlacionarse con la presencia de la mutación HEM R⁺.

Estos hallazgos no ofrecen una clara explicación que justifique el fenotipo observado en las cepas mutantes HEM R⁺: formación elevada de citocromos cuando las células crecen en un medio con una fuente de carbono no fermentable (ver Materiales y Métodos). Sin embargo, con estos resultados se puso de manifiesto la diferente susceptibilidad a las proteasas de las PBG-Deaminasas de las cepas normales y las mutantes HEM R⁺, siendo la forma enzimática de alto PM de las cepas HEM R⁺ más resistente a su acción. Además, se detectó otra forma activa de

bajo PM para las cepas *D27/C6* y *DW10-2A*.

La combinación de estos hechos acoplados probablemente a un fino mecanismo de regulación podrían, quizás, ser la razón de la síntesis aumentada de citocromos encontrada en las cepas HEM R⁺.

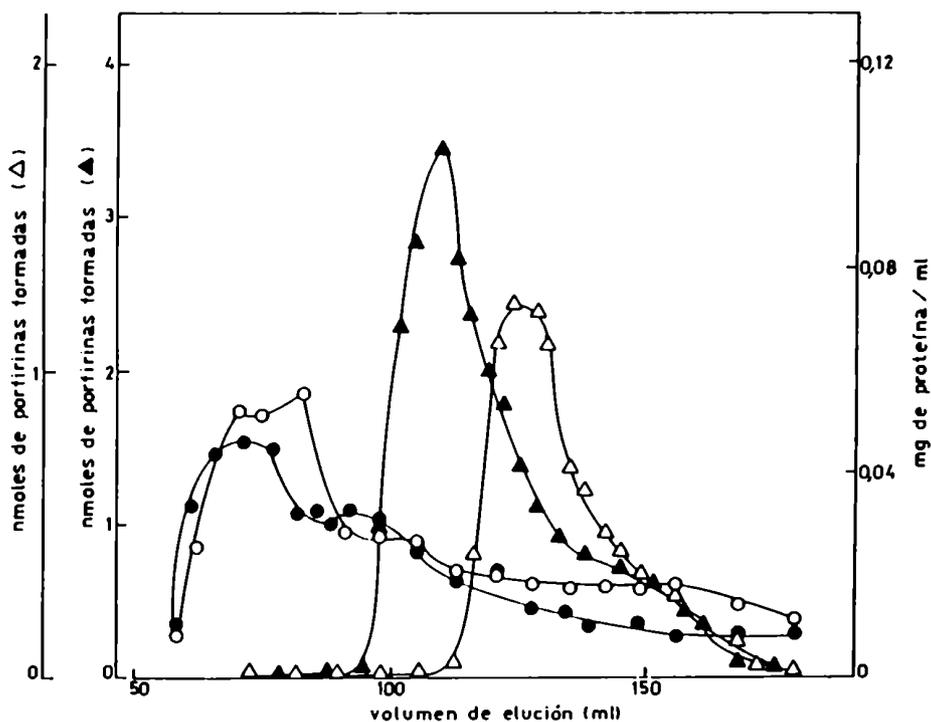


FIGURA III.10.: Perfil de elución de la PBG-Deaminasa de la cepa *DW10-2C* en Sephadex G-100.

(Δ, ▲) nmoles porfirinas formadas,

(O, ●) mg proteína/ml

Se sembró la fracción 45 - 60 % proveniente del fraccionamiento con sulfato de amonio. Las condiciones de incubación fueron las descritas en Materiales y Métodos. Se recogieron fracciones de aproximadamente 3 ml. La enzima se purificó y eluyó en presencia (●, ▲) y en ausencia (O, Δ) de PMSF.

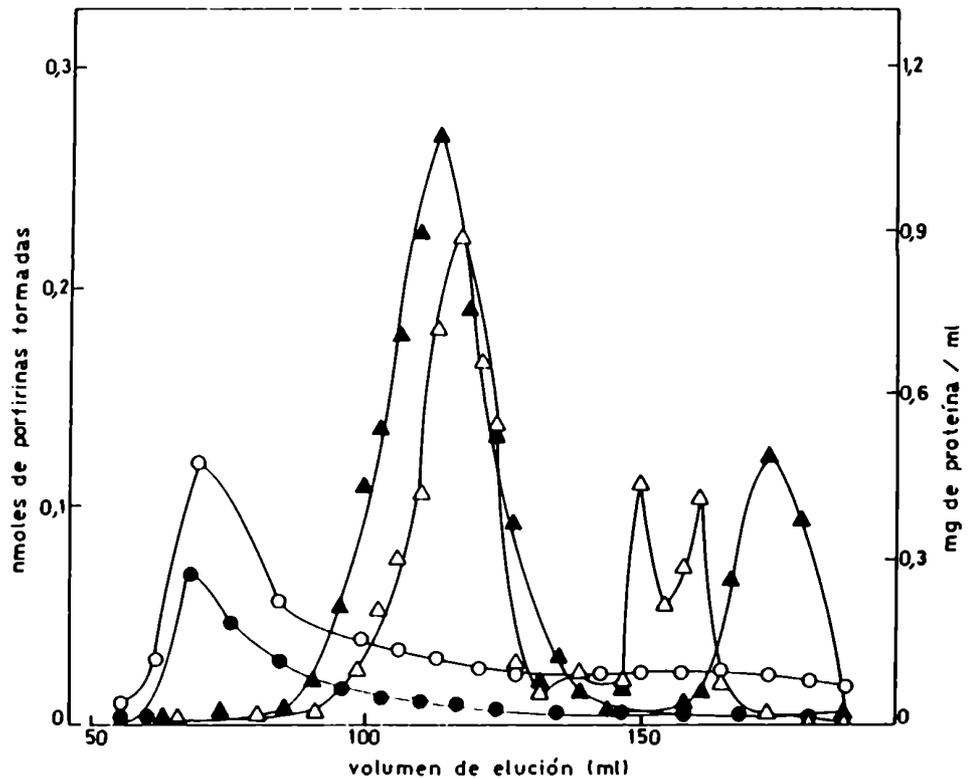


FIGURA III.11.: Perfil de elución de la PBG-Deaminasa de la cepa DW10-2A en Sephadex G-100.

(Δ , \blacktriangle) nmoles porfirinas formadas
(\circ , \bullet) mg proteína/ml

Se sembró la fracción 45 - 60 % proveniente del fraccionamiento con sulfato de amonio. Las condiciones de incubación fueron las descritas en Materiales y Métodos. Se recogieron fracciones de aproximadamente 3 ml. La enzima se purificó y eluyó en presencia (\bullet , \blacktriangle) y en ausencia (\circ , Δ) de PMSF.

III.5. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

Se determinó el PM de la PBG-Deaminasa de las cepas D27 y D27/C6 de *S. cerevisiae* parcialmente purificada en presencia de PMSF empleando una columna de Sephadex G-100 calibrada

con proteínas patrones como se indica en Materiales y Métodos. En las Figuras III.7. y III.9. se muestran los perfiles de elución de la enzima de ambas cepas. Se observa, en ambos casos, un pico de actividad que corresponde a un PM de 30 ± 3 KDa. Este valor es menor al único reportado para la enzima proveniente de la misma fuente (Gellerfors y col., 1986). Estos autores determinaron el PM a partir del análisis del producto codificado por un plásmido que contiene el gen de la PBG-Deaminasa, y sus resultados indicaron que el gen de la enzima codifica para un producto de 43 KDa.

Se ha determinado el PM de la PBG-Deaminasa de diversas fuentes empleando distintos métodos. En *Rhodopseudomonas spheroides* es de 35 KDa por Sephadex G-100 y 39 KDa por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (Jordan y Shemin, 1973); en *E. coli* varía entre 32 y 40 KDa (Hart y col., 1986; Jordan y col., 1988); en *Chlorella regularis* es de 35 KDa (Shioi y col., 1980); en eritrocitos humanos se encuentra en el rango 25 - 44 KDa (Frydman y Feinstein, 1974; Miyagi y col., 1979; Anderson y Desnick, 1980; Brown y col., 1984; Fumagalli y col., 1985; Smythe y Williams, 1988); en *Euglena gracilis* varía entre 20 y 40 KDa (Rossetti y col., 1980, 1989; Williams y col., 1981; Sharif y col., 1989); en hojas de espinaca es de 40 KDa (Higuchi y Bogorad, 1975); en bazo de rata es de 43 KDa (Williams, 1984).

CAPITULO IV

OTRAS PROPIEDADES DE LA PBG-DEAMINASA PARCIALMENTE PURIFICADA

	Página
IV.1. Efecto de cationes	118
IV.1.1. Efecto de cationes monovalentes	118
IV.1.2. Efecto de cationes divalentes	118
IV.2. Efecto de iones amonio y de hidroxilamina	121
IV.3. Efecto de reactivos de grupos tioles y disulfuros	122
IV.4. Efecto del ácido fólico	128
IV.5. Efecto de la sulfamerazina	128

IV. OTRAS PROPIEDADES DE LA PBG-DEAMINASA PARCIALMENTE PURIFICADA

IV.1. EFECTO DE CATIONES

IV.1.1. Efecto de cationes monovalentes

Llambías y Batlle (1971 a) y Sancovich y col. (1976) encontraron que la PBG-Deaminasa de callos de soya y de hígado vacuno se activan en presencia de iones sodio y potasio, respectivamente. Sin embargo, estos cationes no tienen efecto sobre la enzima de eritrocitos de ave, germen de trigo y eritrocitos humanos (Frydman y Frydman, 1970; Llambías y Batlle, 1971 b; Fumagalli y col., 1985).

En la Figura IV.1. se presentan los resultados obtenidos al analizar el efecto de iones sodio (A) y potasio (B) sobre la actividad de la enzima de las cepas D27 y D27/C6. Con ninguna de las concentraciones empleadas (0 - 200 mM) se observa un efecto significativo sobre la PBG-Deaminasa de levaduras.

IV.1.2. Efecto de cationes divalentes

En la Figura IV.2. se muestran los resultados obtenidos al estudiar el efecto de iones magnesio sobre la PBG-Deaminasa de las dos cepas en estudio. Se observa, en ambas cepas, que bajas concentraciones de magnesio (2,5 mM) producen una ligera pero reproducible activación de la enzima (20 %), mientras que concentraciones mayores (100 mM) la inhiben significativamente (50 - 60 %).

Estos resultados son similares a los encontrados para la PBG-Deaminasa de otras fuentes (Frydman y Frydman, 1970; Llambías y Batlle, 1971 b; Sancovich y col., 1976; Anderson y Desnick, 1980; Fumagalli y col., 1985; Kotler y col., 1987 b).

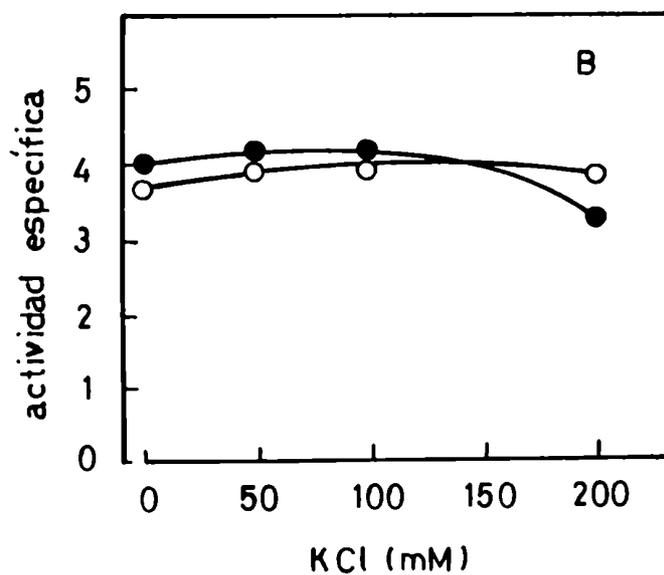
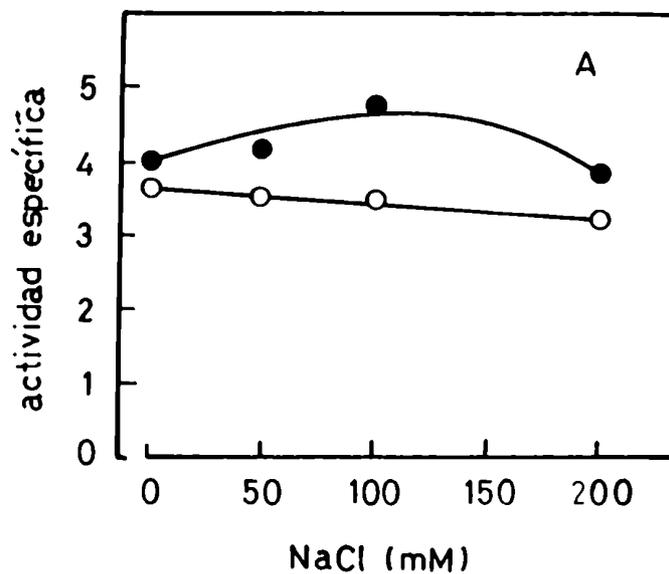


FIGURA IV.1.: Efecto de iones sodio (A) y potasio (B) sobre la actividad de PBG-Deaminasa.

(○) Cepa D27, (●) cepa D27/C6
 Se empleó una preparación enzimática purificada entre 16 y 20 veces. El sistema de incubación y la metodología utilizados fueron los descritos en Materiales y Métodos.

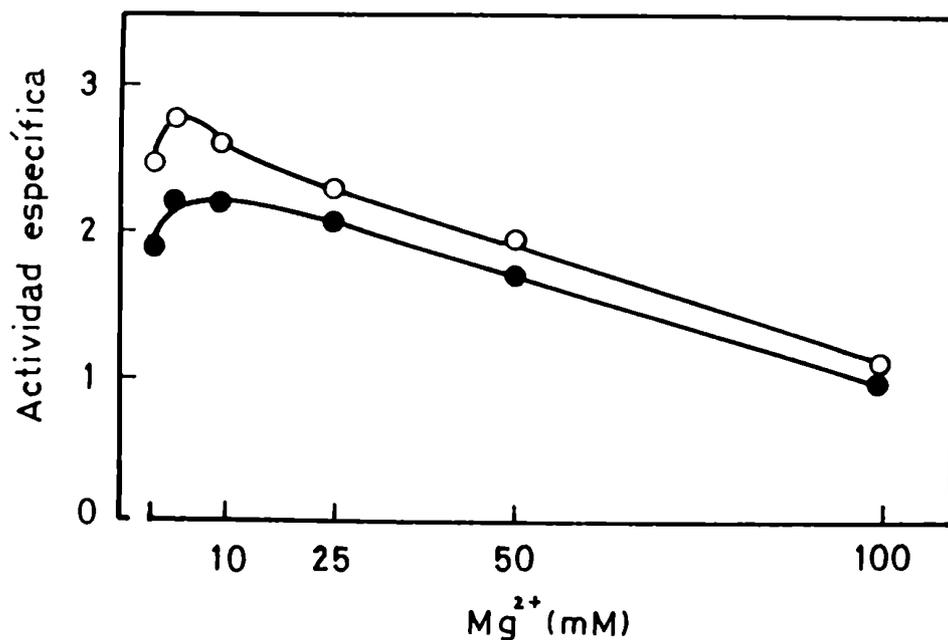


FIGURA IV.2.: Efecto de iones magnesio sobre la actividad de PBG-Deaminasa.

(○) Cepa D27, (●) cepa D27/C6

Se empleó una preparación purificada entre 16 y 20 veces. El sistema de incubación y la metodología fueron los detallados en Materiales y Métodos.

También se investigó la acción de otros cationes sobre la enzima de levaduras. En la Tabla IV.1. se muestra que mercurio (II), plomo (II) y cadmio (II) inhiben completamente la actividad enzimática como ya se ha reportado (Llambías y Battle, 1971 b; Jordan y Shemin, 1973; Sancovich y col., 1976; Anderson y Desnick, 1980; Fumagalli y col., 1985). Esta inhibición es debida, probablemente, a la interacción entre el ion metálico y grupos tiólicos esenciales de la enzima, como se comprueba al lograr la reversión de los efectos del plomo (II) y mercurio (II) con el agregado de cisteína 5 mM.

TABLA IV.1.: Efecto de metales divalentes sobre la actividad de PBG-Deaminasa

INHIBIDOR	CONCENTRACION (mM)	CISTEINA (5 mM)	ACTIVIDAD (%)			
			Porfirinas formadas		PBG consumido	
			D27	D27/C6	D27	D27/C6
HgCl ₂	1		0	0	15	5
	0,2	-	1	0	20	20
	0,2	+	85	80	90	90
CdCl ₂	1		0	0	10	10
	0,2		5	1	20	20
PbCl ₂	0,2	-	1	10	10	20
	0,2	+	85	90	90	95

Se usó como fuente de enzima una preparación purificada 16 - 20 veces. La cisteína se agregó 20 minutos después de que la enzima se preincubó con el inhibidor y el sustrato. Se emplearon los cloruros de los iones metálicos. Las demás condiciones experimentales se describieron en el texto. Las actividades se expresaron como porcentaje del control (100%).

IV.2. EFECTO DE IONES AMONIO Y DE HIDROXILAMINA

El efecto de iones amonio y de hidroxilamina sobre la PBG-Deaminasa fue descrito por primera vez por Bogorad (1962 a, b; 1963), quien encontró que el consumo de PBG está afectado en menor grado que la formación de porfirinas. Estos hallazgos han sido confirmados para la enzima de diferentes fuentes.

(Sancovich y col., 1969 a, b; Frydman y Frydman, 1970; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Frydman y Feinstein, 1974; Batlle y Rossetti, 1977; Kotler y col., 1987 b).

Asimismo, Pluscec y Bogorad (1970), Radmer y Bogorad (1972) y Davies y Neuberger (1973) encontraron que cuando las PBG-Deaminasas de *Rp. spheroides* y hojas de espinaca actúan en presencia de hidroxilamina, amonio o metoxiamina, no se altera la velocidad de condensación de las moléculas de PBG pero sí se previene la ciclización del tetrapirrol lineal. Además, se demostró que los intermediarios pirrólicos se disocian de la enzima (Jordan y Berry, 1981; Jordan y col., 1988 a).

En la Figura IV.3. se ilustra el efecto de distintas concentraciones de amonio sobre la PBG-Deaminasa de las dos cepas de levadura. Inesperadamente, no se observa inhibición en la actividad específica.

Sin embargo, la hidroxilamina produce un marcado efecto inhibitorio de la enzima de ambas cepas. Esta inhibición se observa tanto sobre la formación de porfirinas como sobre el consumo de PBG (Tabla IV.2.). Estos hallazgos concuerdan con los descriptos por Jordan y Warren (1987) quienes encontraron que la hidroxilamina libera las moléculas de sustrato unidas a la enzima sin provocar la liberación del cofactor dipirrometano. Fumagalli y col. (1985) describieron resultados similares para la PBG-Deaminasa de eritrocitos humanos.

IV.3. EFFECTO DE REACTIVOS DE GRUPOS TIOLES Y DISULFUROS

Se ha demostrado la presencia de grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad de PBG-Deaminasa en la mayoría de las fuentes estudiadas (Frydman y Frydman, 1970; Llambías y Batlle, 1971 b; Jordan y Shemin, 1973; Sancovich y col., 1976; Anderson y Desnick, 1980; Russell y Rockwell, 1980; Evans y

col., 1986; Kotler y col., 1987 a; Fumagalli y col., 1991). Sin embargo, la participación directa de alguno de estos grupos en el mecanismo de la catálisis se ha dilucidado sólo recientemente (Hart y col., 1988; Miller y col., 1988; Scott y col., 1988).

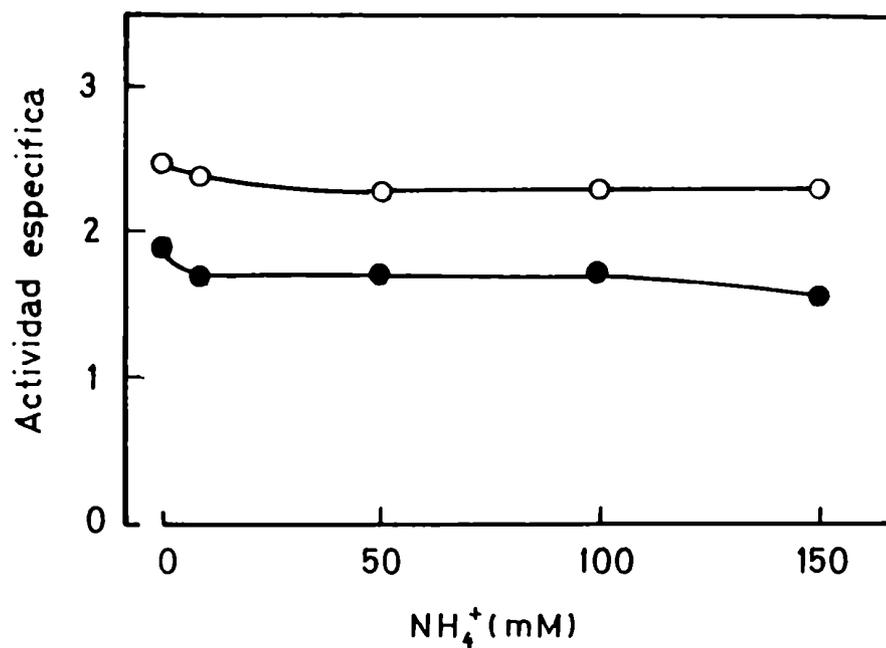


FIGURA IV.3.: Efecto de concentraciones variables de amonio sobre la actividad de PBG-Deaminasa. (○) Cepa D27, (●) cepa D27/C6. Se empleó una preparación enzimática purificada entre 16 y 20 veces. El sistema de incubación y la metodología fueron las descritas en Materiales y Métodos.

Por lo tanto, con el objeto de obtener mayor información acerca de la presencia de grupos sulfhidrilos y disulfuros esenciales en la estructura de la PBG-Deaminasa de *Saccharomyces cerevisiae*, se estudió el comportamiento de esta enzima, de

las dos cepas, frente a una serie de compuestos que reaccionan específicamente con estos grupos.

TABLA IV.2.: Efecto de hidroxilamina sobre la actividad de PBG-Deaminasa

CEPA	HIDROXILAMINA (mM)	ACTIVIDAD (%)	
		Porfirinas formadas	PBG consumido
D27	0	100	100
	10	55	67
	100	0	0
D27/C6	0	100	100
	10	62	56
	100	3	14

Se empleó una preparación enzimática purificada entre 16 y 20 veces. Las condiciones experimentales fueron las detalladas en Materiales y Métodos. Las actividades se expresaron como porcentaje del control (100 %).

La actividad se midió en aerobiosis y anaerobiosis, con y sin preincubación y agregando todos los reactivos antes que el PBG.

En las Tablas IV.3. y IV.4. se presentan los resultados correspondientes a la PBG-Deaminasa de las cepas D27 y D27/C6, respectivamente. Es necesario destacar, que debido a que

no hubo diferencias notables empleando distintas condiciones de incubación, se ilustran solamente los datos obtenidos en aerobiosis y sin preincubación, excepto cuando se estudió la reversión de la inhibición.

TABLA IV.3.: Efecto de reactivos de grupos tioles y disulfuros sobre la actividad de PBG-Deaminasa de la cepa *D27*

REACTIVO	CONCENTRACION (mM)	ACTIVIDAD (%)	
		Porfirinas formadas	PBG consumido
PCMB	1	0	80
NEMI	1	8	79
DTNB	1	0	120
	0,5	0	90
KCN	10	50	100
	1	80	100
Tiourea	10	55	100
	1	55	100
Cisteína	5	94	100
GSH	5	102	100
PCMB + cisteína	1 + 5	90	100
NEMI + cisteína	1 + 5	95	100

Las condiciones experimentales están descritas en el texto y en Materiales y Métodos. Las actividades se expresaron como porcentaje del control (100 %).

TABLA IV.4.: Efecto de reactivos de grupos tioles y disulfuros sobre la actividad de PBG-Deaminasa de la cepa D27/C6

REACTIVO	CONCENTRACION (mM)	ACTIVIDAD (%)	
		Porfirinas formadas	PBG consumido
PCMB	1	0	60
NEMI	1	10	75
DTNB	1	0	80
	0,5	0	85
KCN	10	60	100
	1	87	100
Tiourea	10	65	100
	1	65	95
Cisteína	5	81	100
GSH	5	95	90
PCMB + cisteína	1 + 5	70	90
NEMI + cisteína	1 + 5	70	95

Las condiciones experimentales están descriptas en el texto y en Materiales y Métodos. Las actividades se expresaron como porcentaje del control (100 %).

Los reactivos alquilantes de grupos sulfhidrilos, tales como p-cloromercuribenzoato (PCMB) y N-etilmaleimida (NEMI) inhiben completamente la formación de porfirinas pero tienen

escaso efecto sobre el consumo de PBG cuando estuvieron presentes en una concentración 1 mM. El agregado de cisteína 5 mM revierte estas inhibiciones.

El agente oxidante de grupos tioles, ácido 2,2'dinitro-5,5'ditiobenzoico (DTNB), también afecta solamente la formación de porfirinas.

Los reactivos que reaccionan con uniones disulfuro (tiourea y cianuro de potasio) tampoco tienen efecto sobre el consumo de sustrato pero inhiben aproximadamente un 50 % la formación de producto.

Por otra parte, agentes reductores y protectores de grupos sulfhidrilos, tales como cisteína y glutatión reducido (GSH), no modifican la actividad enzimática.

Estos resultados indican, que si los grupos sulfhidrilos son esenciales para la actividad, no están localizados en regiones expuestas de la proteína o están bien protegidos, tal como ha sido demostrado para la cisteína 242 de la PBG-Deaminasa de *E. coli*, que está unida al cofactor dipirrometano (Jordan y Warren, 1987).

La acción diferencial de los compuestos ensayados, sobre el consumo de PBG y la formación de porfirinas, es difícil de explicar si se piensa que el único grupo tiol esencial en la enzima es la cisteína 242. Pero si otros grupos sulfhidrílicos son necesarios para mantener una correcta orientación de la cadena pirrólica en crecimiento, su modificación podría interferir con la síntesis del HMB y no afectar el consumo de PBG.

En base a los datos obtenidos se puede asegurar que la PBG-Deaminasa de levaduras es una enzima típicamente sulfhidrílica.

IV.4. EFEECTO DEL ACIDO FOLICO

En 1976, el grupo de Tephly aisló del citosol de hígado de rata, una molécula de bajo PM, estable al calor, que poseía un efecto protector sobre la inhibición por plomo de la PBG-Deaminasa. Luego se sugirió que ese factor podría ser una molécula del tipo de los derivados del pteroilpoliglutamato (Piper y Van Vier, 1977), de manera que era de esperar que el ácido fólico tuviera un efecto análogo. Posteriormente, Juknat y col. (1981) describieron el aislamiento de un factor endógeno que estimula la síntesis de porfirinógenos a partir de PBG en homogenatos y sobrenadantes de *E. gracilis*, que podía ser reemplazado por ácido fólico. La estructura de este factor ha sido determinada por Juknat y col. (1988 a, b). También se ha postulado la probable existencia de un sitio de unión para el folato sobre la PBG-Deaminasa (Christenson y col., 1986; Kotler y col., 1988 b). Asimismo se ha demostrado recientemente una activación no esencial de la enzima de hígado de rata por ácido fólico (Noriega y col., 1992).

Teniendo en cuenta los trabajos antes mencionados, resultó de interés investigar el efecto producido *in vitro* por ácido fólico sobre la PBG-Deaminasa de levaduras. En la Figura IV.4. se observa que este compuesto no produce ninguna modificación sobre la actividad de esta enzima. Smythe y Williams (1988) obtuvieron resultados similares para la enzima de eritrocitos humanos.

IV.5. EFEECTO DE LA SULFAMERAZINA

Peters y col. (1980) encontraron que varias sulfonamidas inhibían la actividad de PBG-Deaminasa de hígado de rata. Kotler y col. (1988 a) observaron el mismo efecto sobre la

enzima de sangre de ratas tratadas con sulfamerazina. Sin embargo, se encontró un comportamiento dual cuando se determinó la biosíntesis de porfirinas en homogenatos de cerebros de ratas inyectadas con esta droga (Kotler y col., 1988 a). Estos hallazgos se explicaron postulando que la sulfamerazina podría unirse a la PBG-Deaminasa en el sitio regulatorio correspondiente al cofactor folato probablemente provisto por la Cosintetasa (Kohashi y col., 1984).

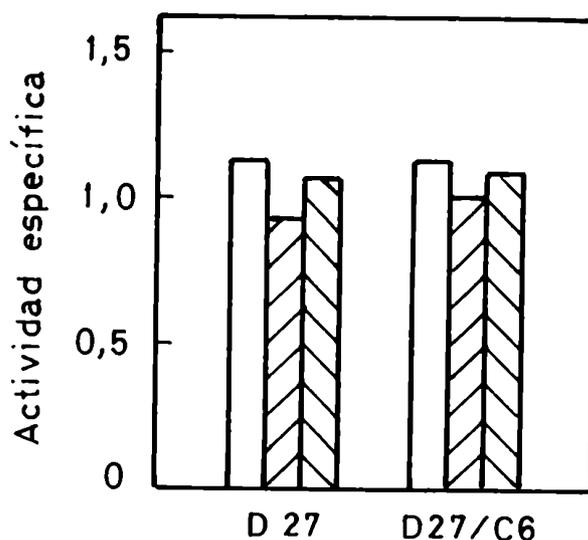


FIGURA IV.4.: Efecto de ácido fólico sobre la PBG-Deaminasa de las cepas D27 y D27/C6.

(□) Control, (▨) 10⁻³ M,
(▩) 10⁻⁷ M,

Se empleó una preparación enzimática purificada entre 16 y 20 veces. El sistema de incubación fue el descrito en Materiales y Métodos excepto que se agregaron al mismo concentraciones variables de ácido fólico.

En consecuencia, se decidió estudiar el efecto de sulfamerazina *in vitro*, sobre la actividad de la PBG-Deaminasa de las cepas D27 y D27/C6. En la Figura IV.5. se ilustran los resultados obtenidos con concentraciones variables de sulfamerazina agregadas al sistema de incubación, no observándose cambios en la actividad enzimática.

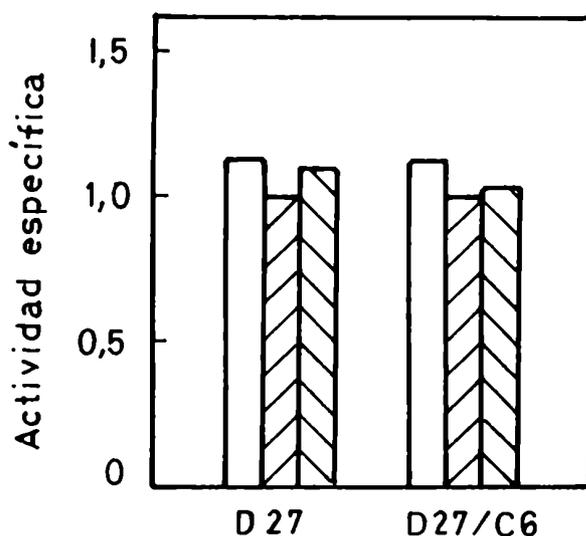


FIGURA IV.5.: Efecto de sulfamerazina sobre la PBG-Deaminasa de las cepas D27 y D27/C6.

(□) Sin sulfamerazina, (▨) 10^{-3} M, (▩) 10^{-7} M.

Se empleó una preparación enzimática purificada entre 16 y 20 veces. El sistema de incubación fue el descrito en Materiales y Métodos excepto que se agregaron concentraciones variables de sulfamerazina.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los efectos producidos por el ácido fólico y la sulfamerazina sobre la PBG-Deaminasa de *S. cerevisiae*, parecería que esta enzima no posee un sitio de unión para folato o bien que éste se encuentra ya ocupado por el cofactor endógeno.

CAPITULO V

CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA. DETECCION DE COMPLEJOS
INTERMEDIARIOS ENZIMA-SUSTRATO

V. CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA. DETECCION DE COMPLEJOS INTERMEDIARIOS ENZIMA-SUSTRATO

Hacia fines de la década del 70 (Battersby y col., 1979; Jordan y Seehra, 1979; Seehra y Jordan, 1980), experimentos de "single-turn-over" (del tipo de reacción instantánea o cinética rápida) usando (^{14}C)-PBG con PBG-Deaminasa de *Rhodopseudomonas spheroides* establecieron que la enzima va uniendo las moléculas de sustrato en un determinado orden, comenzando por el anillo A, seguido por el B, el C y finalmente el D. A partir de ese momento, se sucedieron una serie de trabajos en los cuales se intentó detectar y caracterizar los intermediarios enzima-sustrato formados durante la reacción enzimática.

En 1980, también Anderson y Desnick trabajando con eritrocitos humanos, encontraron 5 picos de actividad de PBG-Deaminasa en una columna de DEAE-celulosa y demostraron por electroforesis que correspondían a la enzima nativa y a diferentes complejos enzima-intermediarios.

Por su parte, Jordan y Berry (1981), incubando la PBG-Deaminasa purificada de *Rhodopseudomonas spheroides*, con (^{14}C)-PBG, aislaron los complejos intermediarios de la reacción y determinaron sus propiedades, obteniendo evidencias de la participación de una unión covalente entre la enzima y las moléculas de sustrato.

Debe notarse que ya en 1979, Miyagi y col. habían detectado múltiples formas de la PBG-Deaminasa de eritrocitos humanos por cromatografía en DEAE-Sephadex A-50 y electroforesis en gel. Sin embargo, Anderson y Desnick (1980) no lograron establecer una relación entre las distintas formas moleculares descritas.

En 1984, Williams encontró que la actividad de PBG-Deaminasa de bazo y de sangre de ratas tratadas con fenilhidrazina

se resolvía en 5 picos por cromatografía en DEAE-celulosa. Sin embargo, cuando se agregó PMSF en los buffers o cuando se incluyó una etapa de calentamiento (70 °C, 15 minutos) previa a la cromatografía de intercambio iónico, se obtuvieron diferentes perfiles de elución. Se concluyó que dos de los picos provenían de la acción de proteasas y otros dos correspondían a las formas moleculares principales halladas por Anderson y Desnick (1980). No se pudo establecer la naturaleza del pico menor que apareció a alta fuerza iónica.

Asimismo, Brown y col. (1984), empleando PBG-Deaminasa de eritrocitos humanos parcialmente purificada, hallaron varios picos de actividad al eluir la enzima en una columna de intercambio aniónico (TSK DEAE-5-PW) adosada a un sistema HPLC. En cambio, Fumagalli y col. (1985), utilizando una columna de DEAE-celulosa, encontraron un único pico de actividad.

Recientemente, Smythe y Williams (1988) purificaron también la PBG-Deaminasa de eritrocitos humanos. En una de las etapas emplearon una columna de DEAE-celulosa, hallando un único pico de actividad si la preparación enzimática se calentaba previamente durante 50 minutos a 80 °C; en cambio, si el calentamiento era de 30 minutos, se detectaban dos bandas activas. Los autores sugirieron que estos dos picos podrían corresponder a las dos especies principales reportadas por Anderson y Desnick (1980), o sea a la enzima nativa y al complejo enzima-mopirrol.

Al aplicar PBG-Deaminasa parcialmente purificada de *E. coli* a una columna Mono QHR 10/10 adosada a un sistema fplc, la actividad enzimática eluyó en un solo pico, aunque ocasionalmente se detectaba un pico menor (Hart y col., 1986). Asimismo, esta enzima fue purificada por Jordan y col. (1988 a) a partir de una cepa de *E. coli* conteniendo un plásmido multicopia con el gen que codifica para la PBG-Deaminasa (HEM 3). Estos autores encontraron que cuando la enzima purificada se sometía a

electroforesis en condiciones no desnaturalizantes o a una columna de intercambio Mono QHR5/3 adósdada a un sistema fplc aparecían, en ambos casos, múltiples bandas que no podían atribuirse a la formación de complejos enzima-sustrato. Se postuló que las distintas formas enzimáticas eran debidas a leves variaciones en la estructura de la enzima, posiblemente ocasionadas por deamidación de los residuos asparagina. Se debe destacar que los complejos enzima-(sustrato)₁₋₄ en *E. coli* también se aislaron y caracterizaron, luego de incubar a la enzima purificada con (¹⁴C)-PBG (Jordan y col., 1988 a).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, resultó de interés estudiar el comportamiento de la PBG-Deaminasa de levaduras en una columna de intercambio aniónico (DEAE-celulosa) bajo determinadas condiciones experimentales.

La fracción enzimática a sembrar en dicha columna se obtuvo siguiendo el esquema de purificación detallado en el Capítulo III de Resultados. Así, las fracciones con actividad eluídas de la columna de Sephadex G-100 se concentraron con sulfato de amonio (0 - 60 %). Las proteínas concentradas se desalaron y sembraron en la columna de DEAE-celulosa (0,8 x 30 cm) previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8. Luego de lavar la columna con un volumen de cama del mismo buffer (25 ml), la elución se realizó con un gradiente de cloruro de sodio de 0 a 0,24 M (4 volúmenes de cama).

En las Figuras V.1. y V.2. se ilustran los perfiles de elución hallados para la PBG-Deaminasa de las cepas *D27* y *D27/C6* respectivamente. Se observan varios picos de actividad en un amplio rango de gradiente, en ambas cepas. Se puede observar que los perfiles son confusos y que los picos activos son poco reproducibles, quizás debido a los valores muy bajos de porfirinas formadas. Con estos datos no se puede expresar ninguna conclusión sobre la existencia de distintas formas enzimáticas.

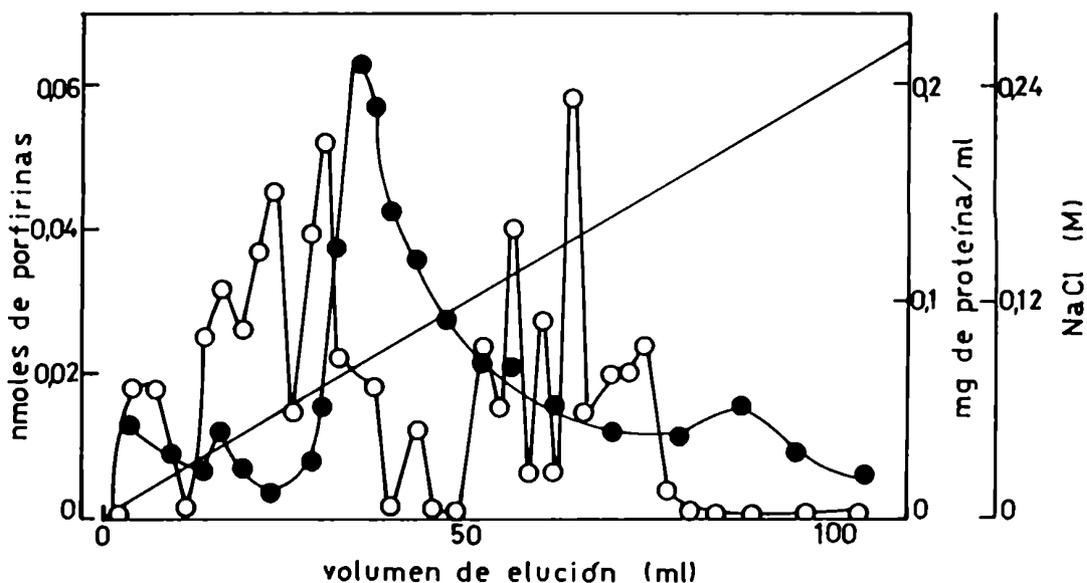


FIGURA V.1.: Cromatografía en DEAE-celulosa de la PBG-Deaminasa de la cepa D27.

Se sembró una preparación enzimática purificada hasta la etapa de Sephadex G-100 según se describió en el ítem III.2., Capítulo III de Resultados. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de cloruro de sodio (0-0,24 M) y el flujo fue de 18 ml/hora. Las demás condiciones se detallan en el texto. (○) nmoles porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml

Teniendo en cuenta que la purificación de la PBG-Deaminasa de ambas cepas, en presencia del inhibidor de proteasas PMSF produjo resultados más claros y reproducibles, se resolvió realizar la cromatografía en DEAE-celulosa con la fracción enzimática así obtenida. Tanto en el buffer de lavado como en el de elución con cloruro de sodio, se incluyó PMSF 0,1 mM.

Los perfiles de elución de actividad enzimática y de proteínas para la cepa normal D27 (Figura V.3.) fueron sumamente nítidos y reproducibles obteniéndose un único y agudo pico, donde se concentró toda la actividad (110 mM de cloruro de sodio), que

eluyó luego del pool proteico. Los valores de actividad específica fueron aproximadamente 20 veces mayores que los encontrados cuando la PBG-Deaminasa, purificada en ausencia de PMSF, se cromatografió en DEAE-celulosa.

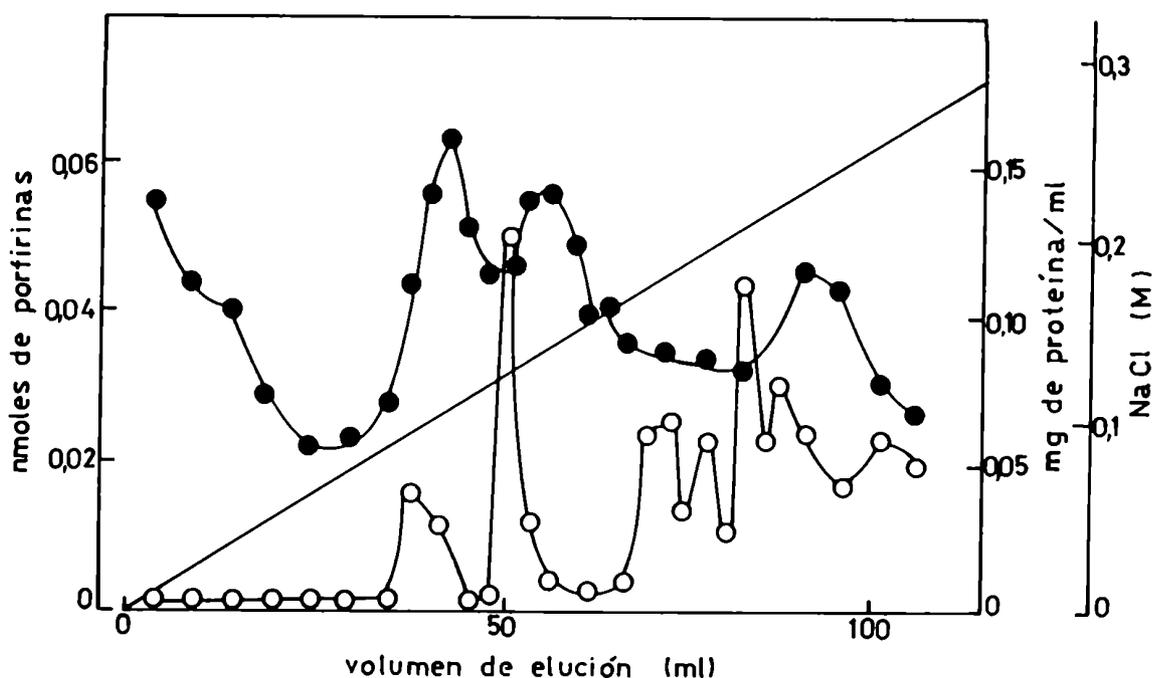


FIGURA V.2.: Cromatografía en DEAE-celulosa de la PBG-Deaminasa de la cepa *D27/C6*.

Se sembró una preparación enzimática purificada hasta la etapa de Sephadex G-100 según se describió en el ítem III.2., Capítulo III de Resultados. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de cloruro de sodio (0-0,24 M) y el flujo fue de 18 ml/hora. Las demás condiciones se detallan en el texto. (O) nmoles porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml

En la Figura V.4. se ilustran los perfiles de actividad y proteínas de la PBG-Deaminasa de la cepa mutante HEM R⁺ purificada en presencia de PMSF y luego cromatografiada en la columna de intercambio aniónico. En este caso, se obtuvo una banda de actividad, que eluyó entre 180 mM y 220 mM de cloruro de

sodio; mientras que las proteínas también eluyeron en un amplio rango del gradiente. Los valores de actividad específica, después del pasaje de la enzima purificada en presencia del inhibidor a través de la columna de DEAE-celulosa, fueron también superiores (4 - 6 veces) a los hallados en su ausencia.

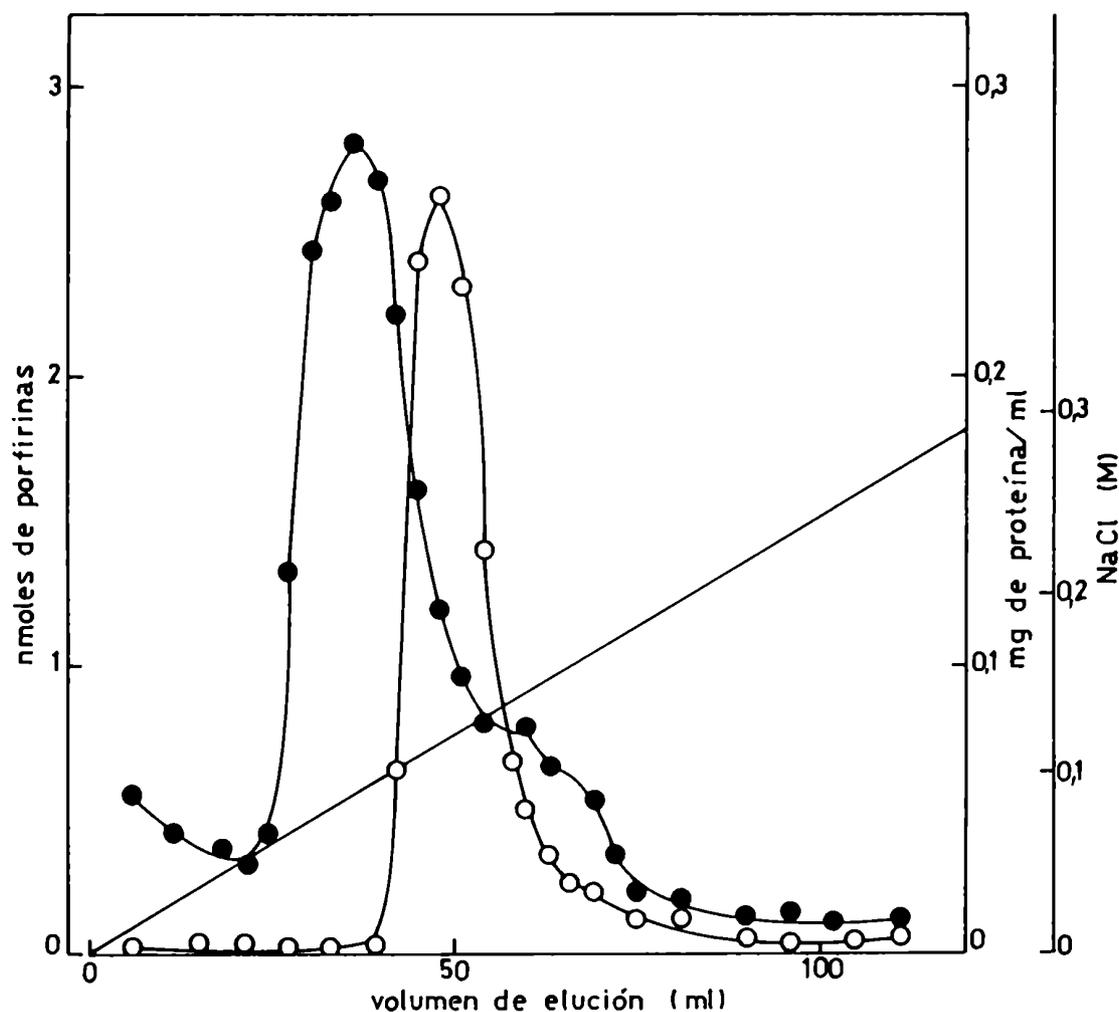


FIGURA V.3.: Cromatografía en DEAE-celulosa de la PBG-Deaminasa de la cepa D27 en presencia de PMSF.

Se sembró una preparación enzimática purificada hasta la etapa de Sephadex G-100 en presencia de un inhibidor de proteasas (PMSF). Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de cloruro de sodio (0 - 0,24 M) y el flujo fue de 18 ml/hora. Las demás condiciones experimentales se detallan en el texto. (○) nmoles porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml

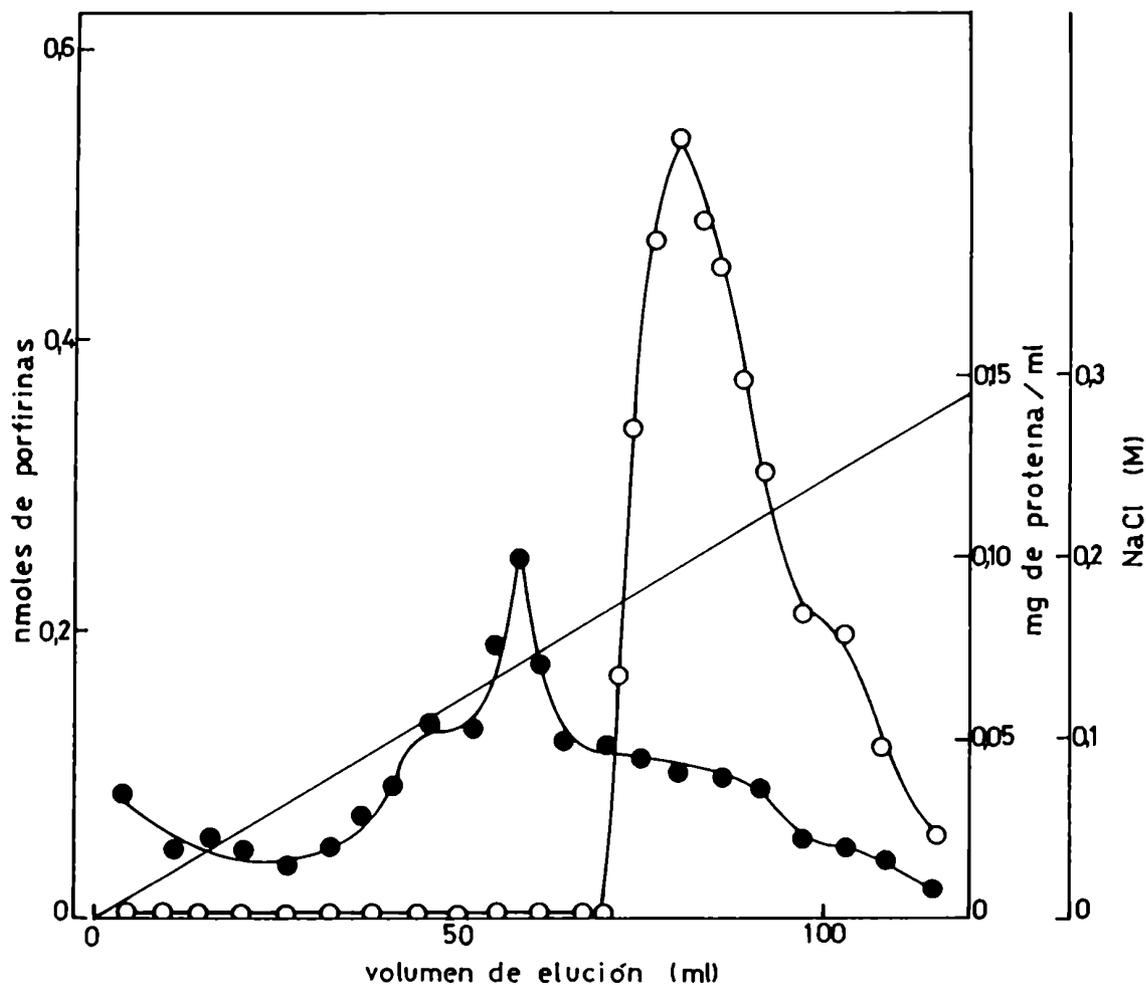


FIGURA V.4.: Cromatografía en DEAE-celulosa de la PBG-Deaminasa de la cepa D27/C6 en presencia de PMSF. Se sembró una preparación enzimática purificada hasta la etapa de Sephadex G-100 en presencia de un inhibidor de proteasas (PMSF). Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de cloruro de sodio (0 - 0,24 M) y el flujo fue de 18 ml/hora. Las demás condiciones experimentales se detallan en el texto. (○) nmol porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml

Por lo tanto, los bajos y poco reproducibles valores de actividad de la enzima eluída, ilustrados en las Figuras V.1. y V.2. serían, al menos en parte, consecuencia de la acción de las proteasas. Estos resultados son muy similares a los descritos por Hart y col. (1986) para la PBG-Deaminasa purificada de *E. coli*.

Por otra parte, se debe destacar que, al comparar las Figuras V.3. y V.4., se deduce que las formas enzimáticas de la cepa normal D27 y de la mutante D27/C6 eluyeron a fuerzas iónicas muy diferentes, indicando que se trataría de proteínas con distinta carga.

Asimismo, teniendo en cuenta aquellos trabajos en los cuales se habían detectado los intermediarios enzima-sustrato de la reacción enzimática (Anderson y Desnick, 1980; Jordan y Berry 1981; Brown y col., 1984; Jordan y col., 1988 a), se decidió investigar el comportamiento de la PBG-Deaminasa de levaduras cuando la enzima, parcialmente purificada en ausencia y en presencia del inhibidor de proteasas hasta la etapa Sephadex G-100, se incubó con PBG durante 30 minutos a 4 °C. Inmediatamente después de esta incubación la mezcla se sembró en una columna de DEAE-celulosa previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 conteniendo PBG (120 µM), en ausencia o presencia de PMSF 0,1 mM. En primer lugar, como se usó una preparación enzimática preincubada con el sustrato y una columna equilibrada con buffer conteniendo también PBG, era necesario conocer el perfil de elución en la columna de intercambio iónico de una solución de PBG (Figura V.5.). El gradiente de cloruro de sodio se varió entre 0 y 0,24 M y el PBG eluyó a una concentración salina 80 mM. Cuando los eluidos se incubaron en condiciones semejantes a las empleadas para determinar actividad, se pudo apreciar la formación de porfirinas. Se debe aclarar que también se midió PBG directamente en los eluidos de la columna y que no se detectó presencia de intermediarios polipirrólicos en dichos eluidos.

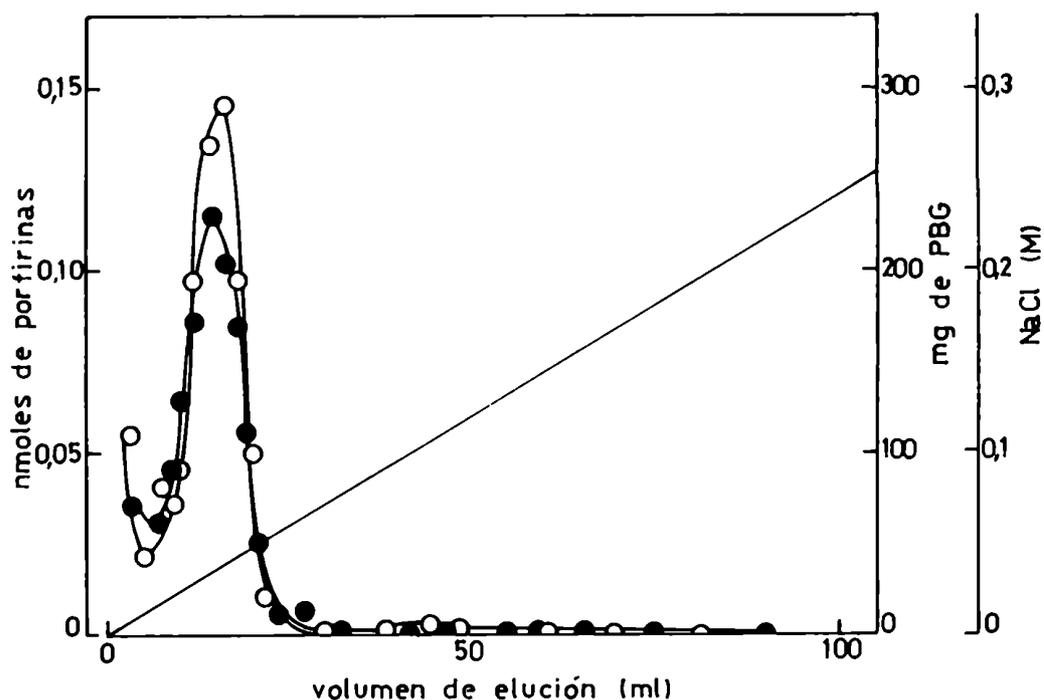


FIGURA V.5.: Perfil de elución de una solución de PBG en una columna de DEAE-celulosa. Se sembraron 1.200 μ g de PBG. La elución se realizó con un gradiente lineal de cloruro de sodio (0 - 0,24 M) y el flujo fue de 18 ml/hora. (O) nmoles porfirinas formadas, (●) mg PBG

La cromatografía en DEAE-celulosa de la PBG-Deaminasa parcialmente purificada en ausencia de PMSF se muestra en la Figura V.6. Se observa que, al eluir las proteínas con un gradiente entre 0 y 0,24 M de cloruro de sodio, la actividad se resolvió en 3 picos que se identificaron como I, II y III a 100 mM, 170 mM y 200 mM de cloruro de sodio. El pico que aparece a baja fuerza iónica corresponde a la formación no enzimática de porfirinas a partir del PBG que eluye con cloruro de sodio 80 mM.

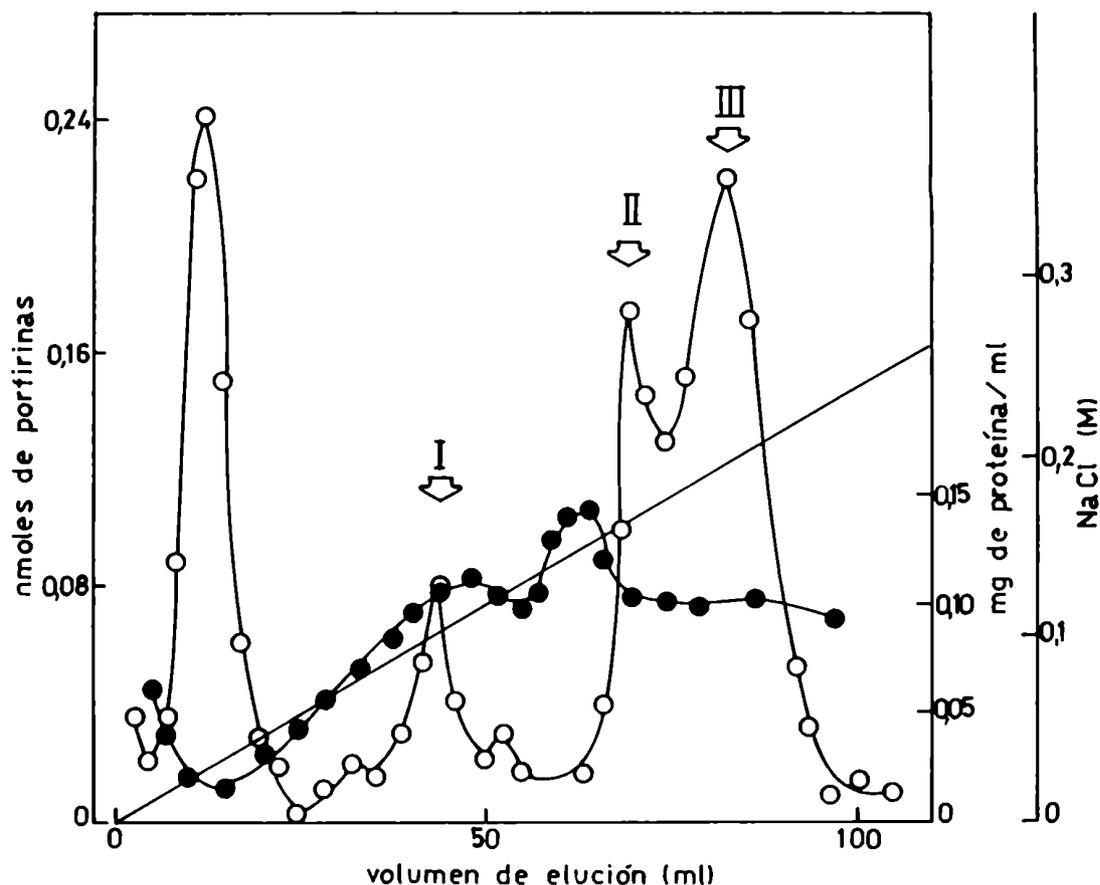


FIGURA V.6.: Cromatografía en DEAE-celulosa de la PBG-Deaminasa de la cepa D27 en presencia de PBG.

Se sembró una preparación enzimática purificada hasta la etapa de Sephadex G-100 y luego preincubada con PBG 30 minutos a 4 °C (aproximadamente 0,2 mg de proteína/80 µg de PBG). Se eluyó con un gradiente lineal de cloruro de sodio (0 - 0,24 M) y el flujo fue de 18 ml/hora. Las demás condiciones experimentales se detallan en el texto.

(O) nmoles porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml

Cuando la fracción enzimática, parcialmente purificada en ausencia de PMSF, correspondiente a la cepa D27/C6, se sembró y se eluyó con un gradiente de cloruro de sodio (0 - 0,24 M) de la columna de DEAE-celulosa, se obtuvo el

perfil ilustrado en la Figura V.7.. Nuevamente se observan 3 picos con actividad de PBG-Deaminasa que eluyen a concentraciones de cloruro de sodio 120 mM, 190 mM y 230 mM.

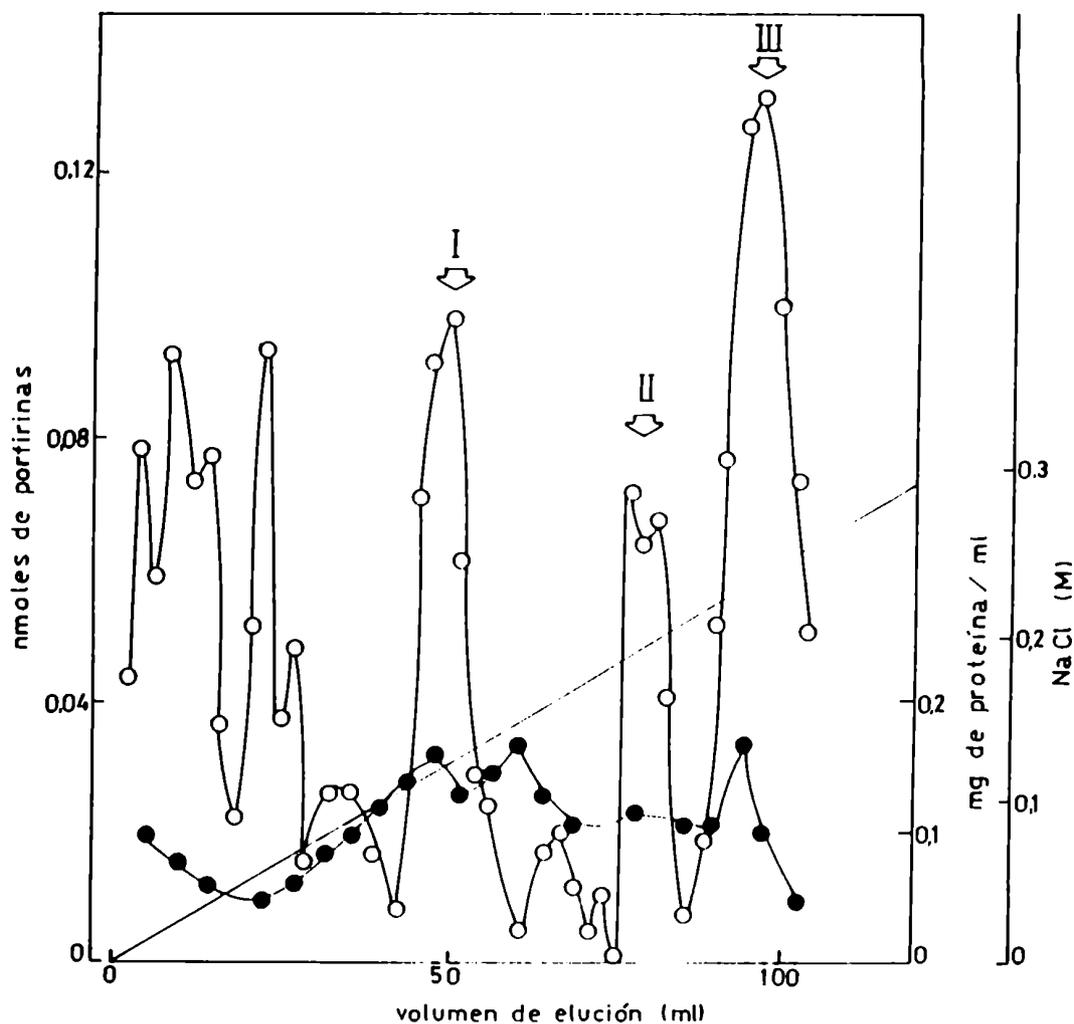


FIGURA V.7.: Cromatografía en DEAE-celulosa de la PBG-Deaminasa de la cepa *D27/C6* en presencia de PBG.

Se sembró una preparación enzimática purificada hasta la etapa de Sephadex G-100 y luego preincubada con PBG 30 minutos a 4 °C (aproximadamente 0,2 mg de proteína/80 µg de PBG). Se eluyó con un gradiente lineal de cloruro de sodio (0 - 0,24 M) y el flujo fue de 18 ml/hora. Las demás condiciones experimentales se detallan en el texto.

(○) nmoles porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml

Si se analizan en forma conjunta los resultados presentados en las Figuras V.3., V.4., V.6. y V.7., se puede concluir que, para ambas cepas, los perfiles de actividad en ausencia de PBG fueron poco claros y con valores de actividad muy bajos, observándose picos más definidos y reproducibles cuando la cromatografía en DEAE-celulosa se realizó en presencia del sustrato. Estos hallazgos corroborarían un efecto protector del PBG sobre la enzima. Se ha postulado que los complejos covalentes enzima-mono, di, tri o tetrapirroles serían menos susceptibles a la degradación (Beaumont y col., 1986) y más resistentes a la inactivación por calor (Williams, 1984).

Posteriormente, se procedió a cromatografiar en la misma columna de intercambio aniónico a la PBG-Deaminasa parcialmente purificada pero ahora en presencia del inhibidor de proteasas, también en razón de los mejores resultados hallados cuando se lo incluyó en el esquema de purificación. Los perfiles de elución obtendidos para la cepa *D27* y para la mutante *D27/C6* se muestran en las Figuras V.8. y V.9., respectivamente. El gradiente de cloruro de sodio también se varió entre 0 y 0,24 M. Para ambas cepas, se observa la aparición de 3 bandas de actividad enzimática I, II y III correspondientes a las siguientes concentraciones 110 mM, 190 mM y 230 mM para la cepa *D27*, y 120 mM, 180 mM y 220 mM para la cepa *D27/C6*. El pico a baja fuerza iónica corresponde nuevamente a la formación no enzimática de porfirinas a partir del PBG libre.

En principio y comparando los resultados hallados para la PBG-Deaminasa de levaduras durante las distintas corridas cromatográficas en DEAE-celulosa, las bandas de actividad identificadas como I, II, y III podrían atribuirse a la enzima nativa y a posibles complejos enzima-intermediarios.

Con el objeto de establecer la correspondencia entre las diversas bandas y los intermediarios enzima-mono, di, tri y tetrapirroles, se procedió a detectar su presencia directamente

en los eluidos de la columna de intercambio aniónico, empleando el reactivo de Ehrlich modificado. Al reaccionar con este compuesto, los distintos intermediarios polipirrólicos dan espectros característicos. Así, los dipirrimetanos y tripirrimetanos dan derivados que presentan máximos a las longitudes de onda 483,5 y 560, y 487 y 561 nm, respectivamente (Rosé y col., 1988).

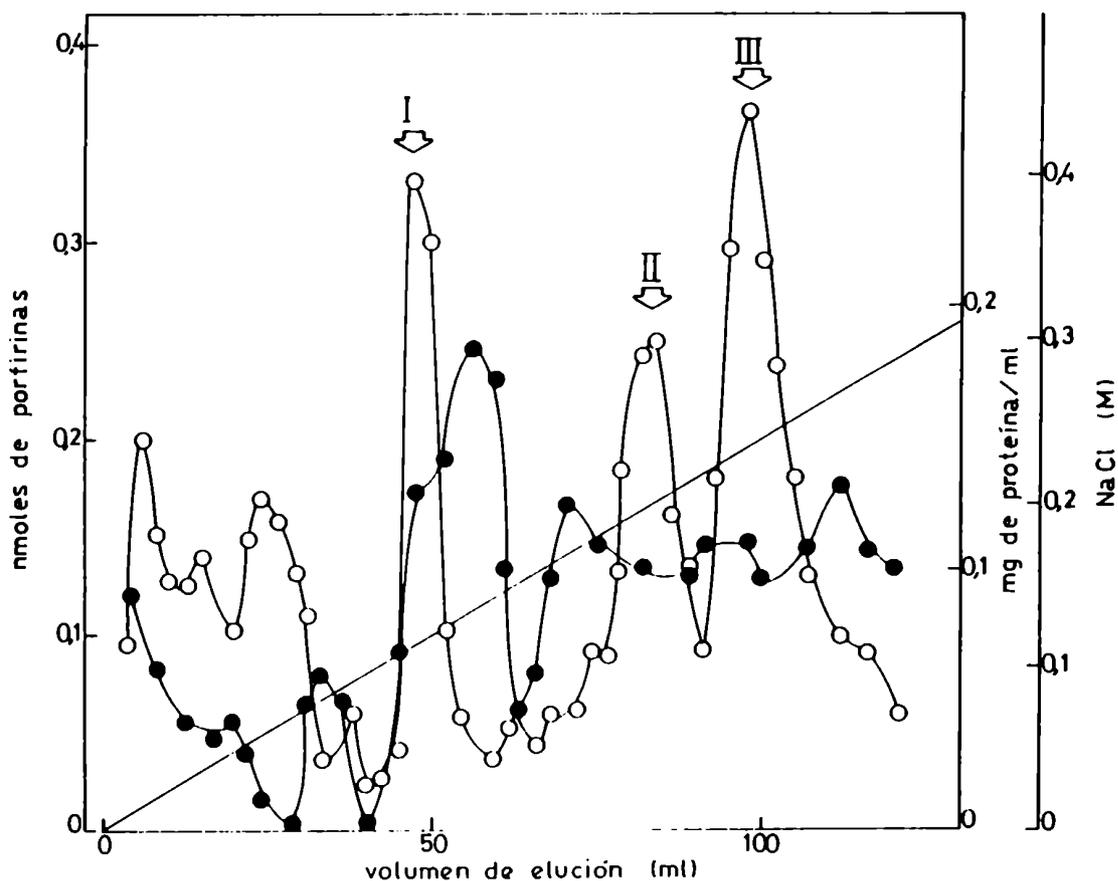


FIGURA V.8.: Cromatografía en DEAE-celulosa de la PBG-Deaminasa de la cepa D27 en presencia de PMSF y PBG. Se sembró una preparación enzimática purificada hasta la etapa de Sephadex G-100 en presencia de PMSF y luego preincubada con PBG (aproximadamente 0,2 mg de proteína/80 μ g de PBG). Se eluyó con un gradiente de cloruro de sodio (0 - 0,24 M) y el flujo fue de 18 ml/hora. Las demás condiciones se detallan en el texto. (O) nmoles porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml

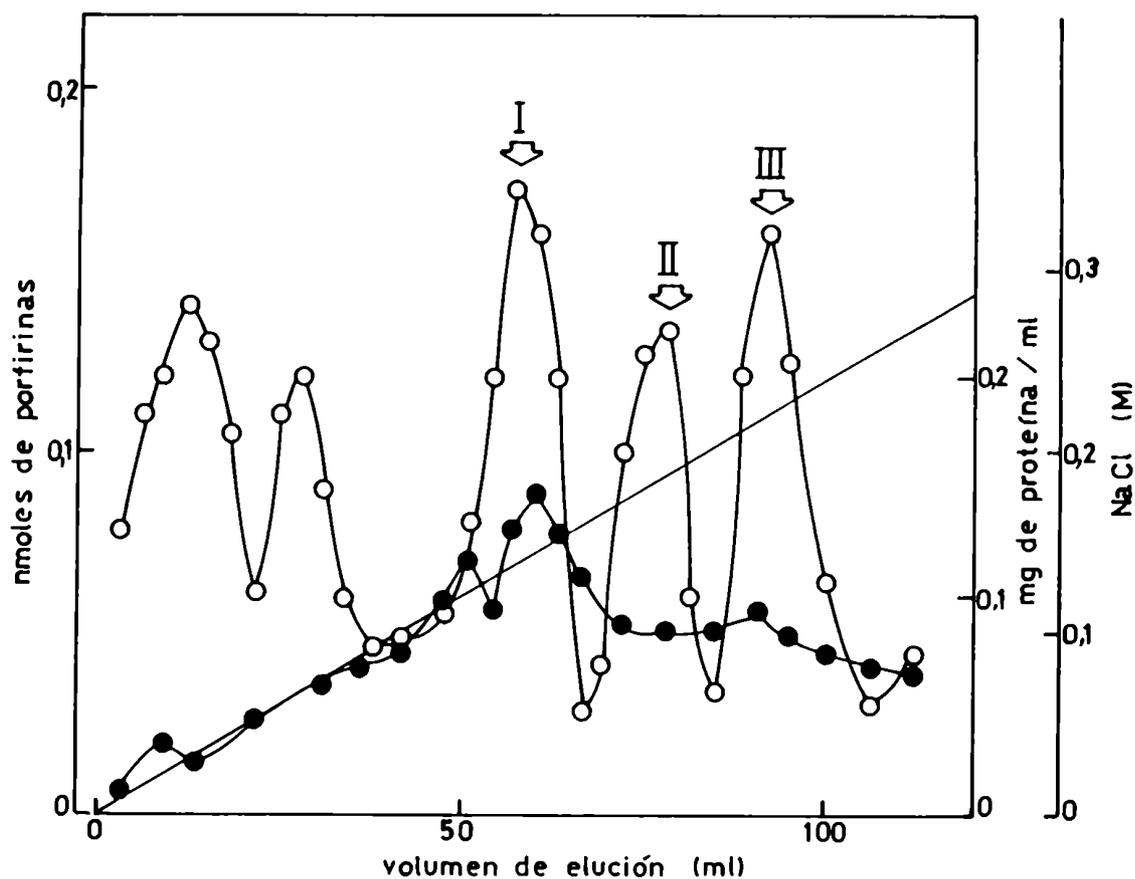


FIGURA V.9.: Cromatografía en DEAE-celulosa de la PBG-Deaminasa de la cepa *D27/C6* en presencia de PMSF y PBG. Se sembró una preparación enzimática purificada hasta la etapa de Sephadex G-100 en presencia de PMSF y luego preincubada con PBG (aproximadamente 0,2 mg de proteína/80 μ g de PBG). Se eluyó con un gradiente de cloruro de sodio (0 - 0,24 M) y el flujo fue de 18 ml/hora. Las demás condiciones se detallan en el texto. (O) nmoles porfirinas formadas, (●) mg proteína/ml

En las Figuras V.10., V.11. y V.12. se muestran los espectros de los eluidos correspondientes a los picos I, II y III, respectivamente, de la PBG-Deaminasa de la cepa *D27*, previamente

purificada en presencia de PMSF y preincubada con PBG. El espectro mostrado en la Figura V.10. es igual al hallado cuando reacciona el reactivo de Ehrlich con el PBG y los mostrados en las Figuras V.11. y V.12. corresponden a los derivados del reactivo con el dipirrol y el tripirrol respectivamente.

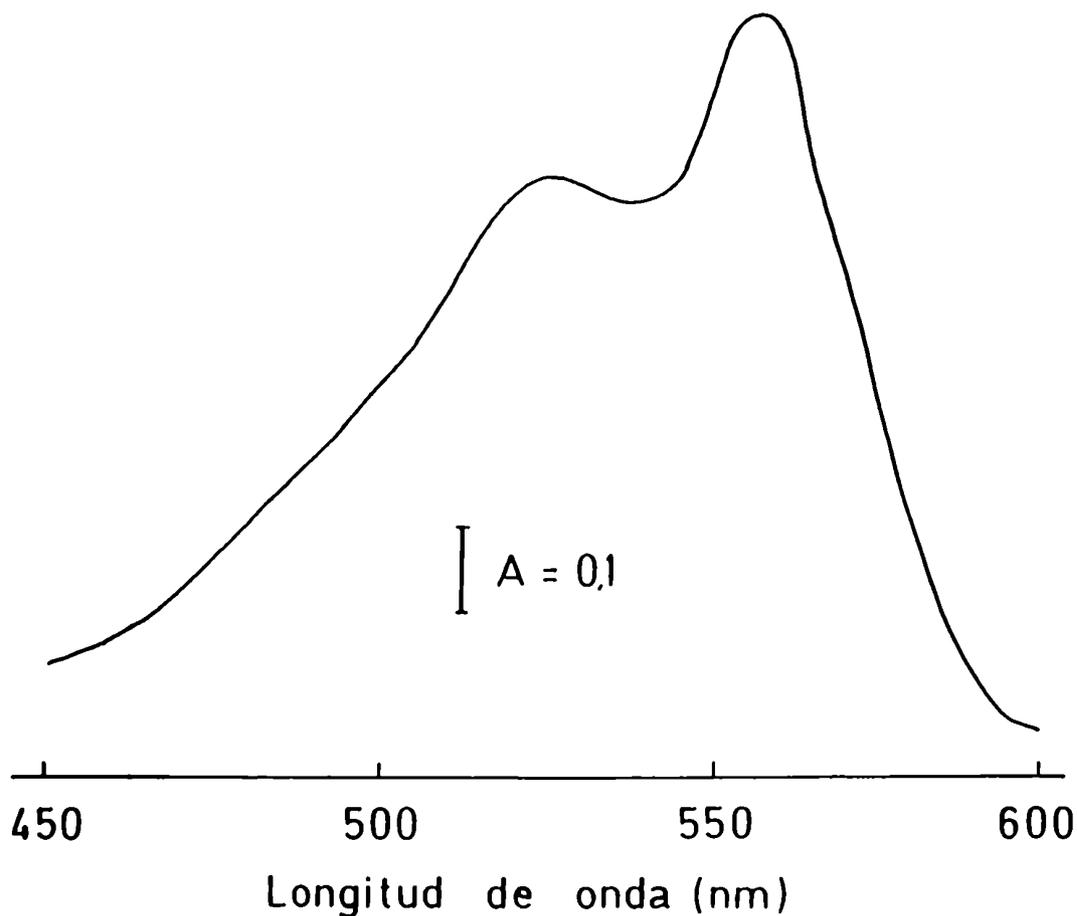


FIGURA V.10.: Espectro de absorción de los polipirroles del pico I eluidos de la columna de DEAE-celulosa. En la columna de DEAE-celulosa se sembró la PBG-Deaminasa de la cepa *D27* purificada en presencia de PMSF y preincubada con PBG como ya se describió. Los eluidos del pico I se hicieron reaccionar con el reactivo de Ehrlich y se registró el espectro de absorción entre 600 y 450 nm a los 10 minutos después de agregar dicho reactivo.

Idénticos espectros se obtuvieron para los picos I, II y III de la enzima de la cepa *D27/C6* (datos no ilustrados).

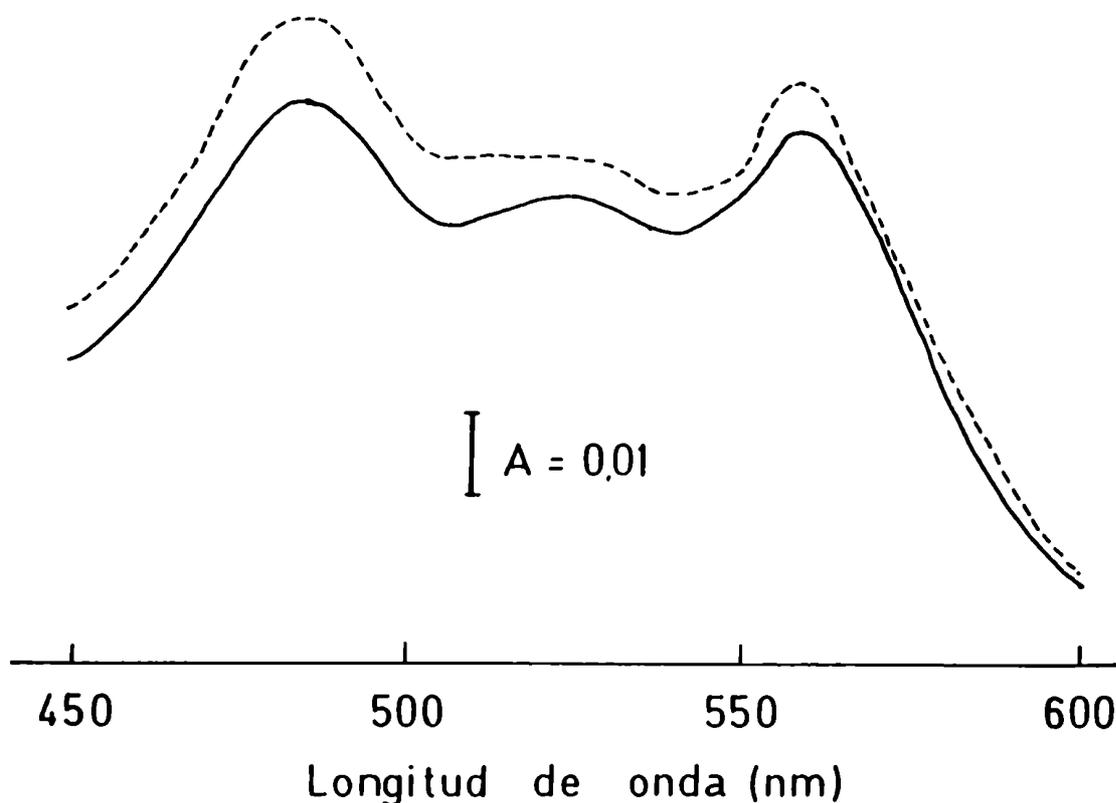


FIGURA V.11.: Espectros de absorción de los polipirroles del pico II eluidos de la columna de DEAE-celulosa. En la columna de DEAE-celulosa, se sembró la PBG-Deaminasa de la cepa *D27* purificada en presencia de PMSF y preincubada con PBG como ya se describió. Los eluidos del pico II se hicieron reaccionar con el reactivo de Ehrlich y se registraron los espectros de absorción entre 600 y 450 nm a los 10 (—) y 20 (---) minutos después de agregar dicho reactivo.

Por lo tanto, los resultados parecen indicar que el pico I corresponde a la enzima nativa y a la enzima-monopirrol, el pico II a la enzima-dipirrol y el pico III a la enzima

tripirrol y quizás también a la enzima-tetrapirrol, aunque este último complejo libera rápidamente el producto (Berry y Jordan, 1981).

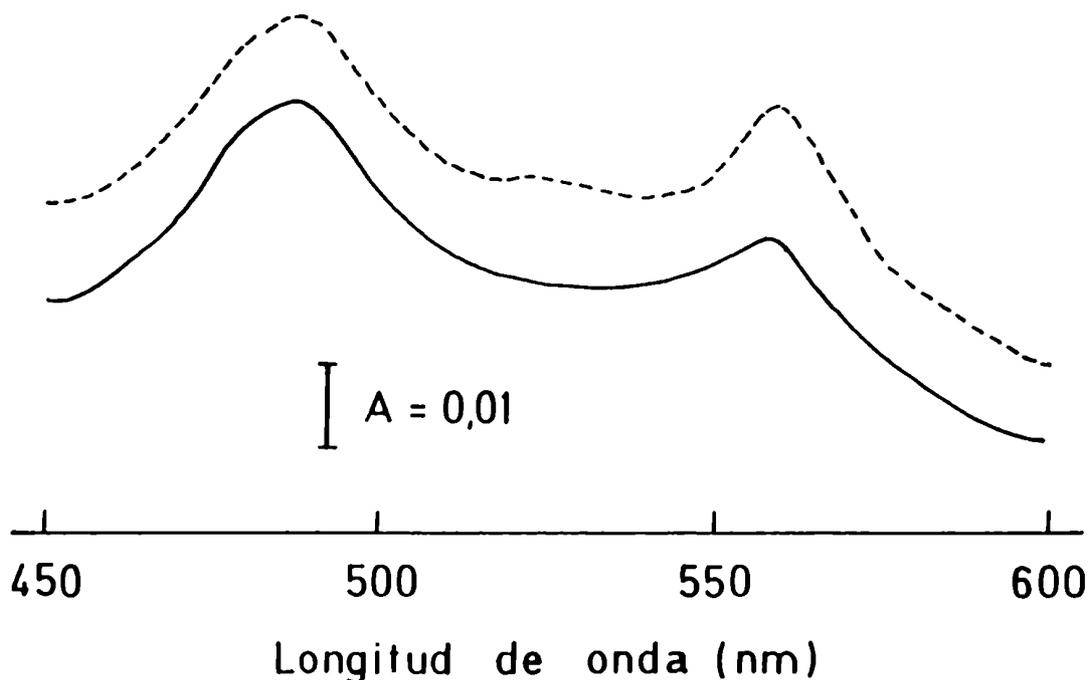


FIGURA V.12.: Espectros de absorción de los polipirroles del pico III eluidos de la columna de DEAE-celulosa. En la columna de DEAE-celulosa, se sembró la PBG-Deaminasa de la cepa D27 purificada en presencia de PMSF y preincubada con PBG como ya se describió. Los eluidos del pico III se hicieron reaccionar con el reactivo de Ehrlich y se registraron los espectros de absorción entre 600 y 450 nm a los 10 (—) y 20 (---) minutos después de agregar dicho reactivo.

En consecuencia, el mecanismo de acción de la PBG-Deaminasa de *S. cerevisiae* sería similar al descrito para la misma enzima de otras fuentes (Anderson y Desnick, 1980; Berry y

Jordan, 1981; Jordan y Berry, 1981; Brown y col., 1984;
Williams, 1984; Jordan y col., 1988 a).

CAPITULO VI

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS EN LEVADURAS

	Página
VI.1. Actividad de ALA-Sintetasa	151
VI.2. Actividad de ALA-Dehidrasa	154
VI.2.1. Método más apropiado para su determinación	154
VI.2.2. Actividad de ALA-Dehidrasa en función del crecimiento	156
VI.3. Interrelación entre actividades enzimáticas y ALA intracelular	160
VI.4. Actividad de PBG-Deaminasa	161

VI. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS EN LEVADURAS

Una propiedad conocida de las levaduras es su respuesta a cambios en las condiciones de crecimiento. Así, cuando las células crecen en un medio con glucosa, las actividades de varias enzimas respiratorias y los citocromos mitocondriales son muy bajos (conocido efecto de represión por glucosa) (Jayaraman, 1971; Polakis y Bartley, 1965; Perlman y Mahler, 1974; Mattoon y col., 1978). En cambio, cuando la glucosa se agotó en el medio o cuando las células se transfieren desde un medio con glucosa a uno que contiene una fuente de carbono no fermentable, el nivel de citocromos y la actividad de varias enzimas aumenta, concomitantemente con la formación de mitocondrias normales y funcionales.

Como era de esperar, la reducción de la síntesis de citocromos está acompañada por una disminución en la formación de hemo. Existen estudios que han indicado que el ALA-D es sensible a represión por catabolito (Jayaraman y col., 1971) y también se ha sugerido que esta enzima es la que controla la síntesis de citocromos durante la de-represión (Mahler y Lin, 1974; Labbe-Bois y Volland, 1977).

Recientemente, Borralho y col. (1989) han obtenido evidencias que indican que el ALA-D no es la única enzima "target" de la represión por glucosa en el camino metabólico del hemo; la glucosa también podría ejercer algún control regulatorio sobre el ALA-S.

Actualmente, los datos existentes indican que el ALA-S, al igual que el ALA-D, es una enzima regulatoria en levaduras. Se ha demostrado que mutantes defectivas en las últimas etapas de la biosíntesis del hemo tienen actividad de ALA-S elevada (Malamud y col., 1983; Rytka y col., 1984). El rol regulatorio de esta enzima parece ser muy complejo ya que su actividad está

regulada por oxígeno, hemo y glucosa (Keng y Guarente, 1987; Carvajal y col., 1990).

Por otra parte, se encontró acumulación intracelular del precursor ALA tanto en células normales (Jayaraman y col., 1971; Muthukrishnan y col., 1972; Labbe-Bois y Volland, 1977; Mattoon y col., 1978; Arrese y col., 1983; Borralho y col., 1983) como en mutantes de levadura (Borralho y col., 1983.1989; Malamud y col., 1983; Carvajal y col., 1990). Estos hallazgos estarían indicando que la actividad de ALA-D es menor que la del ALA-S (Muthukrishnan y col., 1972; Labbe-Bois y col., 1986).

Por lo tanto, teniendo en cuenta los trabajos recién mencionados, según los cuales se postula que tanto el ALA-S como el ALA-D están involucradas en la regulación del camino biosintético de las porfirinas, se decidió determinar las actividades de ambas enzimas en las cepas normal *D27* y su mutante *D27/C6*, además de medir el contenido de ALA intracelular, como indicador de la relación entre estas actividades *in vivo*.

Por otra parte, se midió la actividad de PBG-Deaminasa ya que Labbe-Bois y col. (1986) también propusieron que esta enzima podría ser otro punto de control de la velocidad de síntesis de las porfirinas, a causa de su baja actividad; aunque se debe destacar que nunca se detectó PBG intracelular.

Asimismo, considerando el posible efecto de la presencia de glucosa en el medio, sobre las enzimas en cuestión, se midieron dichas actividades en células en diferentes estados fisiológicos y en medios de crecimiento con fuentes de carbono fermentable y no fermentable.

VI.1. ACTIVIDAD DE ALA-SINTETASA

En la Figura VI.1. se muestran los valores de actividad de ALA-S obtenidos para las cepas *D27* y *D27/C6* crecidas en

medio YPD durante distintos tiempos. Se observa que los perfiles fueron muy semejantes para ambas cepas. La actividad máxima se detecta en la fase inicial del crecimiento, y luego disminuye hasta un tercio del valor inicial a las 25 horas.

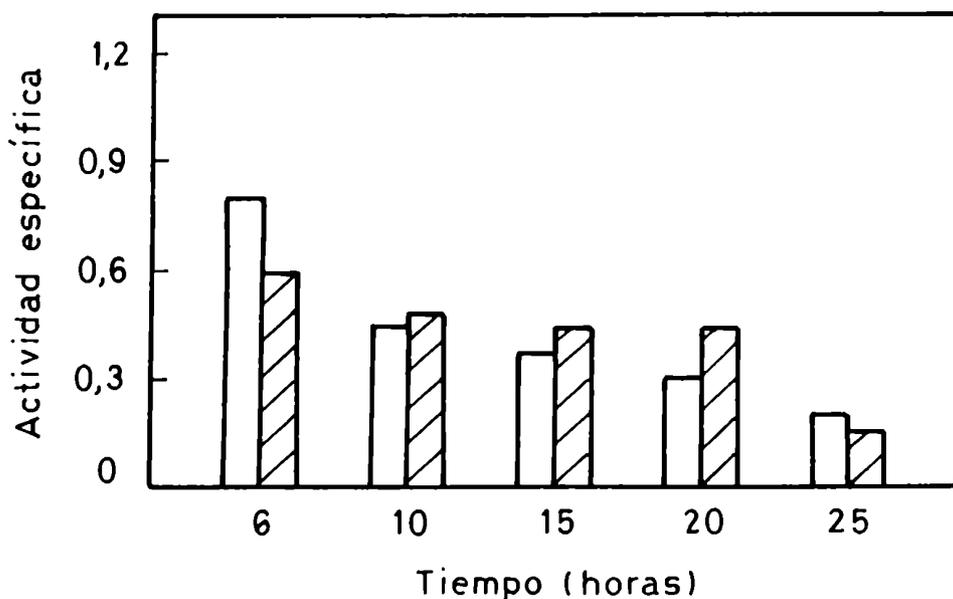


FIGURA VI.1.: Actividad de ALA-S de células crecidas en YPD en función del tiempo de crecimiento. (□) Ceba D27; (▨) cepa D27/C6. Las células se dejaron crecer durante distintos tiempos. La metodología empleada y el sistema de incubación se detallan en Materiales y Métodos.

Por otra parte, cuando las células crecieron en YPet la actividad del ALA-S en función de las horas de crecimiento fue muy diferente para las dos cepas en estudio (Figura VI.2.). En ambos casos, la actividad es máxima en la etapa temprana del crecimiento; en el caso de la cepa normal, disminuye rápidamente, haciéndose indetectable a partir de las 20 horas de crecimiento. En cambio, en la mutante la actividad de ALA-S se mantiene alta y prácticamente invariable por 25 horas.

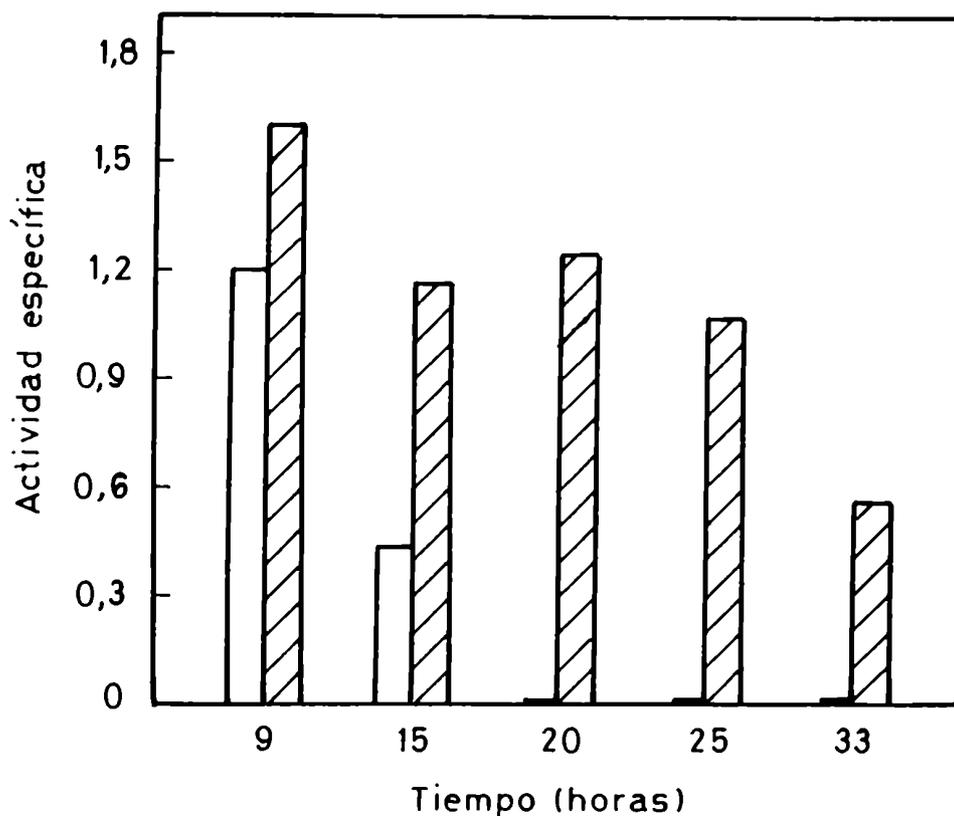


FIGURA VI.2.: Actividad de ALA-S de células crecidas en YPEt en función del tiempo de crecimiento. (□) Cepa D27; (▨) cepa D27/C6. Las células se dejaron crecer durante distintos tiempos. La metodología empleada y el sistema de incubación se detalla en Materiales y Métodos.

Al comparar los valores de actividad en células crecidas en YPD y en YPEt, se encontró que el ALA-S parece ser también sensible a la represión por glucosa, hallazgos que concuerdan con los obtenidos por Borralho y col. (1989).

Los resultados encontrados para el ALA-S de las dos cepas y en ambos medios indicaron claramente que la mutación

presente en la cepa D27/C6 puede solamente expresarse cuando las células crecen en una fuente de carbono no fermentable.

VI.2. ACTIVIDAD DE ALA-DEHIDRASA

VI.2.1. Método más apropiado para su determinación

En la literatura se encuentran descritos varios sistemas de incubación de ALA-D de levaduras que difieren marcadamente entre sí (Labbe-Bois y Volland, 1977; Borralho y col., 1983). Por lo tanto, con el objeto de determinar el método más sensible para detectar actividad de ALA-D en nuestro organismo se ensayaron diversos sistemas. Los mismos contenían 0,5 ml de sobrenadante (5 - 10 mg proteína/ml), ALA 5 mM y se llevó hasta un volumen final de 1 ml con los siguientes buffers: i) fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4; ii) glicina-NaOH 0,2 M pH 9,4 y iii) Tris-HCl 0,05 M pH 7,8.

Los tres sistemas se incubaron a 30 °C, 37 °C y 45 °C durante distintos tiempos y se midió la cantidad de PBG y de porfirinas formados.

Los sobrenadantes provenían de células crecidas durante 25 horas (fase tardía exponencial) en un medio de crecimiento YPD. En este medio, el ALA-D se encuentra reprimida (represión por catabolito). De esta manera, el sistema seleccionado nos debería permitir detectar actividades muy bajas de esta enzima.

Los resultados obtenidos de muestran en las Tablas VI.1. y VI.2. Se observa que las actividades específicas del ALA-D fueron mayores cuando se empleó buffer Tris-HCl en el sistema de incubación, a las tres temperaturas y en los diferentes tiempos.

Se debe destacar que en tiempos cortos de incubación

no se detectó formación de porfirinas; sin embargo, cuando la incubación fue de 2 horas, la cantidad de porfirinas acumuladas fue importante.

TABLA VI.1.: Actividad de ALA-D de la cepa D27.

BUFFER	TIEMPO (minutos)				
	30		60		120
	TEMPERATURA (°C)				
	30	37	30	37	37
Fosfato de sodio	0,47	0,29	0,43	0,52	0,20
Glicina-NaOH	0,24	0,16	0,34	0,13	0,16
Tris-HCl	0,53	0,48	0,84	0,58	0,41

La actividad de ALA-D se determinó durante distintos tiempos, a diferentes temperaturas y utilizando 3 buffers de incubación (fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4; glicina-NaOH 0,2 M pH 9,4; y Tris-HCl 0,05 M pH 7,8).

En consecuencia, se eligió como sistema más apropiado para determinar actividad de ALA-D aquel que contiene sobrenadante, buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8 y ALA 5 mM final; la incubación se realizó durante 1 hora a 30 °C.

Los niveles de actividad de ALA-D en levaduras así como también en otros organismos donde se postula un rol regulatorio para esta enzima (Menon y Shemin, 1967; Ebbon y Tait, 1969;

Muthukrishnan y col., 1972; Paveto y col., 1989) son varias veces más bajos que los valores hallados para la enzima de otras fuentes (Fukuda, 1988).

TABLA VI.2.: Actividad de ALA-D de la cepa D27 medida a 45 °C.

BUFFER	TIEMPO (minutos)		
	5	10	20
Fosfato de sodio	0,26	0,26	0,24
Glicina-NaOH	0,13	0,14	0,22
Tris-HCl	0,24	0,46	0,36

La incubación se realizó durante distintos tiempos y utilizando buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4; glicina-NaOH 0,2 M pH 9,4 y Tris-HCl 0,05 M pH 7,8.

VI.2.2. Actividad de ALA-Dehidrasa en función del crecimiento

Se midieron actividad de ALA-D, ALA intracelular (ALA_i) y contenido de glucosa en el medio durante el crecimiento (4 - 30 horas) de las cepas D27 y D27/C6.

Los perfiles obtenidos a partir de células crecidas en medio YPD (Figura VI.3.) fueron similares para ambas cepas. A las 8 - 10 horas de crecimiento, cuando la glucosa extracelular se consumió casi totalmente, el ALA-D alcanza su valor mínimo;

luego va aumentando hasta llegar a su pico máximo a las 25 horas, y posteriormente vuelve a los niveles iniciales.

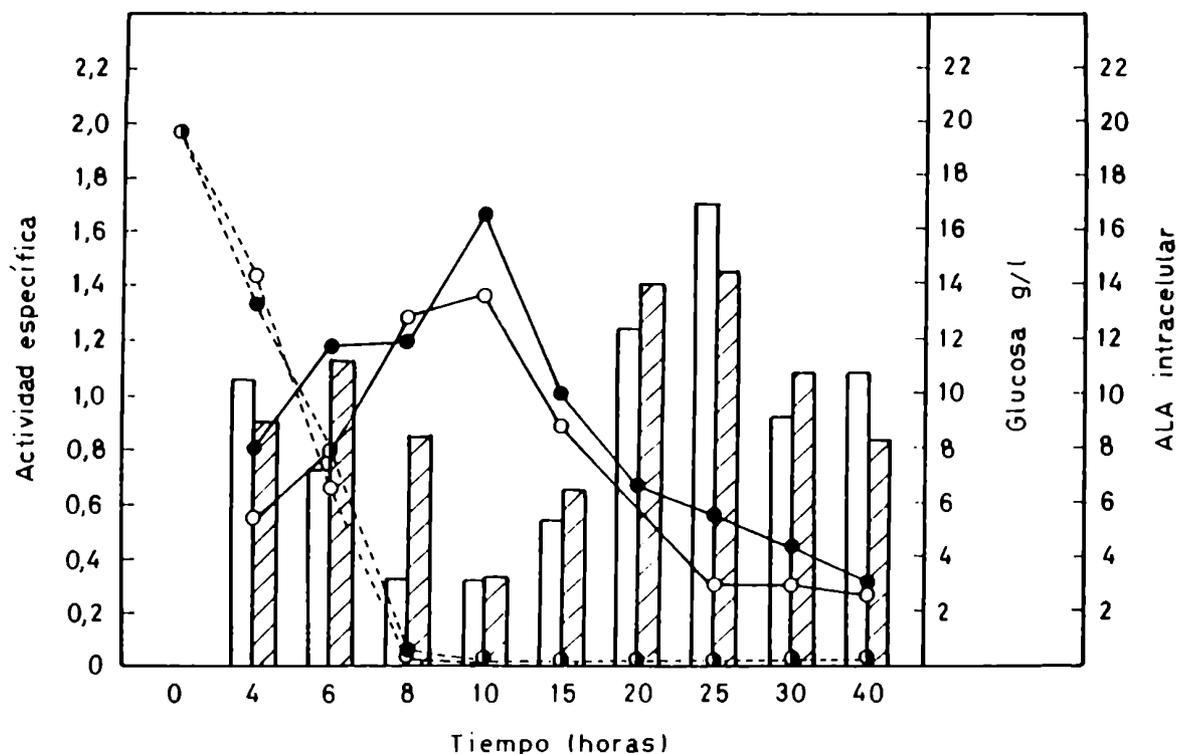


FIGURA VI.3.: Actividad de ALA-D (□, ▨), ALA intracelular (—) y glucosa remanente (---) en células crecidas en YPD, en función del tiempo de crecimiento. (□, ○—○, ○---○): Cepa D27; (▨, ●—●, ●---●): cepa D27/C6.

Se determinó actividad de ALA-D según se detalla en Materiales y Métodos.

También se observa que el ALA_i sufre una serie de cambios opuestos a las variaciones halladas en la actividad de ALA-D. Así, durante las primeras horas, la concentración de ALA_i se va incrementando hasta un valor máximo, cercano al momento en el cual la glucosa se agota y el ALA-D presenta un mínimo. Luego, cuando las células entran en la fase estacionaria

y la actividad de ALA-D comienza a aumentar nuevamente, el ALA_i disminuye.

Por otra parte, en medio YPEt, la respuesta de las cepas *D27* y *D27/C6* fue muy diferente (Figura VI.4.). Se encontró que el ALA-D de la cepa normal aumenta 3 veces hasta las 15 horas, permaneciendo invariable durante 15 horas más y retornando a los niveles iniciales de actividad a las 40 horas. Concomitantemente, la concentración de ALA_i se mantiene prácticamente constante durante todo el período ensayado. En cambio, la actividad de ALA-D en la cepa mutante, después de alcanzar su máximo entre las 9 y 15 horas, disminuye marcadamente hasta un valor 3 veces menor que el inicial. Como era de esperar, el contenido de ALA_i no se modificó durante las primeras 20 horas pero luego comienza a aumentar abruptamente alcanzando su máximo a las 30 horas, coincidente con el mínimo de actividad de ALA-D.

Estos resultados mostraron entonces, una clara relación inversa entre actividad de ALA-D y el contenido de ALA_i .

Los perfiles encontrados para la cepa normal fueron similares a los ya descriptos por otros autores (Labbe-Bois y Volland, 1977; Mattoon y col., 1978).

Es interesante destacar que los valores máximos de actividad de ALA-D en células de levadura crecidas en YPEt son 3 - 4 veces mayores que los hallados en la fase de de-represión de células crecidas en YPD (25 horas de crecimiento). Estos datos sugieren que el metabolismo de células crecidas a expensas del etanol acumulado en la fase fermentativa del crecimiento es diferente al metabolismo de células que crecen en un medio conteniendo una fuente de carbono no fermentable como el etanol. Estos resultados están de acuerdo con los descriptos por Perlman y Mahler (1974).

Asimismo, se debe remarcar que en medio YPD, tanto bajo condiciones de represión como de de-represión, las cepas *D27* y *D27/C6* se comportan de igual manera, como si la mutación

HEM R⁺ no se expresara en este medio. En cambio, el comportamiento de las dos cepas es muy diferente en medio YPEt, en el cual se expresa el fenotipo característico de la cepa mutante D27/C6.

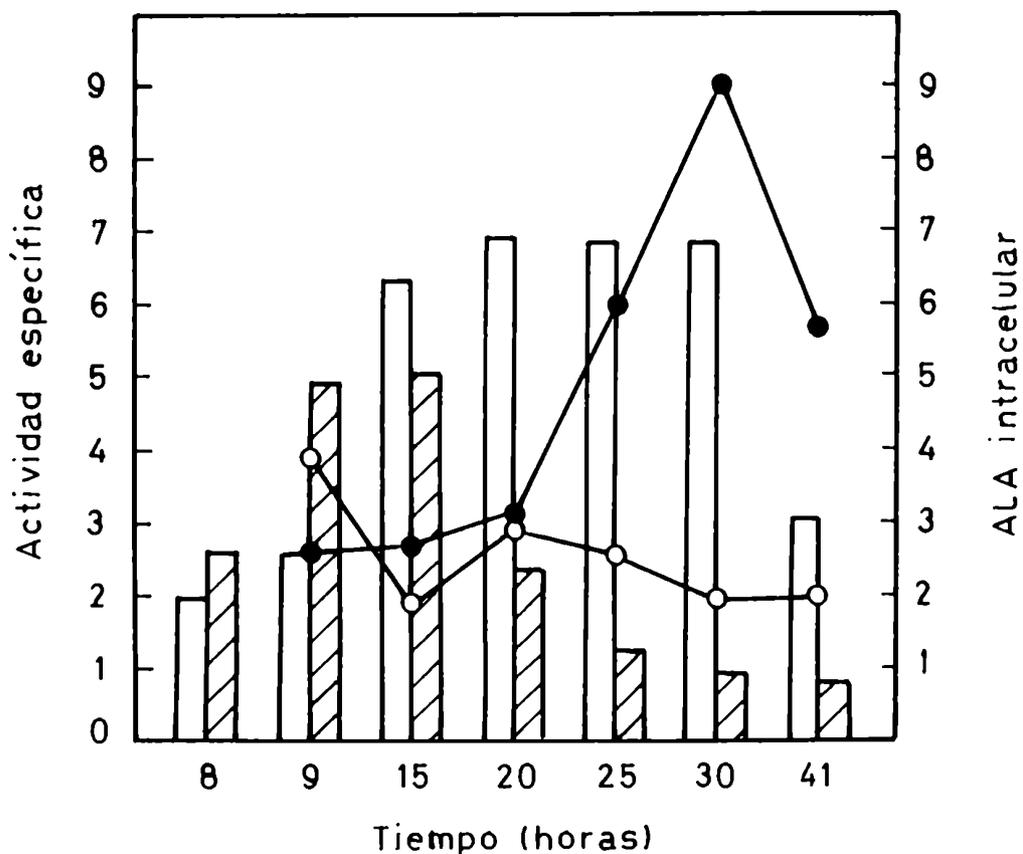


FIGURA VI.4.: Actividad de ALA-D y ALA intracelular en células crecidas en YPEt en función del tiempo de crecimiento.

(□ , ○) Cepa D27; (▨ , ●) cepa D27/C6
 (□ , ▨) Actividad de ALA-D; (○ , ●) ALA_i
 El sistema de incubación y la metodología empleados se detallan en Materiales y Métodos.

VI.3. INTERRELACION ENTRE ACTIVIDADES ENZIMATICAS Y ALA INTRACELULAR

Se pudo observar una clara interrelación entre las actividades de ALA-S, ALA-D y el contenido de ALA_i de las células de las 2 cepas crecidas tanto en medio YPD como en YPEt. Así, un aumento del ALA_i está precedido por una elevada actividad de ALA-S y además está acompañado por una disminución paralela de la actividad del ALA-D.

El hecho de que los valores de ALA-S de la cepa D27/C6 (HEM R⁺) se hayan mantenido altos durante todo el crecimiento en medio YPEt podría explicar el aumento de la concentración de citocromos que caracteriza a esta mutante cuando se hace crecer en presencia de una fuente de carbono no fermentable. Al llegar al estado estacionario, cuando las necesidades por hemo disminuyeron, el camino parece estar regulado por una inhibición del ALA-D, reduciendo así la conversión de ALA en PBG y porfirinas. Por ende se podría postular, que ya sean los citocromos u otra molécula relacionada con ellos podrían actuar inhibiendo la actividad de ALA-D, lo cual explicaría la acumulación de ALA_i.

Por lo tanto, la mutación HEM R⁺ podría producir una desregulación del ALA-S y así su actividad permanecería elevada durante la mayor parte del ciclo de vida.

También se debe remarcar que las cepas normal y mutante muestran perfiles diferentes de actividades de ALA-S y ALA-D y del contenido de ALA_i durante el ciclo, cuando crecen sobre una fuente de carbono no fermentable.

Estos resultados aportan evidencias adicionales en favor de las ideas que asignan un rol regulatorio tanto para el ALA-S como para el ALA-D, en la síntesis de porfirinas en levaduras.

VI.4. ACTIVIDAD DE PBG-DEAMINASA

Para investigar si la PBG-Deaminasa posee un rol regulatorio en el camino metabólico de las porfirinas, se determinó la variación de la actividad de esta enzima en las cepas D27 y D27/C6, durante el crecimiento en los medios YPD e YPet. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras VI.5. y VI.6..

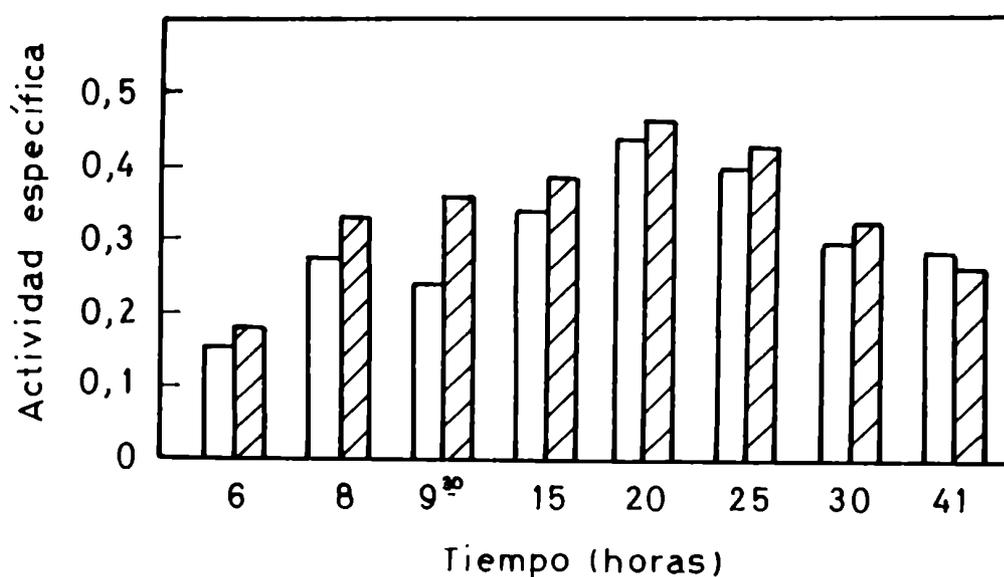


FIGURA VI.5.: Actividad de PBG-Deaminasa de células crecidas en YPD en función del tiempo de crecimiento. (□) Cepa D27; (▨) cepa D27/C6
El sistema de incubación y la metodología empleados se detallan en Materiales y Métodos.

En ambos medios de crecimiento, los perfiles de actividad en función del tiempo son similares para las dos cepas, indicando que la mutación HEM R⁺ no tendría aparentemente un efecto directo sobre la medición de la actividad de la PBG-Deaminasa.

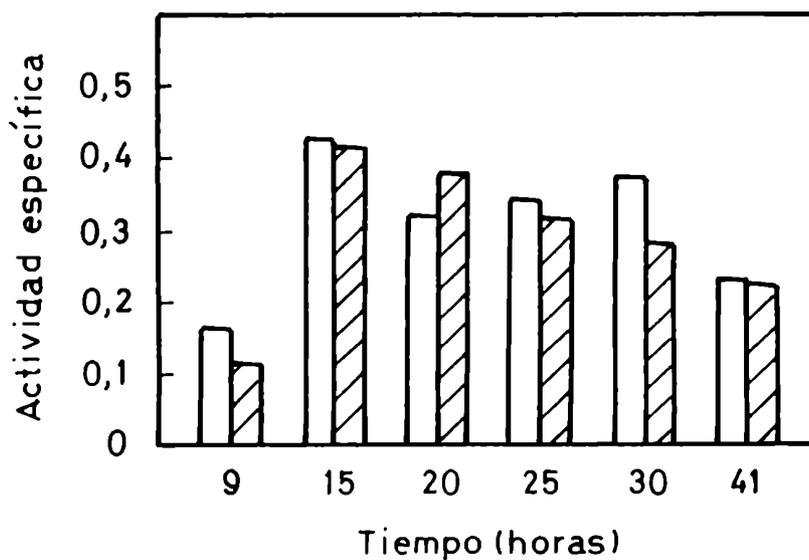


FIGURA VI.6.: Actividad de PBG-Deaminasa de células crecidas en YPEt en función del tiempo de crecimiento.
 (□) Cepa D27; (▨) cepa D27/C6
 El sistema de incubación y la metodología empleados se describen en Materiales y Métodos.

Por otro lado, los valores de actividad enzimática correspondientes a células crecidas en YPD o en YPEt no difieren marcadamente, con lo cual la PBG-Deaminasa no parecería estar sometida a regulación por catabolito.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las levaduras poseen características que las hacen excelentes modelos experimentales eucarióticos; sin embargo, *presentan* el inconveniente de tener una rígida pared celular que dificulta el trabajo con estos organismos. Por ello, el primer paso de este estudio fue determinar el método de ruptura celular más apropiado y optimizar las condiciones del mismo. Cuando las células suspendidas en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,8 se sonicaron en presencia de arena durante 2 minutos en una amplitud de 12 μ , se logró una efectiva extracción de proteínas activas.

La enzima PBG-Deaminasa ha sido estudiada en numerosas fuentes: sin embargo, poco se conoce acerca de sus propiedades y su mecanismo de acción en *Saccharomyces cerevisiae*. Por este motivo, se llevaron a cabo estudios con el objeto de determinar tanto las propiedades de esta enzima como las condiciones óptimas para medir su actividad, en las cepas *D27* y *D27/C6* (HEM R⁺). La *D27* es una cepa normal en la síntesis del hemo mientras que la mutante se caracteriza por sintetizar una cantidad elevada de citocromos, cuando crece en presencia de una fuente carbono no fermentable.

En primer lugar se observó que la PBG-Deaminasa de levaduras es una enzima citosólica.

La actividad de esta enzima no se vio afectada por la atmósfera de incubación.

El estudio de la concentración de proteínas sobre la PBG-Deaminasa mostró un incremento lineal tanto en la formación de porfirinas como en el consumo de PBG. En ambos casos, se llegó a un plateau, aunque el mismo se alcanzó a una concentración proteica menor cuando se analizó el consumo de sustrato.

Por otra parte, al variar el tiempo de incubación se

observó un aumento lineal en la formación de porfirinas mientras que el PBG consumido alcanzó muy rápidamente un plateau.

El pH óptimo de la reacción se halló en el rango 7,5 - 7,9 en buffer Tris-HCl.

Además, se encontró que la enzima proveniente de ambas cepas es relativamente inestable al calor.

Por último, la PBG-Deaminasa se comportó como una enzima típicamente michaeliana, presentando gráficos de inversas lineales y valores de n de Hill cercanos a 1. Los K_m estimados fueron 19 μM y 17 μM para las cepas D27 y D27/C6, respectivamente.

Con estos resultados, no se pudo justificar el fenotipo de la cepa HEM R⁺ ya que no se encontraron diferencias significativas entre los valores de actividad y las propiedades de la PBG-Deaminasa de las dos cepas en estudio. Sin embargo, no se puede descartar que, *in vivo*, existan diferencias entre cepas en algunas de estas propiedades y que, cambios producidos durante la liberación de la enzima al medio libre de células impidan detectarlas.

Con el fin de purificar la PBG-Deaminasa de *S. cerevisiae*, se realizaron algunos ensayos preliminares. En principio se estudió el efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento sobre la enzima, encontrándose que el tratamiento a 55 °C durante 5 minutos es el óptimo ya que aumentó la actividad específica sin pérdida de unidades enzimáticas. Luego, se determinó que la actividad de PBG-Deaminasa se concentró en un estrecho rango de saturación con sulfato de amonio (45 - 60 %). Como última etapa de la purificación parcial de la enzima, se empleó una columna de filtración por gel (Sephadex G-100 superfino). De esta manera, se purificó la PBG-Deaminasa de las cepas D27 y D27/C6 80 y 30 veces, respectivamente. Si bien el grado de purificación obtenido fue bajo en comparación al conseguido para esta enzima de otras fuentes, se debe tener en cuenta

que este es el pimer trabajo de purificación de la PBG-Deaminasa de levaduras.

El PM de la enzima, purificada en presencia de un inhibidor de proteasas (PMSF), fue de 30 KDa para ambas cepas.

También se determinaron otras propiedades de la PBG-Deaminasa parcialmente purificada de las cepas D27 y D27/C6. Se observó que los iones sodio y potasio inhiben a la enzima muy débilmente, mientras que los iones magnesio lo hacen con mayor intensidad. Por otra parte, iones tales como mercurio (II), plomo (II) y cadmio (II) inhiben completamente la actividad enzimática probablemente debido a su unión con grupos tiólicos esenciales de la enzima.

Al estudiar el efecto de hidroxilamina y amonio sobre la PBG-Deaminasa de levaduras se observó que la hidroxilamina inhibe tanto la formación de porfirinas como el consumo de PBG, mientras que, inesperadamente, el amonio no mostró ningún efecto.

Para investigar la presencia de grupos sulfhidrilos y disulfuros esenciales en la PBG-Deaminasa de levaduras, se midió actividad enzimática empleando diferentes compuestos que interactúan específicamente con tales grupos. Se observó que reactivos alquilantes de grupos sulfhidrilos, un agente oxidante de grupos tioles y reactivos que reaccionan con grupos disulfuro afectan la formación de porfirinas ejerciendo escaso efecto sobre el consumo de sustrato. También se encontró que agentes reductores y protectores de grupos sulfhidrilos no modifican la actividad enzimática. Por ende, si bien la PBG-Deaminasa de levaduras es una enzima típicamente sulfhdrílica, no requiere la presencia de grupos protectores para manifestar su actividad.

La enzima de levadura tampoco parece requerir la presencia del cofactor exógeno folato.

Por otra parte, es interesante destacar que del análisis de los distintos pasajes por Sephadex G-100 de la

PBG-Deaminasa de las cepas *D27* y *D27/C6*, purificada en ausencia y presencia de PMSF, surge que el comportamiento cromatográfico de esta enzima fue muy diferente entre dichas cepas. Así, para la cepa normal *D27* se observó una única forma enzimática de PM 30 KDa que sufre proteólisis dando una forma de PM 20 KDa. En cambio, para la cepa *D27/C6*, los resultados mostraron dos formas enzimáticas con actividad de PBG-Deaminasa (30 KDa y 10 KDa), siendo la especie de bajo peso molecular mucho más susceptible a la acción de las proteasas.

Este comportamiento diferencial de la enzima en las cepas *D27* y *D27/C6* pudo correlacionarse con la presencia de la mutación HEM R⁺ mediante un estudio cromatográfico paralelo de la enzima en dos segregantes: *DW10-2C* (normal) y *DW10-2A* (HEM R⁺). Se encontró que los perfiles de elución en Sephadex G-100 de los segregantes normal y mutante son semejantes a los de las cepas *D27* y *D27/C6*, respectivamente. La actividad *in vivo* de las diferentes formas enzimáticas encontradas podrían ser la causa de la síntesis aumentada de citocromos en las cepas portadoras de la mutación HEM R⁺, si bien estos hallazgos no justifican claramente el fenotipo observado en las cepas mutantes.

También resultó de interés establecer el mecanismo de acción de la PBG-Deaminasa de levaduras. Con este objeto se realizaron una serie de pasajes de la enzima purificada en ausencia y presencia del inhibidor de proteasas (PMSF), preincubada o no con PBG, a través de una columna de intercambio aniónico.

Para las dos cepas, se observaron perfiles de elución de porfirinas formadas poco reproducibles, probablemente ocasionados por los muy bajos valores de actividad hallados, cuando la enzima sembrada en DEAE-celulosa se purificó en ausencia de PMSF y no se preincubó con PBG. En cambio, los perfiles fueron sumamente definidos, hallándose un único pico de actividad en ambas cepas, al incluir PMSF durante todos los pasos de purificación seguidos. Por lo tanto, los resultados indicaron que este

inhibidor de proteasas protege efectivamente a la PBG-Deaminasa de la degradación proteolítica. Además, teniendo en cuenta que la actividad enzimática de cada cepa eluyó a una fuerza iónica diferente, se pudo postular que se trata de proteínas con distinta carga.

Sin embargo, estos hallazgos no permiten descartar la posibilidad de que *in vivo* existan complejos intermediarios enzima-(sustrato)₁₋₄, ya que los procedimientos empleados durante la purificación podrían provocar su disociación.

Luego la enzima, purificada en ausencia y presencia de PMSF, se preincubó con PBG antes de ser sembrada en la columna de DEAE-celulosa. Se observaron, en todos los casos, 3 picos (I, II y III) con actividad enzimática. En primer término, se puede concluir que el sustrato PBG ejerce un efecto protector sobre la enzima. Además, el pico I corresponde, aparentemente, a la enzima nativa y a la enzima-monopirrol, el pico II a la enzima-dipirrol y el pico III a la enzima-tripirrol y, quizás también, a la enzima-tetrapirrol.

Por otra parte, se realizaron estudios con el objeto de esclarecer la regulación del camino biosintético de las porfirinas en la cepa normal D27 y su mutante D27/C6 (HEM R⁺). Para ello se determinaron las actividades de las enzimas ALA-Sintetasa, ALA-Dehidrasa y PBG-Deaminasa, en diferentes estados fisiológicos y en medios de crecimiento con fuentes de carbono fermentable y no fermentable.

Se observó que las actividades de ALA-Sintetasa, ALA-Dehidrasa, PBG-Deaminasa y el contenido de ALA intracelular durante el ciclo celular, no variaron entre las dos cepas cuando las células crecieron en medio YPD. En cambio, las cepas normal y mutante mostraron perfiles muy diferentes de actividades de ALA-Sintetasa, ALA-Dehidrasa y de contenido de ALA intracelular en función del tiempo de crecimiento, cuando crecieron sobre una fuente de carbono no fermentable (YPEt). Sin embargo,

no se encontraron diferencias en el caso de la PBG-Deaminasa. Estos hallazgos apoyarían el rol regulatorio postulado tanto para el ALA-Sintetasa como para el ALA-Dehidrasa en el camino biosintético de las porfirinas en levaduras.

Además, se observó que las dos primeras enzimas de este camino sufren represión por catabolito, mientras que la PBG-Deaminasa no está sujeta a este tipo de represión.

Finalmente, los resultados hallados para el ALA-Sintetasa, el ALA-Dehidrasa y el ALA intracelular de las cepas D27 y D27/C6 en ambos medios mostraron claramente que la mutación HEM R⁺ presente en la cepa D27/C6 se expresa únicamente cuando las células crecen en una fuente de carbono no fermentable. También podría postularse que dicha mutación produce una desregulación del ALA-Sintetasa que mantiene su actividad elevada durante la mayor parte del ciclo celular, lo cual explicaría la cantidad elevada de citocromos que caracteriza a la mutación HEM R⁺.

De esta manera, se estableció que la mutación HEM R⁺ está relacionada con la presencia de dos formas enzimáticas con actividad de PBG-Deaminasa así como también con una desregulación del ALA-Sintetasa. Estas características permitirían explicar la cantidad elevada de citocromos que se sintetiza en las mutantes HEM R⁺, si bien no se descarta la posibilidad de que otras modificaciones contribuyan con la expresión de esta mutación.

En este trabajo se caracterizó y purificó la PBG-Deaminasa de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual presentó propiedades muy similares a las de la enzima proveniente de otros organismos. Por otra parte, se determinó que esta enzima no posee un rol regulatorio en el camino biosintético de las porfirinas en

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Ades, I.Z. & Harpe, K.G. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9329.
- Afonso, S.G.; Chinarro, S.; Stella, A.M.; Batlle, A.M. del C; Lenczner, M.J. & Magnin, P.H. (1985) Rev. Arg. Dermatol. 66, 12.
- Alefounder, P.R.; Abell, C. & Battersby, A.R. (1988) Nucleic Acids Res. 16, 9871.
- Alwan, A.F. & Jordan, P.M. (1988) Biochem. Soc. Trans. 16, 965.
- Anderson, P.M. & Desnick, R.J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6924.
- Anderson, P.M. & Desnick, R.J. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1993.
- Andrews, P. (1964) Biochem. J. 91, 222.
- Andrews, P. (1965) Biochem. J. 96, 595.
- Aragonés, A.; García, R.C.; San Martín de Viale, L.C.; Tomio, J.M. & Grinstein, M. (1972) Anales Asoc. Quim. Arg. 60, 239.
- Araujo, L.S.; Lombardo, M.E.; Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1987) Rev. Arg. Microbiol. 19, 109.
- Araujo, L.S.; Lombardo, M.E.; Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1989) Comp. Biochem. Physiol. 92B, 297.
- Arrese, M.; Carvajal, E.; Robinson, S.; Sambunaris, A.; Panek, A. & Mattoon, J.R. (1983) Curr. Genet. 7, 175.
- Bard, M.; Woods, R. & Haslam, J. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 324.
- Barreiro, O.L.C. de (1967) Biochim. Biophys. Acta 139, 479.
- Batlle, A. (1968) Ciencia e Investigación 24 (6), 242.
- Batlle, A. & Grinstein, M. (1962) Latin. Am. Meeting Chem., 8th, Buenos Aires, Abstr., p. 107.
- Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1964 a) Biochim. Biophys. Acta 82, 1.
- Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1964 b) Biochim. Biophys. Acta 82, 13.

- Batlle, A. & Rimington, C. (1965) *Ciencia e Investigación* 22, 369.
- Batlle, A.M. del C. & Stella, A.M. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 861.
- Batlle, A.; Benson, A. & Rimington, C. (1965) *Biochem. J.* 97, 731.
- Batlle, A.M. del C.; Ferramola, A.M. & Grinstein, M. (1967) *Biochem. J.* 64, 80.
- Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M.; Ferramola, A.M.; Sopena, Y.; Wider de Xifra, E.A. & Sancovich, H.A. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 401.
- Batlle, A.M. del C.; Magnin, P.H. & Wider, E.A. (1981) *Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, Clínica y Tratamiento.* EUDEBA.
- Battersby, A.R.; Baldas, J.; Collins, J.; Grayson, D.; James, K. & Mc Donald, E. (1972) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1265.
- Battersby, A.; Fookes, C.; Matcham, G.; Mc Donald, E. & Gustafson-Potter, K. (1979 a) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 316.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Matcham, G.W.J. & Mc Donald, E. (1979 b) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 539.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Gustafson-Potter, K.E.; Mc Donald, E. & Matcham, G.W.J. (1982) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 2427.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Matcham, G.W.J.; Mc Donald, E. & Hollenstein, R. (1983 a) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1, 3031.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Hart, G.J.; Matcham, G.W.J. & Pandey, P.S. (1983 b) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1, 3041.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R. & Pandey, P.S. (1983 c) *Tetrahedron* 39, 1919.
- Beaumont, C.; Grandchamp, B.; Bogard, M.; De Verneuil, H. & Nordmann, Y. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 882, 384.

- Beaupain, D.; Eléouët, J.F. & Romeo, P.H. (1990) *Nucleic Acid Res.* 18 (22), 6509.
- Berry, A. & Jordan, P. (1981) *Biochem. Soc. Trans.* 9 (3), 231.
- Bevan, D.R.; Bodlaender, P. & Shemin, D. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2030.
- Bilinski, T.; Litwinska, J.; Lukaskiewicz, J.; Rytka, J.; Simon, M. & Labbe-Bois, R. (1981) *J. Gen. Microbiol.* 122, 79.
- Bishop, D.F. & Desnick, R.J. (1982) *Enzyme* 28, 91.
- Bogorad, L. (1958 a) *J. Biol. Chem.* 233, 501.
- Bogorad, L. (1958 b) *J. Biol. Chem.* 233, 510.
- Bogorad, L. (1962 a) en "Methods in Enzymology" (Eds. S.F. Colowick y N.O. Kaplan), Vol. 5, p. 885. Academic Press, N.Y.
- Bogorad, L. (1962 b) en "Physiology and Biochemistry of Algae" (Ed. P.A. Lewis), p. 385. Academic Press, N.Y.
- Bogorad, L. (1963) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 104, 676.
- Borralho, L.M.; Panek, A.D.; Malamud, D.R.; Sanders, H.K. & Matton, J.R. (1983) *J. Bacteriol.* 156, 141.
- Borralho, L.M.; Malamud, D.R.; Panek, A.D.; Tenan, M.N.; Oliveira, D.E. & Matton, J.R. (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135, 1217.
- Borralho, L.M.; Ortiz, C.H.; Panek, A.D. & Mattoon, J.R. (1990) *Yeast* 6, 319.
- Borthwick, J.A.; Srivastava, G.; Day, A.R.; Pirola, B.A.; Snoswell, M.A.; May, B.K. & Elliot, W.H. (1985) *Eur. J. Biochem.* 150, 481.
- Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248.
- Brenner, D.A. & Bloomer, J.R. (1980) *Clin. Chem. Acta* 100, 259.
- Brent, R. (1985) *Cell* 42, 3.
- Briggs, D.W.; Condie, L.W.; Sedman, R.M. & Tephly, T.R. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4996.
- Brown, R.; Elder, G.H. & Urquhart, A.J. (1984) *Biochem. Soc. Trans.* 13, 1227.

- Burnham, B.F. & Lascelles, J. (1963) *Biochem. J.* 87, 462.
- Burton, G.; Fagerness, P.; Hosozawa, S.; Jordan, P.M. & Scott, I. (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 202.
- Calissano, P.; Cartasegna, C. & Bonsignore, D. (1965) *Lav. Um.* 17, 493.
- Camadro, J.M. & Labbe, P. (1981) *Biochimie* 63, 463.
- Camadro, J.M. & Labbe, P. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 707, 280.
- Camadro, J.M. & Labbe, P. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11675.
- Camadro, J.M.; Urban-Grimal, D. & Labbe, P. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 724.
- Camadro, J.M.; Ibrahim, N.G. & Levere, R.D. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 5678.
- Camadro, J.M.; Abraham, N.G. & Levere, R.D. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 242, 206.
- Camadro, J.M.; Chambon, H.; Jolles, J. & Labbe, P. (1986) *Eur. J. Biochem.* 156, 579.
- Camadro, J.M.; Matringe, M.; Scalla, R. & Labbe, P. (1991) *Biochem. J.* 277, 17.
- Cánepa, E. (1987) Tesis Doctoral, UBA.
- Carvajal, E.; Panek, A.D. & Matton, J.R. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 2855.
- Clark-Walker, G.D.; Rittenberg, B. & Lascelles, J. (1967) *J. Bacteriol.* 94, 1648.
- Clement, R.; Kohashi, M. & Piper, W.N. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 214 (2), 657.
- Condie, L.; Baron, J. & Tephly, T.R. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 172, 123.
- Cookson, G.H. & Rimington, C. (1954) *Biochem. J.* 57, 476.
- Cornford, P. (1964) *Biochem. J.* 91, 64.
- Cornford, P. & Benson, J. (1963) *J. Chromatogr.* 10, 141.
- Creusot, F.; Verdière, J.; Gaisne, M. & Slonimski, P.P. (1988) *J. Mol. Biol.* 204, 263.

- Cumsky, M.G.; Trueblood, C.E.; Ko, C. & Poyton, R.O. (1987) *Mol. Cell Biol.* 7, 3511.
- Cheh, A. & Neilands, J.B. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 1060.
- Chretien, S.; Dubart, A.; Beaupain, D.; Raich, N.; Grandchamp B.; Rosa, J.; Goossens, M. & Romeo, P.H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6.
- Christenson, W.R.; Reddy, V.R. & Piper, W.N. (1986) *Life Sci.* 38, 1679.
- Dailey, H.A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 14714.
- Dailey, H.A. & Fleming, J.E. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11453.
- Davies, R.C. & Neuberger, A. (1973) *Biochem. J.* 133, 471.
- De Bonis, A.; Rossetti, M.V. & Battle, A. (1992) *Int. J. Biochem.* (en prensa).
- Despaux, N.; Comoy, E.; Bohuon, C. & Boudene, C. (1979) *Biochimie* 61, 1021.
- De Verneuil, H.; Grandchamp. B. & Nordmann. Y. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 611, 174.
- De Verneuil, H.; Sassa, S. & Kappas, A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2454.
- Deybach, J.C.; Da Silva, V.; Grandchamp. B. & Nordmann, Y. (1985) *Eur. J. Biochem.* 149, 431
- Dresel, E. & Falk, J.E. (1953) *Nature* 172, 1185.
- Ebbon, J.G. & Tait, G.H. (1969) *Biochem. J.* 111, 573.
- Elder, G.H. (1977) *Semin. Hematol.* 14, 227.
- Elder, G.H. & Evans, O. (1978) *Biochem. J.* 172, 345.
- Elder, G.H.; Tovey, J.A. & Sheppard, D.M. (1983) *Biochem. J.* 215, 45.
- Elliot, K.R. & Tipton, K.F. (1974) *Biochem. J.* 141, 789.
- Evans, J.N.S.; Fagerness, P.E.; Mackenzie, N.E. & Scott, A.I. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* 106, 5738.
- Evans, J.N.S.; Burton, G.; Fagerness, P.E.; Mackenzie, N.E. & Scott, A.I. (1986) *Biochemistry* 25, 905.

- Felix, F. & Brouillet, N. (1990) Eur. J. Biochem. 188, 393.
- Finelli, V.N.; Klauder, D.S.; Karaffa, M. & Petering, H.G. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 303.
- Fischer, H. (1929) Naturwiss. 17, 611.
- Fischer, H. & Orth, H. (1934) en "Die Chemie des Pyrrols I." Akadem. Verlagsgesell-Schaft, Leipzig, Photostatic. Editions Ann. Arbor Univ. Press 1946 y Johnson Reprint Corp. New York 1968.
- Frydman, R.B. & Feinstein, G. (1974) Biochim. Biophys. Acta 350, 358.
- Frydman, R.B. & Frydman, B. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 136, 193.
- Fukuda, H. (1988) Tesis Doctoral, UBA.
- Fumagalli, S.; Kotler, M.; Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1985) Int. J. Biochem. 17 (4), 485.
- Fumagalli, S.F.; Kotler, M.L.; Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1991) Z. Naturforsch 46c, 1101.
- Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1969) Porphirins et Porphiries. Biochimie et Clinique (Ed. Masson y Co.).
- García, R.C.; San Martín de Viale, L.C.; Tomio, J.M. & Grinstein, M. (1973) Biochim. Biophys. Acta 309, 203.
- Gellerfors, P.L.; Saltzgaber-Müller, J. & Douglas, M.G. (1986) Biochem. J. 240, 673.
- Gibbs, P.N.B.; Chaudhry, A.G. & Jordan, P.M. (1985) Biochem. J. 230, 25.
- Gibson, K.; Lever, E. & Neuberger, A. (1958) Biochem. J. 70, 71.
- Goffeau, A. & Vassarotti, A. (1991) Res. Microbiol. 142, 901.
- Gokhman, I. & Zamir, A. (1990) Nucleic Acids Res. 18, 6130.
- Gollub, E.G.; Liu, K.P.; Dayan, J.; Adlersberg, M. & Sprinson, D.B. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2846.
- Grandchamp, B.; De Verneuil, H.; Beaumont, C.; Chretien, S.; Walter, O. & Nordmann, Y. (1987) Eur. J. Biochem. 162, 105.
- Granick, S. (1954) Science 120, 1105.

- Granick, S. & Beale, S.I. (1978) Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol. 46, 33.
- Granick, S. & Bogorad, L. (1953) J. Am. Chem. Soc. 75, 3610.
- Granick, S. & Mauzerall, D. (1958) J. Biol. Chem. 232, 1119.
- Granick, S. & Sassa, S. (1971) en "Metabolic Regulation" (Ed. H. Vogel), vol. 5, p. 77. Academic Press, N.Y.
- Granick, J.L.; Sassa, S.; Granick, S.; Levere, R.D. & Kappas, A. (1973) Biochem. Med. 8, 149.
- Guarente, L. (1984) Cell 36, 799.
- Guarente, L. (1988) Cell 2, 303.
- Guarente, L. & Mason, T. (1983) Cell 32, 1279.
- Guarente, L. & Ptashne, M. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2199.
- Guarente, L.; Lalonde, B.; Gifford, P. & Alani, E. (1984) Cell 36, 503.
- Gunge, N.; Sugimura, T. & Terasaki, M. (1967) Genetics 37, 243.
- Hädener, A.; Alefounder, P.R.; Hart, G.J.; Abell, C. & Battersby, A.R. (1990) Biochem. J. 271, 487.
- Haldi, M. & Guarente, L. (1989) J. Biol. Chem. 264, 17107.
- Hamilton, B.; Hofbauer, R. & Ruis, H. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7609.
- Hanson, J. & Dailey, H. (1984) Biochem. J. 222, 695.
- Harbin, B.M. & Dailey, H. (1985) Biochemistry 24, 366.
- Hart, G.J. & Battersby, A.R. (1985) Biochem. J. 232, 151.
- Hart, G.J.; Leeper, F.J. & Battersby, A.R. (1984) Biochem. J. 222, 93.
- Hart, G.J.; Abell, C. & Battersby, A.R. (1986) Biochem. J. 240, 273.
- Hart, G.J.; Miller, A.D.; Leeper, F.J. & Battersby, A.R.J. (1987) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1762.
- Hart, G.J.; Miller, A.D. & Battersby, A. (1988) Biochem. J. 252, 909.

- Hart, G.J.; Miller, A.D.; Beifuss, U.; Leeper, F.J. & Battersby, A.R. (1990) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1, 1979.
- Hay, R.; Böhni, P. & Gasser, S. (1984) *Biochem. Biophys. Acta* 779, 65.
- Hayashi, N.; Yoda, B.; Kikuchi, G. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 83.
- Hayashi, N.; Watanabe, N. & Kikuchi, G. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 700.
- Hemler, M.; Lands, W.E.M.; Smith, W.L. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 5575.
- Higuchi, M. & Bogorad, L. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244, 401.
- Hoare, D.S. & Heath, H. (1959) *Biochem. J.* 73, 679.
- Hodge, M.R.; Kim, G.; Singh, K. & Cumsy, M.G. (1989) *Mol. Cell Biol.* 9, 1958.
- Hörtnner, H.; Ammerer, G.; Hartter, E.; Hamilton, B.; Rytka, J.; Bilinski, T. & Ruis, H. (1982) *Eur. J. Biochem.* 128, 179.
- Jackson, A.H. & Games, D.E. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 244, 591.
- Jackson, A.H.; Games, D.E.; Couch, P.; Jackson, J.R.; Belcher, R.B. & Smith, S.G. (1974) *Enzyme* 17, 81.
- Jackson, A.H.; Ferramola, A.M.; Sancovich, H.A.; Evans, N.; Matlin, S.A.; Ryder, D.J. & Smith, S.G. (1976 a) *Ann. Clin. Res.* 8, 64.
- Jackson, A.H.; Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Evans, N.; Games, D.E.; Matlin, S.A.; Elder, G.H. & Smith, S.G. (1976 b) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 273, 191.
- Jackson, A.H.; Nagaraja Rao, K.R.; Supphayen, D.M. & Smith, S.G. (1977) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 696.
- Jackson, A.H.; Elder, G.H. & Smith, S.G. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 877.
- Jackson, A.; Jones, D.; Philip, G.; Lash, T.; Battle, A. & Smith, S. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 681.

- Jackson, A.H.; Lertwanawatana, W.; Pandey, R.K. & Rao, K.R.N. (1989) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 374.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 435.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1976) Biochim. Biophys. Acta 449, 1.
- Jacobs, F. & Monod, J. (1961) Symp. Quant. Biol. 26, 193.
- Jayaraman, J.; Padmanaban, G.; Malathi, K. & Sarma, P.S. (1971) Biochem. J. 121, 531.
- Jones, M.S. & Jones, O.T.G. (1969) Biochem. J. 113, 507.
- Jones, C.; Jordan, P.M. & Akhtar, M. (1984) J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 11, 2625.
- Jordan, P.M. & Berry, A. (1980) FEBS Lett. 112 (1) 86.
- Jordan, P.M. & Berry, A. (1981) Biochem. J. 195, 177.
- Jordan, P.M. & Seehra, J.S. (1979) FEBS Lett. 104, 364.
- Jordan, P.M. & Seehra, J. (1980) FEBS Lett. 114, 283.
- Jordan, P.M. & Shemin, D. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1019.
- Jordan, P.M. & Warren, M.J. (1987) FEBS Lett. 225, 87.
- Jordan, P.M. & Woodcock, S.C. (1991) Biochem. J. 280, 445.
- Jordan, P.M.; Burton, G.; Norlov, H.; Schneider, M.; Pryde, L. & Scott, I. (1979) J. Chem. Soc. Chem. Commun, 204.
- Jordan, P.M.; Thomas, S.D. & Warren, M.J. (1988 a) Biochem. J. 254, 427.
- Jordan, P.M.; Warren, M.J.; Williams, H.J.; Stolowich, N.J.; Roessner, C.A.; Grant, S.K. & Scott, A.I. (1988 b) FEBS Lett. 235, 189.
- Jordan, P.M.; Mgbeje, B.I.A.; Thomas, S.D. & Alwan, A.F. (1988 c) Biochem. J. 249, 613.
- Juknat de Geralnik, A.A.; Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1981) Int. J. Biochem. 13, 343.
- Juknat, A.A.; Doernemann, D. & Senger, H. (1988 a) Z. Naturforsch 43c, 351.
- Juknat, A.A.; Doernemann, D. & Senger, H. (1988 b) Z. Naturforsch 43c, 357.

- Kappas, A.; Sassa, S. & Anderson, K.E. (1983) en "Metabolic Basis of Inherited Diseases", 5ta. ed. (Eds. J. Stanbury, J. Wyngaarden; D. Fredrickson, J. Goldstein y M. Brown), cap. 60, p. 1301.
- Kardish, R.M. & Woods, J.S. (1980) J. Appl. Biochem. 2, 159.
- Karst, F. & Lacroute, F. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 741.
- Kawanishi, S.; Seki, Y. & Sano, A. (1983) J. Biol. Chem. 258, 4285.
- Keng, T. & Guarente, L. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 9113.
- Keng, T.; Alani, E. & Guarente, L. (1986) Mol. Cell. Biol. 6, 355.
- Kikuchi, G.; Kumar, A.; Fahmage, P. & Shemin, D. (1958) J. Biol. Chem. 233, 1214.
- Kohashi, M.; Clement, R.P.; Tse, J. & Piper, W.N. (1984) Biochem. J. 220, 755.
- Komai, H. & Neilands, J.B. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 124, 456.
- Koopmann, G.E.; Juknat de Gernalnik, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1986) Int. J. Biochem. 18, 935.
- Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1987 a) Comp. Biochem. Physiol. 87B, 601.
- Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A. (1987 b) Int. J. Biochem. 19, 981.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A.; Correa García, S.R. & Batlle, A. (1988 a) Med. Sci. Res. 16, 323.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A.; Correa García, S.R.; Princ, F. & Batlle, A. (1988 b) Med. Sci. Res. 16, 983.
- Kreutzer, M.; Schmidt, M.; Stadler, E. & Zeitler, H.J. (1977) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1081.
- Kurlandzka, A. & Rytka, J. (1985) J. Gen. Microbiology, 131, 2909.

- Kurlandzka, A.; Zoladek, T.; Rytka, J.; Labbe-Bois, R. & Urban-Grimal, D. (1988) *Biochem. J.* 253, 109.
- Kurlandzka, A.; Zoladek, T.; Rytka, J. & Labbe-Bois, R. (1991) *BJ Lett.* 273, 246.
- Kurtz, M.D. & Murrinan, J. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 217, 47.
- Labbe, P. (1971) *Biochimie* 53, 1001.
- Labbe, P.; Volland, C. & Chaix, P. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 159, 527.
- Labbe, P.; Dechateaubodeau, G. & Labbe-Bois, R. (1972) *Biochimie* 54, 513.
- Labbe, P.; Camadro, J.M. & Chambon, H. (1985) *Anal. Biochem.* 149, 248.
- Labbe-Bois, F. & Hubbard, N. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 52, 130.
- Labbe-Bois, F. & Nielsen, L. (1976) en "Porphyrins in Human Diseases" (Ed. M. Doss), p. 141. Karger, Basel.
- Labbe-Bois, R. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 7278.
- Labbe-Bois, R. & Labbe, P. (1978) en "Biochemistry and Genetics of Yeast" (Eds. M. Bacilla, B. Horecker y A.O.M. Stoppani), p. 97. Academic Press, N.Y.
- Labbe-Bois, R. & Volland, C. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 565.
- Labbe-Bois, R.; Urban-Grimal, D.; Volland, C.; Camadro, J.M. & Dehoux, P. (1983) en "Mitochondria 1983 - Nuclear Mitochondrial Interactions" (Eds. R.J. Schweyen, K. Wolf y F. Kaudewitz), p. 523. Gruyter, Berlín.
- Labbe-Bois, R.; Brouillet, N.; Camadro, J.M.; Chambon, H.; Felix, F.; Labbe, P.; Rytka, J.; Simon-Casteras, M.; Urban-Grimal, D.; Volland, C. & Zagorec, M. (1986) en "Porphyrins and Porphyrins" (Ed. Y. Nordmann), vol. 134, p. 15. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd.
- Lander, M.; Pitts, A.R.; Alefounder, P.R.; Bardy, D.; Abell, C. & Battersby, A.R. (1991) *Biochem. J.* 275, 447.

- Lascelles, J. (1964) en "Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation" (Ed. W.A. Benjamín). Inc. New York, Amsterdam.
- Laz, T.M.; Pietras, D.F. & Sherman, F. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4475.
- Lockwood, W.H. & Benson, A. (1960) Biochem. J. 75, 372.
- Lockwood, W.H. & Rimington, C. (1957) Biochem. J. 67, 8.
- Lowry, C.V. & Lieber, R.H. (1986) Mol. Cell. Biol. 6, 4145.
- Lowry, C.V. & Zitomer, R.S. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6129.
- Lowry, C.V. & Zitomer, R.S. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 4651.
- Luo, J. & Lim, C.K. (1990) Biochem. J. 268, 513.
- Llambías, E. (1976) Int. J. Biochem. 7, 33.
- Llambías, E. & Batlle, A. (1971 a) Biochem. J. 121, 327.
- Llambías, E. & Batlle, A. (1971 b) Biochim. Biophys. Acta 227, 180.
- Llambías, E.; Locascio, G.A. & Batlle, A.M. del C. (1971) An. Asoc. Quim. Arg. 59, 271.
- Mahler, H.R. & Lin, C.C. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 963.
- Mahler, H.R. & Lin, C.C. (1978) J. Bacteriol. 135, 54.
- Malamud, D.R.; Borralho, L.M.; Panek, A.D. & Mattoon, J.R. (1979) J. Bacteriol. 138, 799.
- Malamud, D.R.; Padrão, G.R.B.; Borralho, L.M.; Arrese, M.; Panek, A.D. & Mattoon, J.R. (1983) Braz. J. Med. Biol. Res. 16, 203.
- Margolis, F.L. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 145, 373.
- Marks, G.; Mc Cluskey, S.; Mackie, J.; Riddick, D. & James, C. (1988) FASEB J. 2, 2774.
- Marquardt, H. (1962) Z. Naturforsch 17b, 689.
- Marver, H.; Tschudy, D.P.; Perlroth, M. & Collins, A. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2803.
- Mathewson, J.H. & Corwin, A.H. (1961) J. Am. Chem. Soc. 83, 135.

- Matringe, M.; Camadro, J.M.; Labbe, P. & Scalla, R. (1989 a) *Biochem. J.* 260, 231.
- Matringe, M.; Camadro, J.M.; Labbe, P. & Scalla, R. (1989 b) *FEBS Lett.* 245, 35.
- Mattoon, J.R.; Malamud, D.R.; Brunner, A.; Braz, G.; Carvajal, E.; Lancashire, W.E. & Panek, A.D. (1978) en " *Biochemistry and Genetics of Yeast*" (Eds. M. Bacilla, B. Horecker y A.O.M. Stoppani), p. 317. Academic Press, N.Y.
- Mattoon, J.R.; Carvajal, E. & Guthrie, D. (1990) *Curr. Genet.* 17, 179.
- Mauzerall, D. & Granick, S. (1956) *J. Biol. Chem.* 219, 435.
- Mauzerall, D. & Granick, S. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 1141.
- Mazanowska, A.M.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1966) *Biochem. J.* 98, 117.
- Mazzetti, M.B. & Tomio, J.M. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 957, 97.
- Mc Kay, R.; Druyan, R.; Getz, G.S. & Rabinowitz, M. (1969) *Biochem. J.* 114, 455.
- Mehta, K.D. & Smith, M. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 8670.
- Meisler, M.; Wanne, L.; Eddy, R.E. & Shows, J.B. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 170.
- Menon, I.A. & Shemin, D. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 304.
- Mignotte, V. ; Eléouët, F.; Raich, N. & Romeo, P.H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6548.
- Miller, A.D.; Hart, G.J.; Packman, L.C. & Battersby, A.R. (1988) *Biochem. J.* 254, 915.
- Miller, A.D.; Leeper, F.J. & Battersby, A.R. (1989 a) *J. Chem. Soc. Perkin Trans* 1, 1943.
- Miller, A.D.; Packman, L.C.; Hart, G.J.; Alefounder, P.R.; Abell, C. & Battersby, A.R. (1989 b) *Biochem. J.* 262, 119.
- Miyake, S. & Sugimura, T. (1968) *J. Bacteriol.* 96, 1997.
- Miyake, S.; Yoshihisa, I.; Minaka, N.; Sugimura, R. & Ohsumi, M. (1972) *J. Bacteriol.* 109, 409.

- Miyagi, K.; Kaneshima, M.; Kawakani, J.; Nakada, F.; Petryka, Z.J. & Watson, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6172.
- Moore, D. & Labbe, R. (1964) Clin. Chem. 10, 1105.
- Mukerji, S.K. & Pimstone, N.R. (1992) Int. J. Biochem. 24, 105.
- Muthukrishnan, S.; Padmanaban, G. & Sarma, P.S. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4241.
- Muthukrishnan, S.; Malati, K. & Padmanaban, G. (1972) Biochem. J. 129, 31.
- Myers, A.M.; Crivellone, M.D.; Koerner, T.J. & Tzagoloff, A. (1987) J. Biol. Chem. 262, 16822.
- Nakakuki, M.; Yamauchi, K.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1738.
- Nandi, D.L. & Shemin, D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 1231.
- Nandi, D.L. & Waygood, E.R. (1967) Can. J. Biochem. 45, 327.
- Navone, N.; Afonso, S.; Polo, C. & Batlle, A. (1992) Comp. Biochem. Physiol. 102B, 87
- Neuberger, A. (1980) Int. J. Biochem. 12, 787.
- Neuberger, A. & Scott, J.J. (1953) Nature 172, 1093.
- Noriega, G.O.; Juknat, A.A. & Batlle, A. (1992) Z. Naturforsch 47c, 416.
- Ohashi, A. & Kikuchi, G. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 178, 607.
- Ohashi, A. & Sinohara, H. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 370.
- Ohashi, A.; Gibson, J.; Gregor, I. & Schatz, G. (1982) J. Biol. Chem. 257, 13042.
- Padmanaban, G.; Venkateswar, V. & Rangarajan, P.M. (1989) TIBS 14, 492.
- Paterniti, J.R. & Beattie, D.S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6112.
- Patton, G.M. & Beattie, D.S. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4467.
- Paveto, C.; Passeron, S.; Stella, A.M. & Batlle, A. (1989) Comp. Biochem. Biophys. 94B, 635.

- Perlman, P.S. & Mahler, H.R. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 162, 248.
- Peters, P.G.; Sharma, M.L.; Hardwicke, D.M. & Piper, W. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 201, 88.
- Pfeifer, K.; Arcangioli, B. & Guarente, L. (1987 a) Cell 49, 9.
- Pfeifer, K.; Prezant, T. & Guarente, L. (1987 b) Cell 49, 19.
- Pfeifer, K.; Kwang-Soo, K.; Kogan, S. & Guarente, L. (1989) Cell 56, 291.
- Piper, W.N. & Van Lier, R.B.L. (1977) Mol. Pharmacol. 13, 1126.
- Piper, W.N.; Condie, L.W. & Tephly, T.R. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 159, 671.
- Piper, W.N.; van Lier, R.B.L.; Ríos, G. & Tephly, T.R. (1976) Life Sci. 19, 1225.
- Pluscec, J. & Bogorad, L. (1970) Biochemistry 9, 4736.
- Polakis, E.S. & Bartley, W. (1965) Biochem. J. 97, 284.
- Polakis, E.S.; Bartley, W. & Meek, G.A. (1964) Biochem. J. 90, 369.
- Polakis, E.S.; Bartley, W. & Meek, G.A. (1965) Biochem. J. 97, 298.
- Polo, C.; Stella, A.; Wider, E.; Battle, A.; Lenczner, J.; Altuna, C. & Magnin, P. (1983) Prensa Med. Arg. 70, 433.
- Pollack, S. & Russel, C. (1978) FEBS Lett. 90 (1), 47.
- Porra, R.J. & Falk, J.G. (1964) Biochem. J. 90, 69.
- Porra, R.J. & Jones, O.T.G. (1963 a) Biochem. J. 87, 181.
- Porra, R.J. & Jones, O.T.G. (1963 b) Biochem. J. 87, 186.
- Porra, R.J.; Vitols, K.S.; Labbe-Bois, R. & Newton, N.A. (1967) Biochem. J. 104, 221.
- Poulson, R. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3730.
- Poulson, R. & Polglase, W. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6367.
- Poulson, R. & Polglase, W. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1269.
- Prezant, T.; Pfeifer, K. & Guarente, L. (1987) Mol. Cell Biol. 7, 3252.

- Radmer, R. & Bogorad, L. (1972) *Biochemistry* 11, 904.
- Raich, N.; Romeo, P.; Dubart, A.; Beaupain, D.; Cohen-Solal, M.; & Goossens, M. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14 (15), 5955.
- Resnick, M.; & Mortimer, R. (1966) *J. Bacteriol.* 92, 597.
- Rimington, C. (1955) *Endeavour* 14, 126.
- Rimington, C. (1958) *Rev. Pure and Appl. Chem.* (Royal Australian Chemical Institute) 8, 129.
- Rimington, C. (1960) *Biochem. J.* 75, 260.
- Rimington, C.; & Sveinsson, S. (1950) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2, 209.
- Ríos de Molina, M. del C.; Wainstok de Calmanovici, R.; Grinstein, M. & San Martín de Viale, L.C. (1980) *Clin. Chim. Acta* 108, 447.
- Ríos de Molina, M. del C.; Billi, S.; Wainstok de Calmanovici, R. & San Martín de Viale, L.C. (1984) *Acta Physiol. Pharmacol. Lationaomer.* 34, 55.
- Romeo, G. & Levin. E.Y. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 230, 330.
- Romeo, P.H.; Raich, N.; Dubart, A.; Beaupain, D.; Pryor, M.; Kushner, J.; Cohen-Solal, M. & Goossens, M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9825.
- Rose, A.H. & Harrison, J.R. (1989) en "The Yeasts" (2da. Ed.) (Eds. A.H. Rose y J.R. Harrison), vol. 1, cap. 1, p. 1. Academic Press, London y N.Y.
- Rosé, S.; Frydman, R.B.; de los Santos, C.; Sburlati, A.; Valasinas, A. & Frydman, B. (1988) *Biochemistry* 27, 4871.
- Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 277.
- Rossetti, M.V.; Juknat, A.A.; Kotler, M.; Fumagalli, S. & Batlle, A. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 761.
- Rossetti, M.V.; Araujo, L.S.; Lombardo, M.E.; Correa García, S.R. & Batlle, A.M. del C. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* 87B, 593.
- Rossetti, M.V.; Juknat, A.A. & Batlle, A. (1989) *Z. Naturforsch* 44c, 578.

- Russell, C. & Rockwell, P. (1980) FEBS Lett. 116 (2) 99.
- Russell, C.; Pollack, S. & James, J. (1984) Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 43, 1545.
- Rytka, J.; Bilinski, T. & Labbe-Bois, R. (1984) Biochem. J. 218, 405.
- Saltzgaber-Müller, J. & Schatz, G. (1978) J. Biol. Chem. 253, 305.
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1969 a) Biochim. Biophys. Acta 191, 130.
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1969 b) FEBS Lett. 3, 223.
- Sancovich, H.; Ferramola, A.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1970) en "Methods in Enzymology" (Eds. Tabor y Tabor), vol. 17, p. 220. Academic Press, N.Y.
- Sancovich, H.; Ferramola, A.M.; Batlle, A.; Kivilevich, A. & Grinstein, M. (1976) Acta Physiol. Latinoam. 26, 379.
- Sanders, H.K.; Mied, P.A.; Briquet, M.; Hernández Rodríguez, J.; Gottal, R.F. & Mattoon, J.R. (1973) J. Mol. Biol. 80, 17.
- San Martín de Viale, L.C. & Grinstein, M. (1968) Biochim. Biophys. Acta 158, 79.
- San Martín de Viale, L.C.; Ríos de Molina, M. del C.; Wainstock de Calmanovici, R. & Tomio, J.M. (1976 a) Int. Porphyrin Meet. 1st. 445.
- San Martín de Viale, L.C.; Tomio, J.M.; Ferramola, A.M.; Sancovich, H.A. & Tigier, H. (1976 b) Int. Porphyrin Meet. 1st., 453.
- Sano, S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5276.
- Sano, S. & Granick, S. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1173.
- Sasarman, A.; Nepveu, A.; Echelard, Y.; Dymetryszyn, J.; Drolet, M.; Goyer, C. (1987) J. Bacteriol. 169, 4257.
- Sassa, S. & Kappas, A. (1981) en "Advances in Human Genetics" (Ed. Harris-Hirschhorn), vol. 1, p. 121. Plenum Press, New York.
- Sassa, S. & Granick, S. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 517.

- Sawada, H.; Takeshita, M.; Sugita, Y. & Yoneyama, Y. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 178, 145.
- Schatz, G. & Butow, R.A. (1984) *Cell* 32, 316.
- Schwencke, J. (1989) en "The Yeast" (2da. Ed.) (Eds. A.H. Rode y J.R. Harrison), vol. 4, cap. 8, p. 347.
- Scott, A.I.; Roessner, C.A.; Stolowich, N.J.; Karuso, P.; Williams, H.J.; Grant, S.K.; Gonzalez, M.D. & Hoshino, T. (1988 a) *Biochemistry* 27, 7984.
- Scott, A.I.; Stolowich, N.J.; Williams, H.J.; González, M.D.; Roessner, C.A.; Grant, S.K. & Fichon, C. (1988 b) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 5898.
- Scott, A.I.; Clemens, K.R.; Stolowich, N.J.; Santander, P.J.; González, M.D. & Roessner, C.A. (1989) *FEBS Lett.* 242, 319.
- Seehra, S. & Jordan, P.M. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* 102, 6841.
- Sharif, A.L.; Smith, A.G. & Abell, C. (1989) *Eur. J. Biochem.* 184, 353.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1945) *J. Biol. Chem.* 159, 567.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1946) *J. Biol. Chem.* 166, 621.
- Shemin, D. & Rittenberg, J. (1951) *J. Biol. Chem.* 192, 315.
- Shemin, D. & Russel, C.S. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4873.
- Sherman, F. & Stewert, J.W. (1971) *Annu. Rev. Genet.* 5, 257.
- Shibata, H. & Ochiai, H. (1976) *Plant & Cell Physiol.* 171, 281.
- Shioi, Y.; Nagamine, M.; Kuroki, M. & Sasa, T. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 616, 300.
- Sinclair, P.R. & Granick, S. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244, 509.
- Sinclair, P.; Gibbs, A.H.; Sinclair, J.F. & De Matteis, F. (1979) *Biochem. J.* 178, 529.
- Sledziewski, A.; Rytka, J.; Bilinski, T.; Hörtnner, H. & Ruis, H. (1981) *Curr. Genet.* 4, 19.
- Sluiters-Scholten, C.M.T.; van der Berg, F.M. & Stegwee, D. (1973) *Pflanzenphysiol.* 69, 217.
- Smith, A.G. & Francis, J.E. (1979) *Biochem. J.* 183, 455.

- Smith, S.F.; Ferramola, A.M.; Sancovich, H.A.; Evans, N.; Matlin, S.A.; Ryder, D.J. & Jackson, A.H. (1976) *Ann. Clin. Res.* 8, 89.
- Smythe, E. & Williams, D.S. (1988) *Biochem. J.* 251, 237.
- Spevak, W.; Hartig, A.; Meindl, P. & Ruis, H. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 203, 73.
- Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Brooker, J.D.; May, B.K. & Elliot, W.H. (1983 a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110, 23.
- Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Brooker, J.D.; Wallace, J.C., May, B.K. & Elliot, W.H. (1983 b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 344.
- Stark, W.M.; Baker, M.G.; Raithby, P.R.; Leeper, F.J. & Battersby, A.R. (1985) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1294.
- Stark, W.M.; Hart, G.J. & Battersby, A.R. (1986) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 465.
- Stark, W.M.; Baker, M.G.; Leeper, F.J.; Raithby, P.R. & Battersby, A.R. (1988) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1, 1187.
- Stella, A.M. (1977) Tesis Doctoral, UBA.
- Struhl, K. (1987) *Cell* 49, 295.
- Taira, M.C. & San Martín de Viale, L.C. (1984) *Enzyme* 31, 79.
- Tait, G.H. (1972) *Biochem. J.* 128, 1159.
- Taketani, S. & Tokunaga, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12748.
- Taketani, S. & Tokunaga, R. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 443.
- Taketani, S.; Tanaka-Yoshioka, A.; Masaki, R.; Tashiro, Y. & Tokunaga, R. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 883, 277.
- Thomas, S.D. & Jordan, P.M. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 6215.
- Tiglier, H.A.; Battlle, A.M. del C. & Locascio, G. (1970) *Enzymologia* 38, 43.
- Tofilon, P.J. & Piper, W.N. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 104.
- Tomio, J. & Grinstein, M. (1968) *Eur. J. Biochem.* 6, 80.
- Tomio, J.M.; García, R.C.; San Martín de Viale, L.C. & Grinstein, M. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 198, 353.

- Trueblood, C.E.; Wright, R.M. & Poyton, R.O. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8, 4537.
- Tsai, S.F.; Bishop, D.F. & Desnick, R.J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 1268.
- Tsai, S.F.; Bishop, D.F. & Desnick, R.J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7049.
- Tschudy, D.P.; Marver, H.S. & Collins, A. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 480.
- Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 570, 167.
- Tyrell, D.L. & Marks, G. (1972) *Biochem. Pharmacol.* 21, 2077.
- Urban-Grimal, D. & Labbe-Bois, R. (1980) *Mol. Gen. Genet.* 183, 85.
- Urban-Grimal, D. & Labbe-Bois, R. (1981) *Mol. Gen. Genet.* 178, 713.
- Urban-Grimal, D.; Volland, C.; Garnier, T.; Dehoux, P. & Labbe-Bois, R. (1986) *Eur. J. Biochem.* 156, 511.
- Vázquez, E.S.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 721.
- Vázquez, E.S. (1984) Tesis Doctoral, UBA.
- Verdière, J.; Gaisne, M. & Labbe-Bois, R. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 228, 300.
- Volland, C. & Felix, F. (1984) *Eur. J. Biochem.* 142, 551.
- Wang, A.L.; Arredondo-Vega, F.X.; Giampietro, P.F.; Smith, M.; Anderson, W.F. & Desnick, R.J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5734.
- Warburg, O. & Christian, W. (1941) *Biochem. Z.* 310, 384.
- Warren, M.J. & Jordan, P.M. (1988 a) *Biochem. Soc. Trans.* 16, 963.
- Warren, M.J. & Jordan, P.M. (1988 b) *Biochemistry* 27, 9020.
- Watanabe, N.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 377.
- Wetmur, J.G.; Bishop, D.F.; Pantelmo, C. & Desnick, R.J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1059.

- Whiting, M.J. (1976) *Biochem. J.* 158, 391.
- Whiting, M.J. & Elliot, W.H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6818.
- Whiting, M.J. & Granick, S. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 1340.
- Wider de Xifra, E.A.; Sandy, J.D.; Davies, R. & Neuberger, A. (1976) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 273, 79.
- Wilson, E.L.; Burger, P.E. & Dowdle, E.B. (1972) *Eur. J. Biochem.* 29, 563.
- Williams, D. (1984) *Biochem. J.* 217, 675.
- Williams, D.; Morgan, G.; Mc Donald, E. & Battersby, A. (1981) *Biochem. J.* 193, 301.
- Winkler, H.; Adam, G.; Mattes, E.; Schanz, M.; Hartig, A. & Ruis, H. (1988) *EMBO J.* 7, 1799.
- Wolfson, S.J.; Bartczak, A. & Bloomer, J.R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 3543.
- Woods, J.S. (1974) *Mol. Pharmacol.* 10, 389.
- Woods, R.A.; Sanders, H.K.; Briquet, M.; Foury, F.; Drysdale, B.E. & Mattoon, J.R. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 9090.
- Wright, C.F. & Zitomer, R.S. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 4, 2023.
- Wu, W.H.; Shemin, D.; Richards, K.E. & Williams, R.C. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1767.
- Yamamoto, M.; Kure, S.; Engel, J.D. & Hiraga, K. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 15973.
- Yamauchi, K.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1980) *FEBS Lett.* 115, 15.
- Yoshinaga, T. & Sano, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4722.
- Yotsuyanagi, Y. (1962) *J. Ultrastruct. Res.* 7, 141.
- Zagorec, M. & Labbe-Bois, R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 2506.
- Zagorec, M.; Buhler, J.M.; Treich, I.; Keng, T.; Guarente, L. & Labbe-Bois, R. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 9718.
- Zaman, Z.; Abbond, M. & Akhtar, M. (1972) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1263.
- Zitomer, R.; Sellers, J.; Mc Carter, D.; Hastings, G.; Wick, R. & Lowry, C. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 5, 2521.

Buenos Aires, 11 de noviembre de 1992

Comisión de Doctorado
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires (UBA)

Doctorando: Lic. Susana Raquel Correa García

Tema de Tesis: "Estudios sobre la enzima PBG-Deaminasa en *Saccharomyces cerevisiae* y su rol en la regulación del camino biosintético de las porfirinas".

Director: Dra Alcira Batlle de Albertoni

INFORME DEL DIRECTOR

Introducción

La estructura tetrapirrólica de las porfirinas es la base química de compuestos esenciales para la vida, involucrados en los procesos fundamentales de respiración y fotosíntesis, a través del hemo y la clorofila, respectivamente. Los tetrapirroles también participan en otras reacciones metabólicas importantes como transportadores de electrones, energía y gases, oxidaciones biológicas, fijación de nitrógeno, etc.

Hoy día la secuencia de eventos enzimáticos que conducen a la biosíntesis de estos compuestos está muy

documentada y se ha comprobado que es prácticamente idéntica en todos los organismos y tejidos estudiados.

Sin embargo, aún quedan por esclarecer varios aspectos acerca del mecanismo de acción de las enzimas de este camino metabólico, así como de su regulación. Así, el estudio de la biosíntesis de hemo y su control en una célula eucariótica simple y bien conocida como la levadura puede contribuir, sin duda, a un mejor y más profundo conocimiento de esta vía metabólica. Además, mutantes de levadura, que presenten mutaciones en la síntesis del hemo, constituyen excelentes modelos experimentales para el esclarecimiento de aspectos concernientes a los mecanismos que controlan la formación de las porfirinas y sus precursores.

Se cuenta, entre otras, con dos cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*: la D27, normal para la síntesis de hemo, y su mutante D27/C6 (HemR⁺) cuya mutación se traduce en una síntesis aumentada de citocromos cuando crece en un medio con una fuente de carbono no fermentable.

En estas cepas, se realizó un estudio comparativo de la Porfobilinógeno Deaminasa. Esta enzima ha sido estudiada en numerosas fuentes; sin embargo, poco se conocía acerca de sus propiedades y su mecanismo de acción en *Saccharomyces cerevisiae*.

Por otra parte, teniendo en cuenta que se ha propuesto que, bajo ciertas condiciones la PBG-Deaminasa sería un segundo punto de regulación de la biosíntesis de las

porfirinas, se investigó asimismo si esta enzima podría tener o no capacidad regulatoria en levaduras.

Resultados y Conclusiones

Como se ha comentado, las levaduras poseen características que las hacen excelentes modelos experimentales eucarióticos; sin embargo, presentan el inconveniente de tener una rígida pared celular que dificulta el trabajo con estos organismos. Por ello, el primer paso de este estudio, fue determinar el método de ruptura celular más apropiado. Las condiciones óptimas resultaron de suspender las células en buffer Tris-HCl 50mM pH 7.8 y sonicarlas en presencia de arena durante 2 minutos en una amplitud de 12 μ .

Dijimos que, si bien la PBG-Deaminasa ha sido estudiada en numerosas fuentes, poco se conocía acerca de sus propiedades y mecanismo de acción en *Saccharomyces cerevisiae*. Por ello, se llevaron a cabo experiencias con el objeto de determinar tanto las propiedades de esta enzima como las condiciones óptimas para medir su actividad, en las cepas D27 y D27/C6 (Hem R+).

Se observó que la PBG-Deaminasa de levaduras es una enzima citosólica y su actividad no se afectó por la atmósfera de incubación.

Tanto la formación de porfirinas como el consumo de PBG mostró un incremento lineal en función de la concentración de proteínas.

Al estudiar el efecto del tiempo de incubación se observó un aumento lineal en la formación de porfirinas hasta tiempos más largos, mientras que el PBG consumido alcanzó muy rápidamente un plateau.

El pH óptimo de la reacción estuvo en el rango 7.5-7.9 en buffer Tris-HCl.

La enzima proveniente de ambas cepas es relativamente inestable al calor, contrariamente a lo que ocurre en la mayoría de las fuentes estudiadas.

Por último, la PBG-Deaminasa se comportó como una enzima típicamente michaeliana, presentando gráficos de inversas lineales y valores de n de Hill cercanos a 1. Los K_m fueron $19\mu\text{M}$ y $17\mu\text{M}$ para las cepas D27 y D27/C6, respectivamente.

Estos resultados, no justifican el fenotipo de la cepa Hem R⁺, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los valores de actividad y las propiedades de la PBG-Deaminasa de las dos cepas en estudio. Sin embargo, no se puede descartar que, *in vivo*, el comportamiento de la enzima en ambas cepas difiera y que, al liberar la enzima al medio, ocurran cambios que impidan detectar tales diferencias.

Con el fin de purificar la PBG-Deaminasa de *S. cerevisiae*, se realizaron algunos ensayos preliminares. Se

estudió el efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento sobre la enzima, encontrándose que el tratamiento a 55°C durante 5 minutos es el óptimo ya que se aumentó la actividad específica sin pérdida de unidades enzimáticas. La actividad de PBG-Deaminasa se concentró en un estrecho rango de saturación con sulfato de amonio (45-60%). Como última etapa de la purificación parcial de la enzima se empleó una columna de filtración por gel (Sephadex G-100 superfino). De esta manera, se purificó la PBG-Deaminasa de las cepas D27 y D27/C6 80 y 30 veces, respectivamente.

El PM de la enzima, purificada en presencia de un inhibidor de proteasas (PMSF), fue de 30 KDa para ambas cepas.

Con la PBG-Deaminasa parcialmente purificada de las cepas D27 y D27/C6 se determinaron otras propiedades. Se observó que los iones sodio y potasio inhiben ligeramente la enzima, en tanto que los iones magnesio lo hacen con mayor intensidad. Iones tales como mercurio (II), plomo (II) y cadmio(II) inhiben completamente por unión a grupos tiólicos esenciales de la enzima.

La hidroxilamina inhibe tanto la formación de porfirinas como el consumo de PBG, mientras que, contrariamente a lo esperado el amonio no mostró ningún efecto.

La presencia de grupos sulfhidrilos y disulfuros esenciales en la PBG-Deaminasa de levaduras se investigó

midiendo la actividad enzimática en presencia de diferentes reactivos específicos. Se observó que reactivos alquilantes de grupos sulfhidrilos, un agente oxidante de grupos tioles y reactivos que reaccionan con grupos disulfuro afectan la formación de porfirinas ejerciendo escaso efecto sobre el consumo de sustrato. Agentes reductores y protectores de grupos sulfhidrilos no modifican la actividad enzimática. Por ende, si bien la PBG-Deaminasa de levaduras es una enzima típicamente sulfhidrónica, no parece requerir la presencia de grupos protectores para expresar su actividad.

La enzima de levadura tampoco parece requerir la presencia del cofactor exógeno folato.

Por otra parte, es importante destacar que del análisis de los perfiles de elución por pasaje a través de Sephadex G-100 de la PBG-Deaminasa de las cepas D27 y D27/C6, purificada en ausencia y en presencia de PMSF, ha surgido que el comportamiento cromatográfico de esta enzima es muy diferente en dichas cepas. Así, para la normal D27 se observó una única forma enzimática de PM 30 KDa que sufre proteólisis produciendo una especie de PM 20 KDa. En cambio, para la cepa D27/C6 los resultados mostraron dos formas enzimáticas con actividad de PBG-Deaminasa (30 y 10 KDa), siendo la especie de bajo PM mucho más susceptible a la acción de las proteasas.

Este comportamiento diferencial de la enzima de las cepas D27 y D27/C6 pudo correlacionarse con la presencia de la mutación Hem R⁺ mediante un estudio cromatográfico

paralelo de la enzima de dos segregantes: DW10-2C (normal) y DW10-2A (Hem R⁺). Se encontró que los perfiles de elución en Sephadex G-100 de los segregantes normal y mutante son semejantes a los de las cepas D27 y D27/C6, respectivamente. La actividad *in vivo* de las diferentes formas enzimáticas encontradas podría ser la causa de la síntesis aumentada de citocromos en las cepas portadoras de la mutación Hem R⁺, si bien estos hallazgos no justifican aún claramente el fenotipo observado en las cepas mutantes.

Resultó de interés investigar el mecanismo de acción de la PBG-Deaminasa de levaduras. Para ello se realizaron una serie de pasajes de la enzima purificada en ausencia y presencia del inhibidor de proteasas (PMSF), preincubada o no con PBG, a través de una columna de intercambio aniónico.

Para las dos cepas, se observaron perfiles de elución de porfirinas formadas poco reproducibles, probablemente a causa de los valores de actividad muy bajos hallados, cuando la enzima sembrada en DEAE-celulosa se purificó en ausencia de PMSF y no se preincubó con PBG. En cambio, los perfiles fueron bien definidos, hallándose un único pico de actividad en ambas cepas, al incluir PMSF durante todos los pasos de purificación. Por lo tanto, los resultados indicaron que este inhibidor de proteasas protege efectivamente a la PBG-Deaminasa de la degradación proteolítica. Por otro lado, teniendo en cuenta que la actividad enzimática de cada cepa eluyó a una fuerza iónica diferente, se ha postulado que se trataría de proteínas con distinta carga.

Sin embargo, estos hallazgos no permiten descartar la posibilidad de que *in vivo* existan complejos intermediarios enzima-(sustrato)₁₋₄, ya que los procedimientos empleados durante la purificación podrían provocar su disociación.

La enzima, purificada en ausencia y presencia de PMSF, se preincubó luego con PBG, antes de ser sembrada en la columna de DEAE-celulosa. Se observaron, en todos los casos, tres picos (identificados como I, II y III) con actividad enzimática. En primer término se puede concluir que el sustrato PBG ejerce un efecto protector sobre la enzima. Además, el pico I corresponde, aparentemente a la enzima nativa y al complejo enzima-monopirrol, el pico II a la enzima-dipirrol y el pico III a la enzima-tripirrol y, quizás también, a la enzima-tetrapirrol.

Asimismo, se realizaron estudios con el objeto de esclarecer la regulación del camino biosintético de las porfirinas en la cepa normal D27 y su mutante D27/C6 (Hem R⁺). Para ello se determinaron las actividades de las enzimas ALA-Sintetasa, ALA-Dehidrasa y PBG-Deaminasa, en diferentes estados fisiológicos y en medios de crecimiento con fuentes de carbono fermentable y no fermentable.

Se observó que las actividades de ALA-Sintetasa, ALA-Dehidrasa, PBG-Deaminasa y el contenido de ALA intracelular durante el ciclo celular, no variaron entre las dos cepas cuando las células crecieron en medio YPD. En cambio, las cepas normal y mutante mostraron perfiles muy diferentes de actividades de ALA-Sintetasa, ALA-Dehidrasa y de contenido

de ALA intracelular en función del tiempo de crecimiento, cuando crecieron sobre una fuente de carbono no fermentable (YPEt). Sin embargo, no se encontraron diferencias en el caso de la PBG-Deaminasa. Estos hallazgos apoyarían el rol regulatorio postulado tanto para el ALA-Sintetasa como para el ALA-Dehidrasa en el camino biosintético de las porfirinas en levaduras.

Además, se observó que las dos primeras enzimas de este camino sufren represión por catabolito, mientras que la PBG-Deaminasa no está sujeta a este tipo de regulación.

Finalmente, los resultados hallados para el ALA-Sintetasa, el ALA-Dehidrasa y el ALA intracelular de las cepas D27 y D27/C6 en ambos medios mostraron claramente que la mutación Hem R⁺ presente en la cepa D27/C6 se expresa únicamente cuando las células crecen en una fuente de carbono no fermentable. También podría postularse que dicha mutación produce una desregulación del ALA-Sintetasa que mantiene su actividad elevada durante la mayor parte del ciclo celular, lo cual explicaría la cantidad elevada de citocromos que caracteriza a la mutación Hem R⁺.

De esta manera, se estableció, que la mutación Hem R⁺ está relacionada con la presencia de dos formas enzimáticas con actividad de PBG-Deaminasa así como también con una desregulación del ALA-Sintetasa. Estas características permitirían explicar la cantidad elevada de citocromos que se sintetiza en las mutantes Hem R⁺, si bien no se descarta

la posibilidad de que otras modificaciones contribuyan a la expresión de esta mutación.

En consecuencia, se ha caracterizado y purificado la PBG-Deaminasa de *Saccharomyces cerevisiae*, enzima que presentó propiedades muy similares a las de la enzima proveniente de otros organismos. Por otra parte, se ha determinado que esta enzima no posee un rol regulatorio en el camino biosintético de las porfirinas en levaduras.