

## Tesis de Posgrado

# Algunos aspectos de la iniciación de la biosíntesis del almidón

Ardila, Fernando Jorge

1993

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Ardila, Fernando Jorge. (1993). Algunos aspectos de la iniciación de la biosíntesis del almidón. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2560\\_Ardila.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2560_Ardila.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Ardila, Fernando Jorge. "Algunos aspectos de la iniciación de la biosíntesis del almidón". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2560\\_Ardila.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2560_Ardila.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**“Algunos aspectos de la iniciación de la biosíntesis del  
almidón.”**

**AUTOR: Fernando Jorge Ardila**

**DIRECTOR: Dra. Juana Sara Tandecarz**

**LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Investigaciones Bioquímicas  
“Fundación Campomar”**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas**

1993

Tandecarz  
25/6/93  
fja

## **Agradecimientos**

**A mi esposa por toda su ayuda y apoyo.**

**A todos los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, especialmente a la Dra. Juana Tandecarz por su valiosa guía y su actitud generosa para conmigo.**

**A la Dirección del Instituto de Investigaciones Bioquímicas por permitirme realizar allí la mayor parte de mi Trabajo de Tesis.**

**Al Dr. T. Akazawa del Research Institute for Biochemical Regulation (Nagoya University) con quien realicé los experimentos mostrados en el capítulo 2 de este Trabajo de Tesis.**

**Deseo recordar en este espacio mi admiración y cariño hacia el Profesor Doctor Carlos Eugenio Cardini.**

Parte de los resultados presentados en este Trabajo de Tesis fueron incluidos en las siguientes publicaciones:

**Ardila, F. y Tandecarz, J. (1992).** Potato tuber UDP-Glc:protein transglucosylase catalyzes its own glucosylation. *Plant Physiol*, **99**, 1342-1347.

**Pozueta-Romero, J., Ardila, F., Akazawa, T. y Kojima, K. (1992).** A method for accurate analysis of intermembrane space in organelles enclosed by double envelope membranes. *Cell Struct Funct*, **17**, 47-53.

**Ardila, F., Pozueta-Romero, J. y Akazawa, T. (1993).** Adenylate uptake by tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv BY2) proplastids confirms that an adenylate translocator similar to that existing in mitochondria is ubiquitously localized in plastids. *Plant Cell Physiol*, en prensa.

**1. INTRODUCCION**

<b>1.1. El almidón</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Composición química del almidón</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Los Plástidos</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Enzimas involucradas en la síntesis de almidón</b>	<b>7</b>
<b>1.5. Regulación de la síntesis de almidón</b>	<b>11</b>
<b>1.6. Localización celular de las enzimas involucradas en la síntesis del almidón</b>	<b>13</b>
<b>1.7. Transporte de metabolitos a través de las membranas de plástidos productores de almidón</b>	<b>15</b>
<b>1.7.1. Transporte de carbono</b>	<b>15</b>
<b>1.7.2. Transporte de energía a amiloplastos</b>	<b>18</b>
<b>1.8. Iniciación de la síntesis del almidón</b>	<b>20</b>
<b>1.9. Iniciación de la síntesis de otros polisacáridos</b>	<b>23</b>
<b>1.9.1. Glucógeno</b>	<b>24</b>
<b>1.10. Objetivos de esta Tesis</b>	<b>27</b>

**2. MATERIALES Y METODOS**

<b>2.1. Reactivos</b>	<b>29</b>
<b>2.2. Buffers</b>	<b>29</b>
<b>2.3. Preparación enzimática proveniente de proplástidos de tubérculo de papa</b>	<b>31</b>
<b>2.4. Cultivo de células de tabaco</b>	<b>32</b>
<b>2.5. Preparación de protoplastos de células de tabaco</b>	<b>32</b>
<b>2.6. Aislamiento de proplástidos de células de tabaco</b>	<b>34</b>
<b>2.7. Aislamiento de mitocondrias de células de tabaco</b>	<b>35</b>
<b>2.8. Medición de actividades enzimáticas</b>	
<b>2.8.1. UDP glicoproteína transglucosilasa</b>	<b>36</b>
<b>2.8.2. Fosforilasa dependiente de aceptor exógeno</b>	<b>36</b>
<b>2.8.3. Almidón sintetasa</b>	<b>37</b>
<b>2.8.4. Nitrito reductasa</b>	<b>37</b>
<b>2.8.5. Citocromo c oxidasa</b>	<b>38</b>
<b>2.8.6. Fosfogluconato deshidrogenasa</b>	<b>39</b>
<b>2.9. Medición de transporte de metabolitos</b>	<b>39</b>



### **3. RESULTADOS**

<b>3.1. Capítulo 1. Identificación y purificación de la enzima UPTG</b>	<b>58</b>
<b>3.1.1. Comportamiento cromatográfico</b>	<b>58</b>
3.1.1.1. Cromatografías de intercambio aniónico	58
3.1.1.2. Cromatografía de tamizaje molecular	62
3.1.1.3. Cromatografía de afinidad	65
<b>3.1.2. Asociación de UPTG con enzimas metabólicamente relacionadas</b>	<b>70</b>
<b>3.1.3. Purificación de la enzima UPTG</b>	<b>79</b>
<b>3.1.4. Determinación del mecanismo enzimático de UPTG</b>	<b>82</b>
<b>3.2. Capítulo 2 Estudios de transporte de metabolitos a proplástidos</b>	<b>87</b>
<b>3.2.1. Calidad de las preparaciones de proplástidos</b>	<b>88</b>
<b>3.2.2. Transporte de metabolitos a través de membranas de proplástidos</b>	<b>90</b>
<b>3.2.3. Flujo de energía hacia los proplástidos</b>	<b>93</b>
3.2.3.1. Estudio del transporte de adenilatos utilizando el método de capa única de aceite de silicona	93
3.2.3.2. Estudio del transporte de adenilatos utilizando el método de doble capa de aceite de silicona	97
3.2.3.2.1. Determinación del tiempo de incubación en el empleo del método de doble silicona.	97
3.2.3.2.2. Determinación del transporte inespecífico por el método de extrapolación en la técnica de centrifugación con doble capa de silicona.	100
3.2.3.2.3. Dependencia del transporte con la concentración de adenilatos	105
3.2.3.3. Análisis inmunológico	108
<b>3.2.4. Flujo de carbono hacia los proplástidos</b>	<b>113</b>
3.2.4.1. Transporte de Glc-1-P y Glc-6-P	113
3.2.4.2. Transporte de nucleótidos azúcar	113

### **4. DISCUSION**

<b>4.1. Capítulo 1. Identificación y purificación de la enzima UPTG</b>	
<b>4.1.1. Agregación de la enzima UPTG</b>	<b>120</b>
<b>4.1.2. Identificación de la UPTG y determinación de su mecanismo catalítico</b>	<b>124</b>

<b>4.2. Capítulo 2. Estudios de transporte de metabolitos a proplástidos</b>	
<b>4.2.1. Calidad de la preparación de proplástidos</b>	<b>127</b>
<b>4.2.2. Transporte de energía</b>	<b>128</b>
<b>4.2.3. Transporte de fuente de carbono</b>	<b>129</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>133</b>
<b>6. REFERENCIAS</b>	<b>135</b>



## ABREVIATURAS

**A<sub>280</sub>**: Absorbancia a 280 nm  
**Amp**: Amperio  
**ADP**: Adenosina 5' difosfato  
**ADP-Glc**: Adenosina 5' difosfato glucosa  
**AMP**: Adenosina 5' monofosfato  
**ATP**: Adenosina 5' trifosfato  
**BSA**: Albúmina sérica bovina  
**BPB**: Azul de bromofenol  
**CAT**: Carboxiatractilósido  
**Ci**: Curie  
**cpm**: cuentas por minuto  
**CTAB**: Bromuro de cetiltrimetilamonio  
**Da**: Dalton  
**DEAE**: Dietilaminoetil  
**EDTA**: Acido etilen diamino tetra-acético  
**FPLC**: Cromatografía líquida y rápida de proteínas  
**glc**: Glucosa  
**glc-1-P**: glucosa 1 fosfato  
**glc-6-P**: glucosa 6 fosfato  
**kDa**: Kilodaltons  
**hs**: horas  
**MES**: Acido 2-(N-morfolino) etansulfónico  
**min**: minutos  
**mg**: miligramo  
**µg**: microgramo  
**mOs**: miliosmios  
**MOPS**: Acido 3-(N-morfolino) propansulfónico  
**6PGDH**: 6 fosfogluconato deshidrogenasa  
**PAGE**: Electroforesis en geles de poliacrilamida  
**PBS**: Buffer fosfato salino  
**Pi**: Ortofosfato inorgánico  
**PMSF**: Fluoruro de fenil metil sulfonilo  
**SDS**: Dodecil sulfato de sodio  
**seg**: segundos  
**TBS**: Buffer tris salino  
**TCA**: Acido tricloroacético  
**Tris**: Tris (hidroximetil) aminometano  
**UDP-Glc**: Uridina 5' difosfato glucosa  
**UDP-GlcUA**: Uridina 5' ácido glucurónico  
**UTP**: Uridina 5' trifosfato

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 El almidón

Mundialmente, del 3 al 5% de la cosecha agrícola que contiene almidón es destinada a la producción de almidón. Entre las numerosas aplicaciones que tiene el almidón, aproximadamente las dos terceras partes se relacionan con la industria alimenticia: en forma directa como espesante de salsas y postres o luego de su hidrólisis, como endulzante de bebidas y postres. En menor proporción, el almidón es también utilizado en otros campos, como en la industria farmacéutica, como adhesivo en la industria del papel o textil, etc. (Shewmaker y Stalker, 1992). La industria química produce a partir de almidón y a través de diversos procesos fermentativos, polioles (eritritol), ácidos orgánicos (gluconato), aminoácidos (lisina), polisacáridos (ciclodextrinas y xantanos), fructosa, enzimas, antibióticos, vitaminas y compuestos relacionados (Koch y Roper, 1988). La aplicación del almidón en la industria química resulta en la competencia efectiva con el petróleo y la celulosa considerando que: a) mientras que las reservas de petróleo son limitadas, el almidón puede ser producido hasta saturar el mercado, b) el precio de las fibras de celulosa es significativamente superior al del almidón, c) el suministro de fibras de celulosa está decreciendo y decrecerá aún más en la medida que la contaminación reduzca el ritmo de crecimiento de los bosques, d) las propiedades del almidón pueden ser modificadas por el

empleo de técnicas de ingeniería molecular con el objeto de producir un polisacárido más adecuado para ser empleado en los procesos químicos y/o biotecnológicos. Esto último requiere de profundos estudios de los factores que influyen la aplicabilidad del almidón, como el contenido en almidón de las especies vegetales, el contenido en proteínas del almidón (Morrison y Karkalas, 1990), la relación amilosa/amilopectina, etc, y el desarrollo de las técnicas necesarias para manipular estos factores. La comprensión de los componentes claves de la maquinaria biosintética del almidón en las plantas tiene entonces un impacto significativo en el campo de la agricultura y la industria.

## 1.2. Composición química del almidón:

El almidón es un polímero de  $\alpha$ -D-glucosa de alto peso molecular y el principal polisacárido de reserva en las plantas. El almidón no es un polisacárido único, está compuesto principalmente por amilosa y amilopectina. La amilosa constituye generalmente del 65% al 70% del total del polisacárido del gránulo de almidón y está formada por cadenas lineales de unidades de D-glucosa unidas por uniones  $\alpha$ -1,4 (Figura 1). El largo de estas cadenas es variable según las distintas especies de plantas, situándose entre  $10^2$  y  $10^4$  unidades de glucosa (Shannon y Garwood, 1984). La amilopectina está formada por cadenas más cortas, de 20 a 30 unidades de D-glucosas unidas también por uniones  $\alpha$ -1,4. Estas cadenas se

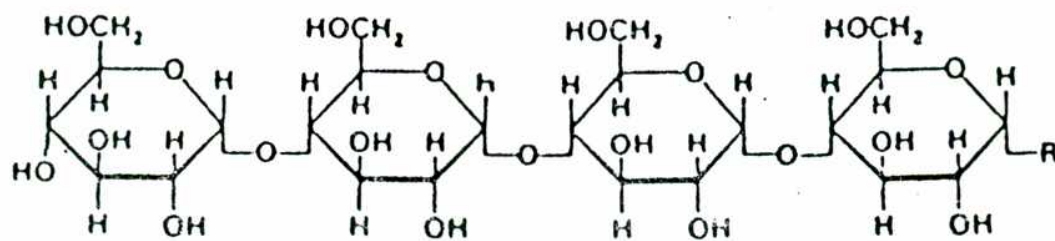


Figura 1. Estructura de la amilosa.

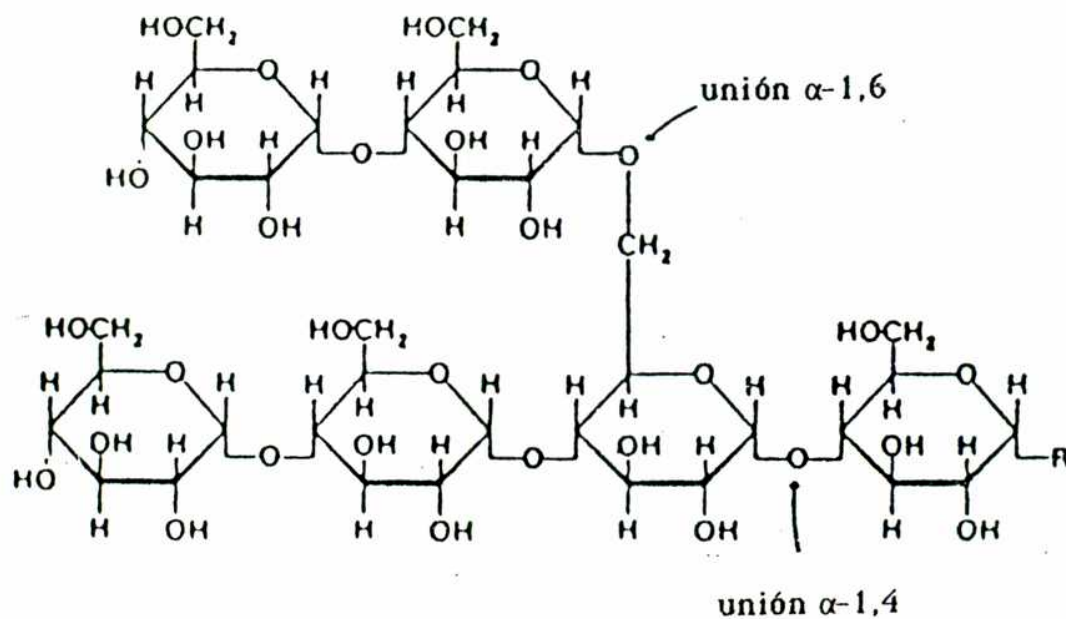


Figura 2. Estructura de la amilopectina.

reunen a su vez en un polisacárido de  $10^4$  a  $10^5$  unidades de D-glucosa a través de uniones  $\alpha$ -1,6 (Figura 2) (Shannon y Garwood, 1984). La amilopectina es estructuralmente similar al glucógeno, el único polisacárido de reserva encontrado en bacterias y mamíferos. Sin embargo, la amilopectina contiene menos ramificaciones que el glucógeno (Gunja-Smith y col., 1970) y, mientras que las ramas internas del glucógeno son de largo similar, las de la amilopectina son de tamaño variable (Gunja-Smith y col., 1970; Hizukuri, 1986). En algunas variedades de plantas el grano de almidón puede contener una tercera variedad de polisacárido denominado fracción intermedia o amilopectina anómala. Esta fracción, presente en baja proporción, tiene menos sitios de ramificación que la amilopectina normal (Preiss, 1991).

El almidón se acumula en los tejidos en forma de granos o gránulos. Las características físicas del grano de almidón son las ideales para constituir un material de reserva nutricional: el ser insoluble en agua y jugos celulares hace que pueda permanecer inalterado por largo tiempo, no interfiriendo con el metabolismo normal de la célula. La forma (esféricos u ovoidales) así como el tamaño de los granos de almidón (con diámetros de 2 a  $175 \mu\text{m}$ ) son estrictamente dependientes de la fuente botánica. Los gránulos de almidón pueden contener además pequeñas cantidades de proteínas (integrales y de superficie) (Morrison y Karkalas, 1990), lípidos internos y de superficie (Morrison y Karkalas, 1990) especialmente del tipo de lisolecitina y esteroides libres, nucleótidos y varias sustancias inorgánicas (French, 1975).

### 1.3. Los Plástidos

Los plástidos son organelas celulares en las que se llevan a cabo diferentes procesos metabólicos. Todos los plástidos están delimitados por dos membranas con estructura de bicapa lipídica cada una, careciendo por lo general de membranas en su espacio estromático. La membrana externa es libremente permeable a moléculas pequeñas, pero la membrana interna forma una barrera entre el citoplasma y el estroma del plástido que queda encerrado en su interior.

En las células vegetales, los granos de almidón se localizan en el interior de plástidos especializados (proplástidos, cloroplastos y amiloplastos) en donde ocurre su síntesis.

Los proplástidos son pequeños plástidos incoloros, con mayor contenido en membranas internas que los amiloplastos, que se localizan en células meristemáticas de tallo y raíz. Los proplástidos son los precursores ontogénicos de los cloroplastos y de los amiloplastos y en algunos casos pueden sintetizar pequeñas cantidades de almidón. Pueden diferenciarse también en: a) cromoplastos, que entre otras funciones tienen la de sintetizar pigmentos celulares, b) proteioplastos, encargados de la acumulación de proteínas y c) elaioplastos, responsables de la acumulación de aceites, entre otros.

Los cloroplastos contienen los pigmentos fotosintéticos, principalmente clorofila y llevan a cabo la fotosíntesis. Un porcentaje considerable del producto de la fotosíntesis se acumula

transitoriamente en el interior de los cloroplastos como almidón (almidón transitorio). El almidón sintetizado durante el día es degradado durante la noche o durante períodos en los cuales la demanda excede la producción fotosintética (Shannon y Garwood, 1984).

Los amiloplastos se encuentran tanto en células correspondientes al endosperma o perisperma de semillas como en órganos vegetativos como raíces y tubérculos (Shannon y Garwood, 1984). Estas organelas están especializadas en la acumulación del almidón de reserva aunque también parecen participar en algunos casos en la percepción de la gravedad (Sack y col., 1983 y Sack y Leopold, 1985). Los amiloplastos se clasifican en simples y compuestos. Los simples contienen un único grano de almidón por amiloplasto mientras que los amiloplastos compuestos contienen más de uno (Shannon, 1989). Muchos tejidos de reserva como el endosperma de trigo y maíz y los tubérculos de papa tienen amiloplastos simples. Por el contrario, los tejidos que no cumplen funciones de reserva, como las raíces, vástagos, meristemas apicales, embriones y tejidos maternos de semillas usualmente tienen amiloplastos compuestos. También los amiloplastos de endosperma de arroz contienen numerosos granos de almidón pequeños (Badenhuizen, 1969).

En algunos casos, se describió la interconversión de un plástido en otro (Zhu y col., 1984; Bathgate y col., 1985; Ngerprasisiri y col., 1988; Boyer, 1989; Tilney-Basset, 1989 y Sakai y col., 1992).

#### 1.4. Enzimas involucradas en la síntesis de almidón:

La formación de amilosa y amilopectina es mediada esencialmente por la intervención de dos actividades enzimáticas: una que sintetiza las uniones  $\alpha$ -1,4 y otra que sintetiza las uniones  $\alpha$ -1,6.

*In vitro* la fosforilasa (EC 2.4.1.1) cataliza la formación de las uniones  $\alpha$ -1,4 entre el extremo no reductor de moléculasceptoras preexistentes y las moléculas de glucosas provistas por la glucosa-1-P (Hanes, 1940):



En 1961 Leloir y colaboradores demostraron que el UDP-Glc (Leloir y col., 1961) y el ADP-Glc (Recondo y Leloir, 1961) eran utilizados como dadores de glucosas en la elongación de glucanos aceptores preexistentes a través de un mecanismo de transglucosilación llevado a cabo por la enzima almidón sintetasa (EC 2.4.1.21):



Esta enzima se encuentra en forma soluble (E.C.2.4.1.21) y unida al grano de almidón (E.C. 2.4.1.11). La actividad de almidón sintetasa soluble se presenta generalmente en dos formas moleculares que pueden ser separadas por cromatografía de



intercambio aniónico (Preiss, 1991 y referencias incluidas). Mientras que ambas formas emplean preferentemente ADP-Glc (con  $K_m$  similares) *in vitro*, la afinidad por el polisacárido aceptor es diferente. La afinidad de la forma I por amilopectina es un orden de magnitud menor que la forma II. Diferencias en las propiedades inmunológicas y físicas (diferentes pesos moleculares) de estas dos formas moleculares, sugieren la posibilidad que se trate de productos de diferentes genes. Además, las diferencias cinéticas observadas con diferentes polisacáridos aceptores sugieren que estas formas enzimáticas podrían tener diferentes funciones en la formación del grano de almidón.

Por otra parte, la almidón sintetasa unida al grano de almidón utiliza como dador de glucosa tanto ADP-Glc como UDP-Glc, aunque mediciones de  $V_{max}$  y  $K_m$  señalan al ADP-Glc como mejor sustrato (Preiss, 1991 y referencias incluidas). El dador *in vivo* parece ser predominantemente ADP-Glc ya que la actividad de ADP-Glc pirofosforilasa (E.C.2.7.7.27), que sintetiza ADP-Glc, correlaciona muy bien con la cantidad de almidón sintetizado en mutantes de maiz (Dickinson y Preiss, 1969) y de *Arabidopsis thaliana* (Lin y col., 1988). Numerosas publicaciones señalan a la almidón sintetasa unida al grano como la enzima responsable de la síntesis de la amilosa ya que la proteína está ausente en mutantes *waxy* cuyo almidón está compuesto exclusivamente por amilopectina (Shure y col., 1983; Sano, 1984; Konishi y col., 1985; Mac Donald y Preiss, 1985; Villarreal y Juliano, 1986; Vos-Scheperkeuter y col., 1986 y Hovenkamp-Hermelink y col., 1987). Además, el contenido en

amilosa en plantas transformadas con secuencias antisentido del gen que codifica para la almidón sintetasa unida al grano disminuye como también lo hace dicha actividad enzimática (Visser y col., 1991).

Criterios inmunológicos y de tamaño molecular indican en forma clara que las enzimas almidón sintetasa soluble y unida al grano de almidón son enzimas claramente diferentes en maíz (Mac Donald y Preiss, 1985) y papa (Ponstein y col., 1990).

En la actualidad, mientras que la intervención de la enzima almidón sintetasa en la biosíntesis de almidón es ampliamente aceptada, la participación fisiológica de la fosforilasa en este camino anabólico es aún materia de discusión. Por una parte, considerando la constante de equilibrio *in vitro* de esta enzima (Cohn, 1961), la medición de concentraciones de glucosa-1-P y  $P_i$  (Bassham y Krause, 1969 y Wirtz y col., 1980) y los valores de  $K_m$  para glucosa-1-P de fosforilasa de distintas fuentes (Frydman y Slabnik, 1973; Burr y Nelson, 1975 y Chen y Whistler, 1976), existirían impedimentos termodinámicos para que se lleve a cabo este proceso. No obstante, no se puede descartar la posibilidad que existan entornos físicos dentro del plástido y/o períodos específicos en la diferenciación del tejido vegetal donde las condiciones termodinámicas permitan que la reacción en el sentido anabólico sea posible. Además, estudios de localización subcelular de fosforilasa de tubérculo de papa apoyan la idea de un papel anabólico de la enzima en determinada etapa de su diferenciación. Durante la etapa de síntesis neta de almidón, la enzima se encuentra localizada en el espacio estromático de los

amiloplastos. En cambio, cuando ocurre la maduración del tubérculo la enzima está localizada exclusivamente en el citosol (Schneider y col., 1981 y Brisson y col., 1989). Resultados similares se obtuvieron del análisis de cotiledones de *Pisum sativum* L.. La forma plastidial de fosforilasa, presente en altos niveles durante la etapa de síntesis neta de almidón, se hace minoritaria al ocurrir la movilización masiva del polisacárido (van Berkel y col., 1991). Finalmente, Catz y col. (1989) llevaron a cabo estudios relacionados con la expresión en callos desdiferenciados provenientes de tubérculo de papa de una forma de fosforilasa capaz de sintetizar almidón en ausencia de polisacárido aceptor en la mezcla de reacción. Mientras que esta forma enzimática se encuentra presente en el tubérculo de papa, no se detecta su actividad en el material desdiferenciado. Esta observación correlaciona con la disminución en el contenido de almidón de estos callos sugiriendo la participación de esta enzima en la biosíntesis del almidón (Catz y col., 1989).

La enzima ramificante o enzima Q (EC 2.4.1.18) es responsable de las ramificaciones presentes en la molécula de la amilopectina. Esta enzima cataliza la formación de las uniones D-glucosídicas  $\alpha$ -1,6 sobre las cadenas lineales  $\alpha$ -1,4 de largo apropiado. Su mecanismo de acción involucra el corte de una unión  $\alpha$ -1,4 no terminal de la cadena de D-glucano  $\alpha$ -1,4 y la transferencia de la cadena lineal liberada hacia otra parte de la cadena  $\alpha$ -1,4-D-glucosídica, para formar la ramificación, dando lugar a una unión  $\alpha$ -1,6 sobre el

carbono 6 de la molécula de glucosa perteneciente a la cadena original.

Múltiples formas de enzima ramificante se encontraron en diferentes plantas: hojas de espinaca, endosperma de maíz, semillas en desarrollo de sorgo y arvejilla (Preiss, 1988), hojas de maíz (Dang y Boyer, 1988) y semillas de ricino (Goldner y Beevers, 1989). En tubérculo de papa, Vos-Scheperkeuter y col. (1989) purificaron una única forma de enzima ramificante y establecieron similitudes inmunológicas con una de las formas enzimáticas presente en maíz.

### 1.5 Regulación de la síntesis de almidón

Estudios llevados a cabo fundamentalmente en tejidos fotosintéticos señalan que la síntesis de almidón parece estar regulada a nivel de producción de sustrato en el interior del cloroplasto. La enzima ADP-Glc pirofosforilasa (E.C. 2.7.7.27) es la responsable de la síntesis de ADP-Glc a partir de glucosa-1-fosfato y ATP (Espada, 1962) y presenta localización plastidial (ver sección 1.6). Esta enzima es estimulada, en el sentido de la síntesis de ADP-Glc, por gliceraldehido-3-fosfato e inhibida por fosfato inorgánico en varias especies botánicas (Preiss y col., 1985; Spilatro y Preiss, 1987 y Preiss y col., 1987). Por lo tanto, una alta tasa de fotosíntesis que resulta en la producción de gliceraldehido-3-fosfato y consumo de ortofosfato via fotofosforilación, se encuentra ajustadamente acoplada con una alta tasa de síntesis de almidón.

Por el contrario, una baja tasa de fotosíntesis conlleva a una baja tasa de síntesis de almidón.

Por otra parte, el pirofosfato inorgánico inhibe la actividad de ADP-Glc pirofosforilasa (Preiss y col., 1985 y Preiss y col., 1987) coordinando así, posiblemente, la síntesis de almidón con el crecimiento celular. Durante el crecimiento celular se producen altas cantidades de pirofosfato inorgánico como subproducto de las reacciones biosintéticas. El pirofosfato producido no es totalmente degradado por pirofosfatasas (E.C.3.6.1.1), llevando a la inhibición de la síntesis de almidón para asegurar un flujo continuo de metabolitos para el crecimiento celular (Preiss, 1985). Menores niveles de pirofosfato inorgánico coinciden con menores niveles de crecimiento celular y, consecuentemente, con una mayor tasa de síntesis de almidón.

Evidencias genéticas apoyan la idea que la regulación de la síntesis de almidón en tejidos fotosintéticos se lleva a cabo en el interior del cloroplasto. El concepto de que el flujo de carbono hacia la síntesis de almidón ocurre via el camino gluconeogénico en los cloroplastos se ve sostenido por la existencia de mutantes de fosfoglucomutasa de cloroplastos de *Arabidopsis thaliana* que acumulan menos del 2% del almidón de las normales (Caspar y col., 1986). Por otra parte, líneas de *Arabidopsis thaliana* que carecen de ADP-Glc pirofosforilasa acumulan menores cantidades de almidón que las normales (Lin y col., 1988).

A pesar que en amiloplastos la regulación alostérica de la síntesis de almidón via la enzima ADP-Glc pirofosforilasa todavía no

esta clara, estudios genéticos señalan que la ADP-Glc pirofosforilasa de amiloplastos cumpliría un papel importante en la síntesis del almidón. Las mutaciones de endosperma de maíz *shrunken- 2* y *brittle- 2* resultan en una disminución en la actividad de ADP-Glc pirofosforilasa que correlaciona con una disminución en el contenido de almidón de éstas (Preiss, 1991). Finalmente, tubérculos de papa transformados con construcciones antisentido del gen de la ADP-Glc pirofosforilasa dieron por resultado plantas incapaces de sintetizar almidón (Muller-Rober y col., 1992).

#### 1.6. Localización celular de las enzimas involucradas en la síntesis del almidón

La facilidad de aislar cloroplastos, debido a su relativamente bajo contenido en almidón, hizo que ya en la década del 70 se conociese que estos plástidos contienen las enzimas necesarias para llevar a cabo la síntesis del almidón transiente: almidón sintetasa y enzima Q, como así también la enzima ADP-Glc pirofosforilasa encargada de sintetizar el ADP-Glc (Levi y Preiss, 1978). En cambio, la dificultad de obtener preparaciones de amiloplastos de integridad y pureza satisfactorias postergó en una década la aparición de información referente a las dotaciones enzimáticas de estos plástidos. El alto contenido en almidón de los amiloplastos atenta contra la integridad de las membranas del plástido durante el aislamiento y, además, la liberación de almidón de los amiloplastos

rotos potencia la rotura de los otros amiloplastos al trabajar como abrasivo. Mac Donald y ap Rees (1983) mostraron que las enzimas almidón sintetasa y ADP-Glc pirofosforilasa estaban confinadas al interior de amiloplastos de soja. A partir de ese momento comenzaron a publicarse trabajos que señalaban la obtención de amiloplastos de integridad y pureza satisfactoria que permitieron extender los estudios a otras fuentes vegetales. Journet y Douce (1985) empleando amiloplastos de brotes de coliflor, Entwistle y ap Rees (1988) utilizando amiloplastos aislados de endosperma de trigo, Echeverria y col. (1988) en amiloplastos de granos de maíz y Frehner y col. (1990) en amiloplastos purificados de sicomoro (*Acer pseudoplatanus* L.), entre otros, confirman lo establecido por Mac Donald y ap Rees en 1983. Echeverria y col. (1988) encuentran, además, que la actividad ramificante también está confinada al interior de amiloplastos de maíz.

Como se señaló más arriba, el UDP-Glc puede ser utilizado, aunque con menor afinidad y velocidad, por la enzima almidón sintetasa para la síntesis de almidón *in vitro*. La formación de UDP-Glc puede darse por la reacción inversa de la sacarosa sintetasa (E.C.2.4.1.13) que utilizando sacarosa y UTP produce fructosa y UDP-Glc, como también por la enzima UDP-Glc pirofosforilasa (E.C.2.7.7.27) que utiliza glucosa-1-fosfato y UTP para formar UDP-Glc y pirofosfato. Diferentes trabajos utilizando técnicas de centrifugación diferencial, señalan que ambas enzimas son de localización esencialmente citoplasmática (Simcox y col., 1977; Nishimura y Beevers, 1979; Mac Donald y ap Rees, 1983 y Entwistle

y ap Rees, 1988). Recientemente, Kimura y col. (1992) empleando técnicas de localización *in situ*, mostraron que mientras que la mayor parte de la UDP-Glc pirofosforilasa de células en cultivo de arroz se encuentra en el citoplasma, una porción minoritaria de la enzima se halla también en el interior de los amiloplastos.

## 1.7. Transporte de metabolitos a través de las membranas de plástidos productores de almidón

### 1.7.1. Transporte de carbono

La capacidad de los cloroplastos de transducir energía lumínica en energía química sumada a la de transformar anhídrido carbónico en hidratos de carbono hace que estas organelas puedan funcionar en forma autónoma del citoplasma en lo que respecta a la síntesis del almidón transitorio.

Sin embargo, es aún materia de discusión cuál es el metabolito que se transporta al interior de los amiloplastos para proveer la fuente de carbono necesaria para la síntesis del almidón. En el caso del cloroplasto, el principal sistema de transporte de carbono es el translocador de triosas fosfato-fosfato inorgánico, último componente del aparato fotosintético encargado de exportar el carbono fijado hacia citoplasma (Heber y Held, 1981). Por mucho tiempo se asumió que un translocador análogo existiría en la membrana interna de los amiloplastos por no disponer en su



---

momento de información precisa sobre las propiedades enzimáticas de los amiloplastos (ver sección 1.6) y por la relación ontogénica existente entre estos dos plástidos (ambos derivan de proplástidos). De esta manera, las triosas fosfato podrían ser incorporadas al interior de estos plástidos para ser utilizadas como fuente de carbono en la síntesis del almidón. En este sentido, Echeverría y col. (1988), Mac Donald y ap Rees (1983) y Journet y Douce (1985) mostraron que los amiloplastos de endosperma de maíz, de soja y de brotes de coliflor, respectivamente, poseían las capacidades enzimáticas necesarias para transformar triosas fosfato en almidón si aquellas ingresaran a la organela. Posteriormente, se observó el transporte efectivo de gliceraldehido-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato (además del de glucosa 6 fosfato y fosfato inorgánico) hacia el interior de amiloplastos de raíz de guisante (Borchert y col., 1989). Sin embargo, numerosas publicaciones señalan la imposibilidad que tienen los amiloplastos de otras fuentes vegetales de disponer del transporte de triosas fosfato como fuente de carbono para la síntesis de almidón. Así, la carencia de fructosa-1,6 bifosfatasa en amiloplastos de endosperma de trigo los imposibilitaría de transformar triosas fosfato en almidón (Entwistle y ap Rees, 1988). Posteriormente se comprobó que estos mismos plástidos no incorporan triosas fosfato pero sí glucosa-1-fosfato (Tyson y ap Rees, 1988). Keeling y col. (1988), estudiando la redistribución isotópica de  $^{13}\text{C}$  en el almidón producido por amiloplastos aislados de granos de trigo incubados con glucosa radiomarcada concluyeron que sus resultados irían en contra del

ingreso de triosas fosfato y, en cambio, apoyarían el ingreso de hexosas fosfato al interior de estos amiloplastos. Conclusiones similares fueron obtenidas luego del estudio de los productos de degradación de almidones sintetizados por tubérculo de papa y maíz incubados con precursores radioactivos (Hatzfeld y Stitt, 1990). En concordancia con estos resultados se encuentran los obtenidos recientemente por Viola y col. (1991) en papa y poroto utilizando espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Simcox y col. (1977) mostraron que los proplástidos de *Ricinus communis* L. contienen el equipamiento enzimático necesario para sintetizar almidón a partir de glucosa-6-P, postulando su ingreso a la organela desde el citoplasma. Evidencias de que glucosa-6-P es importada para la síntesis de almidón por parte de plástidos de arvejas fueron aportadas por Hill y Smith (1991).

La imposibilidad que tienen los amiloplastos de diferentes fuentes de convertir triosas fosfato en almidón abriría la posibilidad de que los nucleótidos azúcar ingresen a estos plástidos para cumplir dicha función. Tyson y ap Rees (1988) encontraron incorporación de glucosa radioactiva a material metanol-insoluble cuando amiloplastos aislados de endosperma de trigo se incubaron en presencia de ADP-[<sup>14</sup>C]Glc y UDP-[<sup>14</sup>C]Glc. Sin embargo, los autores atribuyeron la incorporación del azúcar a la presencia de amiloplastos rotos en su preparación de plástidos. Por otra parte, atribuyeron la mayor parte de la incorporación a partir de UDP-Glc a un tipo de polímero diferente de almidón por la incapacidad de ser degradado con amiloglucosidasa. Recientemente, se mostró el

ingreso de ADP-[<sup>14</sup>C]Glc a amiloplastos purificados de sicomoro (Pozueta-Romero y col., 1991c) y de endosperma de maíz (Liu y col., 1991) y su participación directa en la síntesis de almidón.

### 1.7.2. Transporte de energía a amiloplastos

En el año 1975, Riccio y col. identificaron la proteína translocadora de adenilatos localizada en la membrana interna de mitocondrias de corazón de novillo. Posteriormente, esta actividad enzimática fue también encontrada en mitocondrias de plantas (Janovitz y col., 1976). Esta actividad fue asociada con la entrada de ADP al interior del estroma mitocondrial donde se transforma en ATP vía fosforilación oxidativa. Este transportador exportaría entonces el ATP hacia el citoplasma para satisfacer sus requerimientos energéticos.

Además de la síntesis de ADP-Glc para la formación de almidón, los amiloplastos pueden llevar a cabo otros procesos endergónicos como la biosíntesis de aminoácidos (Miflin y Lea, 1977), nucleótidos (Doremus y Jagendorf, 1985) y lípidos (Ohlrogge y col., 1979) y la asimilación de nitratos (Bowsher y col., 1989 y referencias incluidas). Como los amiloplastos carecen de la maquinaria productora de energía asociada a las membranas de tilacoides de cloroplastos, la energía necesaria para llevar a cabo los citados procesos podría ser generada por las vías glucolítica y de oxidación de pentosas fosfato plastidiales. Sin embargo, numerosos

trabajos señalan la incapacidad de amiloplastos aislados de diferentes fuentes vegetales de llevar a cabo en forma completa estas vías oxidativas (Simcox y col., 1977, Nishimura y Beevers, 1979, Mac Donald y ap Rees 1983, Journet y Douce, 1985 y Frehner y col. 1990). Es por ello, que se asume que la energía necesaria para los procesos mencionados debería ser importada desde el citoplasma (Ngernprasirtsiri y col., 1989 y Pozueta-Romero y col., 1991c). El mismo planteo, realizado en referencia a la provisión de energía para satisfacer las necesidades metabólicas de los cloroplastos (en condiciones de oscuridad) y de los cromoplastos fue satisfecho con el descubrimiento de translocadores de adenilatos activos en cloroplastos de hojas de espinaca (Heldt, 1969) y guisante (Robinson y Wiskich, 1977) y en cromoplastos de flores de narcisos (Liedvogel y Kleining, 1980), los cuales trabajarían en forma inversa al translocador de adenilatos mitocondrial, es decir importando ATP y exportando ADP para completar su ciclo en las mitocondrias.

Más recientemente, se mostró la presencia de un translocador de adenilatos activo en las membranas internas de amiloplastos aislados de células en cultivo de sicomoro con capacidad de importar ATP al interior del amiloplasto (Ngernprasitsiri y col., 1989 y Pozueta-Romero y col., 1991, c).

### 1.8. Iniciación de la síntesis del almidón

Las enzimas almidón sintetasa (soluble y unida al grano de almidón) y fosforilasa requieren de una molécula “primer” o aceptora para llevar a cabo su actividad elongadora de  $\alpha$ -glucanos. Se plantea entonces la necesidad de establecer cuál es el mecanismo de la síntesis *de novo* del almidón. La molécula más pequeña que resulta efectiva como aceptora de la glucosa proveniente del ADP-Glc es la maltosa (Leloir y col., 1961 y Mac Donald y Preiss, 1985); no obstante, estos estudios *in vitro* no aclaraban la iniciación *in vivo* de la síntesis del almidón y cómo se forman los aceptores. Este planteo es similar al que existe con referencia a la síntesis de otros polisacáridos como el glucógeno y los  $\beta$ -glucanos, entre otros (ver sección 1.9).

Utilizando el tubérculo de papa como modelo de estudio de la síntesis del almidón se encontró un sistema enzimático que ha aportado evidencias tendientes a aclarar las etapas tempranas de la síntesis de este polisacárido (Lavintman y Cardini, 1973; Lavintman y col., 1974; Tandecarz y Cardini, 1978 y Tandecarz y Cardini, 1979).

#### 1.8.1. UDP-Glc:proteína transglucosilasa

Un importante avance en la dilucidación de la síntesis *de novo* del almidón fue el hallazgo de la formación de una glucoproteína

(por criterio de precipitación con TCA) en una preparación particulada de proplástidos de tubérculo de papa esencialmente libre de almidón. Esta preparación provee no sólo la actividad enzimática sino también la proteína que funciona como molécula aceptora de glucosa (Lavintman y Cardini, 1973). La actividad enzimática responsable de la síntesis de la glucoproteína fue denominada UDP-Glc:proteína transglucosilasa (UPTG) (E.C. 2.4.1.112). Además, se mostró que el producto de la reacción catalizada por UPTG puede actuar como aceptor de almidón sintetasa y fosforilasa en la síntesis de  $\alpha$ -glucanos (Lavintman y Cardini, 1973).

Se determinaron luego algunas propiedades de la reacción catalizada por UPTG: a) La reacción es muy rápida a 37 °C alcanzándose el 80% del valor del plateau en sólo 3 min y continuando por sólo 15 min. b) El final de la reacción se debe no al consumo total del UDP-Glc sino a la capacidad limitada de sitios en la proteína aceptora. c) La incorporación de glucosas al material precipitable por TCA no se altera cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de polisacáridos. d) La inactivación enzimática en presencia de *p*-cloro-mercuribenzoato de sodio permitió establecer que la enzima presenta grupos sulfhidrilos esenciales para su actividad. e) La actividad UPTG es estimulada por  $Mn^{2+}$  y en menor medida por  $Mg^{2+}$ . f) La reacción es específica para UDP-Glc ( $K_m$  de  $10^{-5}$  M); TDP-Glc, GDP-Glc o ADP-Glc no pueden actuar como dadores de glucosas (Lavintman y col., 1974).

En 1978, Tandecarz y Cardini, utilizando reducción con borohidruro de sodio y degradación de Smith del producto radiomarcado de UPTG, demostraron que en la reacción catalizada por UPTG se transfiere sólo una molécula de glucosa a la proteína aceptora.

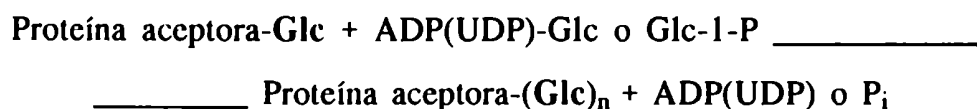
### UPTG

Proteína aceptora + UDP-Glc  $\xrightarrow{\text{UPTG}}$  Proteína aceptora-Glc + UDP (reacción 1)

Posteriormente, por tratamiento alcalino en condiciones reductoras (borohidruro de sodio tritiado) del producto de la reacción 1, se determinó que la glucosa estaría unida a la proteína, a residuos serina y/o treonina, a través de un enlace O-glucosídico (Moreno y col., 1986).

Se estudió también el mecanismo de alargamiento que llevan a cabo almidón sintetasa/s y fosforilasa/s presentes en la misma preparación de proplástidos, utilizando como aceptor el producto de la reacción 1. Se realizaron degradaciones de Smith de los productos de alargamiento (Tandecarz y Cardini, 1978) e incubaciones en presencia de 1,5-D-gluconolactona (inhibidor de fosforilasas y almidón o glucógeno sintetasa/s) (Tandecarz y Cardini 1979). De esa manera se mostró que la síntesis de glucanos  $\alpha$ -1,4 a partir de ADP-Glc, UDP-Glc y Glc-1-P se efectúa a partir de la molécula de glucosa unida a la proteína aceptora (reacción 1) a través de uniones  $\alpha$ -1,4.

enzimas alargadoras



Tanto la enzima UPTG, como la proteína aceptora y las enzimas alargadoras pueden ser solubilizadas mediante el empleo de buffer de alta fuerza iónica (Moreno y Tandecarz, 1982). El aceptor proteico radioglucosilado fue caracterizado como un polipéptido de 38 kDa por autoradiografía de un SDS-PAGE de una preparación enzimática incubada en presencia de UDP-[<sup>14</sup>C]Glc y Cl<sub>2</sub>Mn (Moreno y col., 1986; Moreno y col., 1987).

En 1982, Tandecarz y col. mostraron que plántulas de maíz dulce con 4 días de germinación también presentan actividad de UPTG. Más recientemente, se mostró que preparaciones solubilizadas de endosperma inmaduro de maíz (*Zea mays* L.) presentan también una proteína de 38 kDa producto de la actividad UPTG (Rothschild y Tandecarz, 1990). Estos autores demostraron también que el producto de UPTG, al igual que en el caso de tubérculo de papa, sirve como molécula aceptora para la síntesis de  $\alpha$ -1,4 glucanos (Tandecarz y col. 1991).

### 1.9. Iniciación de la síntesis de otros polisacáridos

Ingold y Seitz (1986) detectaron una actividad de glucosiltransferasa que denominaron GT IsU, en sobrenadantes de



centrifugaciones a 174.000 xg como también en membranas microsomales de células en suspensión de *Daucus carota* L. A pesar que los autores no relacionaron directamente esta actividad enzimática con la biosíntesis de almidón, sugirieron que podría estar involucrada en la biosíntesis de polisacáridos celulares. Esta actividad enzimática, que producía una glucoproteína utilizando UDP-Glc 1 mM como sustrato, fue identificada posteriormente como una proteína de 40 kDa que lleva a cabo un mecanismo de autoglicosilación (Quentmeier y col., 1987).

La síntesis de  $\beta$ -glucanos en la pared celular de la clorofita *Prototheca zopfii* también se lleva a cabo a través de un intermediario glucoproteico. Este intermediario, de aproximadamente 30 kDa, es sintetizado utilizando UDP-Glc como dador de glucosas *in vitro*. El glucano está unido directamente a un residuo de hidroxiprolina de la proteína a través de un enlace O-glucosídico (Rivas y Pont Lezica, 1987).

### 1.9.1. Glucógeno

El glucógeno es el polisacárido de reserva presente en animales, como así también en algunas algas, hongos y bacterias. Es un polímero ramificado de D-glucosas unidas entre sí por uniones glucosídicas  $\alpha$ -1,4 en las cadenas lineales y  $\alpha$ -1,6 en las ramificaciones. El porcentaje de ramificación es de 8 a 10%, aproximadamente el doble que el de la amilopectina.

Luego del descubrimiento de la glucógeno sintetasa por Leloir y Cardini (1957), comenzó la búsqueda del sacárido más pequeño que tuviera la capacidad de ser empleado por esta enzima como molécula aceptora en la biosíntesis *de novo* del glucógeno. A pesar que se demostró que la glucosa podía llevar a cabo esa función (Salsas y Larner, 1975), la elevada concentración de glucosa requerida *in vitro* para tal fin ( $K_m$ : 0,9 M) hizo desechar su participación en el mecanismo *in vivo*.

En 1972, Krisman mostró que en presencia de UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc, una preparación parcialmente purificada de glucógeno sintetasa de hígado de rata es capaz de incorporar [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa a una fracción constituida por glucanos unidos a proteína por el criterio de precipitación por TCA. Además, la formación de este compuesto es inhibida en presencia de glucógeno. Posteriormente, se publicaron observaciones similares referidas a la biosíntesis del glucógeno de *Escherichia coli* (Barengo y col., 1975) y *Neurospora crassa* (Takahara y Matsuda, 1977). Estas observaciones y trabajos subsiguientes llevaron a Krisman y colaboradores (Krisman y Barengo, 1975) a proponer que la biogénesis del glucógeno se lleva a cabo a partir de un esqueleto proteico.

Aón y Curtino (1984) consiguieron radioiodinar proteínas íntimamente asociadas con glucógeno de retina bovina las cuales no pueden ser separadas del glucógeno por el empleo de urea 7,5 M / SDS 0,83%.

Una proteína de 38 kDa (posteriormente llamada glucogenina) fue encontrada covalentemente unida al glucógeno de músculo de

conejo a través de una unión tirosina-glucosa (Rodriguez y Whelan, 1985) manteniendo una relación equimolecular con el polisacárido (Kennedy y col., 1985). Extractos de músculo y corazón de conejo incubados en presencia de UDP-[<sup>14</sup>C]Glc en concentración micromolar y Cl<sub>2</sub>Mn dieron con la identificación de una proteína radiomarcada de 38 kDa, resultado que señala la presencia de una actividad transglucosilasa en estas fracciones (Rodriguez y col., 1986) que forman un producto de peso molecular similar al reportado en tubérculo de papa (Moreno y col., 1986). Se reportó luego que la glucogenina y los productos de actividad transglucosilasa de músculo y corazón de conejo no sólo poseen el mismo tamaño sino que también poseen similitudes estructurales ya que los productos enzimáticos reaccionan con anticuerpos anti-glucogenina (Rodriguez y Fliesler, 1988). Lomako y col. (1988) purificaron la actividad transglucosilasa de músculo esquelético de conejo y encontraron que esta enzima lleva a cabo un proceso de autocatálisis en presencia de UDP-Glc y Cl<sub>2</sub>Mn formando la proteína glucosilada de 38 kDa por un mecanismo de autoglucosilación. Concluyeron entonces que la glucogenina y esta enzima serían la misma proteína.

Pitcher y col. (1987 y 1988) describieron que la glucogenina forma un complejo con la subunidad catalítica de la glucógeno sintetasa de músculo esquelético de conejo en una relación molar 1 a 1. Estos autores mostraron que incubando el complejo glucogenina-glucógeno sintetasa en presencia de UDP-Glc en concentración milimolar se observa incorporación de glucosa a

glucogenina reduciendo su movilidad electroforética en forma notoria. A pesar que se desconoce en la actualidad la actividad enzimática que incorpora la primer molécula de glucosa al residuo tirosina de la glucogenina (Smythe y Cohen 1991), se ha postulado que la actividad autocatalítica de la glucogenina lleva a cabo el alargamiento del/os residuo/s de glucosa preexistentes en la proteína hasta un número máximo de 8 (Lomako y col., 1990, a). El producto glucosilado es posteriormente utilizado como aceptor de glucosas para la síntesis de glucógeno por parte de la glucógeno sintetasa y en presencia de enzima Q (Lomako y col., 1988).

El conocimiento de la secuencia de aminoácidos de la glucogenina de músculo de conejo (Campbell, D. y Cohen, P., 1989) ha permitido confirmar su tamaño (332 aminoácidos) calculado inicialmente por SDS-PAGE y localizar el único residuo de tirosina (posición 194) que actúa como aceptor de glucosas (Smythe y col., 1988).

#### 1.10. Objetivos de esta Tesis

El trabajo que se presenta a continuación tuvo por objeto realizar un aporte que contribuyera a dar respuesta a dos preguntas que carecen de respuestas definitivas en la actualidad en el campo de la biosíntesis del almidón. La primera se refiere a cómo se realiza la síntesis *de novo* del almidón. En este sentido, a pesar de los avances realizados en el estudio de la iniciación de la síntesis de

glucanos  $\alpha$ -1,4 unidos a proteínas en plantas descritos en esta Introducción, no se había aislado aún la enzima UPTG responsable de la formación de la glucoproteína que funciona como aceptora para el alargamiento de este glucano. La segunda de las preguntas es de qué manera los plástidos no fotosintéticos adquieren la fuente de energía y de carbono que son utilizadas para llevar a cabo, en su interior, la síntesis de almidón.

La primera parte de este Trabajo de Tesis trata sobre la identificación de la proteína responsable de la actividad UPTG en preparaciones de proplástidos de tubérculo de papa y se aclara su mecanismo enzimático. En el segundo capítulo, utilizando preparaciones de proplástidos obtenidas de células de tabaco se muestra que estos plástidos poseen la capacidad de incorporar ATP y ADP-Glc como fuentes de energía y carbono, respectivamente.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Reactivos

ATP, ADP, AMP, ADP-Glc, UDP-Glc, CAT, Reactive red 120-agarosa, uridina 5' difosfo-ácido glucurónico-agarosa, Ponceau S y los marcadores proteicos de peso molecular para filtración en gel fueron comprados a Sigma (USA). [ $^3\text{H}$ ]ATP, [ $^3\text{H}$ ]ADP, [ $^3\text{H}$ ]AMP, [ $^3\text{H}$ ]UTP, [ $^{14}\text{C}$ ]sorbitol, [ $^{14}\text{C}$ ]sacarosa y [ $^3\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O fueron comprados a Amersham (UK). UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc (268 Ci/mol) y ADP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc (262 Ci/mol) fueron preparados de acuerdo con Thomas y col. (1968). Siliconas Wacker AR 20 Pharms de Wacker-Chemie (Alemania) y SH 704 de Toray Silicone (Japón) fueron usadas en los experimentos de transporte de metabolitos. El equipo de determinación de glucosa (Glucose assay kit) fue adquirido a Wako Pure Chemicals (Japón). Percoll, concanavalina A Sepharose y las columnas de Superosa 6 y 12 y Mono Q fueron comprados a Pharmacia (Succia).

### 2.2. Buffers

Buffer A: 2-mercaptoetanol 5 mM en Tris ClH 100 mM, pH 7,4.

Buffer B: Cl<sub>2</sub>Mn 1 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 1 mM, Cl<sub>2</sub>Ca 1 mM y ClNa 0,1 M en buffer A.

Buffer C: 2-mercaptoetanol 20 mM en Tris ClH 50 mM, pH 7,4.

Buffer D:  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  1 mM y  $\text{ClNa}$  50 mM en Tris  $\text{ClH}$  50 mM, pH 7,4.

Buffer E:  $\text{ClK}$  100 mM, 2-mercaptoetanol 20 mM en Tris  $\text{ClH}$  50 mM, pH 7,4.

Buffer TAN: sacarosa 17%, EDTA 0,5 mM, espermidina 1,2 mM, 2-mercaptoetanol 7 mM y PMSF 0,4 mM en Tris  $\text{ClH}$  20 mM, pH 7,6.

Medio de suspensión: manitol 0,5 M, EDTA 0,5 mM, espermidina 1,2 mM, 2-mercaptoetanol 7 mM, PMSF 0,4 mM y  $\text{ClK}$  20 mM en Tris  $\text{ClH}$  20 mM, pH 7,5.

Buffer de transferencia: glicina 190 mM, metanol 20% en Tris 25 mM.

Buffer de corrida de geles nativos: Tanque superior: glicina 40 mM en Tris- $\text{ClH}$  37,6 mM, pH 8,89. Tanque inferior: Tris- $\text{ClH}$  63 mM, pH 7,47.

Buffer de corrida de SDS-PAGE: glicina 0,2 M, SDS 0,1% en Tris- $\text{ClH}$  25 mM, pH 8,3

Buffer Veronal: sodio barbital 150 mM-ácido acético hasta pH 9.6.

Buffer TBS:  $\text{ClNa}$  150 mM en Tris  $\text{ClH}$  50 mM, pH 7.5

Buffer PBS:  $\text{ClNa}$  0,14 M,  $\text{ClK}$  2,7 mM,  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  8,06 mM y  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  1,47 mM.

Mezcla desnaturalizante para SDS-PAGE: SDS 3%, 2 mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y BPB 0,25% en Tris- $\text{ClH}$  62,5 mM, pH 6,8.

### 2.3. Preparación enzimática proveniente de proplástidos de tubérculo de papa

Como fuente de enzimas se utilizaron tubérculos de papa de la variedad Kennebec, obtenidos en el mercado local. Se siguió el método descrito por Lavintman y col. (1974). Usualmente se pelaron y rallaron 750 g de papas en un rallador de vidrio en presencia de 2-mercaptoetanol (concentración final en el homogenato: 5 mM) y sin agregado de buffer. Todas las operaciones fueron realizadas entre 0 y 4 °C. El homogenato obtenido (320 ml) se filtró a través de dos capas de "cheese cloth" para eliminar restos de tejidos y se separó el almidón por centrifugación a 2.000 xg durante 10 min en una centrífuga refrigerada marca Sorvall modelo RC 5 empleando un rotor SS34. El sobrenadante obtenido (240 ml) fue nuevamente centrifugado a 25.000 xg durante 15 min en el mismo sistema. El precipitado, que contenía restos celulares, fue descartado y el sobrenadante (200 ml) fue centrifugado a 140.000 xg durante 2 hs en una ultracentrífuga marca Beckman modelo L8 80 utilizando un rotor 60 Ti. El precipitado obtenido, constituido principalmente por proplástidos libres de almidón (Lavintman y Cardini, 1973), fue resuspendido en 10 ml de Buffer A y mantenido a 0 °C por 72 hs. Finalmente esta preparación fue centrifugada a 140.000 xg durante 2 hs y el sobrenadante obtenido, en adelante denominado "P<sub>140</sub> solubilizado", fue empleado como fuente de enzima.

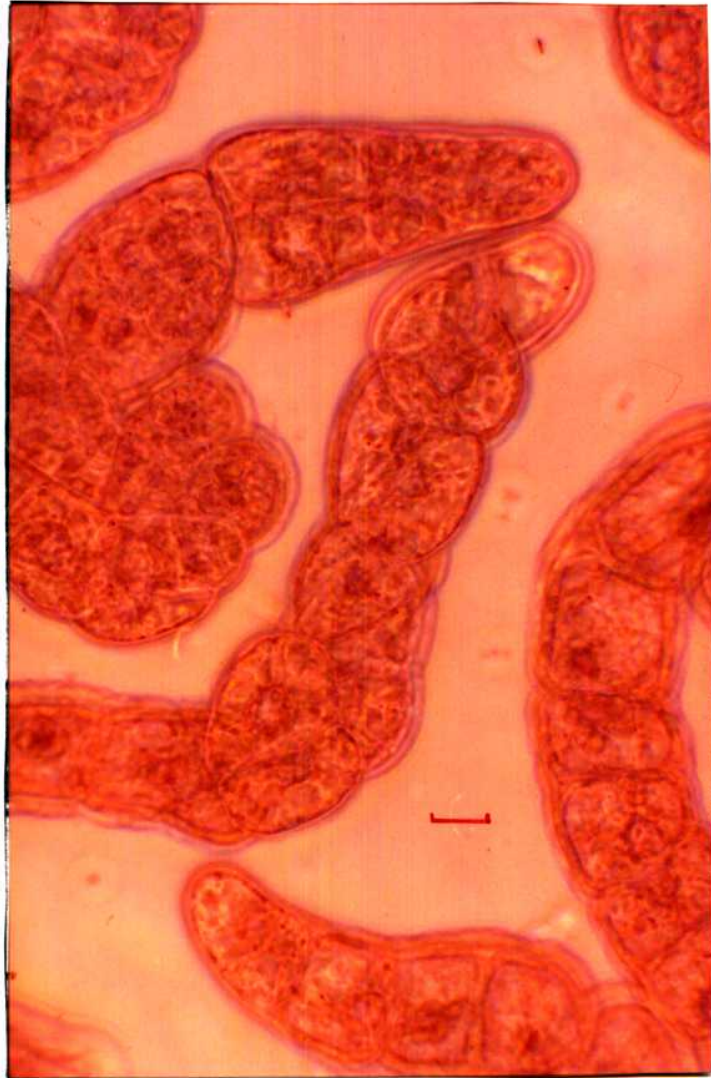


#### 2.4. Cultivo de células de tabaco

Se cultivaron células Bright Yellow 2 (BY2) de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY2) (Kato y col., 1972) (Figura 3) de acuerdo con Nagata y col. (1981) con agitación giratoria a 150 rpm. El medio de cultivo contenía sacarosa 3%,  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  20 mM,  $\text{NO}_3\text{K}$  20 mM,  $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3 mM,  $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5 mM,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  2 mM,  $\text{BO}_3\text{H}_3$  100  $\mu\text{M}$ , IK 5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{SO}_4\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  100  $\mu\text{M}$ ,  $\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  40  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MoO}_4\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Co}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  100  $\mu\text{M}$ , EDTA $\text{Na}_2$  100  $\mu\text{M}$ , hidrocloreto de tiamina 3  $\mu\text{M}$ , 2,4-ácido diclorofenoxiacético 0,1  $\mu\text{M}$ , mio-inositol 0,01% a pH de aproximadamente 5,8 antes de autoclavar por 20 min a 121 °C.

#### 2.5. Preparación de protoplastos de células de tabaco

Los protoplastos fueron preparados de acuerdo con Nagata y col. (1981). Usualmente, ca. 0,9 litros de un cultivo de 4 días (6 erlenmeyers de 1 litro con 150 ml de cultivo cada uno) fueron utilizados como material de partida, de los cuales se cosecharon ca. 110 g (peso fresco) de células pasando la suspensión celular a través de una capa de Miracloth. Las células fueron luego mantenidas por 30 min en medio de cultivo suplementado con 0,4 M manitol y 5 mM MOPS pH 7,5. Posteriormente se incubaron a 25 °C con agitación muy suave en presencia de Celulasa Onozuka 1% (p/v) y Pectoliasa Y23 0,1% (p/v) en manitol 0,4 M, pH 5,8



**Figura 3.** Células Bright Yellow 2 (BY2) de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY2) en medio de cultivo. La barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

(200 ml/100 g de células frescas). La incubación se detuvo cuando, por observación al microscopio óptico, se ponía en evidencia la digestión completa de la pared celular (90-120 min). Con el objeto de eliminar acúmulos celulares no digeridos y restos de pared celular, los protoplastos resultantes se filtraron a través de una capa de Miracloth, se centrifugaron a 500 xg por 5 min, se lavaron por resuspensión en manitol 0,4 M y finalmente se resuspendieron en buffer TAN (4 ml/gr de células frescas).

#### 2.6. Aislamiento de proplástidos de células de tabaco

Se aislaron proplástidos utilizando el procedimiento de Nemoto y col. (1988) con algunas modificaciones. Los protoplastos de células de tabaco se rompieron mecánicamente por pasaje forzado de la suspensión a través de una malla de nylon de 20  $\mu\text{m}$  de poro ajustada a una jeringa. Este procedimiento se repitió una segunda vez. La preparación de protoplastos rotos fue centrifugada a 250 xg por 5 min con el objeto de eliminar núcleos celulares. Se filtró el sobrenadante a través de 2 mallas de nylon de 10  $\mu\text{m}$  por simple gravitación y el filtrado se llevó a 15% de Percoll. Por centrifugación del filtrado a 15.000 xg (10.500 rpm en SW 27) se obtuvo un pellet constituido principalmente por proplástidos. Este pellet fue resuspendido en buffer TAN (0,4 ml/g de células frescas), filtrado por pasaje a través de 2 mallas de nylon de 10  $\mu\text{m}$  y depositado sobre un sistema de colchones de sacarosa de 20, 40 y

60% (p/v) en buffer TAN. Luego de 40 min de centrifugación a 1.800 xg utilizando un rotor SW 27, se obtuvo una preparación purificada de proplástidos amarillos en la interfase existente entre 40 y 60% de sacarosa los que fueron lavados por resuspensión en buffer TAN y centrifugación a 1000 xg por 5 min. Finalmente, se resuspendió el pellet de proplástidos en el medio adecuado al experimento a ser realizado. La preparación de fracciones estromáticas y de membranas de proplástidos de células de tabaco se llevo a cabo por la rotura mecánica de los plástidos en presencia de buffer A. La separación de las membranas plastidiales de las proteínas no asociadas a ellas se consiguió por centrifugación a 140.000 xg.

### 2.7. Aislamiento de mitocondrias de células de tabaco

Se aislaron mitocondrias de las mismas células de tabaco siguiendo el procedimiento de Nemoto y col. (1988). Para tal fin se rompieron protoplastos como se indicó en la sección 2.6, excepto que el buffer de extracción contenía sacarosa 9% en lugar de sacarosa 17% (Buffer TAN). La suspensión de protoplastos rotos fue centrifugada dos veces a 1.700 xg por 10 min. Finalmente se colectaron mitocondrias por centrifugación del último sobrenadante a 9.500 xg por 30 min.

## 2.8. Medición de actividades enzimáticas

### 2.8.1. UDP glc : proteína transglucosilasa.

Se midió la transferencia de glucosa a partir de UDP-[<sup>14</sup>C]Glc a la proteína aceptora endógena según lo descrito por Lavintman y col. (1974). La mezcla de incubación contenía Cl<sub>2</sub>Mn 10 mM, UDP-[<sup>14</sup>C]Glc 2-4 μM (aprox. 100.000 cpm) y enzima (1 a 50 μg de proteínas) en un volumen de incubación de 50 a 200 μl. Las incubaciones se llevaron a cabo a 30 °C durante 30 min. La reacción se detuvo por el agregado de TCA frío a una concentración final de 10%. Se filtró a través de membranas de nitrocelulosa (Millipore BA85). Los filtros se lavaron por pasaje de 10 ml de TCA 10% frío, se secaron bajo lámpara infrarroja y se determinó la radioactividad colocando los filtros en viales de plástico junto con 3 ml de solución centelleadora que contenía 4 g de Omnifluor por litro de tolueno. Se midió la radioactividad en las muestras empleando un contador de centelleo líquido marca Beckman modelo LS 8100. Cuando las muestras se encontraban en presencia de CTAB, las mismas se llevaron a 0,66% de SDS previo al agregado de TCA para detener la reacción enzimática, evitándose así la precipitación del CTAB.

### 2.8.2. Fosforilasa dependiente de aceptor exógeno.

Esta actividad enzimática fue determinada en el sentido de la síntesis de glucanos de acuerdo con lo descrito por Sivak y col. (1981) con algunas modificaciones. Las mezclas de incubación contenían 300 μg de glucógeno de ostra, enzima (5 a 25 μg de

proteínas) y ( $^{14}\text{C}$ )Glc-1-P 1,5 mM (90.000 cpm) en un volumen de reacción de 100  $\mu\text{l}$ . Al término de la incubación a 30 °C (30 min) la reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de ClK 1% en metanol 70%. Luego de 15 min a 0 °C, se colectó el precipitado por centrifugación, se lo disolvió en 50  $\mu\text{l}$  de agua, se lo hirvió por 1 min y se reprecipitó con 1 ml de ClK 1% en metanol 70%. Este procedimiento se repitió 2 veces más para eliminar la marca radioactiva no incorporada. Finalmente, al precipitado disuelto en 50  $\mu\text{l}$  de agua, se agregó 3 ml de líquido de centelleo con 25% de Triton X-100 (v/v) en una solución de 4 g de Omnifluor por litro de tolueno en viales de plástico, y se cuantificó la radioactividad.

#### 2.8.3. Almidón sintetasa

La actividad de almidón sintetasa fue medida utilizando tanto ADP-Glc como UDP-Glc como dadores de glucosas. Las mezclas de reacción contuvieron glicina-NaOH 100 mM, pH 8; ADP(UDP)-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc (0,2 nmoles, 95.000 cpm), glucógeno de ostra 3 mg/ml y enzima. Luego de incubaciones por 60 min a 30 °C, las reacciones se detuvieron por agregado de 1 ml de ClK 1% en metanol 70% y luego de dos lavados, se determinó la radioactividad en el precipitado como se indicó en la sección 2.8.2.

#### 2.8.4. Nitrito reductasa

Se determinó la actividad de nitrito reductasa siguiendo la técnica descrita por Losada y Paneque (1971). El ensayo involucra ditionito de sodio como reductor y metil viológeno como

transportador de electrones. La reacción se llevó a cabo en aerobiosis en tubos de 10 ml. Se mezclaron 0,3 ml de buffer Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0, 0,2 ml nitrito de sodio 20 mM, 0,3 ml de metil viológeno 5 mM, 0,3 ml de solución de ditionito de sodio preparada en el momento (25 mg de ditionito de sodio en 1 ml de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  0,29 M) y preparación enzimática en un volumen final de incubación de 2 ml. Después de una incubación de 10 min a 30 °C, se detuvo la reacción por agitación vigorosa hasta completar la oxidación del ditionito de sodio monitoreada por desaparición del color. La determinación del nitrito remanente fue llevada a cabo siguiendo la técnica descrita por Nicholas y Nason (1957). Esta técnica se basa en la formación de un compuesto AZO de coloración roja. Esto involucra primero la reacción en solución ácida de una amina primaria como la sulfanilamida con el nitrito para formar una sal diAZO. Esta es luego acoplada a una amina aromática para dar el compuesto AZO coloreado cuya concentración se determina colorimetricamente. Alícuotas del ensayo enzimático, no mayores de 1,3 ml, se mezclaron con 0,5 ml del reactivo de sulfanilamida (sulfanilamida 1% en HCl 25%) seguido del agregado de 0,5 ml de hidrocloreuro de N-(1 naftil) etilendiamina 0,02%. Luego de 10 min se determinó la concentración de nitritos contra una curva estandar por lectura a 540 nm.

#### 2.8.5. Citocromo c oxidasa

Esta enzima fue ensayada de acuerdo con Hodges y Leonard (1974). La mezcla de incubación contenía digitonina 0.01% (p/v),

citocromo c 15  $\mu\text{M}$  (previamente reducido con cristales de ditionito de sodio), buffer fosfato 50 mM pH 7,5 y la fracción enzimática en un volumen de incubación de 1 ml. Se determinaron las velocidades de oxidación de citocromo c a 20 °C a partir de las pendientes iniciales (lineales). La cantidad de citocromo c utilizado fue estimado por el empleo de un coeficiente de extinción molar de  $18,5 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a 550 nm.

#### 2.8.6. Fosfogluconato deshidrogenasa

Esta actividad enzimática fue ensayada de acuerdo con Simcox y col (1977). La mezcla de incubación contenía  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  10 mM, Triton X-100 0,05%,  $\text{NADP}^+$  85  $\mu\text{M}$ , 6 fosfogluconato 0.1 mM y fracción enzimática en buffer Hepes-OHNa 25 mM pH 7,5 en un volumen de incubación de 0,5 ml. La reducción de  $\text{NADP}^+$  fue monitoreada a 340 nm considerando un coeficiente de extinción molar de  $6,22 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

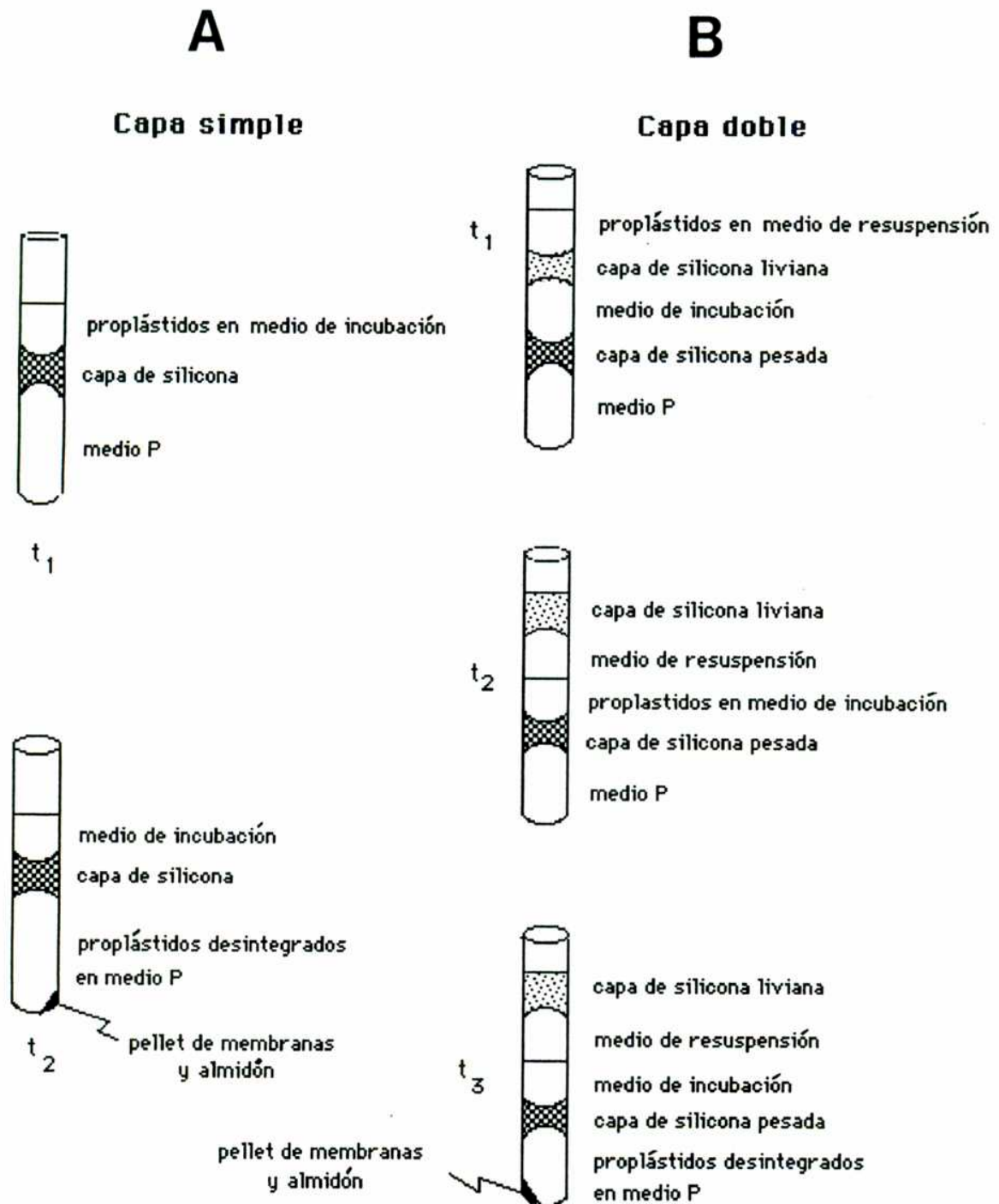
### 2.9. Medición de transporte de metabolitos

#### 2.9.1. Método de centrifugación en capa simple de silicona

Para establecer el ingreso de metabolitos a proplástidos intactos en función del tiempo se utilizó la técnica de centrifugación en capa única de aceite de silicona a 4 y a 20 °C (Werkheiser y Bartley, 1957). Esta técnica permite la interrupción (a los tiempos



deseados) de las incubaciones de plástidos con los metabolitos radiomarcados debido a la separación de los plástidos del medio de incubación. La centrifugación produce la migración de los plástidos hacia el fondo del tubo atravesando la capa de silicona mientras que el medio de incubación permanece por arriba de la capa de silicona debido a su menor densidad ( $\rho$ ). Al arribar al medio que se encuentra por debajo de la capa de silicona (medio P) se detiene todo proceso metabólico ya que se trata de un medio de alta acidez (Figura 4A). En estas condiciones, la fase soluble de los plástidos que contiene los metabolitos radiomarcados incorporados, se homogeneiza con el medio P, mientras que las membranas plastidiales y el almidón precipitan en el fondo del tubo. Con este objeto, alícuotas de proplástidos suspendidos en medio de suspensión (ver sección 2.2) (40  $\mu$ l,  $\rho=1,036$  a 4 °C) y en presencia de los metabolitos y/o inhibidores estudiados se depositaron a los tiempos de incubación elegidos, sobre una capa de aceite de silicona (75  $\mu$ l,  $\rho=1,057$  g/ml a 4 °C) dispuesta a su vez sobre una solución de HClO<sub>4</sub> 10% en sacarosa 0.4 M (medio P: 100  $\mu$ l,  $\rho=1,143$  g/ml a 4 °C) en tubos plásticos de 0,4 ml. Las densidades fueron elegidas de acuerdo a las características físicas de los proplástidos en estudio y fueron conseguidas por mezcla de silicona Wacker AR 20 Pharmas ( $\rho=1,004$  g/ml a 4 °C) y silicona SH 704 ( $\rho=1,081$  g/ml a 4 °C) para el caso de la capa de silicona y por variación de la concentración de sacarosa para el caso del medio P. La osmolaridad requerida para conservar la integridad de los plástidos en el medio de suspensión fue proporcionada por el empleo de manitol (en lugar de sacarosa)



**Figura 4.** Ilustración esquemática de los métodos de centrifugación sobre capas de aceite de silicona. A. Método de centrifugación sobre capa única de aceite de silicona. B. Método de centrifugación sobre doble capa de aceite de silicona.

obteniéndose así un medio con menor densidad que la capa de silicona. Después de la centrifugación por 1 min en centrífuga Eppendorf de mesa, se llevaron a cabo mediciones de la radioactividad en el medio de incubación, en alícuotas del medio P y/o en la fracción insoluble que contiene almidón sedimentado en el fondo del tubo.

En forma paralela a cada experimento se determinó el espacio intermembrana de los proplástidos con el objeto de realizar las correcciones necesarias relativas al transporte inespecífico de metabolitos radiomarcados. Los metabolitos con masas moleculares menores de 10-15 kDa tienen libre acceso a este espacio debido a la permeabilidad no selectiva de la membrana externa de los plástidos. Para tal fin, alícuotas de proplástidos fueron incubadas en presencia de [<sup>14</sup>C]sorbitol y/o [<sup>14</sup>C]sacarosa y luego de las centrifugaciones se cuantificó la marca incorporada en forma inespecífica a los plástidos que accedieron al medio P (Klingenberg y Kroger, 1965; Heldt y Sauer, 1971 y Werkheiser y Bartley, 1957).

### 2.9.2. Método de centrifugación en doble capa de silicona

Los estudios cinéticos fueron llevados a cabo a 4 °C utilizando la técnica de centrifugación a través de dos capas de aceite de silicona (Pozueta Romero y col., 1991b). Para esto, se cargaron delicadamente los proplástidos suspendidos en medio de suspensión (40 µl,  $\rho=1,036$  g/ml a 4 °C) sobre una capa de silicona liviana (75 µl,

---

$\rho=1,003$  g/ml a 4 °C). A 4 °C la capa de silicona liviana mantiene sobre su superficie al medio de suspensión por tensión superficial. La capa de silicona liviana separa inicialmente el medio de suspensión de proplástidos del medio de incubación que contenía manitol 0,4 M, sacarosa 0,1 M, EDTA 1 mM, ClK 25 mM, espermidina 1,2 mM y 2-mercaptoetanol 7 mM en buffer Tris ClH 20 mM, pH 7,5 (60  $\mu$ l,  $\rho=1,043$  g/ml a 4 °C) y los metabolitos radiomarcados a ser estudiados. Las incubaciones de los proplástidos con los metabolitos en el medio de incubación comenzó luego de la inmediata inversión de la silicona liviana con el medio de suspensión durante la centrifugación y el subsiguiente acceso de los plástidos al medio de incubación. Utilizando este dispositivo de capas de silicona (Figura 4B) el tiempo de incubación de los plástidos es función de la fuerza centrífuga a la que está sometido el sistema. En este caso, se utilizó una fuerza centrífuga de 2.900 xg por 4 min, que correspondió a 7 segundos de tiempo de incubación (ver Resultados). La reacción terminó cuando los proplástidos atravesaron el medio de incubación hacia la capa de aceite de silicona pesada (75  $\mu$ l,  $\rho=1,057$  g/ml a 4 °C) ubicada debajo del medio de incubación. Finalmente los proplástidos accedieron al medio P (100  $\mu$ l,  $\rho=1,143$  g/ml a 4 °C) que contenía ClO<sub>4</sub>H 10% en sacarosa 0.4 M, ubicado debajo de la capa de silicona pesada. Después de la centrifugación se procedió a medir la radioactividad en el medio de incubación y en el medio P.

En el caso de los estudios cinéticos de transporte de metabolitos utilizando centrifugaciones en el sistema de doble capa de silicona la determinación del transporte inespecífico fue llevada

a cabo siguiendo la técnica descrita por Pozueta-Romero y col. (1992) (ver Resultados).

## 2.10. Otras mediciones

### 2.10.1. Latencia

Con el objeto de establecer la integridad de los proplástidos aislados, se llevaron a cabo experimentos de latencia utilizando la actividad de 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) como enzima marcadora (Mac Donald y ap Rees, 1983). El ensayo consistió en la comparación de la actividad de 6PGDH medida en preparaciones frescas de proplástidos en medio de incubación osmoticamente estabilizado con sacarosa 16% (valor para la actividad enzimática no encerrada por membranas intactas) con el ensayo que contenía Triton X-100 0,1% que disrumpe las membranas de los plástidos sin modificar sustancialmente la actividad enzimática (valor para la actividad total) (Entwistle y ap Rees, 1988).

### 2.10.2. Almidón

El contenido de almidón de los proplástidos aislados fue determinado según Hatzfeld y Stitt (1990). Basicamente, las fracciones que contenían almidón fueron autoclavadas en presencia de 0,25 ml de agua por 40 min e incubadas en presencia de exceso de amiloglucosidasa y  $\alpha$ -amilasa durante toda la noche a 35 °C. Se determinó la cantidad de glucosa liberada utilizando un kit

comercial (Glucose assay kit) basado en el método de la glucosa oxidasa, y por comparación con una curva estandar.

### 2.10.3. Proteínas

La determinación de concentraciones proteicas en soluciones acuosas fue realizada según la técnica descrita por Lowry y col. (1951). Las proteínas fueron inicialmente precipitadas al llevar la solución proteica a 10% final de TCA en frio.

En casos en que se requirió de ensayos rápidos se empleó la técnica descrita por Bradford (1976). Muestras de hasta 0,1 ml se mezclaron con 2 ml de una solución de Coomassie Blue G 250 0,006% en ácido fosfórico 10%, se leyó a 595 nm contra el blanco y se ingresó a una curva de calibración de 10, 20, 30 y 40  $\mu$ g de BSA.

### 2.10.4. Carotenos

Se llevo a cabo la determinación de  $\alpha$ -carotenos de acuerdo con Washitani y Sato (1977). Basicamente, los carotenos fueron extraidos por solubilización en acetona 80% y su contenido relativo determinado por absorbancia a 470 nm.

## 2.11. Métodos cromatográficos

### 2.11.1. Cromatografía en columna de intercambio aniónico

#### 2.11.1.1. Columna de DEAE Sephacel.

La resina DEAE Sephacel es un intercambiador aniónico débil con una matriz de celulosa y cuyo grupo funcional es el dietilaminoetilo. La capacidad total iónica varía entre 5 y 135 mmoles/ml. El material se compactó en una columna de vidrio de 2,5 cm de diámetro hasta 10 cm de altura (volumen aproximado de 50 ml). La columna se equilibró por el pasaje de 200 ml de Buffer A, volumen al cual el pH del eluido correspondía al del buffer. Luego de sembrada la muestra se removieron las especies catiónicas y neutras por el pasaje de 100 ml de buffer A. Posteriormente se procedió a la separación de las especies unidas a la columna por el pasaje de un gradiente lineal de 0 a 0,5 M de ClK en Buffer A (350 ml en total). Se recogieron fracciones de 3,5 ml a una velocidad de flujo de 0,5 ml por min.

#### 2.11.1.2. Columna de Mono Q HR 5/5 (FPLC)

Las dimensiones de la columna fueron de 0,5 cm de diámetro y 5 cm de altura; el grupo activo es una sal de amonio cuaternaria con una capacidad iónica de 17 a 270 mmoles/ml de gel y se halla acoplado a un equipo de cromatografía FPLC (Pharmacia). La columna se equilibró con Buffer C. Luego de la siembra el aparato

pasó 2 volúmenes de columna del mismo buffer con el objeto de arrastrar las especies no interactuantes y finalmente confeccionó un gradiente de 0 a 0,5 M de ClK en Buffer C con el cual se eluyeron las especies cargadas negativamente (15 ml en total). La cromatografía transcurrió a una velocidad de flujo de 0,5 ml por min y se recogieron fracciones de 0,5 ml.

### 2.11.2. Cromatografía de tamizaje molecular

#### 2.11.2.1. Columna de Superosa 6 HR 10/30 (FPLC)

Esta columna tiene 1 cm de diámetro y 30 cm de altura. Su matriz de agarosa altamente polimerizada tiene un rango de separación de proteínas de 5 a 500 kDa. Esta columna se halla acoplada a un equipo de cromatografía FPLC (Pharmacia). Para componentes hidrofílicos esta columna guarda alta correlación entre volumen de elución y peso molecular, lo que permitió utilizarla no sólo como paso de purificación sino también para determinar el peso molecular relativo. Se sembraron alícuotas de hasta 0,5 ml y 5 mg de proteínas y se empleó el Buffer E.

#### 2.11.2.2. Columna de Superosa 12 HR 10/30 (FPLC)

Las dimensiones de esta columna son de 1 cm de diámetro y 30 cm de alto. Su matriz de agarosa tiene un rango de separación para proteínas globulares de 1 a 300 kDa. Se sembraron en ella



alícuotas de hasta un volumen de 0,5 ml y hasta 5 mg de proteínas y se empleó el Buffer E.

### Calibración de la columna de Superosa 12

Con el objeto de establecer la relación entre el peso molecular de proteínas y el correspondiente volumen de elución de esta columna se sometieron a cromatografía en el sistema FPLC diferentes muestras proteicas estándares. Se cromatografiaron 1 mg de las siguientes especies en presencia de Buffer E: tiroglobulina (bovina), BSA,  $\beta$ -amilasa (batata),  $\text{Cl}_2\text{Co}$ , anhidrasa carbónica (eritrocito bovino), alcohol deshidrogenasa (levadura) y citocromo c (corazón equino). La Figura 5A muestra los valores de  $K_{av}$  obtenidos para cada especie. La Figura 5B muestra la relación existente entre los diferentes  $K_{av}$  correspondientes a las proteínas estándares con los respectivos logaritmos de sus pesos moleculares.

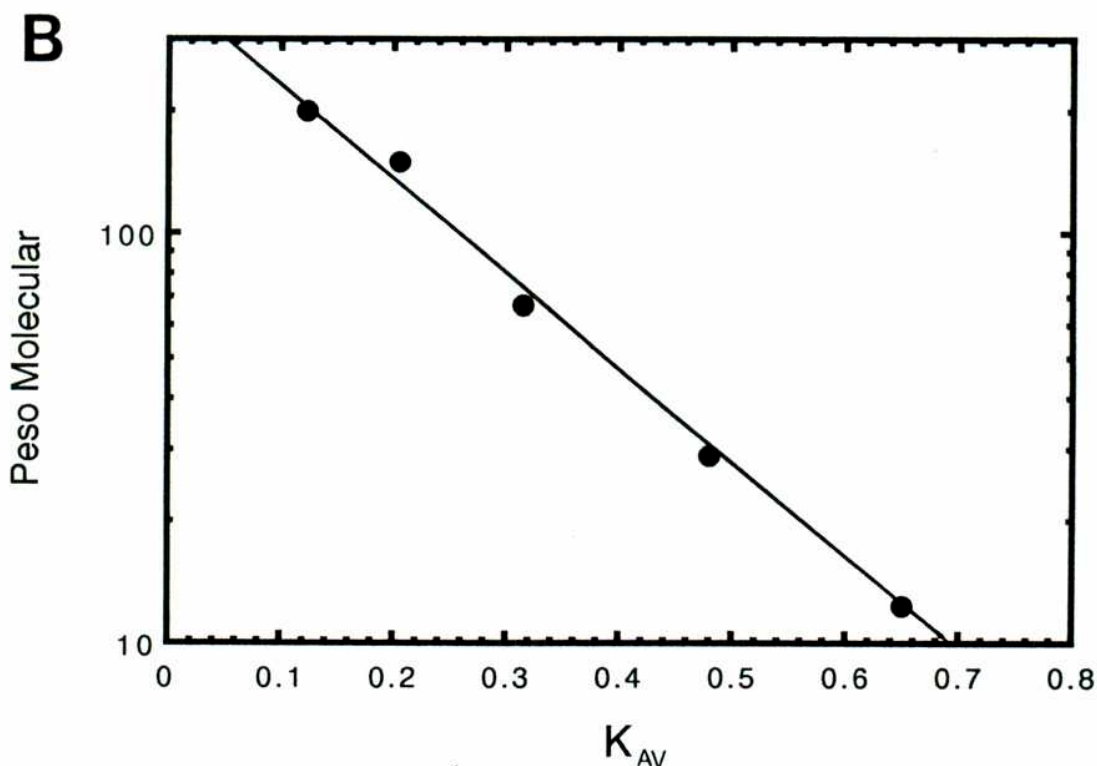
### 2.11.3. Cromatografías de afinidad

#### 2.11.3.1. Columna de concanavalina A Sepharosa

Se utilizó concanavalina A unida a Sepharosa 4B empaquetada en una columna de 2,5 cm de diámetro hasta 2,5 cm de altura (13 ml de volumen total). La columna se equilibró en Buffer B. Luego de sembrada la muestra se lavó la columna con el mismo buffer para separar las especies no interactuantes. Posteriormente se separaron las especies unidas a esta lectina por el pasaje de

**A**

Especies	$K_{av} = V_e - V_o / V_f - V_o$
tiroglobulina ( $V_o$ )= 6,75 ml	
$\beta$ amilasa (200 kDa)= 9 ml	0,123
alcohol desh. (150 kDa)= 10,5 ml	0,205
BSA (67 kDa)= 12,5 ml	0,315
anhidrasa carbónica (29 kDa)= 15,5 ml	0,480
citocromo c (12,4 kDa)= 18,6 ml	0,650
$Cl_2Co$ ( $V_f$ )= 25 ml	



**Figura 5. Calibración de la columna Superosa 12 (FPLC).**  
**A.** La Tabla muestra los valores de  $K_{av}$  obtenidos cuando se cromatografiaron 1 mg de tiroglobulina (volumen de exclusión),  $\beta$ -amilasa, alcohol deshidrogenasa, BSA, anhidrasa carbónica, citocromo c y  $Cl_2Co$  (volumen de inclusión) en la columna.  
**B.** Relación existente entre los valores de  $K_{av}$  y el peso molecular de las especies analizadas.

$\alpha$ -metilmanósido 0,2 M en Buffer B.

#### 2.11.3.2. Columna de Reactive red 120 agarosa

Se empaquetó una columna con 1 ml de Reactive red 120 unida a agarosa 4 % (3 a 5 mmoles totales de Reactive red 120). Inicialmente se pasaron 10 ml de urea 6 M en HONa 0,5 N y luego se neutralizó por el pasaje de 30 ml de agua. Posteriormente se equilibró la columna por el pasaje de 30 ml de Buffer D y se sembró 5 mg de BSA con el objeto de saturar el pegado inespecífico de proteínas. Finalmente y después de un exhaustivo lavado con el mismo buffer, se sembró la muestra a separar. El lavado de la columna se efectuó por el pasaje de 3 ml de Buffer D con el objeto de eluir las especies no interactuantes, para luego despegar las proteínas con afinidad por esta resina con el pasaje del mismo volumen de ClK 0,5 M en Buffer A. Se recogieron alícuotas de 0,3 ml.

#### 2.11.3.3. Columna de Uridina 5' difosfo-ácido glucurónico-agarosa

Se empaquetó una columna con 2 ml de uridina 5' difosfato-ácido glucurónico unida a una matriz de agarosa a través del ácido carboxílico con un espaciador de 6 carbonos. Se equilibró con Buffer F y las muestras fueron sembradas en presencia de dicho buffer. Se lavó la columna con el mismo buffer y se procedió entonces a separar las especies pegadas a la columna con un gradiente de 0 a 0,5 M de ClK en Buffer A. Se recogieron alícuotas de 1 ml.

## 2.12. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes fue llevada a cabo en geles planos armados en una celda marca Bio Rad modelo Mini-Protean™ II según lo descrito por Laemmli (1970) y algunas consideraciones de Fairbanks y col. (1971). Las dimensiones del gel fueron de 7 cm de alto, 8 cm de ancho y 0,75 mm de espesor. El tamaño del poro fue el relativo a una concentración de acrilamida de 10% y en el caso de los geles en gradiente se dispuso de una variación desde 8 a 15% utilizando sacarosa para la conformación del gradiente. En todos los casos se dispuso de un gel concentrador de 5% de acrilamida (la relación acrilamida:bisacrilamida fue de 38:1). Las muestras a ser sometidas a electroforesis fueron llevadas a una concentración final de TCA de 10% y mantenidas a 4 °C por al menos 30 min con el objeto de precipitar las proteínas. Las muestras que contenían CTAB fueron llevadas a 0,66% de SDS previo al agregado del TCA con el objeto de evitar la precipitación del CTAB. Luego de centrifugar y descartar el sobrenadante los precipitados de proteínas se solubilizaron en la mezcla desnaturalizante (ver sección 2.2). La mezcla se calentó a 100 °C por 2 min y fue finalmente sembrada sobre el gel. La electroforesis se desarrolló a 200 voltios por 45 min.

### 2.13. Electroforesis bidimensional

Se llevaron a cabo análisis de electroforesis bidimensional efectuando una primer corrida electroforética en condiciones nativas en geles de poliacrilamida (5%) en ausencia de SDS utilizando gel concentrador de 3%. La electroforesis se desarrolló a 100 voltios por 2 horas. Las distintas calles fueron luego cortadas y equilibradas por 5 min en mezcla desnaturizante. Luego de ser sometidas por 2 min a 100 °C, las calles fueron dispuestas en forma horizontal sobre geles de acrilamida 10% confeccionados en presencia de SDS. La electroforesis se desarrolló a 200 voltios por 45 min y simultáneamente se analizaron proteínas estándares de peso molecular conocido.

### 2.14. Tinción de proteínas con Coomassie blue en geles de poliacrilamida

Los geles fueron fijados y teñidos en una solución de Coomassie Blue G 250 0,25% en metanol:acético:agua (5:5:1) durante 2 horas y decolorados por agitación a 50 °C en una solución acuosa de ácido acético 7% y metanol 5%.

---

### 2.15. Tinción argéntica de proteínas en geles de poliacrilamida

Esta técnica fue llevada a cabo según lo descrito por Oakley y col. (1980). Todos los pasos fueron llevados a cabo en agitación y las soluciones preparadas en agua bidestilada. Los geles fueron prefijados por inmersión en una solución de metanol 50% y de ácido acético 10% durante 60 min. Luego se les permitió volver a sus dimensiones iniciales por lavado en metanol 5%, ácido acético 7% durante toda la noche. Posteriormente se fijó el material en una solución de glutaraldehído 10% por 30 min y se lavó con agua bidestilada por 2 hs. Los geles, entonces, fueron sumergidos en una solución de hidróxido de amonio 1,4% (v/v), hidróxido de sodio 19 mM y nitrato de plata 45,6 mM durante 15 min. Luego de lavar con abundante agua se reveló con el empleo de una solución de ácido cítrico 0,005% y de formaldehído 0,019%. Se detuvo el desarrollo de color con ácido acético 1% y lavados posteriores en agua. De tratarse de minigeles, el tiempo de tratamiento con cada reactivo fue de sólo la mitad.

### 2.16. Determinación del peso molecular de polipéptidos por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Junto con las muestras a ser analizadas se corrieron mezclas de proteínas de peso molecular conocido. Como marcadores de bajo

---

peso molecular se empleó el MW-SDS-70 L Kit (Sigma) que contiene las siguientes proteínas: BSA (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehido-3-P deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocito bovino (29 kDa), tripsinógeno de páncreas bovino (24 kDa), inhibidor de tripsina de semilla de soja (20,1 kDa) y lactalbúmina de leche bovina (14,2 kDa). Como marcadores de alto peso molecular se utilizó el MW-SDS-200 Kit (Sigma) que contiene: miosina de músculo de conejo (205 kDa),  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (116 kDa), fosforilasa b de músculo de conejo (97,4 kDa), albúmina, ovoalbúmina y anhidrasa carbónica. Con la distancia recorrida por los estándares se confeccionó una curva de calibración (log PM vs migración electroforética) que permitió el cálculo de los pesos moleculares de los polipéptidos presentes en las muestras analizadas. En algunos casos se emplearon las siguientes proteínas estándares preteñidas (MW-SDS-Blue-kit):  $\alpha_2$ -microglobulina (plasma humano),  $\beta$ -galactosidasa (*E coli*), Fructosa-6-P quinasa (músculo de conejo), piruvato quinasa (músculo de pollo), fumarasa (corazón porcino), láctico deshidrogenasa (músculo de conejo) y triosa fosfato isomerasa (músculo de conejo).

### 2.17. Detección fluorográfica de radioactividad en geles de poliacrilamida

Para la detección de radioactividad en geles de poliacrilamida se siguió la técnica descrita por Chamberlain (1970). Los geles se tiñeron con Coomassie Blue G 250 y luego de equilibrarlos en glicerol 5%, se sumergieron por 30 min y en agitación en una solución de salicilato de sodio 1 M. Luego de secarlos, se los expuso a una placa sensible (X-OMAT™ AR 5 Kodak) la que fue revelada luego del tiempo de exposición indicado en cada caso.

### 2.18. Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa

La transferencia electroforética de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros de nitrocelulosa fue llevada a cabo de acuerdo con Towbin y col. (1979). Al cabo de la corrida electroforética en condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS, el gel fue dispuesto sobre un filtro de nitrocelulosa y ambos colocados en la rejilla del aparato de electrotransferencia entre hojas de papel Whatman #3. La transferencia fue realizada a 80 V por 2 hs a 4 °C en Buffer de transferencia. Posteriormente se enjuagó el filtro en agua destilada y se dejó secar con el objeto de fijar las proteínas al papel de nitrocelulosa.



### 2.19. Tinción de proteínas en filtros de nitrocelulosa utilizando Ponceau S

Se incubaron los filtros en Ponceau S 0.5 % (p/v) en ácido acético glacial 1% (v/v) con el objeto de teñir los polipéptidos de una manera reversible que permita luego el desafío de los mismos con los anticuerpos. Cuando apareció un patrón de polipéptidos de intensidad satisfactoria, los filtros se lavaron con agua para eliminar el fondo. Luego de ser fotografiados, los filtros se lavaron con agua hasta desaparición de las señales.

### 2.20. Desafío con anticuerpos

Con el objeto de detectar los polipéptidos reconocidos por los anticuerpos empleados, los filtros fueron bloqueados inicialmente por incubación en una solución de BSA 1% en PBS por 30 min para prevenir el posterior pegado inespecífico de anticuerpos. Se incubó luego en antisuero diluido convenientemente en la misma solución de BSA en PBS por 1,5 hs. Se lavó luego con TBS por 0,5 hs con SDS 0.1%, deoxicolato de sodio 0,5% y 1.1% Triton X-100 en TBS por 0,5 hs y nuevamente en TBS por otros 30 min. La detección de las proteínas reconocidas por los anticuerpos fue llevada a cabo según el procedimiento descrito por Blake y col. (1984). Para ello todas las siguientes incubaciones de los filtros fueron realizadas en agitación y a temperatura ambiente. Los filtros lavados se

incubaron durante 1 h en presencia de una dilución 1/500 de anticuerpos de cabra anti IgG (H y L) purificados por afinidad, conjugados con fosfatasa alcalina altamente purificada de intestino de ternero. Luego de exhaustivos lavados con TBS y detergentes como se describió, se puso en evidencia la localización de estos anticuerpos por el producto coloreado que la fosfatasa alcalina produce en presencia de nitro blue tetrazolium 0.1 mg/ml,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  4 mM y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato 0.05%. Cuando el desarrollo de color fue satisfactorio se lavó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente.

#### 2.21. Micrografías electrónicas

Para la obtención de las micrografías electrónicas de las preparaciones de proplástidos de células de tabaco, las muestras fueron fijadas en presencia de glutaraldehído 2,5% en buffer TAN por 10 hs a 4 °C. Luego de delicados lavados (3 veces) con buffer TAN, las muestras fueron teñidas con ácido ósmico 1%. Las micrografías electrónicas fueron realizadas por el Dr. Kiyohide Kojima en el Instituto de Investigaciones de Mecanismo y Control de Enfermedad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Nagoya, Japón.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Capítulo 1**

##### **Identificación y purificación de la enzima UPTG de proplástidos de tubérculo de papa**

Trabajos que describen purificaciones parciales de la actividad UPTG no consiguieron identificar la proteína responsable de esta actividad ni la separación de la enzima de la proteína aceptora (Moreno y col., 1986). Frente a esta última circunstancia se postuló que a) ambas proteínas copurificaban por los criterios de separación empleados o b) que la capacidad aceptora residía en la misma proteína con actividad enzimática. Con el objeto de dilucidar cuál de estas dos posibilidades es la correcta se procedió a un análisis cromatográfico exhaustivo del P<sub>140</sub> solubilizado de tubérculo de papa persiguiendo la posibilidad de la separación de esta dos funciones.

##### **3.1.1. Comportamiento cromatográfico**

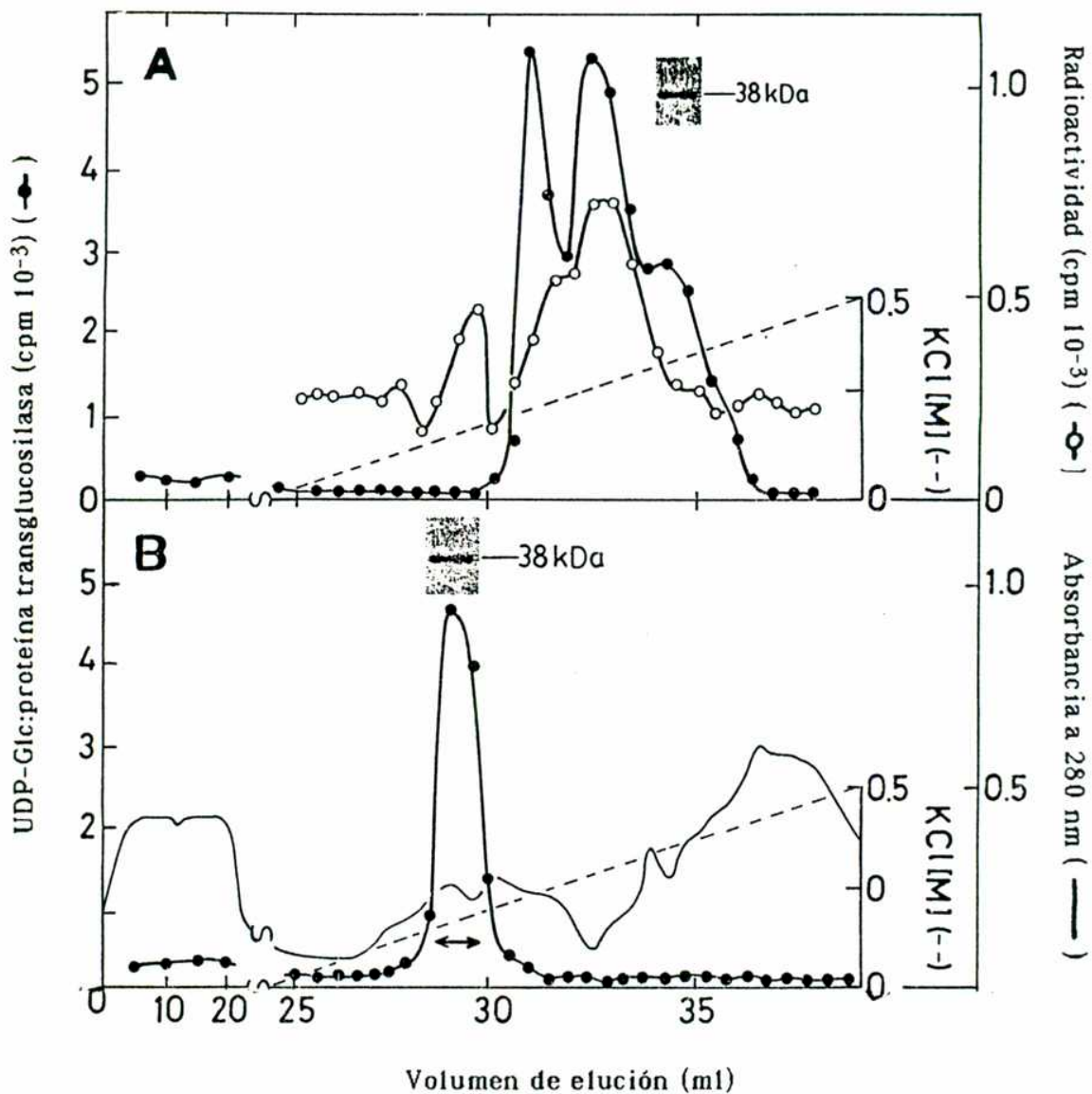
##### **3.1.1.1. Cromatografías de intercambio aniónico**

La cromatografía de intercambio aniónico en columna Mono Q HR 5/5 (FPLC) de una preparación solubilizada de membranas de

---

proplástidos de tubérculo de papa (P<sub>140</sub> sol) en presencia de Buffer C resultó en la unión de la actividad UDP-Glc: proteína transglucosilasa en estudio a dicha columna. Su perfil de elución con un gradiente de 0 a 0,5 M de ClK en el mismo buffer mostró que esta actividad eluye en un amplio rango de fuerza iónica que va de 0,2 a 0,4 M de ClK mostrando, entonces, una marcada heterogeneidad de carga (Figura 6A).

Si la heterogeneidad de carga observada era debida a interacciones moleculares débiles entre las moléculas proteicas aquellas podrían ser eliminadas por incremento de la fuerza iónica del medio en que se encuentran. Con este objeto, se efectuó el mismo análisis cromatográfico pero esta vez en presencia de Buffer A (Tris 100 mM contra Tris 50 mM del Buffer C). La actividad enzimática, en este caso, eluyó en forma de un pico agudo con ClK 0,15 M (Figura 6B). En ambos casos se recuperó más del 90% de las unidades enzimáticas sometidas al análisis cromatográfico. Al detectarse actividad enzimática luego de la separación proteica y al obtenerse el grado de recuperación señalado se concluyó que el aceptor proteico debía coeluir con la enzima si es que se trataba de proteínas diferentes. La posibilidad de que la detección de actividad enzimática se deba a la fortuita superposición en la elución de la columna de Mono Q de la enzima con la proteína aceptora de moléculas de glucosa podría descartarse a partir de la observación del amplio rango en que se detectó actividad de UPTG utilizando buffer de baja fuerza iónica.



**Figura 6.** Cromatografías de intercambio aniónico en columna Mono Q (FPLC). **A.** El P140 solubilizado (5,5 mg de proteínas) fue cromatografiado en una columna Mono Q en presencia de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 y 2-mercaptoetanol 20 mM. (—●—) Actividad UPTG en alícuotas de 0,1 ml. (—○—) Radioactividad precipitable por TCA 10% luego de la recromatografía en el mismo sistema de la fracción 63 (0,4 ml) incubada en presencia de UDP-[<sup>14</sup>C]Glc y Mn<sup>2+</sup>. **B.** El P140 solubilizado (10 mg de proteínas) fue cromatografiado en una columna Mono Q en presencia de buffer Tris 100 mM, pH 7.4 y 2-mercaptoetanol 20 mM. La actividad de UPTG fue determinada en alícuotas (0,03 ml) de cada fracción. El inserto muestra la fluorografía luego de SDS-PAGE del producto de la reacción catalizada por UPTG (38 kDa) obtenido por incubación de una alícuota (0,06 ml) del pool indicado por la doble flecha, en presencia de UDP-[<sup>14</sup>C]Glc y Mn<sup>2+</sup>.

---

Empleando una alícuota enzimáticamente activa purificada por columna de Mono Q (a baja fuerza iónica) e incubada en presencia de  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  y  $\text{UDP-}^{14}\text{C}]\text{Glc}$ , se procedió al análisis del producto radiomarcado de la actividad en estudio por recromatografía en el mismo sistema separativo. Si la glucosilación de la proteína aceptora condujese a su separación de la proteína enzimática, se esperaría un cambio en su comportamiento cromatográfico en este sistema. El producto radiomarcado de UPTG se unió a esta matriz y eluyó con un amplio rango de concentración salina que coincidió con la molaridad a la que eluyó la actividad enzimática (Figura 6A). Este resultado sugiere que la formación del producto glucosilado no condujo a su separación de la enzima.

La cromatografía de intercambio aniónico en columna de DEAE-Sephacel de una preparación solubilizada tampoco consiguió la separación entre aceptor proteico y enzima a la luz de la recuperación en la actividad enzimática unida a su matriz de más del 90% de las unidades enzimáticas sembradas a la columna (no mostrado).

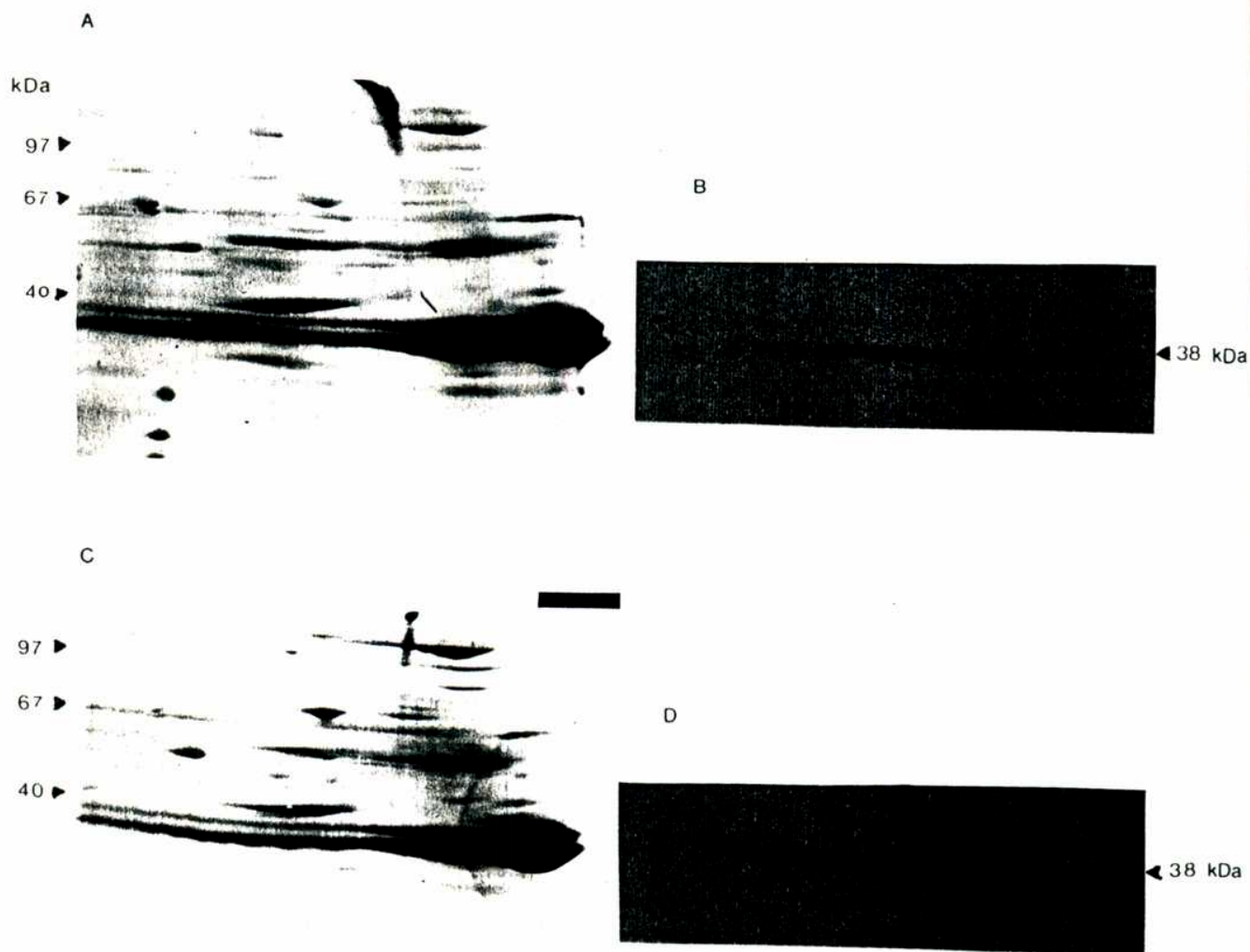
El análisis por fluorografía luego de SDS-PAGE de los productos de la reacción obtenidos por incubación de las fracciones enzimáticamente activas purificadas por columna de Mono Q (Figura 6A y B) en presencia de  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  y  $\text{UDP-}^{14}\text{C}]\text{Glc}$  indicó la presencia de un polipéptido radiomarcado de 38 kDa (Figura 6A y B, insertos). Un polipéptido de idéntico peso molecular es el producto de esta reacción enzimática cuando se emplea como fuente de UPTG una fracción solubilizada de membranas de proplástidos de tubérculo de

---

papa sin purificar (Moreno y col., 1986). Fluorografía luego de electroforesis bidimensional de los productos formados por la actividad UPTG en la fracción solubilizada y en la fracción solubilizada purificada parcialmente por cromatografía de intercambio aniónico en columna Mono Q (Figura 7B y D), puso también de manifiesto la coincidencia en las características físicas (relación de tamaño y carga en la primera dimensión y tamaño en la segunda) de ambos productos. Se concluyó entonces que la actividad enzimática detectada luego de las cromatografías efectuadas continuaba operando sobre el mismo sustrato aceptor que actúa en la preparación enzimática total a pesar de la separación proteica conseguida en las cromatografías señaladas. Además, el análisis fluorográfico de los productos señaló, de nuevo, la existencia de una heterogeneidad de carga y/o de tamaño de los productos en condiciones nativas a juzgar por la extensión de la señal radioactiva en el transcurso de la primera dimensión (Figura 7B y D).

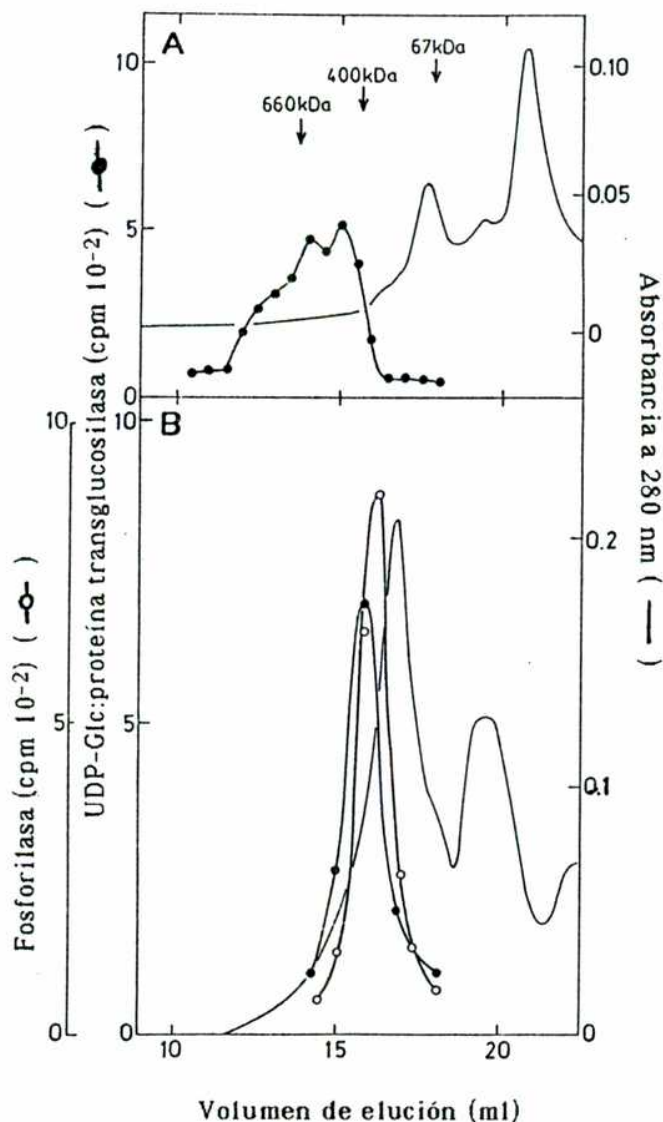
### 3.1.1.2. Cromatografía de tamizaje molecular

La actividad enzimática en estudio purificada por Mono Q fue sometida a cromatografía de tamizaje molecular en columna Superose 6 HR 10/30 (límite de exclusión: 5000 kDa) en presencia del Buffer E. Toda la actividad enzimática eluyó en un amplio rango de peso molecular que se extendía de 200 a 500 kDa indicando una heterogeneidad de tamaño para esta enzima en estas condiciones (Figura 8A). Nuevamente, también por este criterio separativo, el aceptor proteico y la actividad enzimática seguían copurificando.



**Figura 7.** Detección fluorográfica del producto de UPTG sometido a electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. Alícuotas (0,04 mg de proteínas) correspondientes a un P<sub>140</sub> solubilizado (A y B) y a una fracción parcialmente purificada por columna Mono Q (C y D) fueron incubadas en presencia de UDP-[<sup>14</sup>C]Glc y Mn<sup>2+</sup> y sometidas a electroforesis en gel plano de poliacrilamida (5%) en condiciones nativas (1<sup>ra</sup> dimensión). Posteriormente los geles fueron dispuestos sobre geles planos de 10% poliacrilamida y sometidos a electroforesis en presencia de SDS (2<sup>da</sup> dimensión). A y C. Tinción de proteínas con Coomassie blue. B y D. Fluorografía. Los marcadores de peso molecular, corridos en la segunda dimensión, aparecen a la izquierda (A y C).





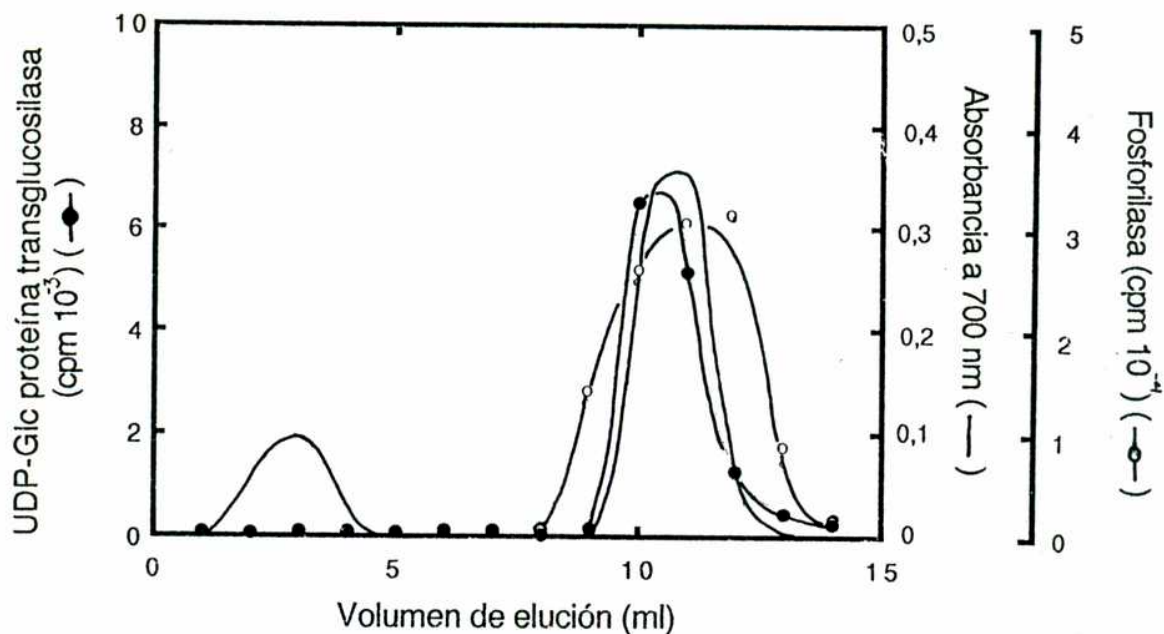
**Figura 8.** Cromatografías en columna Superosa 6 (FPLC). Se sometieron alícuotas (0,3-0,5 mg de proteínas) correspondientes a fracciones parcialmente purificadas por columna Mono Q (Figura 6B) a cromatografía de tamizaje molecular en columna Superosa 6 en presencia (A), o en ausencia de Lubrol PX 1% (B). Se determinó actividad UPTG y fosforilasa en alícuotas (0,05 ml) de cada fracción eluida de la columna, como se indica en Materiales y Métodos. Se indican con flechas los volúmenes de elución de los marcadores de 660 kDa (tiroglobulina), 400 kDa (ferritina) y 67 kDa (BSA).

---

### 3.1.1.3. Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad ha sido utilizada repetidamente en la purificación de diferentes glicosiltransferasas (Matern y col., 1990). Se intentó entonces el empleo de este método separativo como otra herramienta para intentar la identificación de la proteína responsable de la actividad UPTG. Las Figuras 9, 10 y 11 muestran los resultados obtenidos en las cromatografías en columnas de uridina 5' difosfo-ácido glucurónico-agarosa, concanavalina A Sepharose 4B y Reactive red 120 agarose, respectivamente. Una alícuota con actividad de UPTG, parcialmente purificada por cromatografía de intercambio aniónico en columna Mono Q (FPLC) fue sometida a cromatografía de afinidad en columna de uridina 5' difosfo-ácido glucurónico-agarosa. Esta matriz tiene la capacidad de unir proteínas que interaccionan de alguna manera con UDP-GlcUA. La similitud entre este metabolito y el sustrato de la enzima en estudio (UDP-Glc) hizo pensar en la posibilidad que la UPTG interactuase con esta columna. La actividad UPTG mostró afinidad por el UDP-GlcUA uniéndose a la columna y sólo pudo ser despegada, junto con la mayoría de las proteínas contaminantes, por el pasaje de 0,2 y 0,3 M ClK en buffer A (Figura 9).

Por otra parte una alícuota correspondiente a un P<sub>140</sub> solubilizado fue sometida a cromatografía de afinidad en columna de concanavalina A Sepharose 4B. La concanavalina A es una lectina que interacciona con glicoproteínas del tipo alta manosa (Goldstein, 1976). La actividad de UPTG eluyó de esta columna con



**Figura 9.** Cromatografía de afinidad en columna de uridina 5' difosfo-ácido glucurónico-agarosa. Una alícuota (0,45 mg de proteínas) correspondiente a una fracción parcialmente purificada por columna Mono Q fue sometida a cromatografía en columna (2 ml) de uridina 5' difosfo-ácido glucurónico-agarosa. Las actividades de UPTG y fosforilasa fueron determinadas en alícuotas de 0,18 y 0,1 ml, respectivamente, de cada fracción eluída de la columna, como se indica en Materiales y Métodos.

---

el lavado de la misma sin interaccionar con la lectina (Figura 10). No obstante, el perfil de elución proteico, determinado por el metodo de Lowry, señala una importante separación de proteínas contaminantes que sólo fueron despegadas de la columna por el pasaje de  $\alpha$ -metilmanósido 0,2 M. Esta separación se puso de manifiesto por SDS-PAGE como se muestra en el inserto de la Figura 10. La calle correspondiente a la fracción 16 muestra el patrón de polipéptidos correspondiente al material proteico separado de la actividad de UPTG. Se observan importantes cantidades de polipéptidos de 38 y 40 kDa entre otros. El polipéptido de 40 kDa es atribuible a la proteína patatina, la glicoproteína más abundante del tubérculo de papa (Kirshner y Hahn, 1986).

Finalmente, una alícuota con actividad de UPTG parcialmente purificada por cromatografía de afinidad en columna de concanavalina A Sepharosa 4B fue sometida a cromatografía de afinidad en columna de Reactive red 120. A pesar que el tipo de interacción que establece esta resina con las proteínas interactuantes no está del todo clarificado, se asume que las proteínas que interactúan con cationes divalentes se unen a esta matriz. La actividad de UPTG se unió a la resina consiguiéndose su separación por el empleo de ClK 0.5 M en Buffer A, como se muestra en la Figura 11. Nuevamente, el perfil de elución proteica muestra una separación de proteínas contaminantes que son eliminadas por el simple lavado de la columna con Buffer A.

La imposibilidad de separar la proteína enzimática de la proteína aceptora por ninguno de los métodos separativos

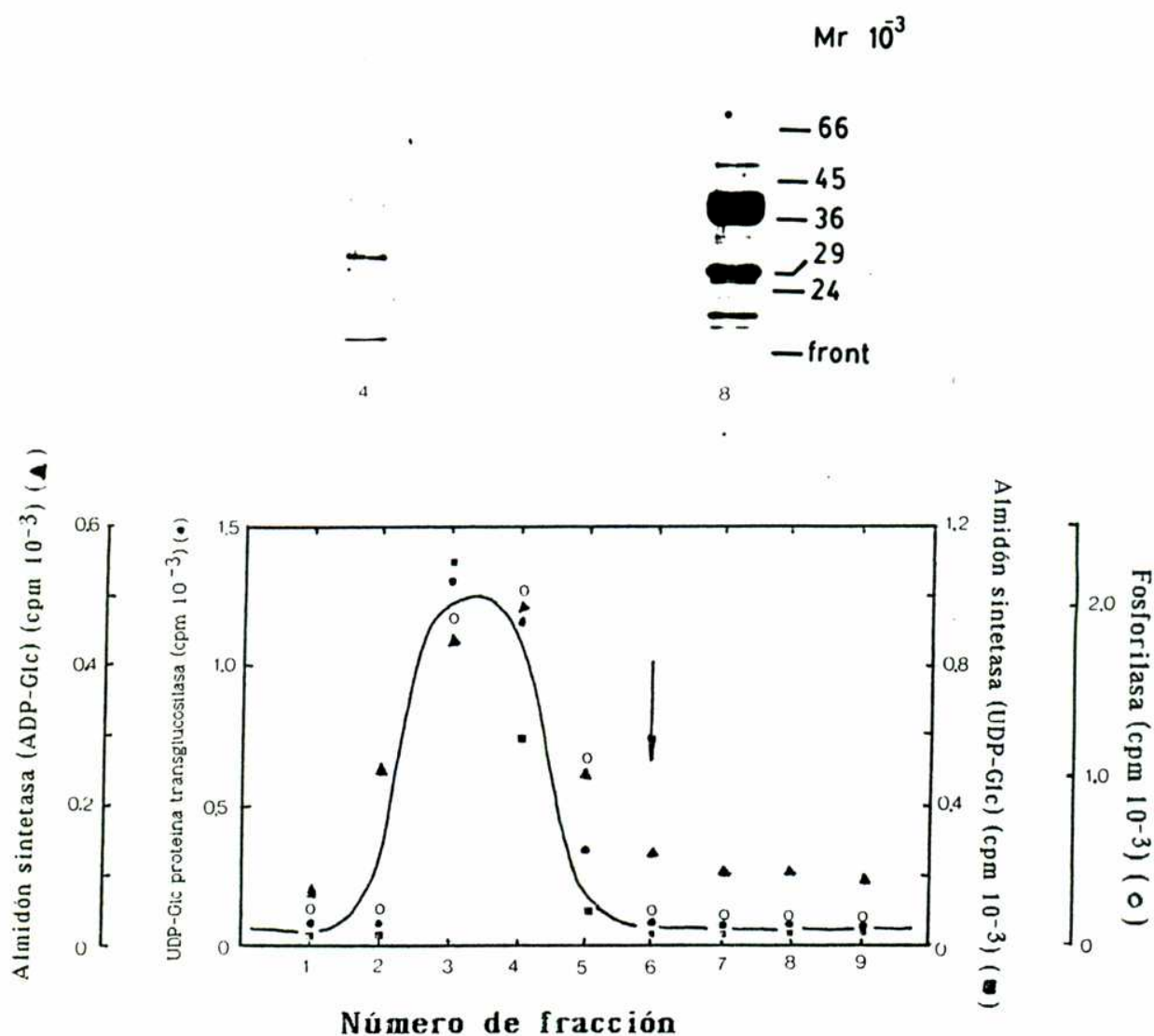
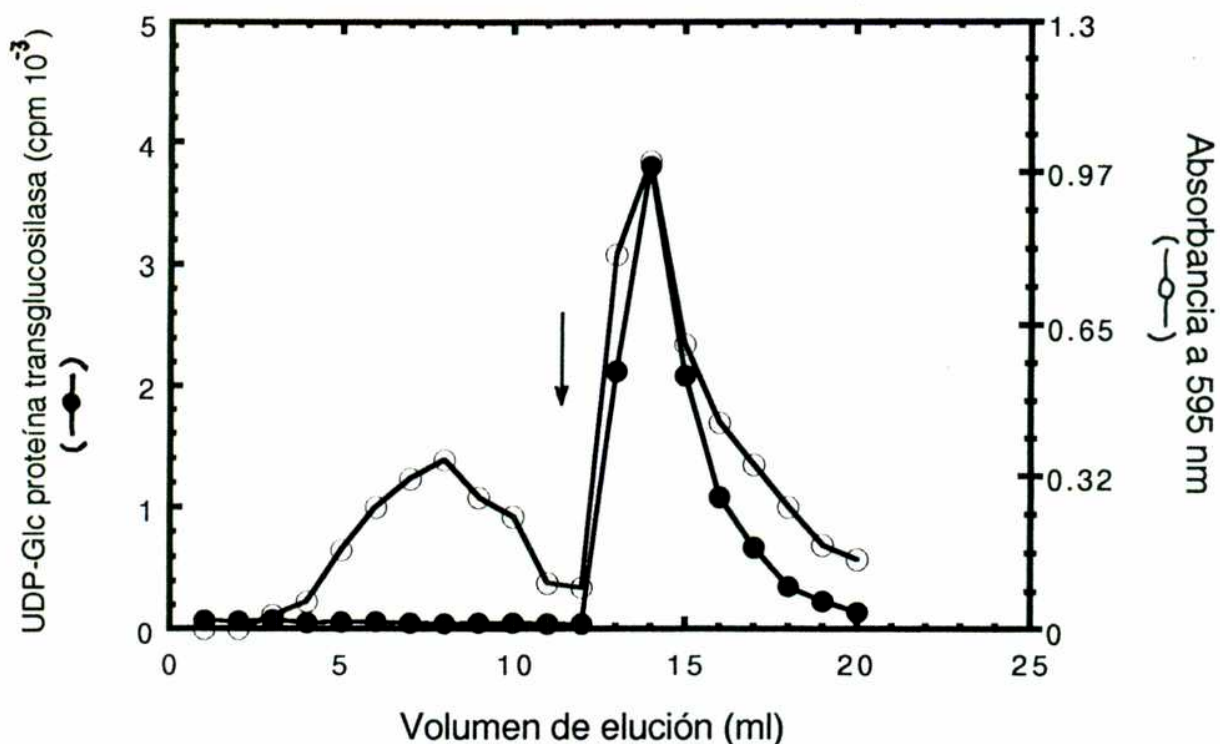


Figura 10. Cromatografía de afinidad en columna de Concanavalina A-Sepharosa 4B. Una alícuota (1 mg de proteínas) correspondiente a un  $P_{140}$  fue sometida a cromatografía en columna de concanavalina A-Sepharosa 4B. Las actividades UPTG, fosforilasa y almidón sintetasa fueron determinadas en alícuotas de 0,1 ml de cada fracción (2 ml) eluida de la columna, como se indica en Materiales y Métodos. La flecha indica el inicio del pasaje de  $\alpha$ -metilmanósido 0,2 M en buffer B. El inserto muestra la tinción argéntica de las proteínas correspondientes a las fracciones 4 y 8 separadas por SDS-PAGE.





**Figura 11. Cromatografía de afinidad en columna de Reactive red 120.** Una fracción enzimática (1 mg de proteínas) parcialmente purificada por cromatografía en columna de concanavalina A Sepharosa 4B fue sometida a cromatografía en columna de Reactive red 120 agarosa (4 ml). La actividad de UPTG fue determinada en alícuotas (0,2 ml) de cada fracción eluida de la columna, como se indica en Materiales y Métodos. La flecha indica el inicio del pasaje de ClK 0,5 M en buffer D.

---

empleados se puso de manifiesto por el alto grado de recuperación de la actividad de UPTG en las cromatografías señaladas. No se observaron luego de las cromatografías disminuciones significativas de la actividad enzimática que pudieran ser atribuidas a dicha separación.

### 3.1.2. Asociación de UPTG con enzimas metabólicamente relacionadas

Además de la íntima asociación que mantendría unidos a la enzima UPTG, su sustrato aceptor y su producto glucosilado (de ser proteínas diferentes) demostrado por la imposibilidad de separarlos con los métodos separativos señalados, se observó en todos estos casos una asociación estrecha de la actividad en estudio con actividades enzimáticas metabólicamente relacionadas. A pesar de que las actividades de almidón sintetasa y fosforilasa eluyen de la columna de Mono Q con concentraciones de ClK mayores de 0,4 M, una considerable proporción de estas actividades enzimáticas coeluyeron con la actividad de UPTG (Figura 12). Esta coelución se observó empleando en la cromatografía tanto el buffer de baja como el de alta fuerza iónica (no mostrado). Estas enzimas, entre otras proteínas copurificantes, fueron también detectadas en las fracciones con actividad UPTG obtenidas luego de las cromatografías de tamizaje molecular (Figura 8) y de afinidad (Figuras 9 y 10). La persistencia de esta copurificación frente a criterios de separación

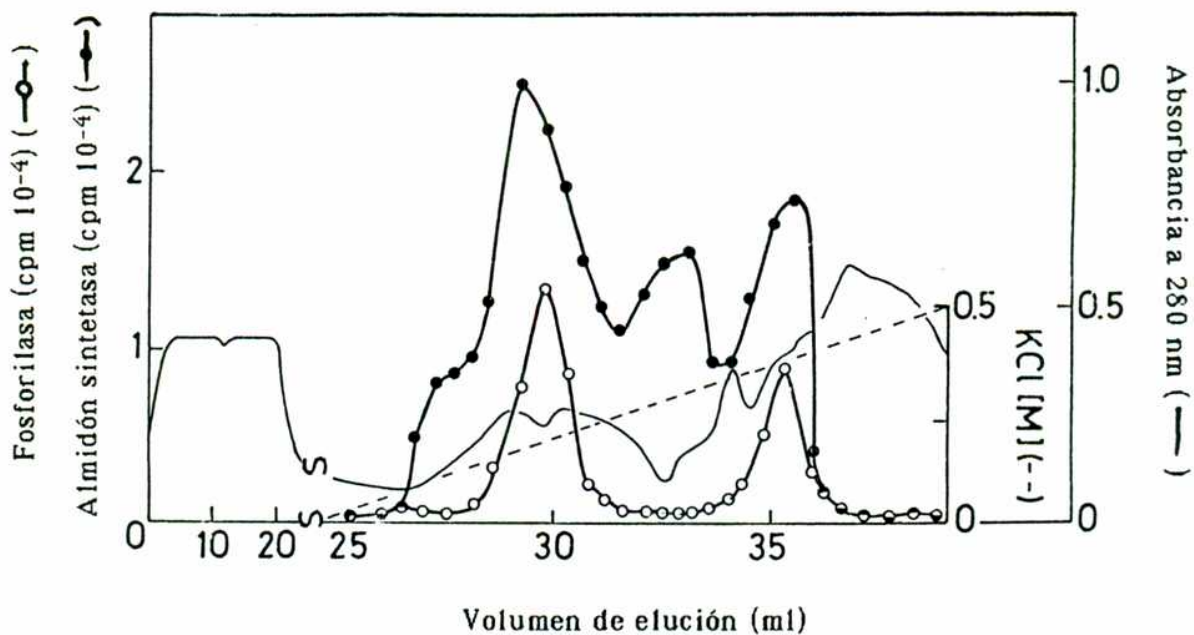


Figura 12. Cromatografía de intercambio aniónico en columna Mono Q. Perfil de elución de las actividades de almidón sintetasa y fosforilasa correspondiente al análisis cromatográfico de la Figura 6B. Las actividades de fosforilasa y almidón sintetasa fueron determinadas en alícuotas de 0,025 y 0,050 ml, respectivamente, de cada fracción eluida de la columna, como se indica en Materiales y Métodos.

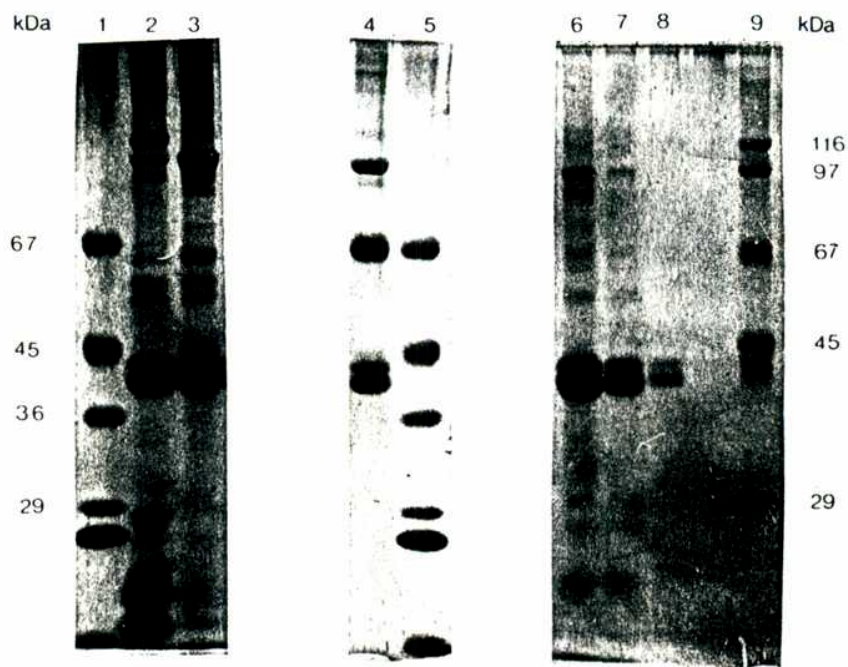


---

tan diferentes empleados durante esta purificación puso en duda la posibilidad que, por ejemplo, UPTG, fosforilasa y almidón sintetasa cumplan por igual las condiciones requeridas para exhibir el mismo comportamiento bajo los análisis efectuados. Por ejemplo, no eran esperadas las uniones de las actividades fosforilasa y almidón sintetasa a la columna de UDP-GlcUA por cuanto los sustratos de estas enzimas difieren notoriamente del UDP-GlcUA. Además, los pesos moleculares de las fosforilasas (Nakano y Fukui, 1986, Moreno y Tandecarz, 1989) y las almidón sintetisas (Ponstein y col., 1990) de tubérculo de papa no corresponden con el volumen de elución mostrado por estas actividades en la cromatografía de tamizaje molecular (Figura 8).

La Figura 13 muestra el SDS-PAGE de alícuotas con actividad de UPTG purificadas por los métodos descritos (Figuras 6B, 9 y 11). Los perfiles proteicos obtenidos permiten apreciar la existencia de polipéptidos mayoritarios de 38, 40 y 94 kDa, entre otros, que copurifican en forma sistemática con la actividad UPTG.

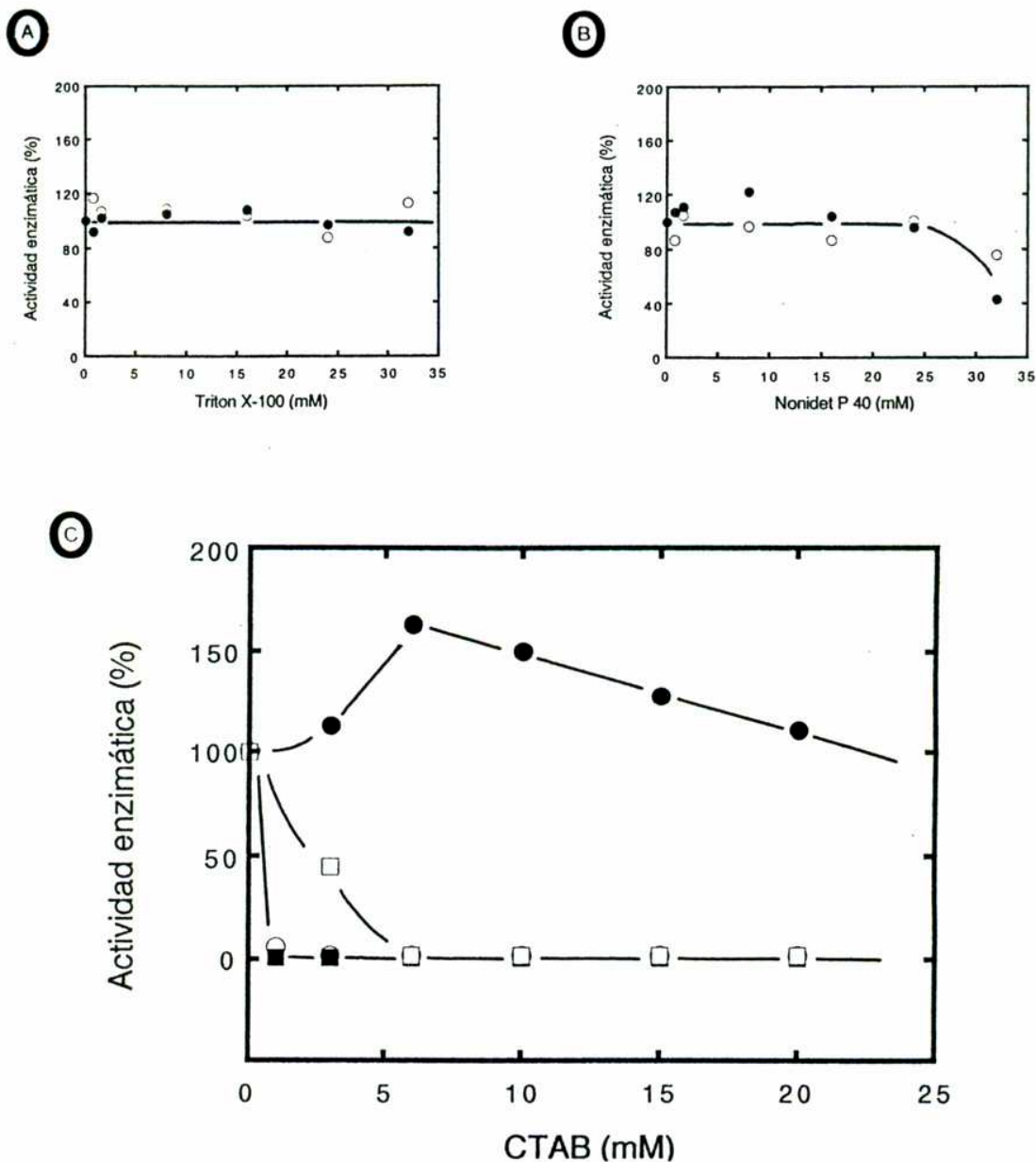
Considerando estos resultados se pensó en la posibilidad que existiese una asociación entre estas proteínas que justificara la persistente copurificación observada. Mas aún, esta posible agregación sería también responsable de la heterogeneidad de carga y de tamaño de la UDP-Glc:proteína transglucosilasa en estudio, puesta de manifiesto por las cromatografías en Mono Q (Buffer C) y en Superosa 6 (Figuras 6 y 8A). Por otra parte, esto podría explicar la imposibilidad de separar la enzima UPTG de su proteína aceptora ya que la actividad enzimática no fue abolida por ningún sistema de



**Figura 13.** Tinción argéntica de proteínas separadas por SDS-PAGE. Las siguientes alícuotas con actividad UPTG fueron sometidas a SDS-PAGE (10%): calle 1, marcadores de peso molecular; calle 2, 40 µg P<sub>140</sub> solubilizado; calle 3, 40 µg fracción purificada por columna Mono Q; calle 4, 30 µg fracción purificada por columna de Reactive red 120 agarosa; calle 5, marcadores de peso molecular; calles 6, 7 y 8, 30 µg, 20 µg y 10 µg fracciones purificadas por columna de UDP-GlcUA agarosa; calle 9, marcadores de peso molecular.

---

separación proteica. Uno de los principales problemas que se encuentra en la purificación de proteínas naturalmente asociadas a membranas es su tendencia a agregarse por su naturaleza hidrofóbica (Newby y Chrambach, 1979). Se postuló entonces, que la imposibilidad de avanzar en la purificación de la enzima UPTG era debida a la agregación de la enzima con otras proteínas. Se probaron entonces diferentes detergentes con el objeto de disociar agregados proteicos. Se pensó que el mejor criterio para establecer la separación de los agregados proteicos observados era la obtención de una enzima UPTG menos polidispersa y de menor peso molecular. Los detergentes fuertemente iónicos generalmente producen polipéptidos individuales complejados al detergente pero estos usualmente se encuentran desnaturalizados e inactivos. Por otra parte, los detergentes no iónicos y las sales biliares a menudo preservan las funciones proteicas pero su accionar es menos efectivo. Las actividades enzimáticas tanto de UDP-Glc: proteína transglucosilasa como de fosforilasa que fue utilizada como actividad enzimática control, a partir de su copurificación con la primera no mostraron variaciones en función de la concentración de Tritón X-100 en que fueron preincubadas por 1 hora a 0 °C (Figura 14). Preincubaciones similares, pero en presencia de distintas concentraciones de Nonidet P40, produjeron un deterioro de las actividades enzimáticas a concentraciones de detergente mayores al 25 mM sin alterarlas por debajo de las mismas (Figura 14). El mismo tratamiento pero con Lubrol PX 1% incrementó 3 veces con respecto al control la actividad de fosforilasa sin afectar la actividad de UPTG



**Figura 14.** Efecto de detergentes sobre las actividades enzimáticas. Alícuotas ( $6 \mu\text{g}$  de proteínas) de preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas por columna Mono Q fueron preincubadas a  $0^\circ\text{C}$  por 60 min en presencia de diferentes concentraciones de Triton X-100 (A), Nonidet P 40 (B) y CTAB (C). Al cabo de la preincubación, se determinó la actividad de UPTG (●), fosforilasa (○) y almidón sintetasa (ADP-Glc □ ; UDP-Glc ■) como se indica en Materiales y Métodos. Se indican porcentajes de actividad referidos a preincubaciones en ausencia de detergente.

---

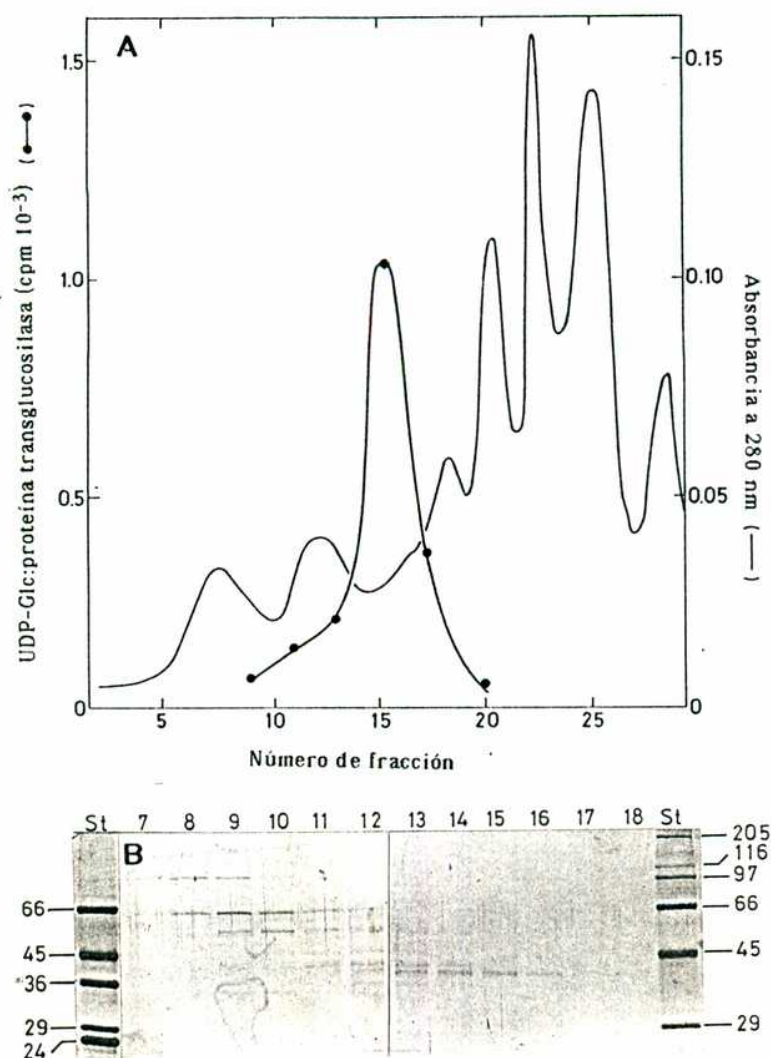
Este comportamiento diferencial de las actividades enzimáticas frente al mismo tratamiento con el detergente Lubrol PX nos llevó a analizar por el criterio de cromatografía de tamizaje molecular, si la asociación física de estas dos enzimas seguía existiendo. La cromatografía de tamizaje molecular en presencia de Lubrol PX 1% en Superosa 6 de una fracción enzimática preincubada 1 hora en presencia de Lubrol PX 1% a 0 °C mostró la eliminación de la heterogeneidad de tamaño de la enzima en estudio, observada en la cromatografía de tamizaje molecular en este sistema en ausencia de detergente (Figura 8A), ya que esta actividad eluyó en forma de un pico agudo (Figura 8B). Sin embargo, en estas condiciones, la actividad de fosforilasa siguió coeluyendo con UPTG. Se concluyó, entonces, que el Lubrol logró eliminar solamente en parte, la agregación.

Se ensayó entonces, el empleo de un detergente catiónico, el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). El ensayo de actividad enzimática de una preparación enzimática preincubada con diferentes concentraciones de CTAB, mostró que la actividad UDP-glc:proteína transglucosilasa aumentó hasta un 65% a 6 mM del detergente para mostrar a CTAB 20 mM la misma actividad enzimática que en su ausencia (Figura 14). En cambio, a las concentraciones estudiadas, no se detecta actividad de fosforilasa, ni de almidón sintetasa (Figura 14). La cromatografía de tamizaje molecular en Superosa 12 (límite de exclusión: 300 kDa, ver calibración en Materiales y Métodos) en presencia de CTAB 10 mM de una preparación enzimática parcialmente purificada por

---

cromatografía de intercambio aniónico en columna Mono Q, resultó en un incremento en el volumen de elución de la actividad UPTG (Figura 15A), indicando una disminución importante del peso molecular de la enzima en condiciones nativas. Dada la imposibilidad de determinar el volumen de elución de la actividad fosforilasa debido a su inactivación durante la preincubación de la muestra en presencia del detergente CTAB, se intentó determinar, mediante el empleo de SDS-PAGE, si la asociación observada en ausencia de detergente entre UPTG y fosforilasa se seguía manteniendo en este sistema. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y posterior tinción argéntica de todas las fracciones eluidas de la columna (Figura 15B) mostró que un polipéptido de 94 kDa, del tamaño similar a la subunidad de una de las fosforilasas de tubérculo de papa (Moreno y Tandecarz, 1989), se encontraba en las fracciones 8 y 9 de la columna correspondientes al peso molecular de la fosforilasa nativa que es de aproximadamente 200 kDa. Además, anticuerpos policlonales obtenidos contra una proteína de tubérculo de papa con actividad de fosforilasa en ausencia de primer exógeno mostraron reacción cruzada con este polipéptido (no mostrado). Estas observaciones pusieron en evidencia la separación de la fosforilasa de la actividad UPTG en estudio. Por otra parte la actividad UPTG eluyó como un pico agudo con un volumen de elución mayor al del estándar de peso molecular BSA correspondiente a 67 kDa indicando la disminución del tamaño molecular en estas condiciones (Figura 15A).





**Figura 15. Cromatografía de tamizaje molecular en columna de Superosa 12 en presencia de CTAB.** Una alícuota (0,5 mg de proteínas) correspondiente a una fracción con actividad UPTG parcialmente purificada por cromatografía en columna Mono Q y preincubada por 60 min a 0 °C en presencia de CTAB 10 mM, fue sometida a cromatografía de tamizaje molecular en columna Superosa 12 en presencia de CTAB 10 mM. El  $V_0$  corresponde a la fracción 1 (6,75 ml) y las proteínas marcadoras de peso molecular BSA (67 kDa) y anhidrasa carbónica (30 kDa) eluyeron en las fracciones 12 y 16 respectivamente. **A.** La actividad de UPTG fue determinada en alícuotas de 0,1 ml de cada una de las fracciones eluidas de la columna. **B.** Tinción argéntica de las proteínas correspondientes a las fracciones (0,4 ml) 7 a 18 de la columna (Panel A), separadas por SDS-PAGE.

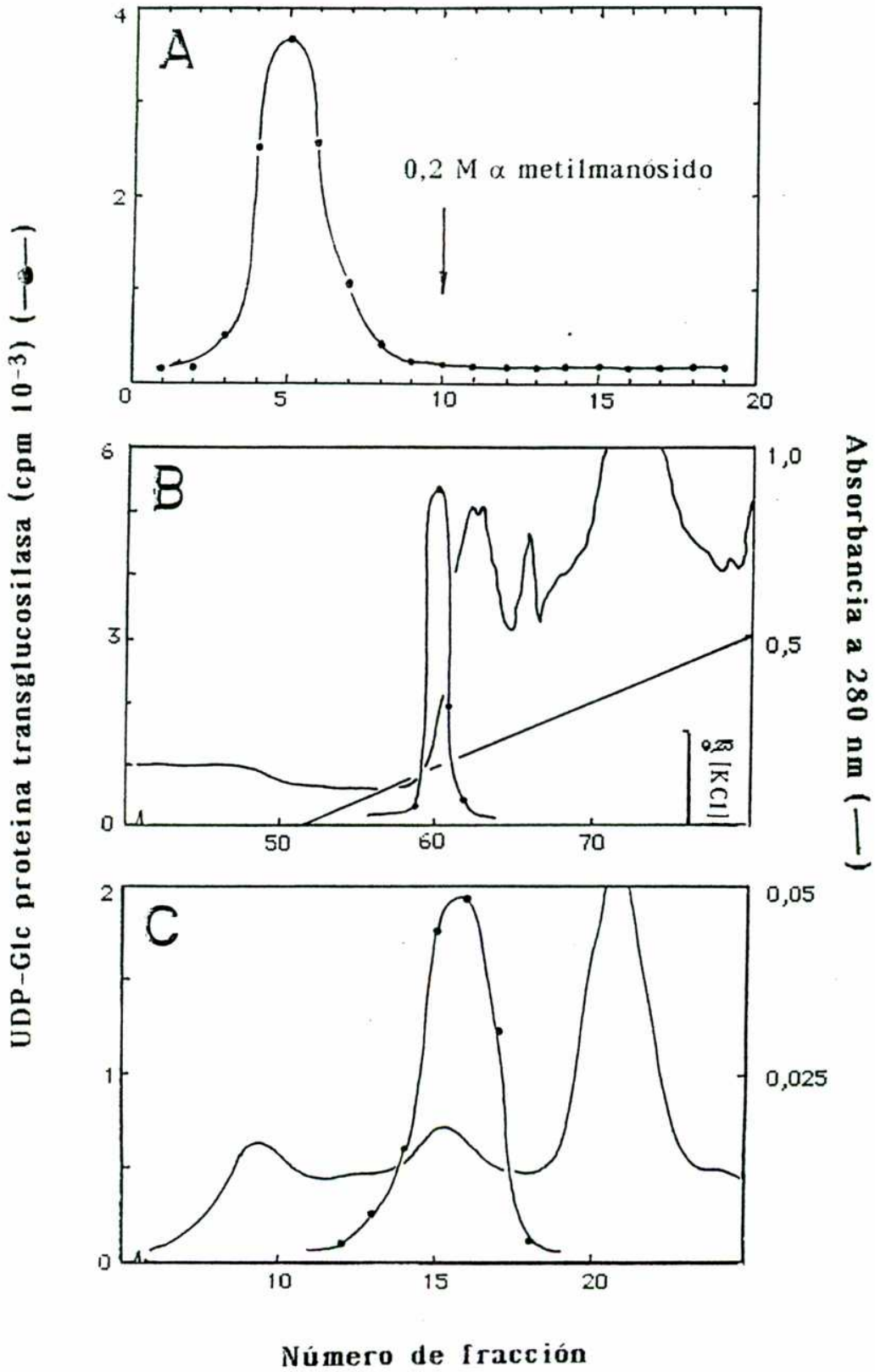
### 3.1.3. Purificación de la enzima UPTG.

Los estudios cromatográficos descriptos sobre la actividad UPTG permitieron obtener información referente al comportamiento de esta enzima bajo diferentes criterios separativos. Además, los estudios con diferentes detergentes permitieron obtener la desagregación proteica necesaria para intentar la purificación enzimática. Se delineó entonces un esquema de purificación de la UPTG que comenzó con la obtención de una preparación de membranas enriquecidas en membranas de proplástidos de tubérculo de papa por el empleo centrifugaciones diferenciales (Lavintman y Cardini, 1972). El esquema prosiguió con la solubilización de la actividad de UDP-Glc:proteína transglucosilasa de estas membranas empleando buffer de alta fuerza iónica. A continuación, la "preparación solubilizada" se sometió a cromatografía de afinidad en columna de concanavalina A Sepharose 4B (Figura 16A). Las fracciones enzimáticamente activas indicadas en la figura fueron juntadas, dializadas contra buffer A y sometidas a cromatografía en columna intercambiadora aniónica de Mono Q (FPLC) (Figura 16B). Finalmente, una alícuota de las fracciones de la columna enzimáticamente activas fue incubada en presencia de CTAB por 60 min a 0 °C y sometida a cromatografía de tamizaje molecular en columna de Superosa 12 (FPLC) en presencia del detergente (Figura 16C). La actividad enzimática eluyó de esta columna muy cerca de donde eluyó la anhidrasa carbónica utilizada como standard de 30 kDa, cromatografiada en ausencia de



---

**Figura 16. Purificación de UPTG.** A. Cromatografía de afinidad en columna de Concanavalina A Sepharosa 4B. Una fracción correspondiente a una preparación solubilizada (30 mg de proteínas) fue sometida a cromatografía de afinidad en columna (20 ml) en presencia de buffer B. La actividad UPTG fue determinada en alícuotas (0,1 ml) de cada fracción (6 ml) eluida de la columna. La flecha indica el inicio del pasaje de  $\alpha$ -metilmanósido 0,2 M en buffer B. B. Cromatografía de intercambio aniónico en columna Mono Q (FPLC). Una alícuota (15 mg de proteínas) de una preparación parcialmente purificada por cromatografía de afinidad en columna de concanavalina A Sepharosa 4B (panel A) fue sometida a cromatografía de intercambio aniónico en columna Mono Q HR 5/5. La actividad UPTG fue determinada en alícuotas de (0,02 ml) de cada fracción eluida de la columna. C. Cromatografía de tamizaje molecular en columna Superosa 12 (FPLC) en presencia de CTAB. Una alícuota (0,1 mg de proteínas) correspondiente a una fracción parcialmente purificada por cromatografía de afinidad en concanavalina A Sepharosa 4B y por cromatografía de intercambio aniónico en columna Mono Q (FPLC) (panel B) fue incubada por 60 min a 0 °C en presencia de 10 mM de CTAB y posteriormente cromatografiada en columna Superosa 12 (FPLC) en presencia de 10 mM de CTAB. Se determinaron actividades enzimáticas en alícuotas de 0,03 ml de cada fracción eluida de la columna. La flecha indica el volumen de elución de anhidrasa carbónica (29 kDa) y BSA (67 kDa) utilizadas como estándares de peso molecular.



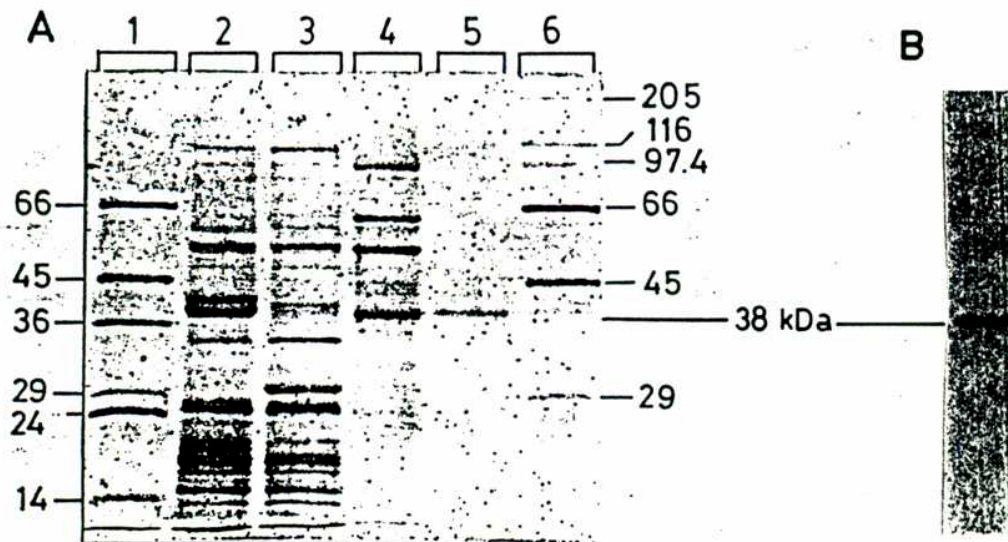
---

detergente.

El análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia de SDS de muestras enzimáticamente activas correspondientes a cada uno de los pasos de purificación empleados se muestra en la Figura 17. El carril correspondiente a la cromatografía de tamizaje molecular muestra que sólo polipéptido/s de 38 kDa forman la enzima nativa. Considerando que esta proteína eluye en forma activa de la columna de tamizaje molecular (Superosa 12) en presencia de CTAB con un volumen de elución similar al que eluye la anhidrasa carbónica (30 kDa) se puede concluir que el monómero de esta enzima es *in vitro* enzimáticamente activo. Sin embargo, se desconoce si el monómero de UPTG constituye la unidad funcional mínima requerida para su accionar *in vivo*.

#### 3.1.4. Determinación del mecanismo enzimático de UPTG

La presencia de un polipéptido de 38 kDa en la fracción correspondiente a la enzima purificada por centrifugaciones diferenciales y cromatografías de intercambio aniónico, de afinidad y de tamizaje molecular señala no solamente que la enzima está constituida únicamente por polipéptido/s de 38 kDa, sino también que en este polipéptido reside la capacidad aceptora de esta enzima. Fluorografía después de SDS-PAGE de una alícuota purificada hasta aparente homogeneidad (criterio de tinción argéntica) preincubada



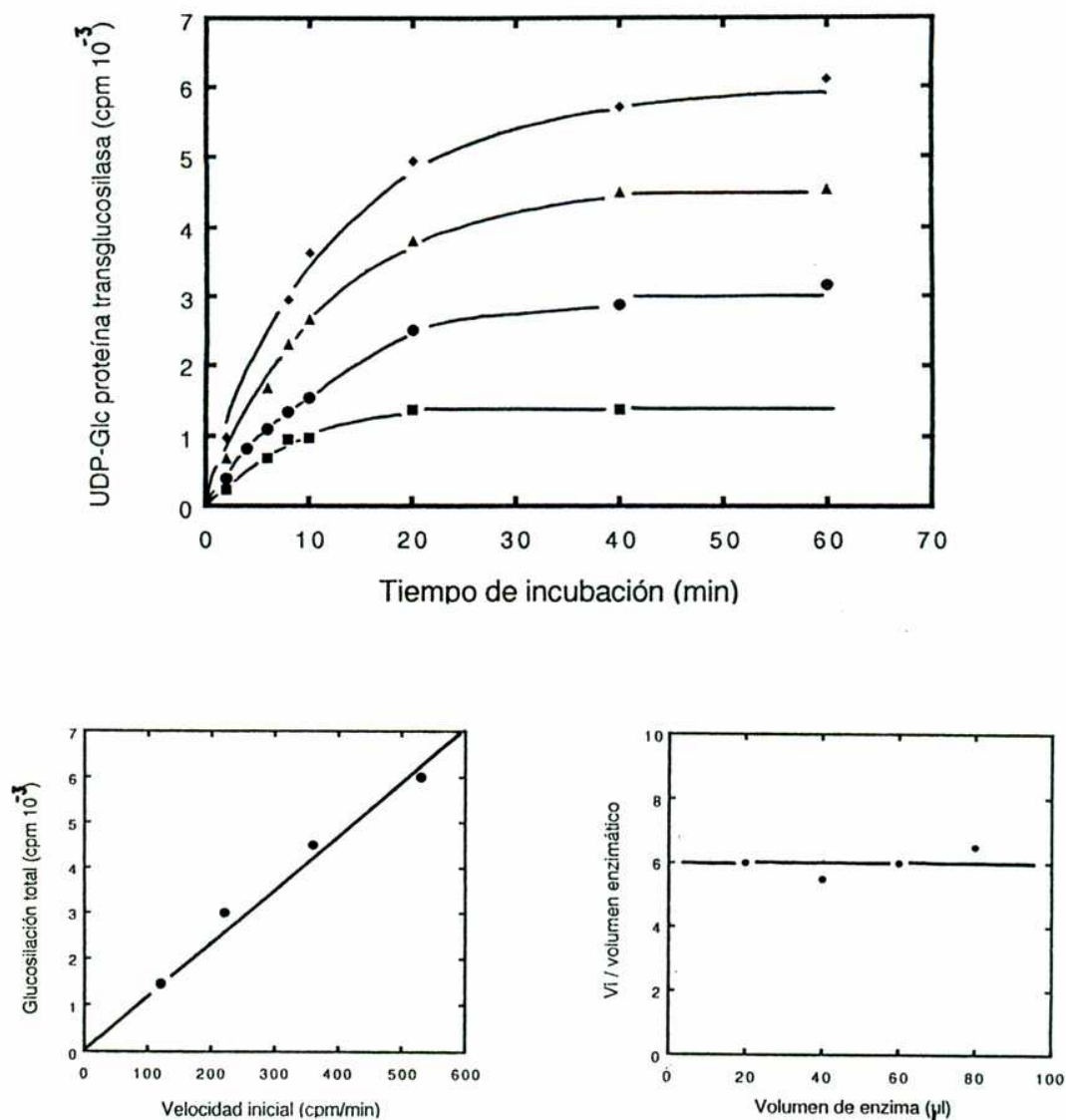
**Figura 17: SDS-PAGE de las etapas de purificación.** Alícuotas (1 a 10  $\mu\text{g}$  de proteínas aproximadamente) con actividad de UPTG correspondientes a los diferentes pasos de purificación fueron sometidos a SDS-PAGE (10% acrilamida). A. Tinción argéntica de: 1, marcadores de peso molecular; 2,  $P_{140}$  solubilizado; 3, concanavalina A Sepharosa 4B; 4, Mono Q; 5, Superosa 12 y 6, marcadores de peso molecular. B. Fluorografía de una alícuota equivalente a la del carril 5 (panel A) sometida a SDS-PAGE (10% acrilamida) luego de incubada por 30 min a 30  $^{\circ}\text{C}$  en presencia de UDP- $[^{14}\text{C}]\text{Glc}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  como se indica en Materiales y Métodos.

---

en presencia de UDP-[<sup>14</sup>C]Glc y Mn<sup>2+</sup> mostró que el polipéptido de 38 kDa se halla radioglucosilado (Figura 17). Se concluyó entonces que un mecanismo de autoglucosilación es el responsable de la actividad UPTG de proplástidos de tubérculo de papa.

La Figura 18A muestra las cinéticas de transglucosilación a 10 °C llevadas a cabo por diferentes concentraciones de UPTG y concentraciones constantes de UDP-[<sup>14</sup>C]Glc y Mn<sup>2+</sup>. Esta temperatura de incubación facilita la determinación precisa de las velocidades iniciales (al disminuirlas significativamente con respecto a la reacción llevada a cabo a 30 °C) sin alterar la cantidad total de glucosas incorporadas a la proteína endógena. Se observó que la velocidad inicial de catálisis guarda una relación lineal con la cantidad total de glucosas transferidas a proteína aceptora por parte de diferentes cantidades de preparación enzimática (Figura 18B). Este comportamiento permite la determinación de las unidades enzimáticas de la enzima UPTG por simple observación de la magnitud de transglucosilación total sin necesidad de conocer la velocidad inicial de catálisis.

La velocidad de catálisis de una enzima que lleva a cabo un mecanismo autocatalítico no debería ser modificada por variaciones de su concentración proteica ya que la concentración local de sitios aceptores en cualquier caso se mantiene constante. Por el contrario si enzima y aceptor fuesen proteínas diferentes se esperaría una potenciación de la velocidad enzimática por el incremento de concentración de proteína aceptora (sustrato) si el sustrato se



**Figura 18. Cinética de actividad UPTG en función de concentración de proteínas.** A. Actividad de UPTG a 10 °C a diferentes tiempos en alícuotas de 0,038 (■); 0,076 (●); 0,114 (▲) y 0,152 (◆) mg de proteínas) de preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas por cromatografía en columna Mono Q. En todos los casos el volumen de incubación fue de 0,1 ml (las demás condiciones se describen en Materiales y Métodos). B. Relación entre velocidades iniciales y cantidad final de aceptores glucosilados. C. Relación entre velocidad inicial de catálisis por unidad de volumen y concentración de fracción enzimática.

---

encuentra en la preparación enzimática en concentraciones cercanas al  $K_m$  de esta enzima (Pitcher y col., 1988 y Smythe y col., 1989). La Figura 18C muestra precisamente que la velocidad inicial de UPTG de una preparación enzimática parcialmente purificada por columna Mono Q normalizada a cantidades constantes de preparación enzimática no muestra dependencia con la concentración de proteína agregada, sugiriendo que la enzima y el sustrato son la misma proteína. Este resultado es consistente con el mecanismo de autoglucosilación inferido de la purificación de la enzima UPTG.

## 3.2. Capítulo 2

### Estudios de transporte de metabolitos a proplástidos de células de tabaco

Con el objeto de establecer la disponibilidad por parte de proplástidos de los sustratos (o sus precursores) requeridos para la actividades enzimáticas a que se refiere en el capítulo 1, se mencionan a continuación los estudios de transporte de metabolitos relacionados con la síntesis de almidón.

La obtención de plástidos intactos y de pureza satisfactoria a partir de tubérculo de papa con las técnicas que se disponen en la actualidad se ha visto dificultada. La fragilidad propia de estas organelas así como el alto contenido en almidón de los tubérculos son las principales características que atentan contra la integridad de estas organelas durante su aislamiento. Considerando la necesidad de disponer de un alto nivel de integridad en las preparaciones de proplástidos para los ensayos de transporte de metabolitos se decidió, como primera aproximación al problema, la obtención de proplástidos de otro material que satisficiera ese requerimiento. Se eligieron entonces células de tabaco (variedad BY2) cultivadas en medio líquido. Este material permitió la obtención de protoplastos que pudieron romperse en forma controlada para facilitar la obtención de proplástidos con un alto nivel de integridad y pureza.



---

### 3.2.1. Calidad de las preparaciones de proplástidos

Se obtuvieron preparaciones de proplástidos siguiendo la técnica descrita por Nemoto y col. (1988) (ver Materiales y Métodos). El seguimiento de los proplástidos en cada etapa de purificación fue monitoreado por la determinación de la actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) (Simcox y col., 1977 y Frenher y col., 1990) y nitrito reductasa (Washitani y Sato, 1977, I, Bowsher y col., 1989 y Dalling y col., 1972), ambas enzimas de localización plastidial, como así también por la presencia de  $\alpha$ -carotenos presentes en las membranas de los proplástidos (Zcheile y col., 1942 y Washitani y Sato, 1977, I). La preparación final de proplástidos mostró un incremento de 3,5 veces de la actividad específica de 6PGDH, de 70,4 veces la de nitrito reductasa y un incremento de 14,2 veces en el contenido de  $\alpha$ -carotenos por mg de proteínas con respecto al homogenato celular inicial. La diferencia entre los incrementos de las actividades específicas observados en las enzimas marcadoras puede atribuirse a la presencia de isoenzima/s citoplasmática/s de 6PGDH (ap Rees, 1985). Con el objeto de establecer la existencia de contaminación por mitocondrias en las preparaciones de proplástidos, se purificaron mitocondrias de las células de tabaco variedad BY2 siguiendo la técnica descrita por Nemoto y col (1988) (ver Materiales y Métodos). Al cabo de la purificación de estas organelas, se estableció una relación de 0,25  $\mu$ U de citocromo c oxidasa por  $\mu$ g de proteína mitocondrial. Con este valor, la

---

contaminación mitocondrial en las preparaciones de proplástidos resultó ser de 1,3%.

A pesar que la pureza de las preparaciones de proplástidos resultó ser altamente satisfactoria para el tipo de estudios a ser realizados, el grado de integridad (60,3%) determinado por experimentos de latencia (ver Materiales y Métodos) utilizando la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa, motivó la búsqueda de modificaciones de la técnica de purificación de proplástidos en procura de una disminución en la rotura de los plástidos durante su aislamiento. Se consideró que la alta osmolaridad existente en la interfase de 40%/60% de sacarosa correspondiente al último paso de purificación de los plástidos podría ser uno de los motivos del relativamente bajo porcentaje de integridad alcanzado (la osmolaridad de la sacarosa 40% es de 2,4 Os/Kg H<sub>2</sub>O). Se optó por utilizar Percoll en lugar de sacarosa en el último paso de purificación dadas sus características fisicoquímicas. Las partículas de Percoll (sílica recubierta de polivinilpirrolidona no dializable) no penetran membranas biológicas, lo que permite la separación de plástidos por su densidad boyante verdadera. Además, su bajísima osmolaridad (20 mOs/Kg H<sub>2</sub>O) permite la preparación de gradientes o colchones isoosmóticos. Una fracción enriquecida en proplástidos obtenida por rotura de los protoplastos de células de tabaco y centrifugaciones diferenciales (ver Materiales y Métodos) resuspendida en buffer TAN (0,4 ml/g células frescas) fue filtrada por pasaje a través de 2 mallas de nylon de 10 µm y dispuesta sobre un sistema de colchones de 15%, 20% y 100% de Percoll en

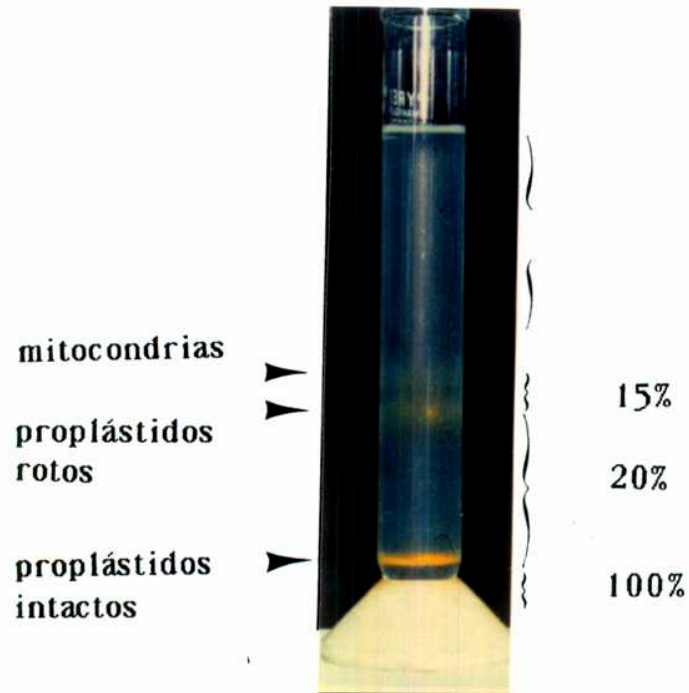
---

Buffer TAN. Luego de 10 min de centrifugación a 2500 xg se obtuvo una preparación purificada de proplástidos amarillos en la interfase existente entre 20 y 100% de Percoll (Figura 19), los que fueron lavados por resuspensión en buffer TAN y centrifugación a 1000 xg por 5 min. La Figura 20 muestra micrografías electrónicas de los proplástidos de células de tabaco purificados con este método. Los experimentos de latencia con estos proplástidos indicaron que la modificación realizada en el último paso de purificación de los mismos fue efectiva ya que produjo un incremento significativo en el valor obtenido de plástidos intactos, siendo éste del 79%. Además, en ninguna preparación, la contaminación de mitocondrias superó el 1,3% correspondiente al aislamiento según la técnica original.

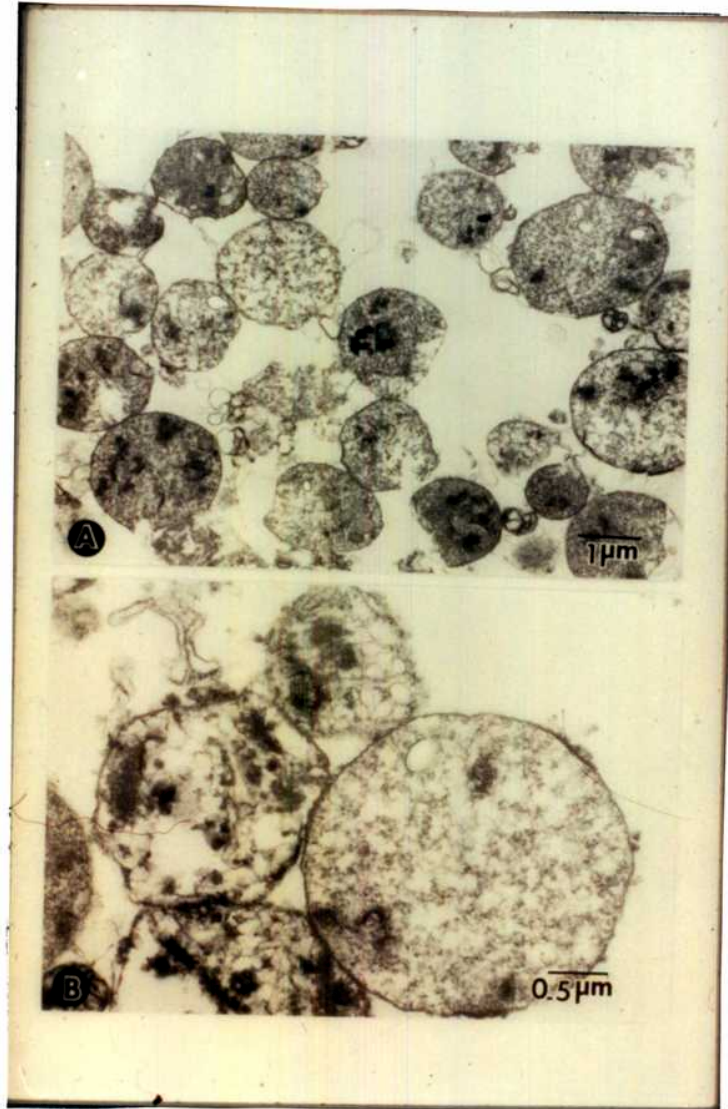
El contenido de almidón de las muestras de proplástidos resultó ser de 0.87 mg/mg de proteínas. Este valor, marcadamente inferior al mostrado por amiloplastos (dos órdenes de magnitud inferior al contenido de almidón en amiloplastos de sicomoro, Pozueta-Romero, comunicación personal), guarda correlación con el desarrollo ontogénico de estos plástidos y señala por otra parte la capacidad de estos proplástidos de sintetizar almidón.

### 3.2.2. Transporte de metabolitos a través de membranas de proplástidos

Para determinar la incorporación de diferentes metabolitos al



**Figura 19. Aislamiento de proplástidos de células de tabaco por centrifugación en gradiente discontinuo de Percoll.**



**Figura 20. Micrografías electrónicas de la preparación de proplástidos de células de tabaco.**

interior de los proplástidos de células de tabaco (cv BY2), se empleó la técnica de centrifugación a través de una capa de aceite de silicona (ver Materiales y Métodos). Considerando que muchos metabolitos pueden permear libremente las membranas externas de estas organelas, en todos los casos los valores obtenidos fueron corregidos considerando el transporte inespecífico hacia el espacio intermembrana (ver Materiales y Métodos).

### 3.2.3. Flujo de energía hacia los proplástidos

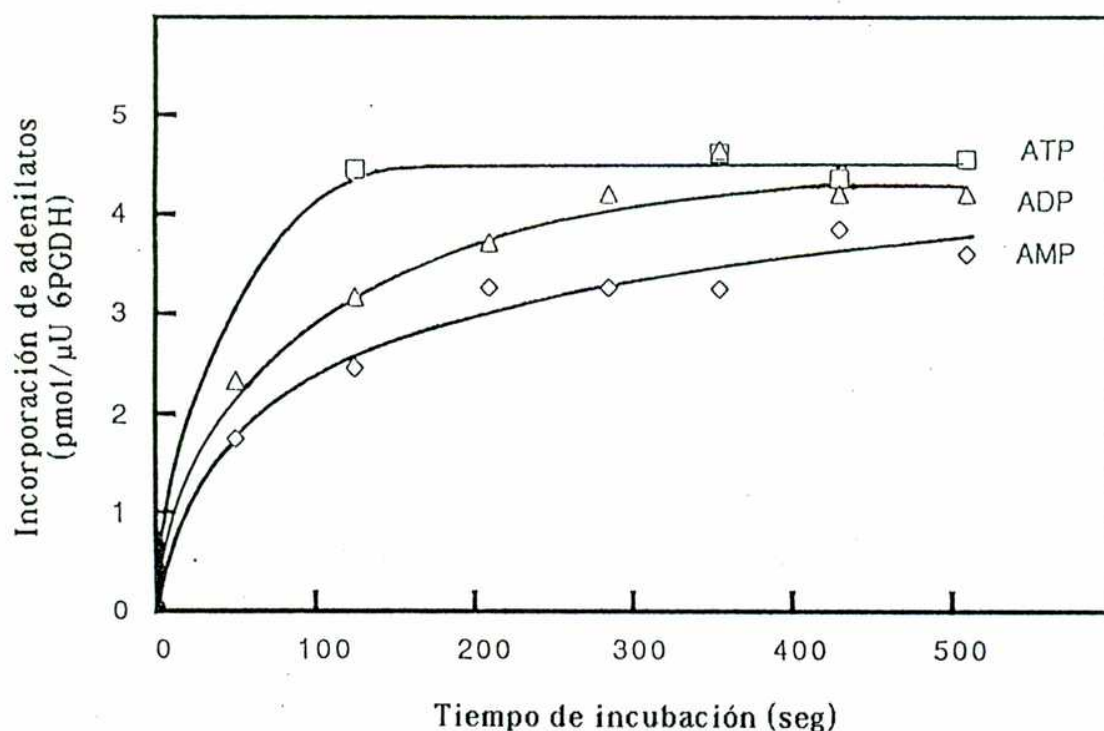
#### 3.2.3.1. Estudio del transporte de adenilatos utilizando el método de capa única de aceite de silicona

Los proplástidos son organelas energeticamente heterotróficas. Esta característica los hace dependientes de un flujo de energía proveniente del citoplasma para llevar a cabo no sólo la síntesis de precursores para la producción de almidón sino también la síntesis de aminoácidos entre otras funciones anabólicas (Washitani y Sato, 1977, III). Con el objeto de determinar si el flujo de energía hacia los proplástidos de células de tabaco podía estar mediado por el transporte de ATP se efectuaron mediciones de su incorporación en función del tiempo de incubación a 4 °C. La Figura 21 muestra que los proplástidos de células de tabaco no sólo incorporan ATP del medio de incubación sino también ADP y AMP. En todos los casos, la concentración de adenilatos en el medio de incubación fue de

---

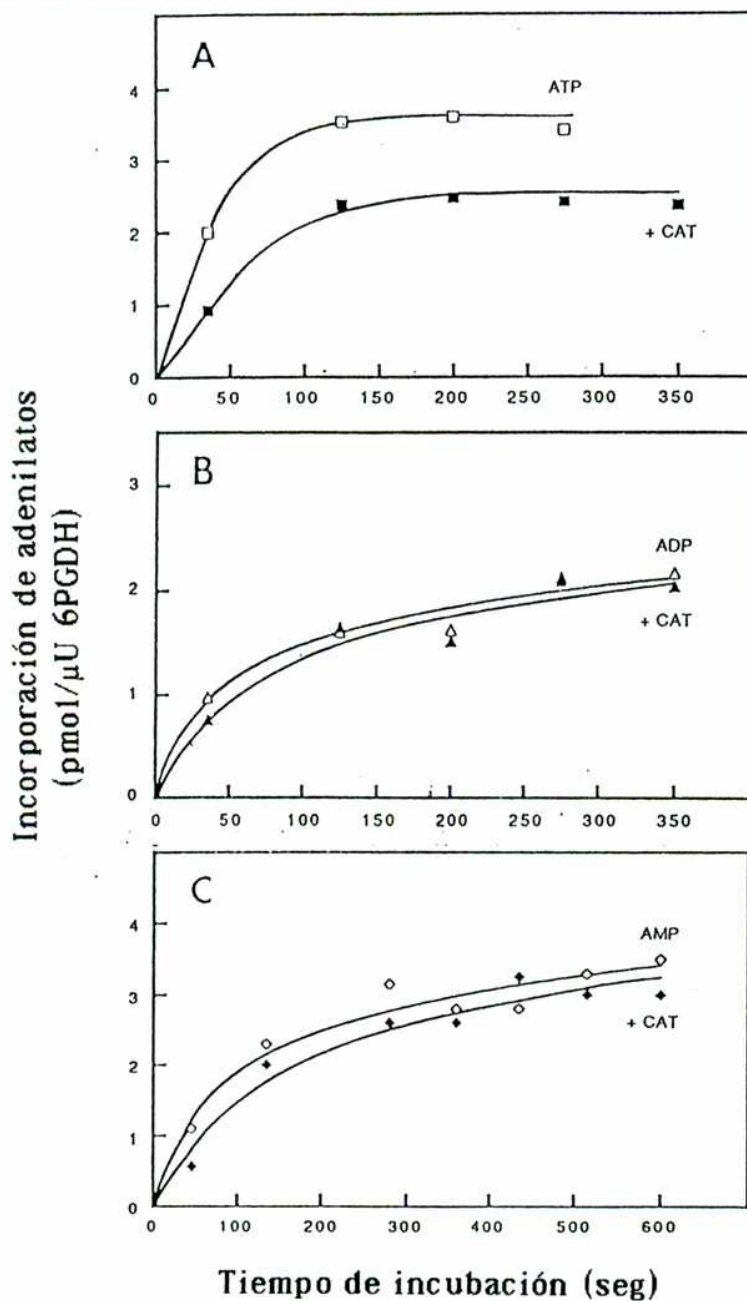
30  $\mu\text{M}$  señalando la alta afinidad del sistema de transporte por estos metabolitos. La incorporación de  $[^3\text{H}]\text{ATP}$ ,  $[^3\text{H}]\text{ADP}$  y  $[^3\text{H}]\text{AMP}$  en la fase estromática de los proplástidos, luego de una fase inicial de 2, 5 y 7 min respectivamente, muestra un comportamiento saturable llegando a aproximadamente el mismo valor para cada metabolito. Por otra parte, los proplástidos de células de tabaco resultaron incapaces de incorporar  $[^3\text{H}]\text{UTP}$  cuando fueron incubados a diferentes tiempos con 30  $\mu\text{M}$  del nucleótido tritiado (no mostrado).

La especificidad de la incorporación de adenilatos se estableció mediante experimentos de transporte utilizando fracciones de proplástidos preincubadas a 4 °C con 100  $\mu\text{M}$  CAT por 30 min. El CAT es un glicósido que inhibe en forma no competitiva el transporte de ATP/ADP en mitocondrias de hígado de rata (Vignais y col., 1973) y papa (Vignais y col., 1976), el transporte de ATP en amiloplastos de sicomoro (Pozueta Romero y col., 1991c) y en forma competitiva, el transporte de ATP en cloroplastos de hojas de espinaca (Pozueta Romero y col., 1991a). Mientras que a los tiempos de incubación estudiados, la preincubación en presencia del glicósido no produjo una inhibición apreciable en la incorporación de ADP (Figura 22B) y AMP (Figura 22C), la incorporación de ATP fue inhibida en aproximadamente un 40% (Figura 22A). En experimentos de transporte de adenilatos llevados a cabo con incubaciones de 7 seg, la preincubación de los proplástidos con CAT 200  $\mu\text{M}$  produjo una evidente inhibición del transporte de ADP (ver sección 3.2.3.2.3.).



**Figura 21. Cinética de incorporación de adenilatos a proplástidos aislados de células de tabaco.** Alícuotas de preparaciones de proplástidos ( $40 \mu\text{l}$ ,  $38,4 \mu\text{U}$  6PGDH) fueron incubadas en presencia de  $[^3\text{H}]\text{ATP}$ ,  $[^3\text{H}]\text{ADP}$ ,  $[^3\text{H}]\text{AMP}$  y  $[^3\text{H}]\text{UTP}$   $0,029 \text{ mM}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las reacciones fueron detenidas por centrifugación de la mezcla de incubación en el sistema de capa simple de silicona, como se describe en Materiales y Métodos.





**Figura 22. Cinética de incorporación de adenilatos a proplástidos preincubados con carboxiatractilósido.** Alícuotas de preparaciones de proplástidos (40  $\mu$ l, 40  $\mu$ U 6PGDH) preincubadas por 30 min a 4 °C en presencia de CAT 0,1 mM fueron incubadas en presencia de [ $^3$ H]ATP, [ $^3$ H]ADP y [ $^3$ H]AMP 0,035 mM a 4 °C por diferentes tiempos. Las reacciones fueron detenidas por centrifugación de la mezcla de incubación en el sistema de capa simple de silicona y se determinó radioactividad en el medio P, como se indica en Materiales y Métodos.

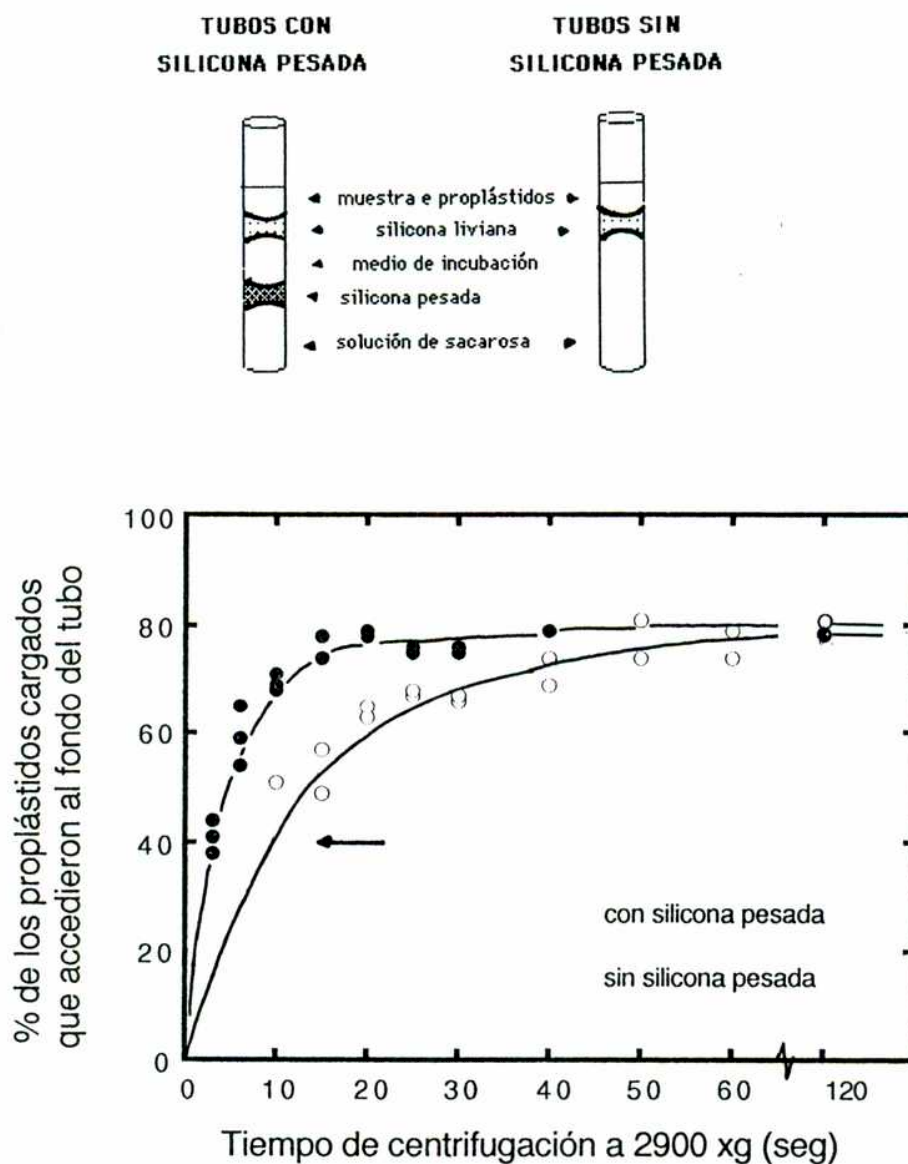
---

### 3.2.3.2. Estudio del transporte de adenilatos utilizando el método de doble capa de aceite de silicona

Para conocer la dependencia de la incorporación de adenilatos con su concentración se requiere disponer de un ensayo que permita obtener valores de incorporación de metabolitos a tiempos de incubación muy cortos y, así, poder analizar el transporte antes de que el sistema acceda a un estado estacionario. Dada la velocidad de incorporación de adenilatos obtenida (Figuras 21 y 22), se descartó el empleo de la técnica de centrifugación en capa de aceite de silicona para estos experimentos por la imposibilidad de detener las incubaciones en el término de pocos segundos. Con el objeto de soslayar esta dificultad, se empleó la técnica de centrifugación a través de dos capas de aceite de silicona (ver Materiales y Métodos). Para ello, fue necesaria: a) la determinación del tiempo de incubación proporcionado por la centrifugación a la fuerza centrífuga y la composición de silicona escogidas y b) el desarrollo de un método de determinación de transporte inespecífico más preciso.

#### 3.2.3.2.1. Determinación del tiempo de incubación en el empleo del método de doble silicona.

La Figura 23 muestra los resultados de los experimentos realizados para establecer el tiempo de incubación que correspondió



**Figura 23.** Determinación del tiempo de incubación cuando se emplea el sistema de doble capa de silicona. Alícuotas de preparaciones de proplástidos (40  $\mu$ l, 0,101 UDO a 470 nm) fueron centrifugadas a 2.900 xg a diferentes tiempos en tubos con y sin capa de silicona "pesada" (Esquema). Culminado el tiempo de centrifugación se determinó el porcentaje de carotenos que accedió a la solución de sacarosa de los tubos con silicona "pesada" (—○—) y al fondo del tubo (indicado con una flecha) de los tubos sin silicona "pesada" (—●—). Se graficaron los porcentajes de carotenos en función del tiempo de centrifugación a 2900 xg.

---

a los proplástidos sometidos a centrifugación a 2900 xg en el sistema de doble capa de siliconas con la composición en siliconas elegida para estas organelas (ver Materiales y Métodos). La Figura 23 indica que los proplástidos de células de tabaco sometidos a esa fuerza centrífuga en los tubos que carecen de la capa “pesada” de silicona (Figura 23, tubo de la izquierda en el Esquema), acceden más rápidamente a la parte inferior del tubo (indicado con una flecha) que los proplástidos centrifugados en los tubos que contiene la capa de silicona “pesada” (Figura 23, tubo de la derecha en el Esquema). El tiempo de incubación corresponde al tiempo en que los proplástidos son demorados en su migración hacia el fondo del tubo por la presencia de la capa de silicona “pesada”, permaneciendo durante ese lapso en contacto con el medio de incubación. El tiempo de incubación fue inferido a partir del desplazamiento de la curva que relaciona el porcentaje de plástidos que alcanzan el fondo del tubo con el tiempo de centrifugación (Figura 23). Se observa que el 80% de los proplástidos cargados en los tubos pudo acceder durante la centrifugación al fondo de los tubos. Este porcentaje es congruente con el porcentaje de integridad determinado para estas preparaciones ya que sólo los plástidos intactos pueden acceder a soluciones de alta densidad (Pozueta-Romero y col., 1991b). Asumiendo que los proplástidos se distribuyen en forma gaussiana durante la migración hacia el fondo del tubo, el valor de desplazamiento de la curva correspondiente al 50% de los plástidos que acceden finalmente al fondo del tubo (40% de los proplástidos cargados) indica el tiempo

---

promedio que los plástidos se hallan en contacto con el medio de incubación. De esta manera, la Figura 23 muestra que el tiempo de incubación corresponde a 7 segundos cuando las preparaciones de proplástidos son centrifugadas a 2900 xg durante por lo menos 2 min en los tubos que poseen la capa de silicona “pesada”.

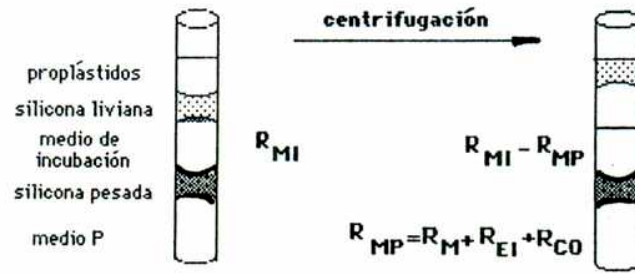
#### 3.2.3.2.2. Determinación del transporte inespecífico por el método de extrapolación en la técnica de centrifugación con doble capa de silicona.

El transporte de adenilatos al interior de los proplástidos se determinó por la radioactividad encontrada en el medio P ( $R_{MP}$ ) luego de la centrifugación (Figura 24a):

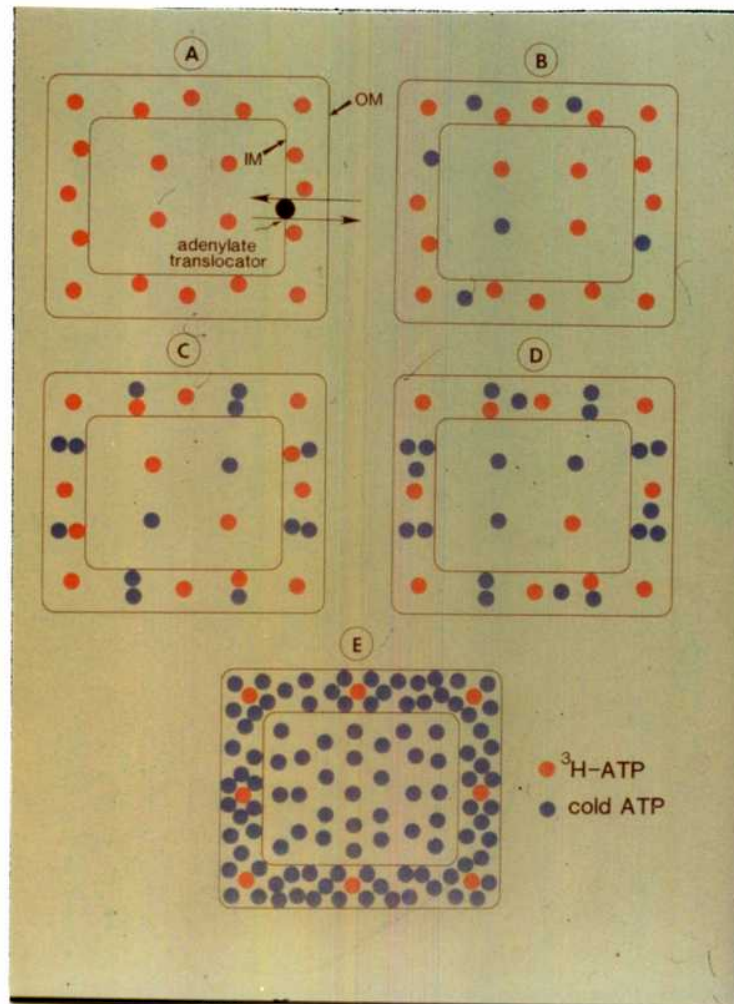
$$R_{MP} = R_{EI} + R_{CO} + R_M$$

Mientras que la radioactividad presente en el espacio intermembrana ( $R_{EI}$ ) depende de las condiciones osmóticas (Heldt y Sauer, 1971; Helt, 1976 y Heldt y Flüge, 1987), la radioactividad correspondiente al medio de incubación que cocentrifuga con los plástidos ( $R_{CO}$ ) depende de las interacciones de las organelas con el medio de incubación. A pesar que estos valores pueden ser considerados constantes bajo determinadas condiciones experimentales, la radioactividad presente en la matriz plastidial ( $R_M$ ) varía en función del tiempo de incubación, de la actividad del

a



b



**Figura 24. Determinación del transporte inespecífico por el método de extrapolación.** a. Esquema de los elementos del sistema. Antes de la centrifugación, los metabolitos radiomarcados se encuentran en el medio de incubación.  $R_{MI}$  es la radioactividad existente en el medio de incubación. Después de la centrifugación, los plástidos acceden al medio P y  $R_{MP}$  es la suma de radioactividades de metabolitos ubicados en la matriz del plástido luego del transporte a través de la membrana interna ( $R_M$ ), los metabolitos ubicados en el espacio intermembrana ( $R_{EI}$ ) y los metabolitos presentes en el medio de incubación que cocentrifuga con los plástidos ( $R_{CO}$ ). b. Representación esquemática del principio que gobierna el método. El método está basado en el análisis del transporte de metabolitos (adenilatos) utilizando la técnica ilustrada en el panel a de esta figura y en la Figura 4B a varias concentraciones de metabolitos, manteniendo constante la radioactividad en el medio de incubación. El volumen del espacio intermembrana de los plástidos ( $V_{EI}$ ) y del medio de incubación que cocentrifuga con los plástidos ( $V_{CO}$ ) se obtienen de  $R_{EI}$  y  $R_{CO}$  (radioactividades encerradas en cada uno de los respectivos compartimientos). Manteniendo constante  $R_{MI}$  (el número de círculos rojos en el esquema es constante) e incrementando la concentración de metabolitos fríos (círculos azules) en cada ensayo (disminución de la radioactividad específica del metabolito), la probabilidad de reconocimiento de un metabolito radiomarcado por parte del translocador disminuirá hasta cero cuando  $[A_{MI}] = \infty$  y entonces,  $R_M = 0$  (el número de círculos rojos en A es mayor que en B, C, D y E). Como se explicó en el panel a,  $R_{MP} = R_M + R_{EI} + R_{CO}$  y, como el valor de  $(R_{EI} + R_{CO})$  no varía al cambiar la concentración del metabolito,  $(R_{EI} + R_{CO})$  puede ser determinado incubando las organelas con radioactividades específicas decrecientes del metabolito y extrapolando a  $1/[A_{MI}] = 0$ .



---

translocador y de la radioactividad específica del adenilato estudiado. Se debe enfatizar que como el translocador funciona por "counter-exchange", la concentración de adenilatos en la matriz permanece constante en forma independiente de la concentración de adenilatos usada durante los experimentos de transporte.

Para los análisis cinéticos, se incubaron los proplástidos con distintas concentraciones de adenilatos en el medio de incubación ( $[A_{MI}]$ ). Por lo tanto, la cantidad de adenilatos transportada por el translocador ( $A_T$ ), como función de la radioactividad presente en el medio de incubación ( $R_{MI}$ ), de  $R_M$ , del volumen del medio de incubación ( $V_{MI}$ ) y de  $[A_{MI}]$ , será:

$$A_T = R_M \times V_{MI} \times [A_{MI}] / R_{MI}$$

Donde

$$R_M = R_{MP} - (R_{EI} + R_{CO})$$

La concentración y radioactividades específicas de los adenilatos en el espacio intermembrana (EI) y en el medio de incubación que cocentrifuga con los plástidos (CO) es la misma que la del medio de incubación (MI). A pesar que  $R_{CO}$  puede ser estimada incubando las organelas con  $[^3H]$ dextrano (Emes y Traska, 1987), el problema más pertinente a resolver es como determinar  $R_{EI}$ . A continuación, se describe el método de determinación de  $R_{EI}$  por extrapolación que se desarrolló para los estudios cinéticos de



transporte de adenilatos a proplástidos de células de tabaco (Pozueta-Romero y col., 1992).

Manteniendo constante la  $R_{MI}$  en cada ensayo es esperable que la  $R_{MP}$  disminuya en paralelo con el incremento de  $[A_{MI}]$  (disminución de las actividades específicas del adenilato). Utilizando concentraciones de adenilatos que superen largamente los respectivos  $K_m$ , la velocidad inicial de incorporación de adenilatos no varía significativamente con respecto a la concentración de adenilatos empleados. Como el tiempo de incubación es el mismo a cada concentración ensayada, se puede inferir que la  $R_M$  es casi exclusivamente dependiente de la radioactividad específica del adenilato (Figura 24b). Bajo condiciones de  $[A_{MI}] = \infty$ , se puede predecir que la probabilidad de reconocimiento de adenilatos radiomarcados por parte del translocador es cero y por lo tanto,  $R_{MP}$  estará restringida a  $R_{EI}$  y  $R_{CO}$  (Figura 24b). Bajo esta condición hipotética, en donde  $1/[A_{MI}] = 0$  y la radioactividad específica es también igual a cero, el transporte inespecífico ( $V_{EI} + V_{CO}$ ) puede ser determinado como una función de las radioactividades recuperadas en el medio P:

$$(V_{EI} + V_{CO}) = (R_{EI} + R_{CO}) \times V_{MI}/R_{MI}$$

Donde

$$(R_{EI} + R_{CO}) = \lim R_{MP} \text{ (cuando } [A_{MI}] \text{ tiende a } \infty)$$

---

Es obvio que  $R_{MP}$  con  $[A_{MI}] = \infty$  no puede ser establecido en forma empírica, pero este valor puede ser estimado por extrapolación a  $1/[A_{MI}] = 0$  de la curva ajustada a los puntos del gráfico  $R_{MP}$  versus  $1/[A_{MI}]$ . La Figura 25 muestra experimentos representativos de dicha gráfica con las correspondientes extrapolaciones para determinar el transporte inespecífico. Como se observa, la determinación del transporte inespecífico por el empleo de  $[^{14}C]$ sorbitol o  $[^{14}C]$ sacarosa sobrestima el mismo y, por consiguiente, subestima el transporte específico de adenilatos. Este valor de transporte inespecífico fue determinado para cada experimento y con ellos se realizaron las correcciones necesarias para establecer el transporte específico de adenilatos al interior del espacio estromático de proplástidos de células de tabaco.

### 3.2.3.2.3. Dependencia del transporte con la concentración de adenilatos

La Figura 26 muestra la dependencia de la incorporación de adenilatos con su concentración en experimentos representativos. Se obtuvieron los siguientes valores de  $K_m$ :  $21,05 + 0,5 \mu M$  ( $n=2$ ) para ATP (Figura 26A),  $26,18 + 4 \mu M$  ( $n=3$ ) para ADP (Figura 26B) y  $77,78 \mu M$  ( $n=1$ ) para el caso de AMP (Figura 26C). Se observó una inhibición de tipo no competitivo del transporte de ATP y ADP por parte de CAT cuando los experimentos de cinética fueron llevados a cabo con preparaciones de proplástidos preincubadas con  $200 \mu M$

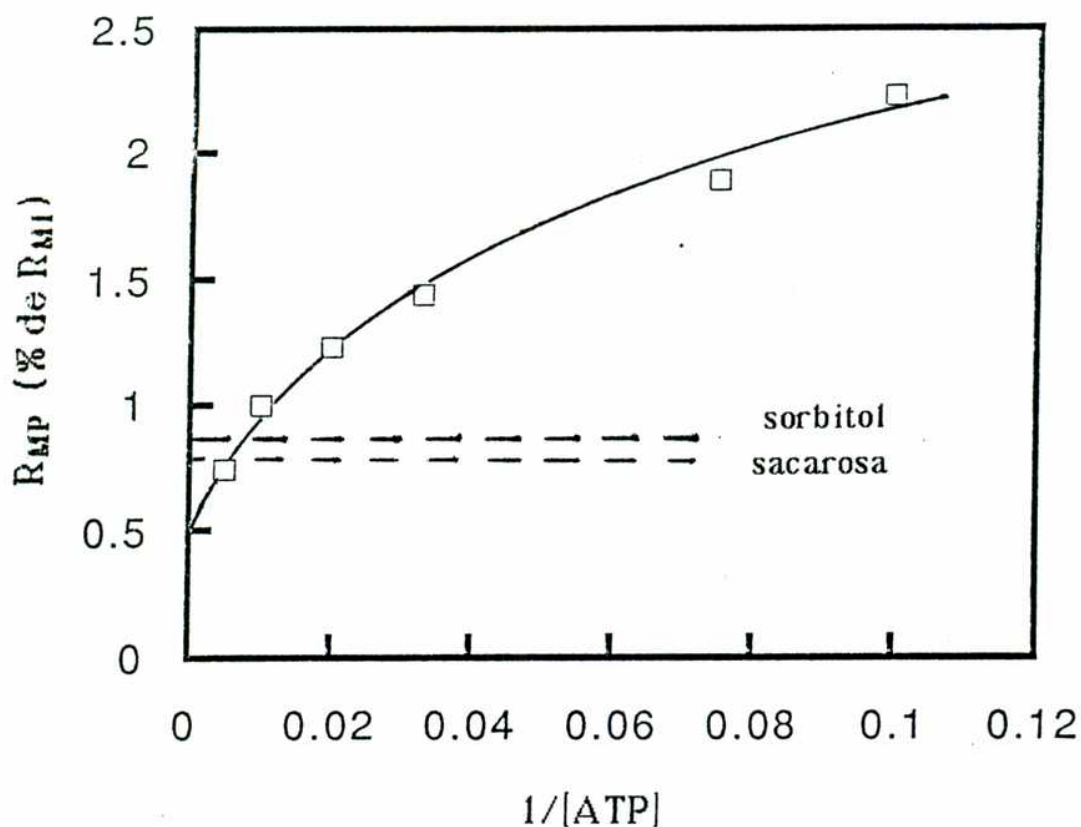
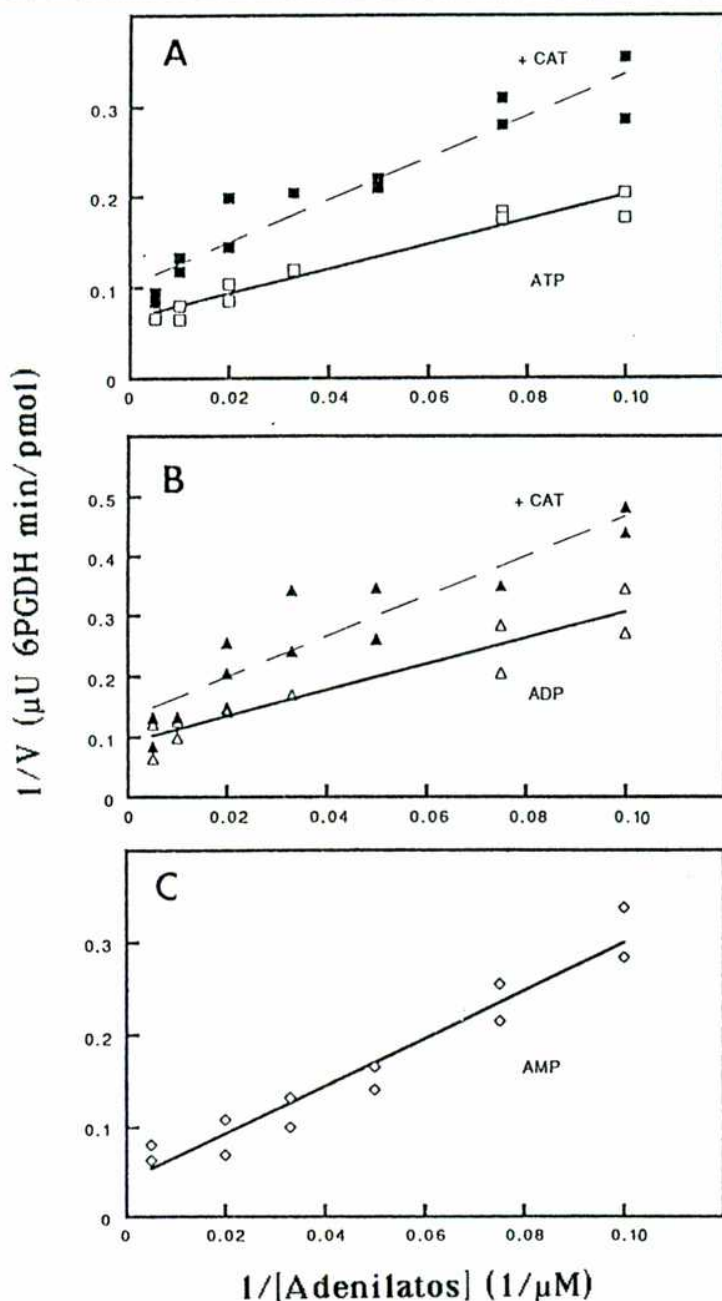


Figura 25. Determinación del transporte inespecífico por el método de extrapolarción en proplástidos de células de tabaco. Determinación de la radiactividad encerrada en el espacio intermembrana ( $R_{EI}$ ) y el medio de incubación que cocentrifuga ( $R_{CO}$ ) con los proplástidos en una fracción de proplástidos (40  $\mu$ l, 27,3  $\mu$ U 6PGDH) incubados por 7 seg en presencia de diferentes concentraciones de  $[^3\text{H}]\text{ATP}$ . Las radioactividades correspondientes a los espacios permeables a  $[^{14}\text{C}]\text{sorbitol}$  y  $[^{14}\text{C}]\text{sacarosa}$  son constantes y se indican por una flecha.



**Figura 26.** Estudios cinéticos de la incorporación de adenilatos a proplástidos. Se incubaron alícuotas de preparaciones de proplástidos (40  $\mu\text{l}$ , 27,3  $\mu\text{U 6PGDH}$ ) con y sin preincubación por 30 min en presencia de CAT 0,2 mM, con diferentes concentraciones de  $[^3\text{H}]\text{ATP}$  (A),  $[^3\text{H}]\text{ADP}$  (B) y  $[^3\text{H}]\text{AMP}$  (C) por 7 seg a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Se determinó la radioactividad en el medio P como se indica en Materiales y Métodos. Los coeficientes de regresión lineal fueron 0,95 y 0,97 para ATP; 0,93 y 0,94 para ADP (con y sin CAT respectivamente) y 0,97 para AMP.

---

del glicósido a 4 °C por 30 min (Figura 26A y B). Este sistema de transporte de adenilatos muestra una alta afinidad por estos metabolitos. En las condiciones ensayadas se observa mayor afinidad por ATP que por los otros adenilatos ensayados, lo que se correlaciona con la función propuesta para este sistema de incorporar ATP desde el citoplasma. En este sentido se obtuvieron resultados similares en amiloplastos de células de sicomoro (Pozueta Romero y col., 1991c) y cloroplastos de hojas de espinaca (Pozueta Romero y col., 1991a) en los que el sistema de transporte trabajaría con el mismo propósito. En el caso de cloroplastos le suministraría energía para solventar requerimientos metabólicos nocturnos (Heldt, 1969). Por el contrario, en mitocondrias, donde la función propuesta es la de exportar ATP sintetizado a partir del ADP ingresado, las relación de  $K_m$  es inversa con mayor afinidad por ADP (Pozueta Romero y col., 1991d).

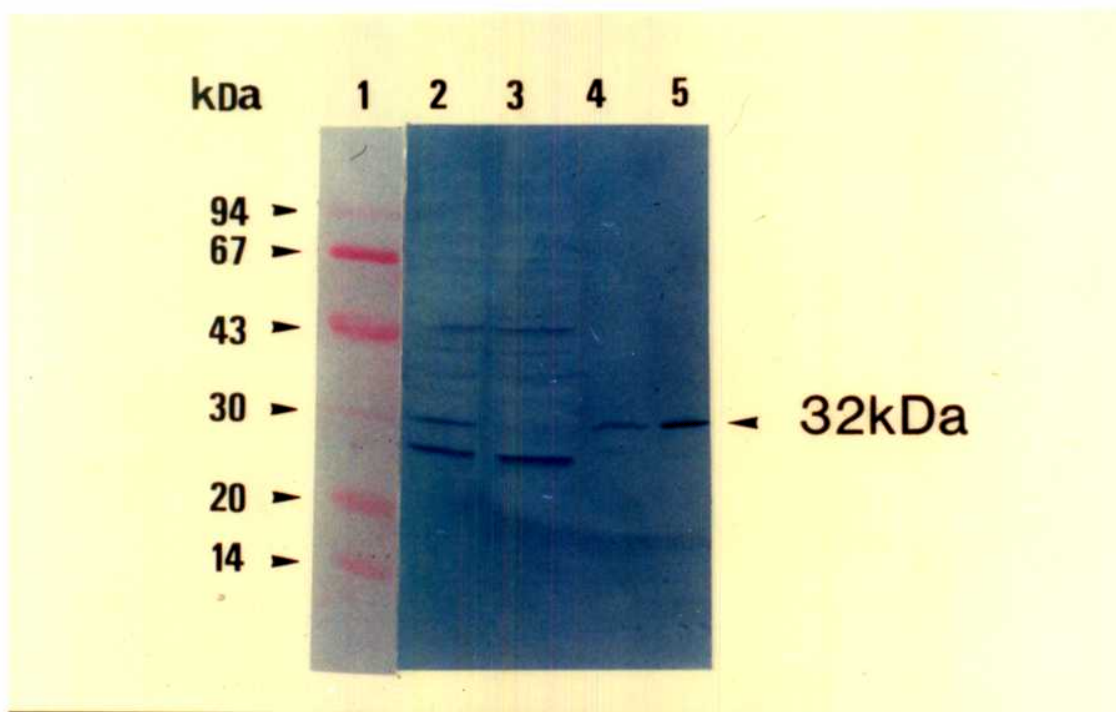
### 3.2.3.3. Análisis inmunológico

Considerando los transportes de adenilatos observados se quiso establecer la presencia de proteínas inmunologicamente relacionadas con un translocador de adenilatos en los proplástidos de células de tabaco. Se realizaron estudios inmunoquímicos empleando un anticuerpo preparado en conejo contra el translocador mitocondrial de adenilato de *Neurospora crassa*.

---

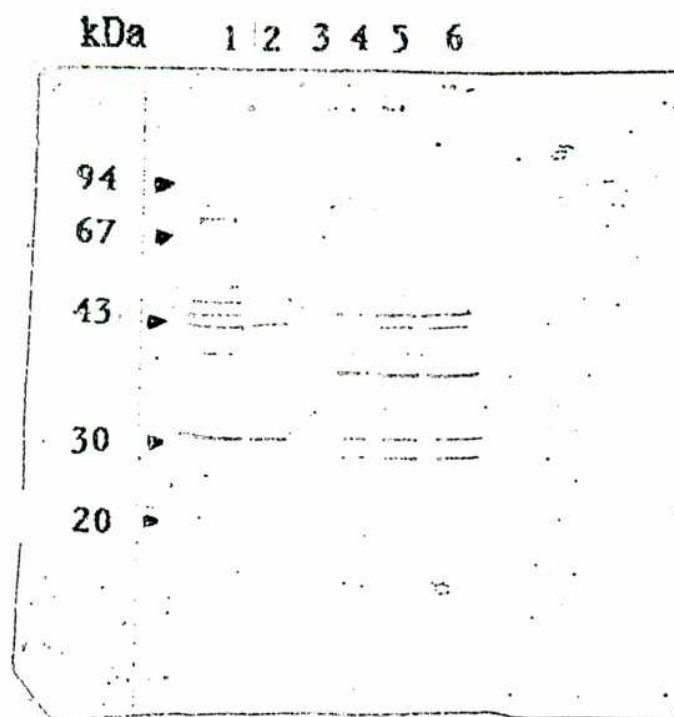
La figura 27 muestra un análisis de Western Blot utilizando una dilución 1 en 500 del anticuerpo antes mencionado. Diferentes fracciones de la misma preparación de proplástidos fueron desafiados con este anticuerpo. Como control positivo se analizó también una muestra correspondiente a un homogenato de mitocondrias purificadas de células de tabaco (Figura 27, calle 5). El anticuerpo reconoce 5 polipéptidos diferentes en la fracción correspondiente al homogenato de proplástidos purificados (proplástidos totales) (Figura 27, calle 2). Cuatro de estos cinco polipéptidos están localizados en la fracción estromática (Figura 27, calle 3). El quinto polipéptido, de 32 kDa, presente en la fracción de proplástidos totales se halla ausente de la fracción estromática (Figura 27, calles 2 y 3) y es, precisamente, este único polipéptido el que es reconocido en la fracción correspondiente a las membranas de los proplástidos (Figura 27, calle 4). Además, este polipéptido posee el mismo tamaño que el polipéptido reconocido por el anticuerpo en mitocondrias (Figura 27, calle 5).

Con el objeto de descartar una contaminación por mitocondrias como la responsable de las señales detectadas en la Figura 27, calles 2, 3 y 4, se realizó un inmunoblot en el que se dispuso de fracciones de proteínas totales de mitocondrias purificadas de células de tabaco (con actividad de citocromo c oxidasa conocida) como control. Mientras que en fracciones totales de proplástidos purificados con hasta 0,07  $\mu$ U de citocromo c oxidasa se detecta el polipéptido de 32 kDa (Figura 28, calles 4, 5 y 6), en preparaciones de mitocondrias puras con 0,2  $\mu$ U de la misma actividad enzimática no se observa



**Figura 27. Inmunoblot de proplástidos y mitocondrias de células de tabaco.** Se sometieron las siguientes muestras: marcadores de peso molecular (calle 1); proplástidos totales (60  $\mu$ g de proteínas, calle 2); fracción estromática de proplástidos (60  $\mu$ g de proteínas, calle 3); membranas de proplástidos (60  $\mu$ g de proteínas, calle 4) y mitocondrias de tabaco (8  $\mu$ g de proteínas, calle 5) a SDS-PAGE (gradiente continuo de 10 a 15% de acrilamida), y luego de su transferencia a nitrocelulosa se desafiaron con una dilución 1/1000 de un anticuerpo anti-translocador de adenilatos mitocondrial de *Neurospora crassa*. Los complejos antígeno-anticuerpo se evidenciaron por el empleo de un segundo anticuerpo conjugado con fosfata alcalina, como se indica en Materiales y Métodos.





**Figura 28. Inmunoblot de proplástidos y mitocondrias de células de tabaco.** Se sometieron las siguientes muestras: mitocondrias (80  $\mu\text{g}$  de proteínas, 20  $\mu\text{U}$  de citocromo c oxidasa, calle 1); mitocondrias (8  $\mu\text{g}$  de proteínas, 2  $\mu\text{U}$  de citocromo c oxidasa, calle 2); mitocondrias (0,8  $\mu\text{g}$  de proteínas, 0,2  $\mu\text{U}$  de citocromo c oxidasa, calle 3); proplástidos (20  $\mu\text{g}$  de proteínas, 0,07  $\mu\text{U}$  de citocromo c oxidasa, calle 4); proplástidos (40  $\mu\text{g}$  de proteínas, 0,14  $\mu\text{U}$  de citocromo c oxidasa, calle 5); proplástidos (60  $\mu\text{g}$  de proteínas, 0,21  $\mu\text{U}$  de citocromo c oxidasa, calle 6) a SDS-PAGE (gradiente de 10 a 15% de acrilamida), y luego de su transferencia a nitrocelulosa, se desafiaron con una dilución 1/1000 de un anticuerpo anti-translocador de adenilatos mitocondrial de *Neurospora crassa*. Los complejos antígeno-anticuerpo se evidenciaron por el empleo de un segundo anticuerpo conjugado con fosfata alcalina, como se indica en Materiales y Métodos.



---

señal alguna (Figura 28, calle 3). Se concluye entonces que un polipéptido perteneciente a los proplástidos de células de tabaco es responsable de la señal inmunoquímica observada. Se observa, por otra parte, el menor contenido de translocador (con respecto a proteína total) en proplástidos que en mitocondrias de células de tabaco, pues con casi diez veces la cantidad de proteína sembrada en el caso de los proplástidos no se obtiene la intensidad de señal conseguida en el caso de mitocondrias. A pesar de que no se descarta la posibilidad que el reconocimiento de estos dos tipos de polipéptidos por el anticuerpo no sea el mismo, esta observación concuerda con el hecho que el translocador de adenilatos mitocondrial es el polipéptido más abundante en membranas de mitocondrias (Klingenberg, 1979 y Klingenberg, 1989).

Estos resultados señalan la presencia en proplástidos de células de tabaco de un polipéptido antigénicamente relacionado con el translocador de adenilatos de mitocondrias de *Neurospora crassa*. Cabe señalar la similitud de tamaño de este polipéptido con los polipéptidos identificados como los componentes de los translocadores de adenilatos de otros orígenes, descritos hasta el momento. Riccio y col. (1975) reportaron un polipéptido de 29 kDa como componente del translocador de adenilatos de mitocondria de corazón de novillo. Ngerprasirtsiri y col. (1989) demostraron la existencia de un polipéptido de 32 kDa en una fracción correspondiente a membranas internas de amiloplastos de sicomoro que es reconocido por un anticuerpo contra el translocador de adenilatos mitocondrial de *Neurospora crassa*. Este mismo

---

anticuerpo reconoce un polipéptido de tamaño similar en membranas de cloroplastos de hojas de espinaca (*Spinacea oleracea*) (Pozueta Romero y col., 1991a).

#### 3.2.4. Flujo de carbono hacia los proplástidos

##### 3.2.4.1. Transporte de Glc-1-P y Glc-6-P

Con el objeto de establecer la fuente de carbono que ingresa a los proplástidos de células de tabaco para llevar a cabo la síntesis del almidón se realizaron experimentos de incorporación de metabolitos relacionados con el metabolismo del carbono.

La medición de incorporación de hexosas fosfato como Glc-1-P y Glc-6-P mostró resultados negativos. A los tiempos ensayados (similares a los empleados para el caso de adenilatos) no se observó incorporación cuando los proplástidos fueron incubados con 50  $\mu\text{M}$  de estas hexosas (no mostrado).

##### 3.2.4.2. Transporte de nucleótidos azúcar

La incapacidad por parte de los proplástidos en estudio de incorporar, en las condiciones ensayadas, Glc-1-P y Glc-6-P como fuente de carbono para la síntesis de almidón, así como también recientes reportes respecto de la incorporación de ADP-Glc por

---

parte de diferentes plástidos y su intervención directa en la síntesis de almidón (ver Introducción), llevó a estudiar la incorporación de los nucleótidos azúcar ADP-Glc y UDP-Glc por parte de los proplástidos de células de tabaco. No se observó incorporación de UDP-Glc al interior de estas organelas cuando fueron incubadas con 100  $\mu$ M de este metabolito (no mostrado). En cambio, cuando estas organelas fueron incubadas con 100  $\mu$ M ADP-[ $^{14}$ C]Glc se observó incorporación de radioactividad a la fase estromática de proplástidos de células de tabaco con características de saturación (Figura 29). El transporte de este metabolito se vió disminuído significativamente cuando los proplástidos fueron preincubados por 30 min a 4 °C en presencia de 200  $\mu$ M CAT (Figura 29). Este comportamiento sugirió que el translocador de adenilatos encontrado en la membrana de estos plástidos estaría involucrado en este transporte.

Cuando se realizaron estudios de incorporación de [ $^3$ H]ATP, [ $^3$ H]ADP y [ $^3$ H]AMP por parte de proplástidos incubados a 20 °C a diferentes tiempos (Figura 30), los transportes ensayados mostraron dependencia con la temperatura al acceder a la meseta mucho antes que cuando las mediciones fueron llevadas a cabo a 4 °C (Figuras 21 y 22). El transporte de [ $^3$ H]ATP (Figura 29A), [ $^3$ H]ADP (Figura 29B) y [ $^3$ H]AMP (Figura 30C) al interior de proplástidos de células de tabaco resultó ser inhibido en presencia de 300  $\mu$ M ADP-Glc durante las incubaciones a 20 °C. Estos resultados refuerzan entonces la idea del ingreso del ADP-Glc al plástido utilizando el translocador de adenilatos.

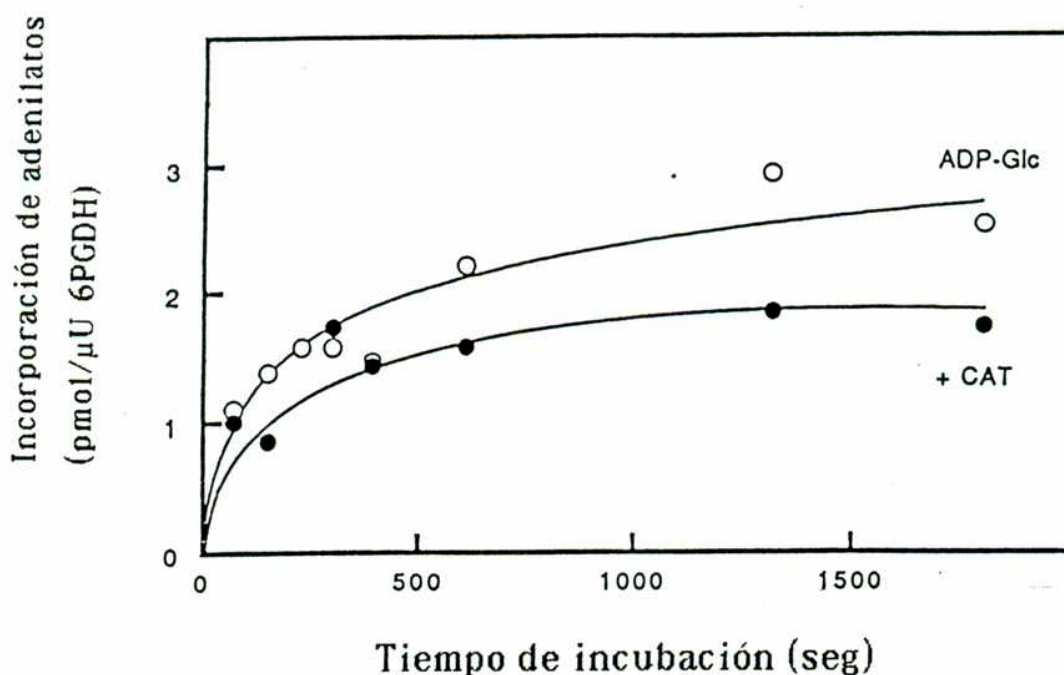
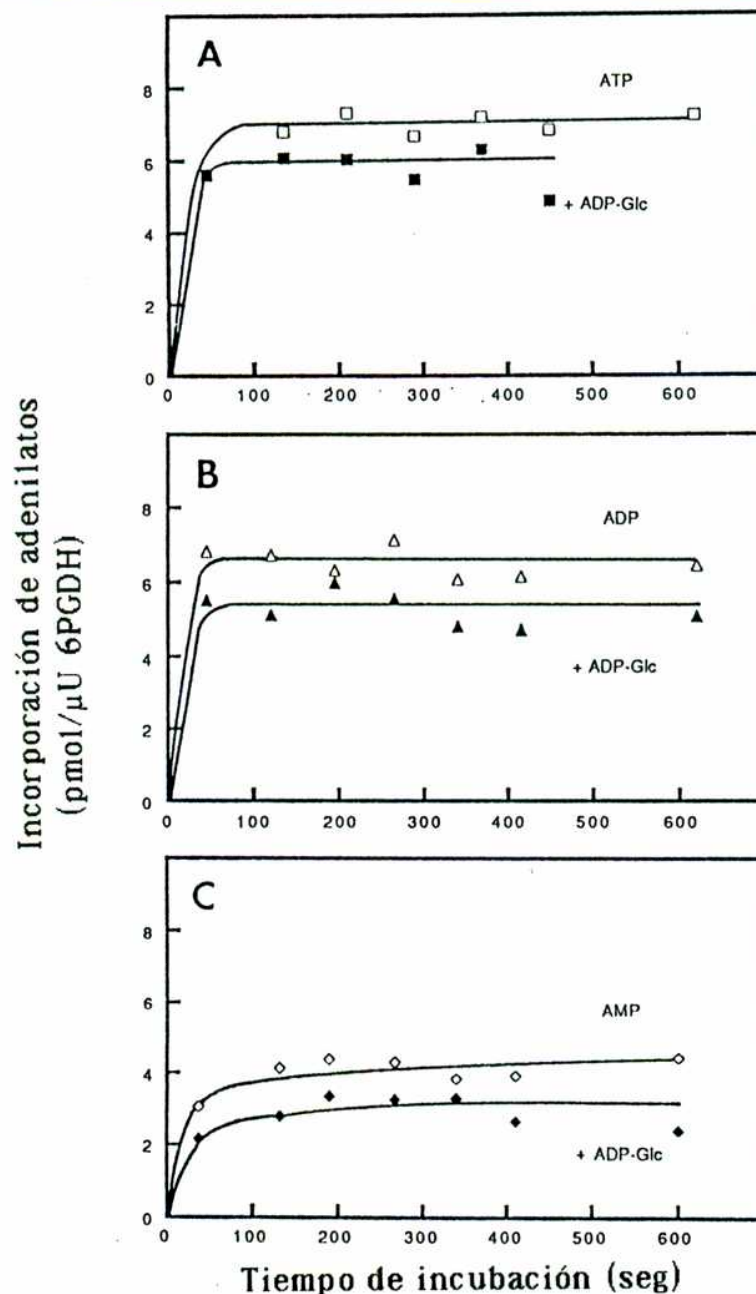


Figura 29. Cinética de incorporación de ADP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc a la fase estromática de proplástidos. Se incubaron alícuotas de proplástidos (43  $\mu\text{l}$ , 27,2  $\mu\text{U}$  6PGDH), sometidos o no a preincubación por 30 min a 4  $^{\circ}\text{C}$  en presencia de 0,2 mM CAT, a diferentes tiempos a 4  $^{\circ}\text{C}$  con ADP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc 100  $\mu\text{M}$ . Finalizado el tiempo de incubación, la reacción se detuvo por centrifugación a través del sistema de capa simple de silicona y se determinó la radioactividad en una alícuota de la fase soluble del medio P, como se describe en Materiales y Métodos.

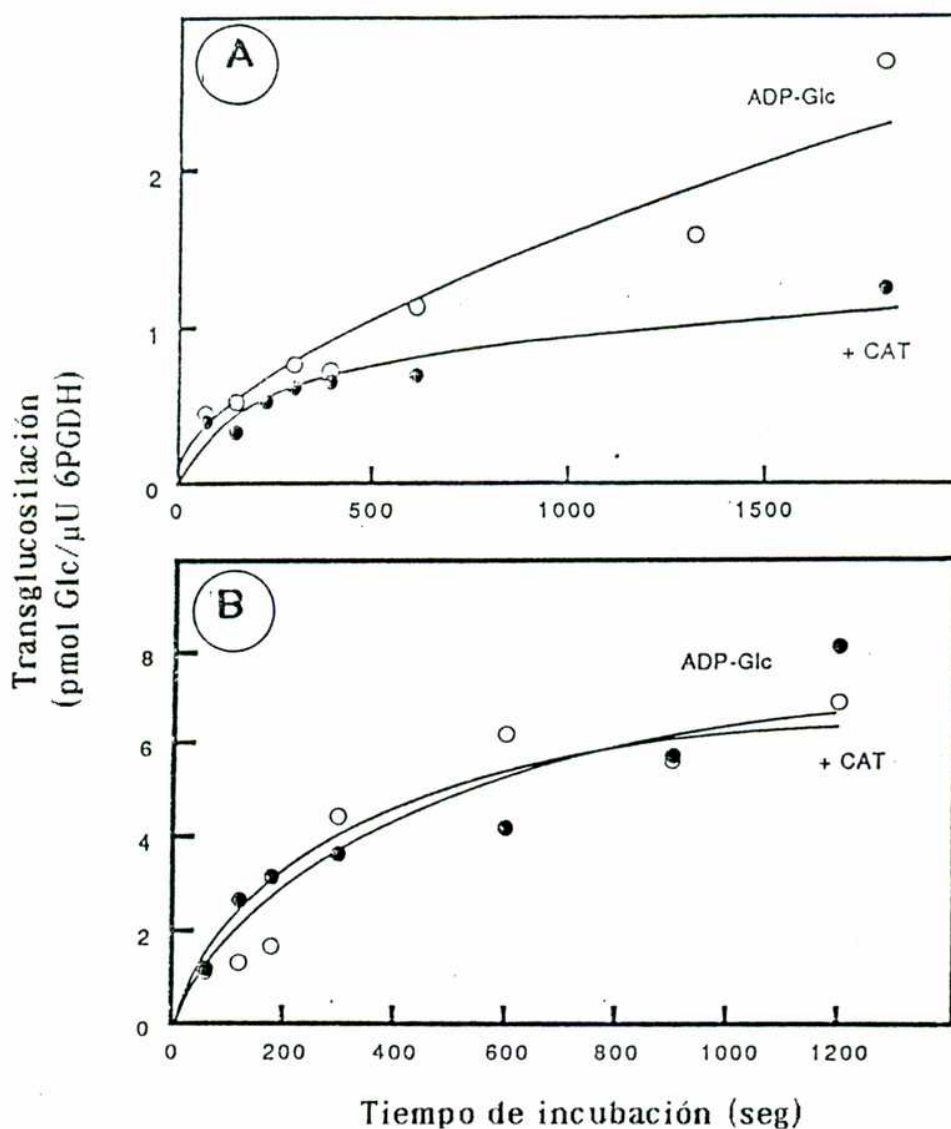


**Figura 30.** Efecto de la presencia de ADP-Glc sobre la incorporación de adenilatos en proplástidos. Alícuotas de preparaciones de proplástidos (40  $\mu$ l, 21,36  $\mu$ U 6PGDH) fueron incubados en presencia de [ $^3$ H]ATP (A), [ $^3$ H]ADP (B) y [ $^3$ H]AMP (C) 0,04 mM en presencia y en ausencia de ADP-Glc 0,3 mM, a diferentes tiempos a 20  $^{\circ}$ C. Finalizado el tiempo de incubación la reacción se detuvo por centrifugación a través del sistema de silicona simple y se determinó radioactividad en el medio P, como se describe en Materiales y Métodos.

---

En los experimentos de transporte de ADP-[<sup>14</sup>C]Glc se encontró, además, marca radioactiva en el pellet insoluble que contiene almidón del medio P de los tubos en que se midió el transporte (Figura 31A) lo que indica que la molécula de glucosa proveniente del ADP-Glc fue transferida al almidón a través de la actividad de almidón sintetasa presente en estos plástidos. La posibilidad de que la transglucosilación observada sea atribuida únicamente a la actividad de almidón sintetasa presente en el medio de incubación y proveniente de la fracción de plástidos rotos fue descartada por los experimentos presentados en la Figura 31B. Mientras que no se observó inhibición en la incorporación de marca radioactiva en la fracción portadora de almidón correspondiente a proplástidos rotos mecánicamente y preincubados en presencia de CAT 200  $\mu$ M (Figura 31B), la transglucosilación resultó ser marcadamente inhibida por la misma concentración del glicósido cuando se emplearon proplástidos intactos (Figura 31A). Se demuestra entonces, que el ADP-Glc puede entrar a los proplástidos intactos a través de un translocador de adenilatos para intervenir directamente en la biosíntesis del almidón.

La Figura 32 muestra el modelo postulado a la luz de los resultados presentados en este capítulo. En él se observa el transporte de ATP hacia el interior de los proplástidos de células de tabaco *via* el translocador de adenilatos presente en la membrana interna de estas organelas para ser utilizado en su metabolismo anabólico, como así también señala la capacidad por parte de ADP-Glc de ingresar a los proplástidos para participar en forma directa en la síntesis del almidón catalizada por la almidón sintetasa.



**Figura 31.** Cinética de transglucosilación de ADP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc en proplástidos. Alícuotas de preparaciones de proplástidos (43  $\mu\text{l}$ , 27,2  $\mu\text{U}$  6PGDH) intactos (A) y rotos mecánicamente (B), sometidos o no a preincubación por 30 min a 4  $^{\circ}\text{C}$  en presencia de CAT 0,2 mM, fueron incubados a diferentes tiempos a 4  $^{\circ}\text{C}$  en presencia de ADP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc 0,1 mM. Finalizado el tiempo de incubación, la reacción se detuvo por centrifugación a través del sistema de simple capa de silicona y se determinó la radioactividad asociada al pellet de membranas y almidón en el medio P, como se describe en Materiales y Métodos.



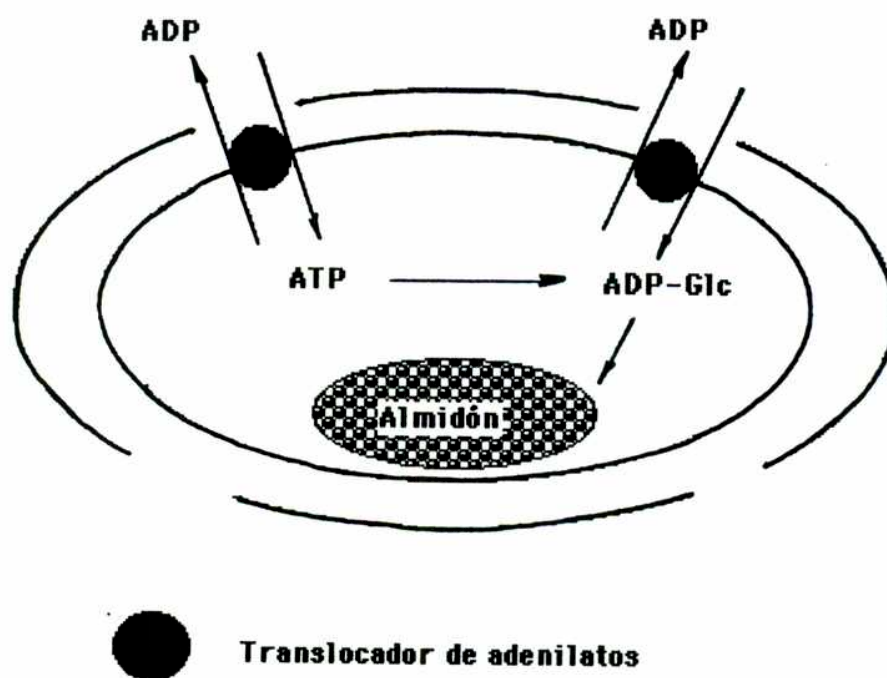


Figura 32. Modelo propuesto para el ingreso de ATP y ADP-Glc al interior de los proplástidos y la utilización del ADP-Glc en la biosíntesis del almidón.



---

## 4. DISCUSION

### 4.1. **Capítulo 1. Identificación y purificación de la enzima UPTG**

#### 4.1.1. Agregación de la enzima UPTG

Los resultados presentados en el Capítulo 1 señalan la agregación de la enzima UPTG no solamente con otras moléculas de la misma enzima sino también con otras enzimas involucradas en el mismo camino metabólico i.e., la biosíntesis del almidón.

Si bien la localización celular precisa de la UPTG no está aún determinada, su existencia asociada a membranas de proplástidos de tubérculo de papa (Lavintman y Cardini, 1972) sugiere un carácter hidrofóbico, que podría ser responsable de las agregaciones mencionadas.

Sólo el empleo de alta fuerza iónica permitió la separación de esta actividad enzimática de las membranas de proplástidos (Moreno y Tandecarz, 1982). En el mismo sentido, sólo la utilización de buffer de alta fuerza iónica consiguió eliminar la heterogeneidad de carga observada en cromatografía de intercambio aniónico en columna de Mono Q (Figura 6) indicando que interacciones moleculares débiles existentes entre las moléculas de UPTG y/u otras proteínas, podrían ser las responsables de este comportamiento.

---

Un comportamiento similar fue descrito por Lomako y col. (1988) durante la purificación de la enzima SGP (self glucosylating protein) involucrada en la iniciación de la biosíntesis de glucógeno de músculo de conejo (ver Introducción). Estos autores utilizaron el detergente CHAPS (2 mM) con el objeto de evitar la adhesión de esta proteína a las superficies de vidrios y plásticos. Aun en presencia de este detergente, la actividad enzimática eluyó en forma de picos anchos de una columna de Mono Q (FPLC). Este resultado, similar al obtenido en el caso de UPTG, fue adjudicado a la existencia de oligomerización de la enzima y/o a la interacción de SGP con proteínas contaminantes (Lomako y col., 1988). Estos autores atribuyeron también a un fenómeno de oligomerización de la proteína purificada, la observación de que la mayor parte de la misma no ingresa al gel durante una electroforesis en gel de poliacrilamida (7%) en condiciones nativas. Similarmente, Quentmeier y col. (1987) encontraron durante la purificación de la enzima GT sTl de *Daucus carota* L. (ver Introducción) que esta enzima en condiciones nativas se encuentra formando parte de un gran complejo enzimático. En condiciones nativas esta enzima no ingresa a un gel de 7,5% poliacrilamida y eluye con el volumen muerto de una columna de tamizaje molecular (Sephacryl S300 de rango separativo  $1 \times 10^4$  a  $1,5 \times 10^3$  kDa).

Los resultados presentados muestran también que la enzima UPTG coeluye con otras enzimas involucradas con la síntesis de almidón luego de las cromatografías realizadas basadas en diferentes criterios separativos. La enzima UPTG coeluye, al menos

---

de la columna Mono Q, junto con actividades derramificante y fosforilasa independiente del agregado de 'primer' polisacárido a la mezcla de reacción (no mostrado). Además, actividades de fosforilasa y almidón sintetasa coeluyen con UPTG luego de separaciones por DEAE Sephacel (no mostrado), Mono Q (Figura 12), Superosa (Figura 8), UDP-Glucurónico agarosa (Figura 9) y concanavalina A Sepharosa 4B (Figura 10). Además, ni el empleo de alta fuerza iónica, ni el de detergente no iónico (Lubrol PX) logró la separación de las proteínas contaminantes (Figuras 8 y 12).

Esta coelución sistemática de enzimas relacionadas sugiere la posibilidad de que estas formaran parte de un mismo "metabolon" (Srere, 1987). Las enzimas intervinientes en un mismo camino metabólico han sido en numerosos casos reportadas formando parte de un mismo sistema multienzimático. Estos complejos llevan a cabo una serie de reacciones secuenciales donde los intermediarios están fuera del equilibrio difusional con los mismos metabolitos del resto de ese compartimiento celular, permitiendo alcanzar concentraciones locales suficientemente altas como para acelerar la catálisis por parte del sistema (tunneling). En el caso de la síntesis del glucógeno, Meyer y col. (1970) y Nimmo y Cohen (1976) mostraron que enzimas de la biosíntesis del glucógeno de músculo esquelético como fosforilasa b con sus respectivas quinasas y fosfatasas, glucógeno sintetasa con sus respectivas quinasas y fosfatasas y desrramificantes se hallan asociadas en partículas que contienen además 50% de glucógeno. Además, en esas partículas están presentes todas las enzimas de la glucólisis permitiendo al

sistema sintetizar ácido láctico a expensas del polisacárido. El estudio de los distintos parámetros cinéticos de las enzimas agregadas con UPTG permitirá establecer si, el descrito, es otro caso de asociación enzimática funcional.

La asociación de UPTG con las mencionadas enzimas fue revertida finalmente por el empleo de un detergente catiónico como el bromuro de cetiltrimetilamonio, como se puso de manifiesto por la cromatografía de tamizaje molecular de una preparación enzimática preincubada en este detergente (Figura 15). Este detergente produjo un incremento de hasta el 65% en la actividad UPTG y la drástica disminución, por otra parte, de las actividades de fosforilasa y almidón sintetasa (Figura 14C).

Similarmente, Cohen y col. (1987) encontraron que la enzima glucógeno sintetasa de músculo esquelético de conejo está compuesta por dos diferentes tipos de subunidades. Mientras que la de mayor tamaño (86 kDa) lleva a cabo la actividad catalítica de la enzima, la subunidad de menor tamaño (38 kDa) fue identificada como la proteína "glucogenina" (ver Introducción). La asociación de estos dos componentes de la enzima glucógeno sintetasa es fuerte ya que la presencia de cloruro de sodio 2 M no consiguió disociarlos. Sólo la incubación por 60 min en presencia de bromuro de litio 4 M posibilitó la completa disociación de los componentes enzimáticos.

---

#### 4.1.2. Identificación de la UPTG y determinación de su mecanismo catalítico

La purificación de la enzima responsable de la actividad UPTG puso de manifiesto el carácter autocatalítico de esta reacción enzimática. Polipéptido/s de 38 kDa no sólo llevan a cabo la actividad UPTG sino que también son el producto glucosilado de esta reacción (Figura 17). Además, el comportamiento cinético de esta enzima a diferentes concentraciones corrobora dicha conclusión (Figura 18). El tamaño de esta enzima inferido del análisis por cromatografía de tamizaje molecular en columna de Superosa 12 en presencia de CTAB 10 mM, sugiere que la proteína en su estado de monómero es enzimáticamente activa puesto que la actividad enzimática eluye con un volumen muy similar al del marcador de 30 kDa (Figura 15 y 16). Sin embargo, queda aún por establecer si el monómero de UPTG constituye la unidad mínima requerida para su accionar en condiciones fisiológicas y si, en dicho estado, posee todas sus propiedades funcionales. En este sentido, la oligomerización que presenta en condiciones nativas, sumado a la asociación observada con otras enzimas involucradas en el mismo camino metabólico, llevaría a pensar que la proteína activa en su estado monomérico es un artificio producto del trabajo *in vitro*. Lomako y col. (1990 y 1991) han sugerido que la forma de 38 kDa de la glucogenina proviene de una forma más grande (llamada p400) que posee un esqueleto proteico y cadenas sacarídicas más grandes que la glucogenina. La posibilidad de que la glucogenina sea un fragmento

---

proteolítico de una proteína más grande debería ser descartado a la luz del aislamiento y secuenciación del gen completo de esta proteína (ver Introducción). Sin embargo, es posible que existan *in vivo* moléculas de glucogenina y también de UPTG, en el caso de tubérculo de papa, que posean una cadena sacarídica más larga producto de la acción *in vivo* de enzimas elongadoras.

El mecanismo de autocatálisis de la UPTG parece ser, entonces, una estrategia común utilizada por la naturaleza para los mecanismos de iniciación de polisacáridos de tubérculo de papa (este estudio y las correspondientes referencias), granos de maíz (Rothschild y Tandecarz, 1990), músculo de conejo (Lomako y col., 1988), hígado de conejo (Smythe y col., 1989), faltando establecer fehacientemente si los mecanismos de autoglucosilación de proteínas encontradas en células de zanahoria (Quentmeier, 1987) y maíz dulce (Gieowar-Singh y col., 1992) están involucrados en la iniciación de la síntesis de los respectivos polisacáridos. En todos estos casos, proteínas de aproximadamente 40 kDa son las responsables de la glucosilación autocatalítica (ver Introducción).

A pesar de las virtudes evidenciadas por el CTAB en cuanto a la separación de la UPTG de las proteínas contaminantes, la imposibilidad de eliminar totalmente el detergente de las fracciones que contenían la UPTG purificada dio por resultado el mantenimiento por pocas horas de su actividad enzimática aparentemente por la inestabilidad de esta enzima en esas condiciones. Además, la presencia del CTAB conspiró contra la posibilidad de llevar a cabo experimentos de alargamiento del producto glucosilado de UPTG por

---

parte de enzimas alargadoras como almidón sintetasa y fosforilasa. Como se mostró en la Figura 14, la presencia de mínimas concentraciones de detergente disminuyó marcadamente estas actividades enzimáticas. Lo mismo ocurrió cuando se intentó el alargamiento con enzimas elongadoras provenientes de otros sistemas biológicos (no mostrado).

Si bien la purificación de la UPTG permitió identificar a la proteína responsable de la actividad enzimática y aclarar su mecanismo de acción, el protocolo de purificación empleado no parecería útil para producir cantidades elevadas del polipéptido purificado. La concentración de CTAB a utilizar está acotada por la cristalización de dichas soluciones a baja temperatura, limitando de esta manera la concentración proteica de las muestras a separar por tamizaje molecular (cuyo volumen está además limitado por el volumen de las columnas). Además, como se mencionó, los estudios de alargamiento están impedidos por la presencia del CTAB. La elaboración de un protocolo de purificación que evite la utilización del CTAB permitiría la purificación de esta proteína en grado tal que permita la secuenciación de esta proteína abriendo así la posibilidad de estudios sobre su estructura molecular como así también posibles mecanismos regulatorios de su actividad. La obtención de anticuerpos contra esta proteína permitiría además llevar a cabo estudios de localización celular y dilucidar así, si esta actividad enzimática se lleva a cabo en el interior de los proplástidos como lo hacen las otras enzimas relacionadas con la síntesis del almidón.

---

## 4.2. Capítulo 2. Estudios de transporte de metabolitos a proplástidos

### 4.2.1. Calidad de la preparación de proplástidos

La calidad de los proplástidos utilizados para estos estudios resultó ser altamente satisfactoria. La integridad del 79% determinada por experimentos de latencia resultó superior al 54% de las preparaciones de amiloplastos de endosperma de trigo obtenidos por Tyson y ap Rees (1988) y al 53% obtenido por Echeverria y col. (1988) en amiloplastos de maíz, y similar a las obtenidas en preparaciones plastidiales de embriones de arvejillas por Hill y Smith (1991) y en amiloplastos de sicomoro obtenidos por Frehner y col (1990), sin alcanzar no obstante el 90% de integridad obtenido por Brochert y col. (1989) en sus preparaciones de amiloplastos de raíces de arvejillas. La contaminación de mitocondrias, estrictamente controlada debido a la existencia del translocador de adenilatos mitocondrial, resultó ser del orden del 1% no pudiendo adjudicársele entonces ingerencia alguna en los resultados obtenidos. Además, los análisis inmunoquímicos cuantitativos señalaron que la contribución por parte del translocador mitocondrial no es significativa (Figura 28).



---

#### 4.2.2. Transporte de energía

Los proplástidos de células de tabaco resultaron capaces de incorporar ATP y ADP a su espacio estromático (Figura 21) en forma similar a los cromoplastos de flores de narciso (Liedvogel y Kleining, 1980), los cloroplastos de hojas de espinaca (Heldt, 1969) y guisante (Robinson y Wiskich, 1977) y los amiloplastos de sicomoro (Pozueta-Romero y col., 1991c). Además, los experimentos de dependencia del transporte con la concentración utilizando la técnica de centrifugación en doble capa de aceite de silicona y las inhibiciones no competitivas observadas por la presencia de CAT señalan la alta afinidad y especificidad del sistema (Figuras 22 y 26). El valor de  $K_m$  para ATP y ADP a 4 °C resultó ser de, aproximadamente, 21  $\mu\text{M}$  y 26  $\mu\text{M}$ , respectivamente, mostrando entonces mayor afinidad que en caso de los cromoplastos de flores de narciso ( $K_m$  de 0,25 mM para ATP a 8 °C) (Liedvogel y Kleining, 1980), similar a los de cloroplastos de hojas de espinaca ( $K_m$  de 20  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$  para ATP y ADP respectivamente a 4 °C) (Pozueta-Romero y col., 1991a) y los amiloplastos de sicomoro (24  $\mu\text{M}$  para ATP) (Pozueta-Romero y col., 1991c). Además, se mostró la presencia en membranas de proplástidos de células de tabaco de una proteína inmunológica y estructuralmente relacionada con el translocador de adenilatos de mitocondrias de *Neurospora crassa* (Figuras 27 y 28). Esta proteína, además de ser reconocida específicamente por el antisuero, posee un tamaño (32 kDa) muy similar a la de mitocondrias de células de tabaco (Figura 27) y a los translocadores

---

de adenilatos de mitocondrias de corazón de novillo (29 kDa) (Riccio y col., 1975), amiloplastos de sicomoro (32 kDa) (Ngemprasirtsiri y col., 1989) y cloroplastos de hojas de espinaca (32 kDa) (Pozueta-Romero y col., 1991a). Estos resultados señalan que los proplástidos de células de tabaco están capacitados para incorporar ATP citosólico como fuente de energía para desarrollar sus procesos endergónicos. Eventualmente, si estos plástidos poseyeran la capacidad de sintetizar ATP a través de rutas oxidativas durante la movilización del almidón, estarían capacitados de incorporar el precursor (ADP) si es que ocurre exportación de ATP hacia el citoplasma.

#### 4.2.3. Transporte de fuente de carbono

La presencia del translocador de adenilatos en la membrana interna de los proplástidos de células de tabaco permitiría el ingreso de ATP para sintetizar, junto con Glc-1-P, ADP-Glc (*via* la enzima ADP-Glc pirofosforilasa) para la síntesis del almidón (Preiss, 1988). A pesar que en las condiciones estudiadas en este trabajo no se ha podido establecer ingreso directo de Glc-1-P a estos plástidos, se requieren estudios adicionales para descartar que este ingreso ocurra en otras condiciones o que la Glc-1-P pueda ser sintetizada en el interior de los proplástidos a partir del ingreso de otra forma carbonada como triosas-P, si es que estos plástidos poseen el equipamiento enzimático necesario para tal fin (Echeverria y col.,

---

1988; Mac Donald y ap Rees, 1983 y Journet y Douce, 1985). Sin embargo, en este trabajo se describe el ingreso directo de ADP-Glc al interior de los proplástidos (Figura 29). Este transporte resultó ser específico y mediado por el translocador de adenilatos presente en estos plástidos de acuerdo con la inhibición producida por la preincubación de los plástidos con CAT (Figura 29) y la inhibición del transporte de [<sup>3</sup>H]ATP, [<sup>3</sup>H]ADP y [<sup>3</sup>H]AMP por la presencia de ADP-Glc en el medio de incubación (Figura 30). Además, el ingreso de ADP-Glc resultó estar directamente acoplado a un mecanismo de transglucosilación que ocurre en el interior de estos plástidos (Figura 31). La efectiva demostración de la síntesis de almidón a partir del ADP-Glc incorporado requeriría la degradación del almidón plastidial con amiloglucosidasa y/o  $\alpha$ -amilasa para liberar la marca incorporada. No obstante, el tipo de cinética no saturable (Figura 31A) y la co-localización de la marca radioactiva con la fracción plastidial que contiene el almidón sugieren fuertemente esta posibilidad. Cabe señalar que, recientemente, se han descrito incorporaciones de ADP-Glc por parte de diferentes tipos de plástidos sintetizadores de almidón. En 1991(c), Pozueta-Romero y col. demostraron el ingreso de ADP-Glc a amiloplastos de sicomoro y su acoplamiento directo con la síntesis de almidón. Resultados similares fueron reportados para el caso de cloroplastos de hojas de espinaca (Pozueta-Romero y col., 1991a) y amiloplastos de maíz (Liu y col., 1991 y 1992). Similarmente, Viola y Davis (1991) trabajando con cortes de tubérculo de papa observaron que ocurre síntesis de almidón a partir del ADP-[<sup>14</sup>C]Glc presente en el medio

---

de incubación, sugiriendo que esos amiloplastos podrían incorporar ADP-Glc.

Como se describió en la Introducción, numerosas evidencias bioquímicas, genéticas y, más recientemente, de biología molecular apoyan la participación de la enzima ADP-Glc pirofosforilasa en la síntesis de almidón en plástidos no fotosintéticos en forma similar a lo que ocurre en cloroplastos (Preiss, 1991, Okita, 1992). Sin embargo, no puede dejar de considerarse, al menos como un mecanismo complementario, el ingreso directo a los plástidos de ADP-Glc citoplasmático para la biosíntesis del almidón. Esta hipótesis se ve además apoyada por a) la observación que la mayor cantidad de ADP-Glc presente en una célula vegetal se encuentra precisamente en el citoplasma y que posiblemente la relación de fosfato a fosfoglicerato presente en el estroma del amiloplasto no permitiría un activo accionar de la enzima ADP-Glc pirofosforilasa (Liu y Shannon, 1984) y b) que el ADP-Glc puede ser sintetizado en el citoplasma de células de sicomoro por la enzima sacarosa sintetasa a partir de ATP (Huber y Akazawa, 1986). En ese sentido, Lee y Su (1982) encontraron que durante las etapas tempranas del desarrollo de la semilla de arroz la enzima clave para la transformación de sacarosa en almidón es la sacarosa sintetasa. Sus resultados indican que la glucosa-1-P no se encuentra en equilibrio metabólico con el ADP-Glc ni el UDP-Glc, eliminando así la posibilidad que la ADP-Glc pirofosforilasa tenga un papel predominante en dicha transformación en ese estadio fisiológico. Finalmente, Sullivan y col. (1991) sugirieron que un defecto en el

translocador de adenilatos de los amiloplastos de la línea *brittle-1* de maíz es el responsable de su fenotipo carente de almidón.

Futuras investigaciones aclararán, seguramente, la presente controversia relacionada con el camino metabólico (y su localización subcelular) que conduce a la síntesis de almidón. Las referidas evidencias apoyando al menos dos posibilidades (*i.e.* la síntesis de ADP-Glc en el interior del plástido a partir de ATP y Glc-1-P o el ingreso directo de ADP-Glc citosólico mostrado en este trabajo y las correspondientes referencias) hacen presumir la posibilidad que ambas puedan ser efectivas tal vez en diferentes materiales vegetales, en diferentes estadios ontogénicos de una misma planta o frente a distintas condiciones metabólicas.

## 5. CONCLUSIONES

### 5.1. Capítulo 1

Se describió la asociación estrecha de UPTG con otras enzimas involucradas en la biosíntesis del almidón, como fosforilasa y almidón sintetasa.

La utilización del detergente catiónico CTAB dió lugar a la separación de UPTG de las demás actividades enzimáticas que copurificaban sistemáticamente con UPTG.

Se purificó la enzima UPTG de fracciones de proplástidos de tubérculo de papa, identificándose a un polipéptido de 38 kDa como la mínima unidad con actividad catalítica "*in vitro*".

En el polipéptido de 38 kDa reside también la capacidad aceptora, atribuyendosele entonces un mecanismo de autoglucosilación a la enzima UPTG.

### 5.2. Capítulo 2

Se describió la existencia de un translocador de adenilatos en las membranas de proplástidos de células de tabaco (BY2), determinándose algunos de sus parámetros cinéticos.

El translocador de adenilatos permite el ingreso de ATP a los proplástidos como fuente de energía para su metabolismo.

Se desarrolló un método de determinación de transporte inespecífico a organelas que permitió llevar a cabo mediciones precisas del transporte específico.

Se estableció el ingreso de ADP-Glc a proplástidos *via* el translocador de adenilatos. Este ingreso les suministraría de una fuente de carbono para llevar a cabo la biosíntesis de almidón.

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

## **6. REFERENCIAS**

- Aón, M. y Curtino, J. (1984).** Evidence for the glycoprotein nature of retina glycogen. *Eur J Biochem*, **140**, 557-566.
- ap Rees, T. (1985).** The organization of glycolysis and oxidative pentose pathways in plants. *En* R. Douce y D. Day eds., Higher plant cell respiration. *Encyclopedia of Plant Physiology*, Springer Verley, Vol. 18, pp. 391-417.
- Badenhuizen, N. (1969).** *En* The biogenesis of starch granules in higher plants. Appleton, F., Century, J. and Crofts, A. eds, New York, pp. 1-46.
- Barengo, R., Flawia, M. y Krisman, C. (1975).** The initiation of glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, **53**, 274-278.
- Bassham, J. y Krause, G. (1969).** Free energy changes and metabolic regulation in steady-state photosynthetic carbon reduction. *Biochim Biophys Acta*, **189**, 207-221.
- Bathgate, B., Purton, M., Grierson, D. y Goodenough, P. (1985).** Plastids changes during the conversion of chloroplasts to chromoplasts in ripening tomatoes. *Planta*, **165**, 197-204.
- Blake, M., Johnston, K., Russel-Jones, G. y Gotschlich, E. (1984).** A rapid sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Anal Biochem*, **136**, 175-179.
- Blumenfeld, M. y Krisman, C. (1986).** The initiation of glycogen biosynthesis in rat heart  $\alpha$ -1,4 glucans tightly associated with glycogen synthase. *Eur. J. Biochem*, **156**, 163-169.



- 
- Borchert, S., Große, H. y Heldt, H. (1989). Specific transport of inorganic phosphate, glucose 6-phosphate, dihidroxyacetone phosphate and 3-phosphoglycerate into amyloplasts from pea roots. *FEBS Lett*, 1, 2, 183-186.
- Bowsher, C., Hucklesby, D. y Emes, M. (1989). Nitrite reduction and carbohydrate metabolism in plastids purified from roots of *Pisum sativum* L. *Planta*, 177, 359-366.
- Boyer, C. (1989). Genetic control of chromoplast formation during fruit development of *Cucurbita pepo* L. En C. Boyer, J. Shannon, Hardison L eds, *Physiology, biochemistry and genetics of nongreen plastids*. American society of plant physiologists, Maryland, pp. 241-252.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brisson, N., Giroux, H., Zollinger, M., Camirand, A. y Simard, C. (1989). Maturation and subcellular compartmentation of potato starch phosphorylase. *Plant Cell*, 1, 559-566.
- Burnette, W. (1981). Western blotting electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112, 195-199.
- Burr, B. y Nelson, O. (1975). Maize  $\alpha$ -glucan phosphorylase. *Eur J Biochem*, 56, 539-546.
- Campbell, D. y Cohen, P. (1989). The amino acid sequence of rabbit skeletal muscle glycogenin. *Eur J Biochem*, 185, 119-125.
-

- 
- Cardini, C. y Frydman, R. (1966). ADP-Glucose:  $\alpha$ -1,4-glucan glucosyltransferases (starch synthases and related enzymes) from plants. *En Methods in Enzymology*, E. Neufeld y V. Guinsburg, eds., Academic Press, New York, Vol 8, pp. 387-394.
- Caspar, T., Huber, S. y Sommerville, C. (1986). Alterations in growth, photosynthesis and respiration in a starch mutant *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiol*, 79, 11-17.
- Catz, D., Moreno, S. y Tandecarz, J. (1989). Changes in phosphorylase isoenzymes during dedifferentiation of potato tuber cells. *Physiol Plant*, 76, 221-225.
- Chamberlain, J. (1970). Fluorographic detection of radioactivity in polyacrilamide gels whit water soluble fluor, sodium salicilate. *Anal Biochem*, 98, 132-135.
- Cohn, M. (1961). *En The Enzymes*, P. Boyer, H. Lardy y K. Myrback, eds., Academic Press, New York, 2nd ed, Vol 5, pp. 179-206.
- Dalling, M., Tolbert, N. y Hageman, R. (1972). Intracellular localization of nitrate reductase and nitrite reductase in wheat roots. *Biochem Biophys Acta*, 283, 513-519.
- Dang, P. y Boyer, C. (1988). Maize leaf and kernel starch synthases and starch branching enzymes. *Phytochem*, 27, 1255-1259.
- Dickinson, D. y Preiss, J. (1969). Presence of ADP-Glc pyrophosphorylase in *shrunk* -2 and *brittle* -2 mutants of maize endosperm. *Plant Physiol*, 44, 1058-1062.
-

- 
- Echeverria, E., Boyer, C., Thomas, P., Liu, K. y Shannon, J. (1988). Enzyme activities associated with maize kernel amyloplasts. *Plant Physiol*, **86**, 786-792.
- Emes, M. y Traska, A. (1987). Uptake of inorganic phosphate by plastids purified from the roots of *Pisum sativum* L. *J Exp Bot*, **38**, 1781-1788.
- Entwistle, G. y ap Rees, T. (1988). Enzymic capacities of amyloplast from wheat (*Triticum aestivum* ) endosperm. *Biochem J*, **255**, 391-396.
- Espada, J. (1962). Enzymic synthesis of adenosine diphosphate glucose from glucose 1 phosphate and adenosine triphosphate. *J Biol Chem*, **237**, 3577-3581.
- Fairbanks, G.; Steck, T. y Wallach, D. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**, 2606-2616
- Fox, J. Kawaguchi, K., Grennberg, E. y Preiss, J. (1976). Biosynthesis of bacterial glycogen. Purification and properties of the *Escherichia coli* B ADP-Glc:1,4- $\alpha$ -D-glucan 4- $\alpha$ -glucosiltransferase. *Biochemistry*, **15**, 849-857.
- Frehner, M., Pozueta-Romero, J. y Akazawa, T. (1990). Enzyme sets of glycolysis, gluconeogenesis and oxidative pentose pathway are not complete in non green highly purified amyloplast from sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cell suspension cultures. *Plant Physiol*, **94**, 538-544.

- 
- French, D. (1975). *En* M.T.P. Int. Rev. Sci. Biochem. Ser. The biochemistry of carbohydrates. W. Whelan, ed. Butherworth, Univ Park Press, Londres, UK, Vol V, pp 267.
- Frydman, R. y Slabnik, E. (1973). The role of phosphorylase in starch biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci*, 210, 153-159.
- Gieowar-Singh, D., Lomako, J. y Whelan, W. (1992). Purification of a self-glucosylating protein from seet corn. *FASEB J*, 6, A#3382.
- Goldner, W y Beevers, H. (1989). Starch synthase and starch branching enzyme from germinating castor bean endosperm. *Phytochem*, 28, 1809-1812.
- Goldstein, I. (1976). Carbohydrate binding specificity of Concanavalin A. *En* Concanavalin A as a tool. H. Bittiger y H. Schnebli, eds. Pitman Press, Bath, U.K. pp. 57-65.
- Gunja-Smith, Z., Marshal, J., Mercier, C., Smith, E. y Whelan, W. (1970). A revision of the Meyer-Benfled model of glycogen and amylopectin. *FEBS Lett*, 12, 101-104.
- Hanes, C. (1940). The reversible formation of starch from glucose-1-phosphate catalysed by potato phosphorylase. *Proc R Soc London Ser B* 120, 174-208.
- Hatzfeld, W. y Stitt, M. (1990). A study of the rate of recycling of triose phosphates in heterotrophic *Chenopodium rubrum* cells, potato tubers and maize endosperm. *Planta*, 180, 198-204.
- Heber, U. y Heldt, H. (1981). The chloroplast envelope: structure, function and role in leaf metabolism. *Ann Rev Plant Physiol*, 32, 139-168.
-

- 
- Heldt, H. (1969). Adenine nucleotide translocation in spinach chloroplasts FEBS lett, 5, 11-14.
- Heldt, H. y Sauer, F. (1971). The inner membrane of the chloroplast envelope as the site of specific metabolic transport. Biochim Biophys Acta, 234, 83-91.
- Heldt, H. (1976). Metabolite transport in intact spinach chloroplasts. *En* The intact chloroplast. J. Barber, ed., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp. 215-234.
- Heldt, H. y Flugge, U. (1987). Subcellular transport of metabolites in plant cells. *En* The biochemistry of plants. D. Davies, ed, Academic Press, pp. 49-85.
- Hill, L. y Smith, A. (1991). Evidence that glucose 6-phosphate is imported as the substrate for starch biosynthesis by the plastids of developing pea embryos. Planta, 185, 91-96.
- Hizukuri, S. (1986). Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. Carboh Res, 147, 342-347.
- Hodges, T. y Leonard, R. (1974). Purification of a plasma membrane-bound ATPase from membrane roots. Methods Enzymol, 32, 392-406.
- Hovenkamp-Hermelink, J., Jacobsen, E., Ponstein, A., Visser, R., Vos-Sheperkeuter, G., Bijmolt, E., de Vries, J., Witholt, B. y Feenstra, W. (1987). Isolation of an amylose-free starch mutant of the potato (*Solannum tuberosum* L.). Theor Appl Genet, 75, 217-221.

- 
- Huber, S. y Akazawa, T. (1986). A novel sucrose synthase pathway for sucrose degradation in cultured sycamora cells. *Plant Physiol*, **81**, 1008-1013.
- Ingold, E. y Seitz, H. (1986). Characterization and properties of different glucosyltransferases isolated from suspension cultured cells from *Daucus carota* . *Z Naturforsch*, **41c**, 409-407.
- Janovitz, A., Chavez, E. y Klapp, M. (1976). Adenine nucleotide translocation in cauliflower mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, **163**, 264-268.
- Journet, E., Bligny, R. y Douce, R. (1986). Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plants. *J Biol Chem*, **261**, 3193-3199.
- Journet, E. y Douce, R. (1985). Enzymic capacities of purified cauliflowers bud plastids for lipid synthesis and carbohydrate metabolism. *Plant Physiol*, **79**, 458-467.
- Kato, K., Matsumoto, T., Koiwai, A., Mizusaki, S., Noguchi, M. y Tamaki, E. (1972). Liquid suspension culture of tobacco cells. *En* G. Terui, ed., *Ferment Technol Today*. Soc Ferment Technol, Osaka, Japan, pp. 689.
- Keeling, P., Wood, J., Tyson, R. y Bridges, I. (1988). Starch biosynthesis in developing wheat grain. Evidence against the direct involvement of triose phosphates in the metabolic pathway. *Plant physiol*, **87**, 311-319.

- 
- Kennedy, L., Kirkman, B., Lomako, J., Rodriguez, I. y Whelan, W. (1985). The biogenesis of rabbit-muscle glycogen. *En Membranes and Muscle*, M. Berman, W. Gevers y L. Opie, eds, Oxford, England, ICSU-IRL Press, pp. 65-84.
- Kimura, S., Mitsui, T., Matsuoka, T. y Igaue, I. (1992). Purification, characterization and localization of rice UDP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol Biochem*, 30, (6), 683-693.
- Kirshner, B. y Hahn, H. (1986). Patatin, a major soluble protein of the potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber is synthesized as a large precursor. *Planta*, 168, 386-389.
- Klingenberg, M. y Kroger, P. (1965). Techniques for studying kinetics in mitochondria suspensions. *En Rapid mixing and sampling techniques in biochemistry* (B Chance, R Eisenhardt, Gibson Q and K Lonberg-Holm eds), Academic Press, New York, pp 333-337.
- Klingenberg, M y Pfaff, E. (1966). *En Regulation of metabolic processes in mitochondria*. J. Tager, S. Papa, E. Quagliariello y E. Slater, eds., Vol 7, BBA Library, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, the Netherlands, pp. 180-201.
- Klingenberg, M. (1979). The ADP, ATP shuttle of mitochondrion. *Trends Biochem Sci*, 4, 249-252.
- Klingenberg, M. (1989). Molecular aspects of adenosine nucleotides carrier from mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 270, 1-14.
- Koch, H. y Roper, H. (1988). New industrial products from starch. *Starch*, 40, 121-131.

- 
- Konishi, Y., Nojima, H., Okuno, K., Asaoka, M. y Fuwa, H. (1985). Characterization of starch granules from waxy, nonwaxy and hybrid seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Agric Biol Chem*, **49**, 1965-1971.
- Krisman, C. (1972). A possible intermediate in the initiation of glycogen biosynthesis. *Biochem Biophys Res Comm*, **46**, (3), 1206-1212.
- Krisman, C. y Barengo, R. (1975). A precursor of glycogen biosynthesis:  $\alpha$ -1,4-glucan-protein. *Eur J Biochem*, **52**, 117-123.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lavintman, N. y Cardini C. (1972). *En Biochemistry of the glycosidic linkage*. Piras, R. y Pontis, H., eds. Academic Press, New York, pp 503.
- Lavintman, N. y Cardini, C. (1973). Particulate UDP - Glucose : protein transglucosylase from potato tuber. *FEBS Lett*, **29**, 43-46.
- Lavintman, N., Tandecarz, J., Carceller, M., Mendiara, S. y Cardini, C. (1974). Role of uridine diphosphate glucose in the biosynthesis of the starch. Mechanism of formation and enlargement of a glucoproteic acceptor. *Eur J Biochem*, **50**, 15-155.
- Lee, P. y Su, J. (1982). Sucrose starch transforming system in rice grains. A tracer feeding study. *Proc Natl Sci Counc B. ROC*, **6**, 2, 189-196.
- Leloir, L. y Cardini, C. (1957). Biosynthesis of glycogen from uridine diphospho glucose. *J Am Chem Soc*, **79**, 6340.
-



- 
- Leloir, L., Rongine de Fekete, M. y Cardini, C (1961). Starch and oligosaccharide synthesis from uridine diphosphate glucose. *J Biol Chem*, **236**, 636-641.
- Levi, C. y Preiss, J. (1978). Amylopectin degradation in pea chloroplast extracts. *Plant Physiol*, **61**, 218-220.
- Liedvogel, B. y Kleining, H. (1980). Phosphate translocator and adenylate translocator in chromoplasts. *Planta*, **150**, 170-173.
- Lin, T., Caspar, T., Sommerville, C. y Preiss, J. (1988). Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* L. heynh lacking ADP-Glc pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol*, **83**, 1131-1135.
- Lin, T., Caspar, T., Sommerville, C. y Preiss, J. (1988). A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADP-Glc pyrophosphorylase activity lacks one of the two subunits of the enzyme. *Plant physiol*, **88**, 1175-1181.
- Liu, K. y Shannon, J. (1984). Measurement of metabolites associated with nonaqueously isolated starch granules from immatures *Zea mayz* L. endosperm. *Plant Physiol*, **67**, 525-529.
- Liu, K., Boyer, C. y Shannon, J. (1991). Evidence of an adenylate translocator in maize amyloplast membranes. *En Molecular approaches to compartmentation and metabolic regulation*. A. Huang y L. Taiz, eds., American Society of Plant Physiologist, Rockville, MD, USA, pp. 236-237.
- Liu, K., Boyer, C. y Shannon, J. (1992). Carbohydrate transfer into isolated mayze (*Zea mayz* L.) amyloplasts. Supplement to *Plant Physiol*, **99**, 1, pp. 39, A# 234.

- 
- Lomako, J., Lomako, W. y Whelan, W. (1988). A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. *FASEB J*, 2, 3097-3103.
- Lomako, J., Lomako, W. y Whelan, W. (1990, a). Nature of the carbohydrate chain in glycogenin. *FASEB J*, 4, Abstract # 2577.
- Lomako, J., Lomako, W. y Whelan, W. (1990, b). The nature of the primer for glycogen synthesis in muscle. *FEBS Lett*, 268, 1, 8-12.
- Lomako, J., Lomako, W. y Whelan, W. (1991). Proglycogen: a low-molecular-weight form of muscle glycogen. *FEBS Lett*, 279, 2, 223-228.
- Losada, M. and Paneque, A. (1971). Nitrite reductase. *Methods Enzymol*, 23, 487-488.
- Lowry, O., Rosebrough, J., Fan, A. y Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-271
- Mac Donald, F. y ap Rees, T. (1983). Enzymic properties of amyloplast from suspension cultures of soybean. *Biochim Biophys Acta*, 755, 81-89.
- Mac Donald, F. y Preiss, J. (1985). Partial purification and characterization of granule bound starch synthases from normal and waxy maize. *Plant Physiol*, 78, 849-852.
- Matern, H., Bolz, R. y Matern, S. (1990). Isolation and characterization of UDP-glucose dolichyl-phosphate glucosyl transferase from human liver. *Eur J Biochem*, 190, 99-105.

- 
- Meyer, F., Heilmeyer, L., Haschke, R. y Fisher, E. (1970). Control of phosphorylase activity in a muscle glycogen particle. I. Isolation and characterization of the protein-glycogen complex. *J Biol Chem*, **245**, 6642-6648.
- Miflin, B. y Lea, P. (1977). Aminoacid metabolism. *Ann Rev Plant Physiol*, **28**, 299-378.
- Moreno, S. y Tandecarz, J. (1982). Potato tuber glucosyl transferases: partial characterization of the solubilized enzymes. *FEBS Lett*, **139**, 2, 313-316.
- Moreno, S., Cardini, C. y Tandecarz, J. (1986).  $\alpha$ -Glucan synthesis on a protein primer, uridine diphosphoglucose: protein transglucosylase I. Separation from starch synthase and phosphorylase and a study of its properties. *Eur J Biochem*, **157**, 539-545.
- Moreno, S., Cardini, C. y Tandecarz, J. (1987).  $\alpha$ -Glucan synthesis on a protein primer. A reconstituted system for the formation of protein bound  $\alpha$ -glucan. *Eur J Biochem*, **162**, 609-614.
- Moreno, S. y Tandecarz, J. (1989). Identification of the 110-kDa polypeptide as the potato unprimed phosphorylase subunit. *Biochem Int*, **18**, 1229-1235.
- Morrison, W. y Karkalas, J. (1990). Starch, *En Methods in Plant Biochemistry*. P. Dey y J. Harborne, eds. Academic Press, New York, Vol. 2, pp. 323-353.

- 
- Muller-Rober, B. Sonnewald, U. y Willmitzer, L. (1992). Inhibition of the ADP-Glc pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber-storage protein genes. *EMBO J*, **11**, 1229-1238.
- Murata, T. y Akazawa, T. (1964). The role of adenosine diphosphate glucose in leaf starch formation. *Biochem Biophys Res Commun*, **16**, 6-11.
- Nagata T, Okada K Takebe I and Matsui C (1981). Delivery of tobacco mosaic virus RNA into plant protoplast mediated by reverse phase evaporation vesicles (liposomes). *Mol Gen Genet*, **184**, 161-165.
- Nakano, K. y Fukui, T. (1986). The complete aminoacid sequence of potato  $\alpha$ -glucan phosphorylase. *J Biol Chem*, **261**, 8230-8236.
- Nemoto, Y., Kawano, S., Nakamura, S., Mita, T., Nagata, T. y Kuroiwa, T. (1988). Studies on plastid-nuclei (nucleoids) in *Nicotiana tabacum* L. I. Isolation of proplastid-nuclei from cultured cells and identification of proplastid-nuclear proteins. *Plant Cell Physiol*, **29**, 1, 167-177.
- Newby, A. y Chrambach, (1979). A. Disaggregation of adenylate cyclase during polyacrylamide-gel electrophoresis in mixture of ionic and non-ionic detergents. *Biochem J*, **177**, 623-630

- 
- Ngernprasirtsiri, J., Macherel, D., Kobayashi, H. y Akazawa, T. (1988). Expression of amyloplast and chloroplast DNA in suspension-cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). *Plant Physiol*, **86**, 137-142.
- Ngernprasirtsiri, J., Takabe, T. y Akazawa, T. (1989). Inmunochemical analysis shows that an ATP/ADP-translocator is associated with the inner envelope membranes of amyloplast of *Acer pseudoplatanus* L. *Plant Physiol*, **89**, 1024-1027.
- Nicholas, D. y Nason, A. (1957). Determination of nitrate and nitrite. *Methods Enzymol*, **3**, 981-984.
- Nimmo, H., Proud, C. y Cohen, P (1976). The phosphorylation of rabbit squeletal muscle glycogen synthase by glycogen synthase kinase 2 and adenine-3':5'-monophosphate dependent protein kinase. *Eur J Biochem*, **68**, 31-44.
- Nishimura, M. y Beevers, H (1979). Subcellular distribution of gluconeogenic enzymes in germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol*, **64**, 31-37.
- Oakley, B.; Kirsch, D. y Morris, R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, **105**, 361-363 .
- Ohlrogge, J., Kuhn, D. y Stumpf, P. (1979). Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacea oleracea* . *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 1194-1198.
- Okita, T. (1992). Is there an alternative pathway for starch synthesis?, *Plant Physiol*, **100**, 560-564.
-

- 
- Pitcher, J., Smithe, C., Campbell, D. y Cohen, P. (1987). Identification of the 38-kDa subunit of rabbit skeletal muscle glycogen synthase as glycogenin. *Eur J Biochem*, **169**, 497-502.
- Pitcher, J., Smythe, C. y Cohen, P. (1988). Glycogen is the priming glucosyltransferase required for the initiation of glycogen biogenesis in rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **176**, 391-395.
- Ponstein, A., de Wit, J., Galama, M., Vos Sheperkeuter, G., Feenstra, W., Preiss, J. y Witholt, B. (1990). Soluble proteins related to starch synthesis in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). Tesis doctoral de Ponstein, A. Universidad de Groningen, Holanda, capítulo 3, pp 39-59.
- Pozueta-Romero, J., Ardila, F. y Akazawa, T. (1991, a). ADP-Glc transport by the chloroplast adenylate translocator is linked to starch biosynthesis. *Plant Physiol*, **97**, 1565-1572.
- Pozueta-Romero, J., Frehner, M. y Akazawa, T. (1991, b). Filtering centrifugation through two layers of silicone oil : a method for the kinetic analysis of rapid metabolite transport into organelles. *Cell Struct Funct*, **16**, 357-363.
- Pozueta-Romero, J., Frehner, M., Viale, A. y Akazawa, T. (1991, c). Direct transport of ADPglucose by an adenylate translocator is linked to starch biosynthesis in amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 5769-5773.
- Pozueta-Romero, J., Viale, A. y Akazawa, T. (1991, d). Comparative analysis of mitochondrial and amyloplast adenylate translocator. *FEBS Lett* **287**, 62-66.

- 
- Pozueta-Romero, J., Ardila, F., Akazawa, T. y Kojima, K. (1992). A method for accurate analysis of intermembrane space in organelles enclosed by double envelope membranes. *Cell Struct Funct*, 17, 47-53.
- Preiss, J., Mac Donald, F., Singh, B., Robinson, N. y Mac Namara, K. (1985). Various aspects in the regulation of starch biosynthesis. *En New Appr Res Cer Carboh.* R. Hill y L Munck, eds Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, The Netherlands, pp. 1-17.
- Preiss, J., Bloom, M., Morell, M., Knowles V., Plaxton, W., Okita, T., Larsen, R., Harmon, A. y Putnam-Evans, C. (1987). Regulation of starch synthesis: enzymological and genetic studies. *En Tailoring genes for crop improvement.* G. Bruening, J. Harada, T. Kosuge y A. Hollaender, eds. Plenum Publishing Corporation, pp. 133-152.
- Preiss, J. (1988). *En The biochemistry of plants.* J. Preiss, ed., Academic press, New York, USA, Vol 14, pp 181-254.
- Preiss, J. (1991). Biology and molecular biology of starch synthesis and regulation. *En B. Mifflin, ed, Oxford Surveys of Plant Molecular and Celular Biology,* vol 7, Oxford University Press, Oxford, pp. 59-114.
- Quentmeier, H., Ingold, E. y Seitz, H. (1987). Purification of an autocatalytic protein-glycosylating enzyme from cell suspensions of *Daucus carota* L. *Planta*, 171, 483-488.
- Recondo, E. y Leloir, L. (1961). Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 6, 85-88.

- 
- Riccio, P., Aquila, H. y Klingenberg, M. (1975). Purification of the carboxyatractylate binding protein from mitochondria. *Febs Lett*, **56**, 133-137.
- Rivas, L. y Pont Lezica, R. (1987). Synthesis of  $\beta$ -glucans in *Prototheca zopfi*. Isolation and characterization of the glycoprotein primer. *Eur J Biochem*, **163**, 135-140.
- Rodriguez, I. y Whelan, W. (1985). A novel glucosyl-aminoacid-linkage: rabbit-muscle glycogen is covalently linked to a protein via tyrosine. *Biochem Biophys Res Commun*, **132**, 829-836.
- Rodriguez, I., Tandecarz, J., Kirkman, B. y Whelan, W. (1986). Tyrosine glycosylation is involved in muscle glycogen synthesis. *ICSU Short Rep*, **4**, 96-99.
- Rodriguez, I. y Fliesler, S. (1988). A 42,000 Da-protein in rabbit tissues and in a glycogen synthase preparation cross-reacts with antibodies to glycogenin. *Arch Biochem Biophys*, **260**, 628-637.
- Rothschild, A. y Tandecarz, J. (1990). UDP-Glc proteína transglucosilasa de maiz cataliza su propia autoglucosilación. XXVI Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB). A# 259.
- Sack, F. y Leopold, A. (1985). Cytoplasmic streaming affects gravity-induced amyloplast sedimentation in maize coleoptiles. *Planta*, **164**, 56-62.
- Sack, F., Priestly, D. y Leopold, A. (1983). Surface charge on isolated maize-coleoptile amyloplasts. *Planta*, **157**, 511-517.



- 
- Sakai, A., Kawano, S. y Kuroiwa, T. (1992). Conversion of proplastids to amyloplast in tobacco cultered cells is accompanied by changes in the transcriptional activities of plastids genes. *Plant Physiol*, **100**, 1062-1066.
- Salsas, E. y Larner, J. (1975). Glycogen synthase can use glucose as an acceptor. *J Biol Chem*, **250**, 1833-1837.
- Sano, Y. (1984). Diferential regulation of *waxy* gene expression in rice endosperm. *Theor Appl Genet*, **68**, 467-473.
- Schneider, E., Becker, J. y Volkmann, D. (1981). Biochemical properties of potato phosphorylase change with its intracellular localization as revealed by immunological methods. *Planta*, **151**, 124-134.
- Shannon, J. y Garwood, D. (1984). Genetics and physiology of starch development. *En* R. L. Whistler, J. N. Bemiller, E. F. Paschall, eds, *Starch: Chemistry and Technology*, 2nd edition. Academic Press, Orlando, pp. 25-86.
- Shannon, J. (1989). Aqueous and nonaqueous methods for amyloplast isolation.. *En* C. Boyer, J. Shannon, Hardison L eds, *Physiology, biochemistry and genetics of nongreen plastids*. American society of plant physiologists, Maryland, pp. 37-48.
- Shewmaker, C. y Stalker, D. (1992). Modifying starch biosynthesis with transgenes in potatoes. *Plant Physiol*, **100**, 1083-1086.
- Shure, M., Wessler, S. y Fedoroff, N. (1983). Molecular identification and isolation of the *waxy* locus in maize. *Cell*, **35**, 225-233.
-

- 
- Simcox, P., Reid, E., Canvin, D. y Dennis, D. (1977). Enzymes of the glycolytic and pentose phosphate pathways in proplastids from the developing endosperm of *Ricinus communis* L. *Plant Physiol*, **59**, 1128-1132.
- Sivak, M., Tandecarz, J. y Cardini, C. (1981). Studies on potato tuber phosphorylase-catalyzed reaction in the absence of an exogenous acceptor. I. Characterization and properties of the enzyme. *Arch Biochem Biophys*, **212**, 525-536.
- Smythe, C., Caudwell, F., Ferguson, M. y Cohen, P. (1988). Isolation and structural analysis of a peptide containing the novel tyrosyl-glucose linkage in glycogenin. *EMBO J*, **7**, 2681-2686.
- Smythe, C., Villar-Palasi, C. y Cohen, P. (1989). Structural and functional studies on rabbit liver glycogenin. *Eur J Biochem*, **183**, 205-209.
- Smythe, C. y Cohen, P. (1991). The discover of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur J Biochem*, **200**, 625-631.
- Spilatro, S. y Preiss, J. (1987). Regulation of starch synthesis in the bundle sheath and mesophyll of *Zea mays* L. Intercellular compartmentalization of enzymes of starch metabolism and the properties of the ADP-Glc pyrophosphorylases. *Plant Physiol*, **83**, 621-627.
- Srere, P. (1987). Complexes of sequential metabolic enzymes. *Ann Rev Biochem*, **56**, 89-124.

- 
- Takahara, H. y Matsuda, K. (1977). Biosynthesis of glycogen in *Neurospora crassa*. Existence of a glucoproteic intermediate in the initiation process. *J Biochem*, **81**, 1587-1594.
- Tandecarz, J., Ardila, F., Moreno, S. y Rothschild, A. (1991). A protein undergoing self-glycosylation primes  $\alpha$ -glucan synthesis in potato tubers and developing maize. 15<sup>th</sup> Congreso Internacional de Bioquímica, Jerusalem, Israel.
- Tandecarz, J. y Cardini, C. (1978). A two step enzymatic formation of a glucoprotein in potato tuber. *Biochim Biophys Acta*, **543**, 23-429.
- Tandecarz, J. y Cardini, C. (1979). Effect of 1,5-gluconolactone on the formation of a glucoprotein in potato tuber. *Plant Sci Lett*, **15**, 151-158.
- Tandecarz, J., Szalai, E. y Cardini, C. (1982). Glucosyl transfer activity in sweet corn germinating seeds. *Anales Asoc Quim Arg*, **70**, 395-404.
- Thomas, J., Kaith, K., Schlender, K. y Larner, J. (1968). A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-<sup>14</sup>C-glucose. *Anal Biochem*, **25**, 486-499.
- Tilney-Bassett, R. (1989). The diversity of the structure and function of higher plant plastids. *En* C. Boyer, J. Shannon, Hardison L eds, *Physiology, biochemistry and genetics of nongreen plastids*. American society of plant physiologists, Maryland, pp. 1-14.

- 
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 4350-4354.
- Tyson, R. y ap Rees, T. (1988). Starch synthesis by isolated amyloplast from wheat endosperm. *Planta*, **175**, 33-38.
- van Berkel, J., Conrads-Strauch, J. y Steup, M. (1991). Glucan-phosphorylase forms in cotyledons of *Pisum sativum* L. Localization, developmental change, *in-vitro* translation and processing. *Planta*, **185**, 432-439.
- Vignais, P. V., Vignais, P. M. y Defaye, G. (1973). Adenosine diphosphate translocation in mitochondria. Nature of the receptor site for carboxyatractyloside (Gummiferin). *Biochemistry*, **12**, 1508-1518.
- Vignais, P., Douce, R., Lauquin, G. y Vignais, P. (1976). Binding of radioactively laveled carboxyatractyloside, atractyloside and bonkrekiic acid to the ADP translocator of potato mitochondria. *Biochem Biophys Acta*, **40**, 688-696.
- Villareal, C. y Juliano, B. (1986). Waxy gene factor and residual protein of rice starch granules. *Starch*, **38**, 118-119.
- Viola, R., Davies, H. y Chudeck, A. (1991). Pathways of starch and sucrose biosynthesis in developing tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) and seeds of faba bean (*Vicia faba* L.). *Planta*, **183**, 202-208.
- Visser, R., Somhorst, I., Kuipers, G., Ruys, N., Feenstra, W. y Jacobsen, E. (1991). Inhibition of the expression of the gene

---

for the granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Mol Gen Genet*, **225**, 289-296.

Vos-Scheperkeuter, G., de Boer, W., Visser, R., Feenstra, W. y Witholt, B. (1986). Identification of granule-bound starch synthase in potato tubers. *Plant Physiol*, **82**, 411-416.

Vos-Scheperkeuter, G., de Wit, J., Ponstein, A., Feenstra, W. y Witholt, B. (1989). Immunological comparison of the starch branching enzyme from potato tubers and maize kernels. *Plant Physiol*, **90**, 75-84.

Washitani, I. y Sato, S. (1977). Studies on the function of proplastids in the metabolism of *in vitro* cultured tobacco cells. I. Localization of nitrite reductase and NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Plant Cell Physiol*, **18**, 117-125.

Washitani, I. y Sato, S. (1977). Studies on the function of proplastids in the metabolism of *in vitro* cultured tobacco cells. III. Source of reducing power for aminoacid synthesis from nitrite. *Plant Cell Physiol*, **18**, 1235-1241.

Werkheiser, W. y Bartley, F. (1957). The study of steady state concentrations of internal solutes of mitochondria by rapid centrifugal transfer to a fixation medium. *Biochem J*, **66**, 79-91.

Wirtz, W., Stitt, M. y Heldt, H. (1980). Enzymic determination of metabolites in the subcelular compartments of spinach protoplasts. *Plant Physiol*, **66**, 187-193.

Zcheile, F., White, J., Beadle, B. y Roach, J. (1942). The preparation and absorption spectra of five pure carotenoid pigments. *Plant Physiol*, **17**, 331-346.

**Zhu, Y., Merkle-Lehman, D. y Kung S. (1984). Light-induced transformation of amyloplasts into cloroplasts in potato tubers. Plant Physiol, 75, 142-145.**