Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Aminolevúlico dehidrasa del hongo dimórfico Mucor rouxii

Melito, Viviana Alicia

2013

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

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

Cita tipo APA:
Melito, Viviana Alicia. (2013). Aminolevúlico dehidrasa del hongo dimórfico Mucor rouxii. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Melito, Viviana Alicia. "Aminolevúlico dehidrasa del hongo dimórfico Mucor rouxii". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

"Aminolevúlico dehidrasa del hongo dimórfico *Mucor rouxii*"

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

VIVIANA ALICIA MELITO

Directora de Tesis: Dra. Alcira María del Carmen Batlle de Albertoni
Consejero de Estudios. Dra. María Victoria Rossetti

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2013

A mis seres amados, especialmente a Luli, Coti y Sebi
para que nunca abandonen sus sueños.
A mi papá.

"AMINOLEVÚLICO DEHIDRASA DEL HONGO DIMÓRFICO

Mucor rouxii "

La 5-Aminolevúlico dehidrasa (ALA-D), segunda enzima de la biosíntesis del hemo, es una metaloenzima que cataliza la condensación de dos moléculas de ácido 5-aminolevúlico (ALA) para formar el único monopirrol natural, el Porfobilinógeno (PBG).

El ALA-D en general no es la enzima limitante de la síntesis de hemo. En la mayoría de los organismos estudiados su actividad es muy superior a la necesaria para la formación de la cantidad requerida de hemo, con la excepción de *Neurospora crassa* y levadura, organismos en los cuales se le ha asignado un rol regulatorio. Es una enzima altamente conservada, aún entre organismos filogenéticamente muy distantes. Sin embargo, existen diferencias en cuanto al requerimiento por metales que cumplen un papel fundamental en la catálisis y estado de oligomerización de la proteína. La enzima de mamíferos y aves, levadura y algunas bacterias requieren Zn^{++}. Por el contrario, la enzima de plantas y algunas bacterias requiere Mg^{++} en lugar de Zn^{++}; mientras que en *Rp. spheroides* el requerimiento por el metal puede sustituirse por K^{+}. Se ha propuesto que en *E. coli, P. sativum* y *B. japonicum* están presentes ambos cationes, en diferentes proporciones.

Los hongos dimórficos son un grupo de organismos capaces de crecer como levadura o micelio en respuesta a las condiciones de crecimiento; según sean estas modificaciones pueden inducir, además, la transición morfológica de levadura a micelio o viceversa. Esta propiedad, los hace interesantes para investigar los mecanismos bioquímicos y moleculares que operan durante la diferenciación celular. En el hongo dimórfico *Mucor rouxii* existen evidencias de que el ALA -D también cumpliría un papel regulatorio en la biosíntesis del hemo y que esta enzima, a través de la mitocondriogénesis participaría en la transición morfogénica de levadura a micelio.

En primer lugar se determinaron las condiciones óptimas para la extracción de la proteína y medición de la actividad enzimática de ambas formas, se encontró que ésta se duplica al pasar del estado fermentativo al del micelio aeróbico.

Empleando diferentes técnicas para la purificación de proteínas, como diversas columnas de geles de afinidad, hidrofóbicos, iónicos y sulfosustituídos, se purificó la enzima de ambas formas obteniéndose preparaciones enriquecidas alrededor de 700 y 500 veces para micelio y levadura respectivamente. En ambos casos, el peso molecular fue de 280.000 Da, coincidiendo con el determinado para el ALA-D proveniente de otras fuentes.

Tanto las propiedades de estabilidad térmica como cinéticas, también resultaron similares para ambas formas morfogénicas del hongo, comportándose en ambos casos como una enzima con cinética michaeliana y valores de Km comparables.

Del estudio del efecto de cationes divalentes sobre la actividad enzimática se encontró que en la enzima de *Mucor rouxii*, el metal involucrado es el Zn^{++}. Se postula la existencia de diferentes sitios de interacción del Zn^{++}, un sitio A, en el cual el metal se encuentra fuertemente unido, un sitio B, en el que el catión se puede eliminar por diálisis y reemplazarlo parcialmente por otros cationes y sitios C, donde el Zn^{++} actuaría cuando la enzima se encuentre en un medio no reductor, en cuyo caso, los grupos sulfhidrilos oxidados provocarían la pérdida de la actividad catalítica, en tal situación, este catión sería capaz de restablecer las condiciones reductoras. Se estudió además la conocida inhibición de la actividad del ALA-D por el Pb^{++}. Se demostró que este metal se puede unir a todos los sitios en los que se une el Zn^{++}, produciendo una significativa inhibición.

Se sabe que los átomos de Zn^{++} se unen a la proteína a través de una secuencia altamente conservada, rica en cisteínas e histidinas. Empleándose diversos agentes bloqueantes de grupos SH se comprobó la participación de residuos cisteína que son esenciales para la actividad enzimática y/o unión del metal; su titulación indicó la existencia de 5 grupos SH por subunidad, de los cuales 1 no se encuentra expuesto. La inhibición por DEP reveló la presencia de 2 grupos histidina por subunidad catalítica, uno de ellos es esencial para la catálisis.

Cuando se modificaron algunos parámetros de las condiciones de crecimiento, se encontró que en ambas formas del *Mucor rouxii* el camino metabólico del hemo es funcional y se puede inducir por el agregado de concentraciones de ALA 10^{-5}–10^{-3}M en el medio de cultivo.

La captación de ALA, acumulación de precursores y porfirinas y la actividad de ALA-D fue significativamente mayor para micelio que para levadura. El crecimiento en condiciones aeróbicas para el micelio requiere de un mayor contenido de hemoproteínas, fundamentalmente citocromos. Esta demanda se satisface por medio del funcionamiento más activo del camino biosintético de las porfirinas en micelio que en levadura.

Así, los niveles de actividad del ALA-D en levadura fueron inferiores a los del micelio. Se demostró, además, su capacidad para regular la concentración de ALA acumulado intracelularmente.

Durante la transformación dimórfica inducida mediante aireación del cultivo de levadura se observó la existencia de un camino biosintético del hemo eficientemente regulado. Por lo tanto si bien la inducción de la morfogénesis desde levadura a micelio estimuló la biosíntesis de porfirinas, lo que se puso en evidencia por el aumento de actividad del ALA-D durante la misma, no se encontró acumulación significativa ni de precursores ni de porfirinas.

Los resultados obtenidos permiten asignar un rol regulatorio para el ALA-D en levadura del hongo dimórfico *Mucor rouxii*.

.

Palabras claves: Aminolevúlico dehidrasa; *Mucor rouxii*; dimorfismo; biosíntesis del hemo; ALA-D

"AMINOLEVULINIC ACID DEHYDRATASE FROM THE DIMORPHIC FUNGUS *Mucor rouxii.*

5-Aminolevulinic Acid Dehydratase (ALA-D) is a metal enzyme, the second in the haem biosynthetic pathway, which catalices the condensation of two molecules of 5-Aminolevulinic Acid (ALA) to yield the monopyrrol Porphobilinogen.

In general, ALA-D is not the regulating enzyme in haem biosynthesis. In most organisms, its activity is high in accordance with the cells needs of haem, excepting in *Neurospora crassa* and yeasts, where a regulatory role has been assigned. It is an enzyme highly preserved. However there exist differences about its requirements for metals, which play a key role in both the catalysis and oligomeritation of ALA-D. In mammals, birds, fowls, yeasts and some bacteria, the enzyme requires Zn^{++}. Instead, the ALA-D from plants and some bacteria requires Mg^{++} and not Zn^{++}, while in *Rp. spheroides*, the metal can be replaced for K^{+}. It has been indicated that in *E. coli, P. salivum* and *B. japonicum*, can be present both cations, in different proportions.

The dimorphic fungus are a group of organisms, which depending on the growing conditions, are able of developing both as yeasts and mycelium. Manipulation of such conditions can induce the morphological transition from yeasts to mycelium and vice versa. In the dimorphic fungus *Mucor rouxii*, there is evidence that the ALA-D would play a regulatory role in haem biosynthesis and that it also would participate in the morphogenic transition from yeasts to mycelium.

The optimum conditions for extracting the protein and measuring enzymic activity, from both forms were determined, it was found that activity is doubled when passing from the fermentative state to the aerobical mycelium form.

Using several affinity chromatography columns, hydrophobics, ionics and sulpho substituted, the enzyme from yeasts and mycelium was purified 500 and 700 times, respectively. The molecular weight was also 280,000 Da for both forms.

Thermal stability and kinetics was again similar for yeasts and mycelium, showing a michaelianan kinetics and comparable Km values.

The action of divalent cations on the enzymic activity showed that in *Mucor rouxii*, the metal involved is Zn^{++}. The existence of different interaction sites for Zn^{++}, has been proposed, an A site, where Zn^{++} is tightly attached, a B site where the metal can be removed by dialysis and be partially replaced for other cations and a C site, where Zn^{++} would function when the enzyme is found in a non reducing media, in this case, the oxidized sulphydril groups would diminish the catalytic activity, in such a situation, Zn^{++} could restore the reducing conditions. It is well known the strong inhibition of ALA-D by Pb^{++}. It was demonstrated, that this metal can be attached to all Zn^{++} sites, significantly reducing the enzyme activity.

The Zn^{++} atoms, bind to the protein trough a sequence highly preserved, rich in cysteins and histidines. Using several blockers of SH groups the participation of cystein residues essentials for activity and/or metal binding was shown, by tritation 5 SH residues per subunit were measured, one of them not exposed. Inhibition by DEP revealed the presence of 2 histidines per subunit, only one of them necessary for catalysis.

Some parameters of growing conditions were modified, showing, that in both forms of *Mucor rouxii*, the haem pathway is functional and it can even be induced by adding ALA 10^{-5} - 10^{-3} M to the culture medium.

Incorporation of ALA, accumulation of precursors and porphyrins and ALA-D activity was significantly higher in mycelium than in yeasts, in concordance with a haem synthesis necessarily greater in the former.

The levels of ALA-D activity in yeasts were then lower than in mycelium. It was demonstrated the capacity of yeasts to regulate the concentration of ALA intracellularly accumulated.

Along the dimorphic transition induced through aereation of yeasts cultures, it was observed that this process stimulates porphyrin biosynthesis, shown by an increase in the activity of mycelium ALA-D, although accumulation of neither precursors nor porphyrins was detected.

These findings allow us to assign a regulatory role for the yeasts ALA-D of *Mucor rouxii.*

Keywords: 5-Aminolevulinic acid dehydratase, metal enzyme, *Mucor rouxii,* dimorphic fungus, yeast, mycelium, purification, active site, porphyrin biosynthesis, divalent cations, regulatory enzyme

.

Agradecimientos

A Alcira por apoyarme y brindarme toda su sabiduría incondicionalmente.
A mis compañeras de siempre, con las que ya llevo compartiendo la mitad de mi vida, presentes en los momentos más importantes y que hoy están a mi lado más que nunca. Y aunque las palabras no alcancen a expresar todo quiero dedicarles, desde el corazón, el GRACIAS más grande que exista.
A todos mis compañeros del CIPYP, los que siguen estando y los que ya no, por hacer de nuestro lugar de trabajo un espacio que es mucho más que eso.

Especialmente a mi familia,
A Hugo, que me acompaña y alienta desde la primera hora.
A mis tres hijos, que me esperaron pacientemente tantas veces, en el jardín maternal, en casa…
A mi mamá, a quien siempre necesito, y que junto a Nieves cuidaron a sus nietos incontables veces.
A Ale y Pauli, que están siempre presentes.
A todas las personas que me alentaron desinteresada y sinceramente.

ÍNDICE

Página

ABREVIATURAS
OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I: BIOSÍNTESIS DEL HEMO 1

I.1 Porfirinas 1
I.2 Biosíntesis del Hemo 3
I.3 Enzimas del camino metabólico del hemo 7
I.4 Alteraciones de la biosíntesis del hemo. Porfirias 11
I.5 Regulación de la síntesis de hemo 12
I.6 Referencias 14

CAPÍTULO II: 5-AMINOLEVÚLICO DEHIDRASA 22

II.1 Introducción 22
II.2 Caracteristicas y propiedades 23
II.3 Referencias 44

CAPÍTULO III: DIMORFISMO EN HONGOS: *Mucor rouxii* 51

III.1 Dimorfismo en hongos 53
III.2 Dimorfismo en Mucor 53
III.3 Referencias 66

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO I: MATERIALES 67

I.1 Fuente enzimática 67
I.2 Reactivos 67
I.3 Equipos 67

CAPÍTULO II: MÉTODOS 68

II.1 Cultivo y mantenimiento de células 68
II.2 Determinación del contenido de porfirinas y precursores del camino metabólico del hemo 69

Página

II.3 Determinación del contenido de grupos sulfhidrilos 71
II.4 Medición de actividad del ALA-D 71
II.5 Contenido proteico 73
II.6 Purificaicón del ALA-D 73
II.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) 75
II.8 Determinación de la masa molecular relativa mediante cromatografia por tamiz molecular 76
II.9 Análisis Estadístico 76
II.10 Referencias 76

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I: DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA MEDIR ACTIVIDAD DE ALA-D DE MICELIO Y LEVADURA DE *Mucor rouxii* 77

I.1 Obtención de la enzima de micelio y levadura 77
I.2 Condiciones óptimas para la medición de la actividad enzimática 79
I.3 Conclusiones 84

CAPÍTULO II: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ALA-D DE MICELIO Y LEVADURA DE *Mucor rouxii* 86

II.1 Ensayos preliminares 86
II.2 Purificación del ALA.D de micelio y levadura de *Mucor rouxii* 88
II.3 Etapas alternativas de purificación del ALA-D. Cromatografía de afinidad en Thiopropyl-Sepharose 6B 91
II.4 Caracterización del ALA-D de micelio y levadura de *Mucor rouxii* 95
II.5 Conclusiones 110
II.6. Referencias 112

CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN DEL SITIO ACTIVO DEL ALA-D DE MICELIO Y LEVADURA DE *Mucor rouxii*: 113

III.1 Grupos sulfhidrilos 113
III.2 Grupos histidina 115
III.3 Caracterización del sitio activo. Cationes divalentes 122
III.4 Conclusiones 139
III.5 Referencias 142

Página

CAPÍTULO IV: DIMORFISMO DE *Mucor rouxii* Y BIOSÍNTESIS DEL HEMO 143

IV.1 Biosíntesis del hemo en micelio y levadura de *Mucor rouxii.* efecto del agregado de ALA 145
IV.2 Biosíntesis del hemo durante la transición de *Mucor rouxii* de levadura a micelio. Efecto del agregado de ALA 148
IV.3 Conclusiones 152
IV.4 Referencias 153

CONCLUSIONES GENERALES 154

ABREVIATURAS

A.E.	Actividad específica
ALA	Ácido δ-aminolevúlico
ALA-D	δ-Aminolevúlico dehidrasa
ALA-S	δ-Aminolevúlico sintetasa
AMPc	3´- 5´adenosinmonofosfato cíclico
Bt_2AMPc	Dibutiril 3´,5´-adenosinmonofosfato cíclico
AS	Azida sódica
COPRO	Coproporfirina
CPGasa	Coproporfirinógeno oxidasa
Cys	Cisteína
DEP	Dietilpirocarbamato
DOVA	Ácido γ-dioxovalérico
DOVA-T	Ácido γ-dioxovalérico transaminasa
DP	α-α'dipiridilo
D.S.	Desviación estándar
DTNB	Ácido 5-5'ditiobis-2-nitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FECH	Ferroquelatasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GSH	Glutation reducido
HMB	Hidroximetilbilano
8-HQ	8-Hidroxiquinolina
IA	Iodoacetamida
IB	Iodosobenzoico
β-Me	β-Mercaptoetanol
MMTS	Metilmetanotiosulfonato
Mr	Masa molecular relativa
NEMI	N-etilmaleimida
ODC	Ornitina decarboxilasa
o-Fe	o-fenantrolina
PAI	Porfiria Aguda Intermitente
PBG	Porfobilinógeno
PBG-D	Porfobilinógeno deaminasa
PBG-S	Porfobilinógeno sintetasa
pCMB	p-Cloromercuribenzoato
PCT	Porfiria Cutánea Tardía
PCT-A	Porfiria Cutánea Tardía adquirida
PCT-F	Porfiria Cutánea Tardía familiar
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPox	Protogen oxidasa
PROTO	Protoporfirina IX
Protogen	Protoporfirinógeno IX
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAM	S-Adenosil-L-metionina
SDS	Dodecilsulfato sódico
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano-clorhidrato
TU	Tiourea
U.E.	Unidades enzimáticas
URO	Uroporfirina
URO-D	Uroporfirinógeno decarboxilasa
Urogen	Uroporfirinógeno

OBJETIVOS

La δ-aminolevúlico dehidrasa (ALA-D), también llamada Porfobilinógeno sintetasa (PBG-S), es una metaloenzima que cataliza la condensación de 2 moléculas de ALA para formar el primer monopirrol natural en el camino biosintético del hemo, el porfobilinógeno (PBG).

En la mayoría de los organismos estudiados su actividad es muy superior a la necesaria para la formación de la cantidad requerida de hemo, con la excepción de *Neurospora crassa* y levadura, organismos en los cuales se le ha asignado un rol regulatorio. Se ha observado que la actividad de ALA-D aumenta con el aumento de la formación de las mitocondrias.

Los hongos dimórficos son un grupo de organismos capaces de desarrollarse tanto como levadura o como micelio en respuesta a las condiciones de crecimiento.

Existen evidencias que en el hongo dimórfico *Mucor Rouxii* (cepa NRRL1894) el ALA-D también cumpliría un papel regulatorio en la biosíntesis del Hemo.

Este organismo, capaz de crecer tanto como levadura o como micelio, proporciona un sistema muy ventajoso para investigar los mecanismos bioquímicos y moleculares que operan en la diferenciación celular.

En este trabajo:

- ✓ Se estudiarán las formas enzimáticas del ALA-D provenientes de micelio y levadura de *Mucor rouxii* :
- ✓ Se determinarán las condiciones óptimas para la extracción de la proteína y medición de la actividad enzimática de ambas formas.
- ✓ Empleando las técnicas usuales de purificación de proteínas y diversas columnas de geles de afinidad, hidrofóbicos, iónicos y sulfosustituídos se purificará la enzima de ambas formas obteniéndose preparaciones enriquecidas. Se determinará la naturaleza del sitio activo en cuanto al tipo

y contenido de grupos sulfhidrilos, residuos histidina y metal o metales divalentes que forman parte del mismo.

- ✓ Se preparará la apoenzima del ALA-D de ambas formas mórficas y realizarán ensayos de reconstitución de la holoenzima utilizando cationes divalentes tales como Zn^{++}, Mg^{++} y Co^{++}.

- ✓ Se establecerá si el ALA-D de *Mucor rouxii* posee diferentes sitios de unión para el metal divalente y cuál o cuáles de esos cationes están involucrados en el sitio activo efectuando un análisis comparativo con las enzimas provenientes de otras fuentes, por cuanto hasta el momento no existen datos sobre la enzima en hongos dimórficos.

- ✓ Se estudiará la biosíntesis del hemo en cultivos de levadura, micelio y durante la transformación morfogénica de levadura a micelio, determinando la variación del contenido de precursores del metabolismo del hemo, de porfirinas y la actividad del ALA-D bajo diferentes condiciones de crecimiento. A partir de los resultados encontrados se analizará el posible rol regulatorio para la enzima en *Mucor rouxii*.

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I

BIOSÍNTESIS DEL HEMO

I.1 PORFIRINAS

Las porfirinas, moléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza, juegan un rol central en los sistemas vivientes principalmente en el control de las oxidaciones biológicas y en el transporte de oxígeno.

En la fotosíntesis el principal componente, la clorofila, es una magnesio protoporfirina mientras que en el proceso respiratorio de células eucariotas, lo es el hemo, una hierro protoporfirina.

Las porfirinas constituyen así una parte fundamental del metabolismo aeróbico y anaeróbico. La estructura tetrapirrólica es la base de otro tipo de compuestos tales como la vitamina B_{12}, que es un quelato con cobalto, las enzimas catalasa y peroxidasa y los citocromos que son hemoproteínas; también participan de otras reacciones diversas como las que producen la coloración en las plumas de ciertos pájaros y cáscaras de huevos (Rimington, 1939; With, 1973)

La estructura básica de las porfirinas es singular y consiste de un macrociclo constituído por cuatro anillos pirrólicos unidos entre sí por cuatro puentes metileno que dan lugar a una molécula plana debido a la presencia de dobles enlaces conjugados entre los 16 átomos de carbono internos del anillo tetrapirrólico (Figura I.1). Esta estructura de resonancia es químicamente muy estable.

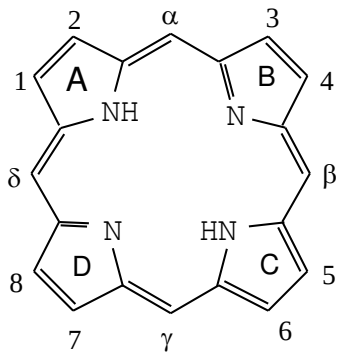


Figura I.1: Estructura de las porfirinas

Los anillos pirrólicos se denominan A, B, C y D mientras que los puentes metileno son α, β, γ y δ. En las posiciones β de los carbonos que se numeran de 1 a 8, según la nomenclatura de Fisher, se encuentran las cadenas laterales, cuyo número y estructura química determinan las características físicas de las porfirinas resultantes.

El espectro de absorción característico en la región visible y ultravioleta cercano que exhiben las porfirinas, así como también su coloración y la intensa fluorescencia roja que emiten al ser irradiadas por luz UV, son consecuencia de su estructura altamente conjugada de dobles enlaces alternados. Todas las porfirinas poseen una banda con un máximo de absorción entre 350-450 nm del espectro electromagnético, conocida como banda de Soret. Estas propiedades son de suma utilidad para su identificación y cuantificación.

El porfirinógeno o hexahidroporfirina constituye el metabolito fisiológico o biológicamente activo. En este compuesto se encuentran reducidos los grupos metileno, razón por la cual son compuestos no conjugados e incoloros que se oxidan espontáneamente a porfirinas (Figura 1.2).

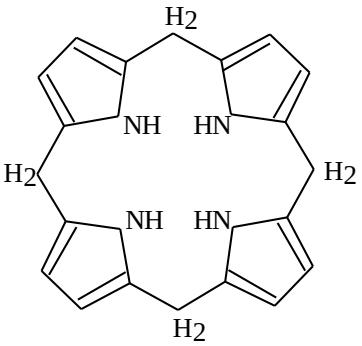


Figura I.2: Estructura de los porfirinógenos

Debido a la estructura de las porfirinas pueden encontrarse diferentes isómeros de posición. Para la Uroporfirina (URO) y la Coproporfirina (COPRO), que poseen sólo dos tipos de sustituyentes, hay 4 isómeros posibles según las posiciones relativas de los grupos acetilo y propionilo en los carbonos β del pirrol. En la naturaleza sólo se encuentran el isómero III y el I, siendo el tipo III el intermediario fisiológico y el tipo I el patológico.

Para la Protoporfirina (PROTO) que posee tres sustituyentes diferentes, son posibles 15 isómeros, de los cuales sólo el isómero IX, que proviene de URO y COPRO tipo III, es el que se halla en las células.

Las porfirinas reaccionan fácilmente con metales formando quelatos, que como ya hemos mencionado, integran parte de la estructura de moléculas de gran importancia biológica, como por ej:

- Hemoglobina y mioglobina, que poseen hierro en estado ferroso.
- Clorofila y bacterioclorofila, que contienen magnesio
- Cobalaminas o corrinas, que son complejos de porfirinas con cobalto.

En la Figura I.3 se muestra la estructura del hemo y de la clorofila

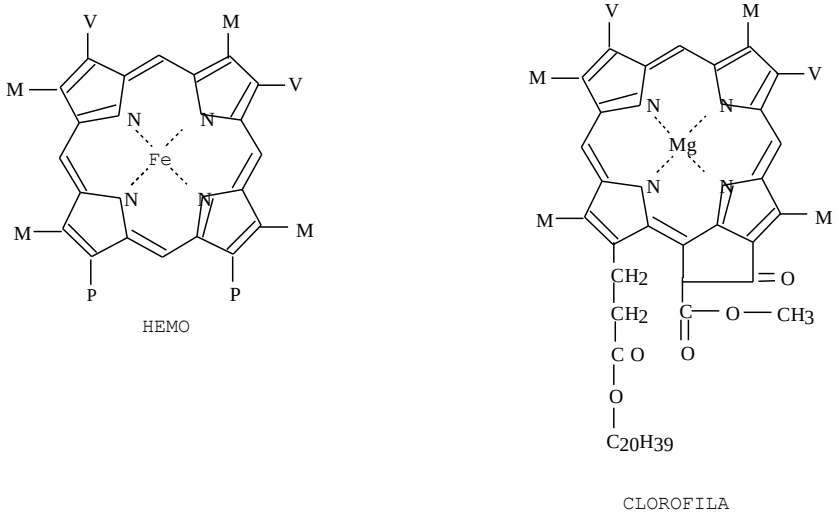


Figura I.3: Estructura del hemo y de la clorofila

I.2 BIOSÍNTESIS DEL HEMO

La biosíntesis de porfirinas es un proceso común a todas las células aeróbicas de bacterias, plantas y animales. Unos pocos microorganismos, como las bacterias del género *Hemophilus* y un número de protozoos parásitos de la sangre, no pueden sintetizar hemo requiriendo su agregado o el de algún derivado, para su crecimiento (Brock, 1978). Hasta la etapa de síntesis de Protoporfirina, el hemo y la clorofila

comparten la misma ruta metabólica, mientras que en la formación de corrinas se produce una ramificación a nivel del Uroporfirinógeno (Urogen) III.

Estudios realizados sobre el origen y evolución de la vida (Brock, 1978) señalan como paso clave la aparición de una primera molécula de estructura tetrapirrólica, probablemente relacionada con los citocromos, que habría conducido al desarrollo de un compuesto transportador de electrones que permitiera realizar fosforilación oxidativa mediante el uso de fuentes de energía que no podrían ser utilizadas por fosforilación a nivel de sustrato.

La biosíntesis del anillo porfirínico se lleva a cabo a través de una secuencia de reacciones catalizadas por 8 enzimas (Batlle, 1997) (Figura I.4)

La elucidación de este camino metabólico fue el resultado de estudios efectuados con compuestos radioactivos en el año 1953 en los laboratorios de Shemin, Rimington, Neuberger y Granick (Cookson & Rimington, 1953; Granick & Bogorad, 1953; Neuberger & Scott, 1953; Shemin & Russel, 1953).

De las enzimas que intervienen en la biosíntesis del hemo la primera y las 3 últimas están localizadas en la mitocondria, mientras que las 4 restantes se encuentran en el citosol.

La síntesis de porfirinas se inicia con la unión de 2 moléculas pequeñas como la glicina y la succinil CoA, derivadas del ciclo de Krebs, que por acción de la δ-aminolevúlico sintetasa (ALA-S) forman una molécula de ácido δ-aminolevúlico (ALA). Cabe destacar que en mamíferos el ALA se forma principalmente por acción del ALA-S pero en vegetales se ha demostrado la existencia de una ruta alternativa; se observó que por acción de una transaminasa, la enzima ácido γ-dioxovalérico aminotransferasa (DOVA-T) se podía producir ALA a partir de ácido γ-dioxovalérico (DOVA) y de precursores de 5 átomos de carbono, como glutamato, glutamina y α-cetoglutarato (Beale *et al.*, 1975; Lombardo *et al.*, 1988, 2003). En un principio se creyó que la vía de síntesis de ALA a través del ALA-S existía sólo en tejidos animales y en bacterias mientras que la ruta de la DOVA-T era exclusiva en plantas y algas. Diferentes investigaciones dieron por concluída esta teoría ya que demostraron la presencia de ambas enzimas en una gran diversidad de fuentes: bacterias (Chen *et al.*, 1981; Avissar *et al.*, 1989), algas (Shioi *et al.*, 1984; Lombardo *et al.*, 1988), levadura (Hoare & Datta, 1990), plantas (Harel *et al.*, 1983; Hayashi & Noguchi, 1983), hígado y riñón de rata

(Morton *et al.*, 1983; Singh y Datta, 1985; Shanker & Datta, 1986), hígado de pollo (Ades, 1989) e hígado bovino (Varticowsky *et al.*, 1980).

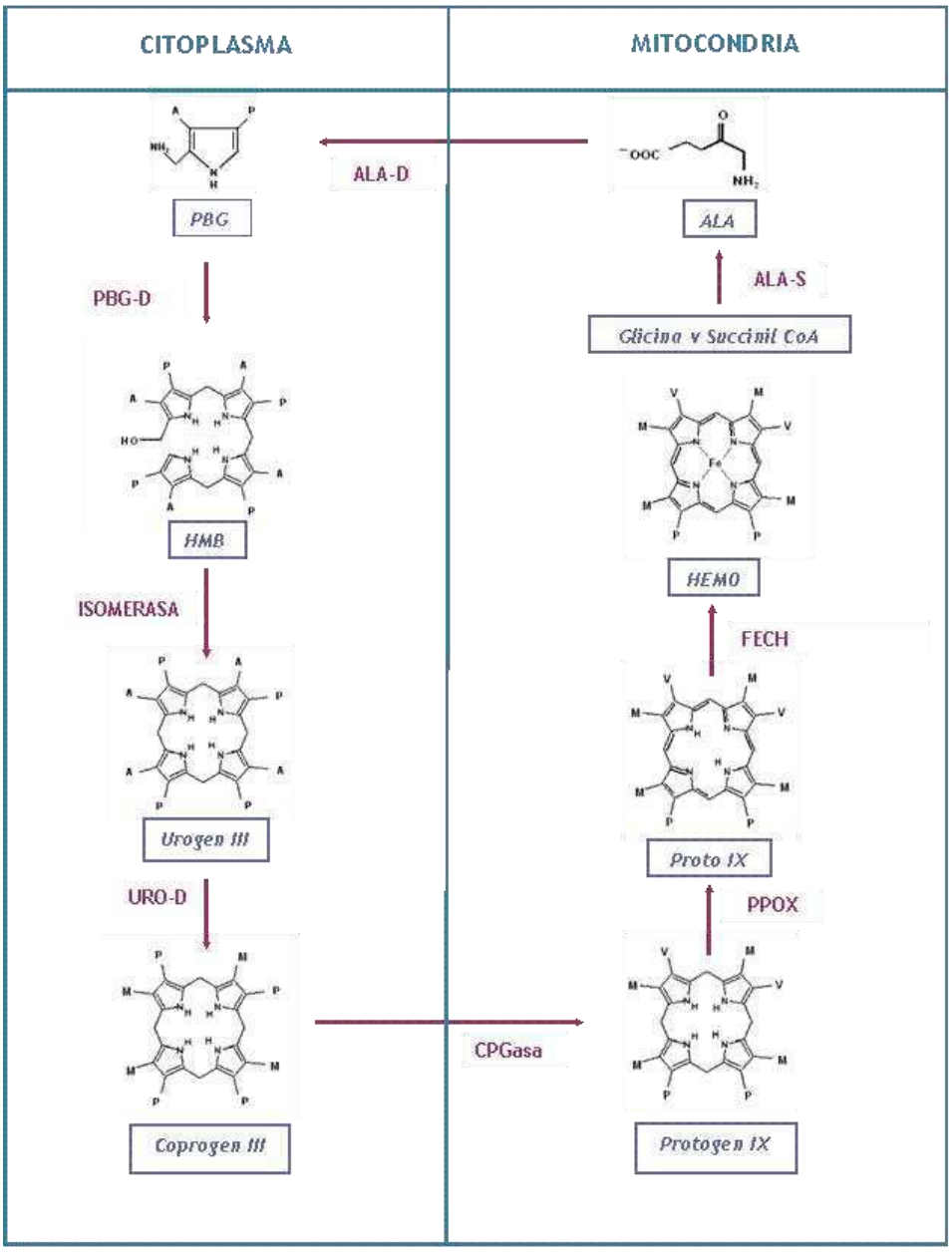


Figura I.4: Camino biosintético del hemo.

ALA-S: δ-Aminolevúlico sintetasa; ALA-D: δ-Aminolevúlico Dehidrasa; PBG-D: Porfobilinógeno deaminasa; URO-D: Uroporfirinógeno decarboxilasa; CPGasa: Coproporfirinogenasa; PPox: Protoporfirinógeno oxidasa; FECH: Ferroquelatasa. HMB: hidroximetilbilano. ALA: ácido δ-aminolevúlico. PBG: porfobilinógeno. Urogen: Uroporfirinógeno. Coprogen: coproporfirinógeno. Protogen: Protoporfirinógeno. Proto: Protoporfirina

La síntesis de ALA ocurre en la mitocondria y luego, por transporte activo (Bermúdez *et al.,* 1995) se traslada al citoplasma donde la unión de dos moléculas de ALA conduce a la formación del monopirrol no saturado heterocíclico porfobilinógeno (PBG) por medio de la enzima δ-aminolevúlico dehidrasa (ALA-D).

El primer tetrapirrol de este camino biosintético, el Uropoporfirinógeno (Urogen) es sintetizado por dos enzimas: la Hidroximetilbilano sintetasa (HMB-S) llamada también Porfobilinógeno deaminasa (PBG-D) o Uroporfirinógeno I sintetasa (URO I-S) y la Uroporfirinógeno III sintetasa (URO III-S) también denominada Cosintetasa o Isomerasa. La PBG-D cataliza la condensación de 4 moléculas de PBG que se unen sencuencialmente "cabeza-cola" dando lugar a la formación de un intermediario inestable, el hidroximetilbilano (HMB). La URO III-S cataliza la isomerización y ciclación del HMB a Urogen III que es el intermediario fisiológico en el camino de síntesis del hemo, clorofilas y corrinas, pero no actúa sobre el Urogen I, que es el producto de ciclación no enzimática del HMB.

La siguiente etapa es la decarboxilación en forma secuencial comenzando por el anillo D y siguiendo por los anillos A, B y C, de los cuatro grupos carboxilos de los sustituyentes acetilos del Urogen III por acción de la Uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D) para obtener el Coproporfirinógeno (Coprogen) III. La catálisis ocurre en una primera etapa rápida que involucra la decarboxilación del anillo D del Urogen mientras que la pérdida del resto de los residuos carboxílicos se produce en forma más lenta y en el orden antes mencionado, justificándose así la presencia de intermediarios decarboxilados. Esta enzima puede actuar también sobre el Urogen I produciendo Coprogen I.

El Coprogen III reingresa a la mitocondria donde es convertido en Protogen IX por la enzima mitocondrial Coproporfirinógeno oxidasa (CPGasa) o Coproporfirinogenasa. La reacción se lleva a cabo por medio de una decarboxilación oxidativa de dos cadenas laterales de ácido propiónico, ubicados en los anillos A y B, a grupos vinilo. La decarboxilación oxidativa del grupo propiónico para ser convertido en vinilo se produce en etapas, comenzando por el anillo A y prosiguiendo por el B.

En el paso siguiente la Protoporfirinógeno oxidasa (PPox) cataliza la dehidrogenación del Protoporfirinógeno (Protogen) IX a Protoporfirina (PROTO) IX con pérdida de 6 átomos de hidrógeno.

El último paso en la biosíntesis del hemo es la inserción de un átomo de hierro (Fe^{++}) en la PROTO IX. Esta reacción es catalizada por la enzima ferroquelatasa (FECH), también denominada hemosintetasa.

El hemo generalmente requiere de proteínas extracelulares e intracelulares específicas como transportadores (Wandersman & Stojiljkovic, 2000; Worthington *et al.*, 2001; Shayeghi *et al.*, 2005; Taketani, 2005).

El hemo es el grupo prostético de un gran número de proteínas que cumplen diversas funciones biológicas, por lo que juega un papel vital en el metabolismo celular, las biotransformaciones químicas, la detoxificación de drogas, el transporte de oxígeno, la respiración mitocondrial y la transducción de señales (Ferreira, 1995; Wijayanti *et al.*, 2004; Tsiftsoglou *et al.*, 2006). Estas hemoproteínas incluyen hemoglobina y mioglobina, involucradas en el transporte y almacenamiento del O_2; los citocromos mitocondriales respiratorios como componentes de la cadena de transporte de electrones; el citocromo P450, involucrado en el sistema metabolizante de drogas; la triptofano pirrolasa, que degrada el triptofano; y la catalasa y la peroxidasa peroxisomales, que degradan el H_2O_2 (Wijayanti *et al.*, 2004; Tsiftsoglou *et al.*, 2006). El átomo de hierro central de la molécula del grupo prostético es crucial para la actividad funcional de las hemoproteínas, existiendo en estado ferroso o férrico.

I.3 ENZIMAS DEL CAMINO METABÓLICO DEL HEMO

A continuación se describen brevemente cada una de las enzimas que catalizan las distintas etapas de la biosíntesis del hemo:

I.3.1 δ-**Aminolevúlico sintetasa**.

El ALA-S fue identificada originalmente en bacterias fotosintéticas (Kikuchi *et al.*, 1958) y en eritrocitos de pollo (Gibson *et al.*, 1958). A partir de entonces ha sido detectada en una gran variedad de fuentes bacterianas (Menon & Shemin, 1967; Tait, 1973; Viale *et al.*, 1980), en levadura (Porra *et al.*, 1972; Volland & Felix, 1984), en algas (Beale *et al.*, 1981; Lombardo *et al.*, 1988) y en insectos (Brattsten & Wilkinson, 1975). En tejidos vegetales las evidencias son escasas, únicamente se la describió en callos de

soya (Wider de Xifra *et al.*, 1971), en espinaca, (Miller & Teng, 1967) y cáscaras de papa (Ramaswamy & Nair, 1973).

En la mayor parte de los tejidos en que se ha estudiado el ALA-S, la enzima se encuentra asociada a la fracción particulada, sin embargo se ha aislado también una forma soluble (Marver *et al.*, 1966; Hayashi *et al.*, 1969; Whiting & Elliot, 1972; Patton y Beattie, 1973; Ohaski & Kikuchi, 1979) cuyo origen se asigna a un precursor de la enzima sintetizado en el citoplasma, que luego se traslada a la mitocondria (Granick & Sassa, 1971; Hayashi *et al.*, 1980, Srivastava *et al.*, 1988) donde manifiesta su actividad.

Existen dos genes que codifican para el ALA-S: el "housekeeping" y el eritroide, que están regulados por mecanismos diferentes. Estos genes se expresan de manera tejido específica y se regulan diferencialmente. El gen del ALA-S "housekeeping" (ALA-S 1) se expresa ubicuamente a nivel bajo y es inducible, principalmente en el hígado (Whiting & Elliot, 1972; Ohashi & Kikuchi, 1979; Bawden *et al.,* 1987; Sassa & Kappas, 1995; Ponka, 1999) y rata (Borthwick *et al.,* 1985; Srivastava *et al.,* 1988). El otro gen del ALA-S, el gen eritroide específico (ALA-S 2), se expresa sólo en el tejido eritroide y se induce por eritropoyetina durante la diferenciación eritroide (Srivastava *et al.,* 1988) Ambas isoenzimas del ALA-S muestran una homología del 75% en la región C terminal (Cox *et al.,* 1991) dominio donde se ubica el sitio activo (Ferreira *et al.,* 1993). El dominio N-terminal de ALA-S parece no ser necesario para la actividad catalítica de la enzima, sino que estaría involucrado en el transporte de la enzima a la mitocondria (Ponka, 1999).

ALA-S es una enzima muy inestable y de vida media corta, entre 20 y 160 minutos dependiendo de la fuente (Marver *et al.*, 1966; Sassa & Granick, 1970; Woods y Murthy, 1975).

I.3.1 δ-**Aminolevúlico dehidrasa**

Las propiedades y características de esta enzima se describen en el siguiente Capítulo II de esta Introducción.

I.3.2. **Porfobilinógeno deaminasa e Isomerasa**

Estas dos enzimas actúan en conjunto catalizando la síntesis del primer tetrapirrol, el UROgen. Ambas enzimas han sido aisladas y purificadas de diversas fuentes.

La PBG-D es una enzima citoplasmática en la mayoría de los casos estudiados, sin embargo se la ha encontrado en cloroplastos de espinaca (Bogorad, 1955) y de *Euglena gracilis* (Rossetti *et al,* 1986; Juknat *et al.,* 1989a), y en membranas externas de eritrocitos (Falk & Dresel, 1960). Además, se la purificó a homogeneidad de una gran variedad de fuentes, entre ellas glóbulos rojos humanos (Fumagalli *et al.*, 1985); algas (Juknat *et al.*, 1994), *Rp palustris* (Juknat *et al.*, 1987b) y *Sacharomyces cerevisiae* (Correa García *et al.*, 1990).

La PBG-D es una enzima termoestable, pudiendo calentarse hasta 65 ºC durante tiempos variables, condición que permite separarla de la Isomerasa. A temperaturas superiores sufre una inactivación considerable (Sancovich *et al.*, 1969; Llambías & Batlle, 1970, 1971; Jones & Jordan, 1994). En *Chlorella regularis* la PBG-D retiene el 87% de su actividad luego de preincubarla a 75 ºC por 1 hora (Shioi *et al.*, 1980). En muchas fuentes es una enzima alostérica con cooperatividad positiva (Sancovich *et al.*, 1969) o negativa (Llambías *et al.*, 1971) indicando que la enzima puede ser regulada por su sustrato.

La Isomerasa es una enzima termosensible; en eritrocitos humanos pierde el 50% de su actividad cuando se la mantiene a 60 ºC durante má de 10 minutos (Kohashi *et al,* 1984). Se la ha identificado en varias fuentes, entre ellas en *Euglena gracilis,* en ratón y en humanos (Hart & Battersby, 1985; Xu *et al.,* 1995).

I.3.3. **Urodecarboxilasa**

La URO-D ha sido estudiada en numerosas fuentes tales como eritrocitos de conejo (Mauzerall & Granick, 1958), eritrocitos e hígado humanos (De Verneuil *et al.*, 1983; Afonso *et al.*, 1985), aves (Kawanishi *et al.*, 1983), *Rp. palustris* (Koopmann & Batlle, 1987), *Euglena gracilis* (Juknat *et al.*, 1989a), adenocarcinoma mamario de ratón (Navone *et al.*, 1992), hígado de rata (Ríos de Molina *et al*, 1999), algas (Juarez *et al*, 2007).

Es una enzima termolábil, de vida media larga y sulfhidrílica. El oxígeno la inactiva probablemente por oxidación del sustrato, aunque no puede descartarse un efecto directo sobre la enzima (Straka & Kushner, 1983; Koopmann *et al.*, 1986).

I.3.4 Coproporfirinogenasa

Esta enzima ha sido encontrada en una gran variedad de fuentes como hígado de rata (Batlle *et al.*, 1965), linfocitos humanos (Grandchamp & Nordmann, 1977), hígado bovino (Yoshinaga & Sano, 1980), *Sacharomyces cerevisiae* (Camadro *et al.*, 1986). La enzima se encuentra débilmente unida a la membrana interna de la mitocondria en el espacio intermembrana (Greenawalt, 1974) y no es afectada por la presencia de agentes quelantes (Yoshinaga & Sano, 1980).

En eucariontes esta enzima requiere la presencia de oxígeno molecular para su actividad (Batlle *et al.*, 1965) y ningún otro aceptor de electrones puede reemplazarlo. Es altamente específica para el Coprogen III aunque puede utilizar el isómero IV, que no es natural, produciendo un isómero de Protoporfirina no fisiológico.

Los organismos que crecen en condiciones anaeróbicas también forman Protoporfirina, debiendo en estos casos funcionar otro aceptor de electrones distinto del oxígeno. En *Rp. spheroides* Tait (1972) ha propuesto que el aceptor estaría constituído por ATP, L-metionina y Mg. Se ha detectado actividad de CPGasa anaeróbica en *Pseudomonas* (Etheshamuddin, 1968), *Chromatium* (Tait, 1972), levadura (Poulson & Poglase, 1974) y *Rp. palustris* (Batlle, 1997).

I.3.5 Protoporfirinogenasa

Esta enzima, de localización mitocondrial, es específica para su sustrato y no actúa sobre otros porfirinógenos. Ha sido detectada en *Sacharomyces cerevisiae* (Poulson & Poglase, 1975), *Escherichia coli* Jacobs & Jacobs, 1975), *Rp. spheroides* (Jacobs & Jacobs, 1979; Deybach *et al.*, 1985).

En la mayoría de los casos la actividad de esta enzima es dependiente de oxígeno, pero en *Escherichia coli* se demostró que el fumarato (Jacobs & Jacobs, 1975), nitrato (Jacobs & Jacobs, 1975) y las quinonas (Jacobs & Jacobs, 1978) actúan como aceptores de electrones en anaerobiosis.

Aunque no se ha encontrado que requiera cofactores, los agentes reductores de grupos tiólicos estimulan su actividad (Poulson, 1976).

I.3.6 Ferroquelatasa

La actividad de esta enzima ha sido medida en una gran variedad de fuentes : *Sacharomyces cerevisiae* (Porra & Jones, 1963), hígado de rata (Porra & Jones, 1963; Taketani & Tokinaga, 1981; Ríos de Molina *et al*, 1991), de cerdo (Jones & Jones, 1969) y humanos (Camadro *et al.*, 1984), eritrocitos de ave (Hanson & Dailey, 1984) y *Rp. spheroides* (Dailey *et al.*, 1986).

Esta proteína se encuentra fuertemente asociada a la membrana interna de la mitocondria (Mc Kay *et al.*, 1969). Es altamente específica para Fe^{++}, aunque puede unir otros metales divalentes como Co^{++} y Zn^{++} (Johnson & Jones, 1964). Puede utilizar como sustratos a otras porfirinas dicarboxílicas como meso y deuteroporfirina *in vitro* (Porra & Jones, 1963; Jones & Jones, 1969).

Esta enzima es de naturaleza sulfhidrílica. Los reactivos de grupos tioles no sólo protegen los grupos sulfhidrilos de la proteína, sino que además contribuyen al mantenimiento del hierro en estado reducido (Porra & Jones, 1963).

La Ferroquelatasa es fuertemente inhibida por el oxígeno y por algunos metales divalentes como el Pb^{++}, Mg^{++} y Mn^{++} (Taketani & Tokinaga, 1981; Dailey & Fleming, 1983); el Cu^{++} en presencia de Fe^{++} también es un fuerte inhibidor (Dailey & Fleming, 1983; Salzman & Batlle, 1986).

Se ha postulado la existencia de dos sitios activos para esta enzima, uno para el metal y otro para la porfirina, asignándole a este último un modelo de bolsillo hidrofóbico dado el gran porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos en esta región (Taketani &Tokinaga, 1981; Dailey *et al.*, 1989). Además se ha propuesto la presencia de grupos arginina (Dailey *et al.,* 1986) y triptofano (Dailey, 1987) en el sitio activo. Las argininas estarían involucradas en la unión de la porfirina, posiblemente a través de una interacción iónica entre el residuo del aminoácido y la cadena sustituyente del ácido propiónico.

La enzima de humanos mostró un 88% de identidad con la de ratón y un 46% con la de levadura, el mayor grado de conservación se encontró en la región carboxiterminal.

I.4 ALTERACIONES DE LA BIOSÍNTESIS DEL HEMO. PORFIRIAS

Las porfirias son enfermedades metabólicas producidas por alteraciones en la biosíntesis del hemo. Cada tipo de porfiria es el resultado de una deficiencia enzimática parcial primaria de alguna de las enzimas del camino de las porfirinas, caracterizada por un patrón específico de acumulación y excreción de intermediarios del hemo.

Las porfirias se clasifican según el sitio principal de expresión de la falla metabólica, en hepáticas o eritropoyéticas, y según las principales manifestaciones clínicas en agudas, cutáneas o mixtas. Entre las porfirias agudas se encuentran la Porfiria Aguda Intermitente (PAI), la Coproporfiria Hereditaria (CPH), la Porfiria Variegata (PV), y la Nueva Porfiria Aguda (NPA) (Batlle, 1997). Entre las porfirias no agudas se encuentran la Porfiria Cutánea Tardía (PCT), la Protoporfiria Eritropoyética (PPE) y Porfiria Congénita Eritropoyética (CPE).

El signo característico de la mayoría de las porfirias es la fotosensibilización cutánea resultante de la acción de la luz sobre las porfirinas acumuladas en la piel. Este síntoma se observa en todas las porfirias con excepción de la PAI y la NPA.

La PAI, la NPA, la PV y la CPH se caracterizan por ataques agudos con síndrome neuroabdominal, asociados a una masiva producción y excreción urinaria de los precursores ALA y PBG.

Las porfirias pueden ser genéticas o adquiridas. Las drogas son los desencadenantes más comunes, pero entre los otros factores que pueden provocar una crisis se encuentran el alcohol, el ayuno, la dieta, infecciones e intoxicaciones diversas.

La prevalencia de las porfirias varía desde 0,5 a 10 por 100.000 habitantes en diferentes poblaciones.

I.5 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE HEMO

La regulación de la biosíntesis del hemo ha despertado el interés de muchos autores durante años. El hemo controla la biosíntesis de algunas proteínas e incluso, regula a nivel transcripcional y postraduccional su propia síntesis y degradación,

modulando la producción de las enzimas involucradas en los pasos limitantes de su biosíntesis.

En general, todos los autores concuerdan en que la primera enzima de la biosíntesis del hemo, el ALA-S determina la velocidad de la biosíntesis de este tetrapirrol, y la regulación de esta enzima ha sido el foco principal de atención de la mayoría de las investigaciones (Granick, 1966; Doss & Dormston, 1971; Müller-Eberhard & Fraig, 1993; Medenica *et al.,* 1997). Comparada con otras enzimas de la biosíntesis del hemo, el ALA-S exhibe actividad enzimática baja en células eritroideas y hepáticas (Bottomley & Müller-Eberhard, 1988) constituyéndose así en el punto de regulación de dicha biosíntesis.

Los dos genes que codifican para el ALA-S: el "housekeeping" y el eritroide, están regulados por mecanismos diferentes. Es de destacar que el hemo regula la expresión del gen del ALA-S 1 pero no reprime la expresión del gen del ALA-S 2 (Furuyama et al., 2007).

La regulación negativa del ALAS1 ocurre en varios niveles: reducción de la transcripción (Yamamoto *et al.,* 1982) y traducción (Sassa & Granick 1970; Yamamoto *et al*., 1983), desestabilización del ARNm (Hamilton *et al*., 1991) e inhibición del transporte a la mitocondria del precursor de la proteína (Yamauchi *et al*., 1980, Munakata *et al*., 2004; Furuyama *et al*., 2007). Además, los resultados obtenidos por Yoshino *et al.* (2007) sugieren la existencia de un sistema de degradación de ALA-S 1 mitocondrial que estaría regulado por el nivel celular de hemo y representaría un punto adicional de control del hemo sobre la actividad de esta enzima.

El gen eritroide es regulado a nivel transduccional por los niveles de hierro, a través de la interacción del factor hierro regulatorio con un elemento de respuesta al hierro (IRE) (Bhasker *et al.,* 1993; Taketani, 2005; Piccinelli & Samuelson, 2007) localizado en la region 5' no codificante del ARNm del ALA-S .

Todas las células necesitan hemo, algunas en mayor grado que otras, particularmente en respuesta a factores endógenos y exógenos. Además, considerando que el hemo puede ser tóxico para las células (Balla *et al.,* 1991*;* Müller-Eberhard & Fraig, 1993), la síntesis del hemo estará regulada de acuerdo a los requerimientos específicos de las mismas.

El significado fisiológico de esta regulación tan fina por producto final, probablemente se deba a que niveles altos de hemo pueden ser tóxicos. Cuando el hemo interactúa con el H_2O_2, la cual se forma durante el metabolismo oxidativo normal de la célula, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan los lípidos y proteínas (Balla *et al.,* 1991; Müller-Eberhard & Fraig, 1993). Asimismo, los intermediarios del camino del hemo acumulados también producen efectos adversos. Los porfirinógenos cuando se oxidan a porfirinas, absorben luz y generan radicales libres que provocan daño cutáneo (Darr & Fridovich, 1994), y la producción excesiva de los intermediarios ALA y PBG puede contribuir a los disturbios neurológicos observados en las porfirias agudas de manera que, la regulación de los niveles del ALA-S a través de la represión por producto final, la cantidad de hemo celular y de los intermediarios del camino del hemo, se mantienen en valores aceptables.

I.6 REFERENCIAS

Ades, I. (1989) "Characterization of chicken liver L-alanine: 4,5-dioxovaleric acid aminotransferase". Int. J. Biochem. **21** 679-687.

Afonso, S.; Chinarro Familiar, S.; Stella, A.; Batlle, A.; Lenczner, J. & Magnin, P. (1985) "Uroporfirinógeno decarboxilasa eritrocitaria y hepática en porfiria cutánea tardía". Rev. Arg. Dermat. **66** 12-16.

Avissar, Y.; Ormerod, J. & Beale, S. (1989) "Distribution of delta-aminolevulinic acid biosynthetic pathway among phototrophic bacterial groups". Arch. Microbiol. **151** 513-519.

Balla, G.; Jacob, H.S.; Eaton, J.W.; Belcher, J.D. & Vercellotti, G.M. (1991) "Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury". Arterioscler Thromb. **11**(6) 1700-1711.

Batlle AMC. (1997). Porfirinas y Porfirias. Aspectos Clínicos, Bioquímicos y Biología Molecular, Ed. Acta. Bioq. Lat. Sup.2. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires.

Batlle, A.M.; Benson, A. & Rimington; C. (1965) Purification and properties of coproporphyrinogenase. Biochem J.**97**(3) 731-740.

Bawden, M.J.; Borthwick, I.A.; Healy, H.M.; Morris, C.P.; May, B.K. & Elliott, W.H. (1987) Sequence of human 5-aminolevulinate synthase cDNA. Nucleic Acids Res. **15**(20) 8563

Beale, S.; Gough, S. & Granick, S. (1975) "Biosynthesis of delta-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley". Proc. Natl. Acad. Sci. **72** 2719-2723.

Beale, S.; Foley, T.; Dzelzkalns, V. (1981) "delta-Aminolevulinic acid synthase from *Euglena gracilis*". Proc. Natl. Acad .Sci. U S A. **78**(3)1666-1669

Bermúdez Moretti, M.; Correa García, S.R.; Chianelli, M.S.; Ramos, E.H.; Mattoon, J.R. & Batlle A.(1995) "Evidence that 4-aminobutyric acid and 5-aminolevulinic acid share a common transport system into *Saccharomyces cerevisiae*". Int J Biochem Cell Biol. **27**(2) 169-173.

Bhasker, C.R.; Burgiel, G.; Neupert, B.; Emery-Goodman, A.; Kühn, L.C. & May, B.K. (1993) "The putative iron-responsive element in the human erythroid 5-aminolevulinate synthase mRNA mediates translational control". J Biol Chem. **268**(17) 12699-12705.

Bogorad, L. (1955) "The enzymic synthesis of uroporphyrin III". Plant Physiol. **30** XIV.

Borthwick, I.; Srivastava, G.; Day, A.; Pirola, B.; Snoswell, M.; May, B.; & Elliott, W. (1985) "Complete nucleotide sequence of hepatic 5-aminolaevulinate dehydratase precursor". Eur. J. Biochem. **150** 481-484.

Bottomley, S.S. & Müller-Eberhard, U. (1988) "Pathophysiology of heme synthesis". Semin Hematol. **25**(4) 282-302

Brattsten, L & Wilkinson, C (1975) "Properties of 5-aminolaevulinate synthetase and its relationship to microsomal mixed-function oxidation in the southern armyworm (*Spodoptera eridania*)". Biochem. J. 1975 **150** 97-104.

Brock, T.D. (1978) en "Biología de los microorganismos." Ediciones Omega, Barcelona. **5** 122.

Camadro, J.; Abraham, N. & Levere, R. (1984) "Kinetic studies of human liver ferrochelatase". J. Biol. Chem. **259** 5678-5682.

Camadro, J.; Chambow, H.; Jolles, J.; & Labbe, P. (1986) "Purification and properties of coproporphyrinogen oxidase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". Eur. J. Biochem. **156** 579-587.

Chaufan, G.; Ríos de Molina, M.C. & San Martín de Viale, L.C. (2001) "How does hexachlorobenzene affect Uroporphyrinogen decarboxylase?" Int. J. Biochem. Cell. Biol. **33** 621-630.

Chen, J. Miller, G. & Takemoto, J. (1981) "Biosynthesis of delta-aminolevulinic acid in *Rhodopseudomonas sphaeroides*". Arch. Biochem. Biophys. **208** 221-228.

Cookson, C.; & Rimington, C. (1953) "Porphobilinogen; Chemical Constitution" Nature **171** 875-876

Correa García, S.; Rossetti, M. & Batlle, A. (1990) "Different pophobilinogen deaminase forms in wild and mutant strains *of Sacharomyces cerevisiae*". Int. J. Biochem. **23** 1019-1023**.**

Cox, T.C.; Bawden, M.J.; Martin, A. & May, B.K. (1991). "Human erythroid 5-aminolevulinate synthase: promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the mRNA". EMBO J. **10** 1891–1902.

Dailey, H. & Fleming, J. (1983) "Bovine ferrochelatase kinetics analysis of inhibition by N-methylproto, manganese and haem". J. Biol. Chem. **258** 11453-11459.

Dailey, H.; Fleming, J. & Harbin, B. (1986) "Ferrochelatase from *Rp. Sphaeroides*: substrate specificity and role of sulphydryl and arginyl residues". J. Bacteriol. **165** 1-5.

Dailey, H.; Jones, C. & Karr, S. (1989) "Interaction of free porphyrins and metalloporphyrins with mouse ferrochelatase". Biochim. Biophys. Acta **999** 7-11.

Dailey, H. (1987) "Spectrometric examination of the active site of bovine ferrochelatase". Biochem., USA **24** 1287-1294.

Darr, D.; Fridovich, I. (1994) " Free radicals in cutaneous biology".J Invest Dermatol. **102**(5) 671-675. Review

De Verneuil, H.; Sassa, S. & Kappas A. (1983) "Purification and properties of uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes. A single enzyme catalizing the four sequential decarboxylations of uroporphyrinogen I and III". J. Biol. Chem. **258** 2454-2460.

Deybach, J.C; Da Silva, V.; Grandchamp, B. & Nordmann, Y. (1985) "The mitochondrial localization of Protoporphyrinogen oxidase". Eur. J. Biochem. **149** 431-435.

Doss, M. & Philipp-Dormston, W.K. (1971) " Porphyrin and heme biosynthesis from Endogenous and exogenous delta-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Achromobacter metalcaligenes*".Hoppe Seylers Z Physiol Chem. **352**(5) 725-733.

Ehteshamuddin, A.F. (1968) " Anaerobic formation of protoporphyrin IX from coproporphyrinogen III by bacterial preparations". Biochem J. **107**(3) 446-447.

Falk, J.E. & Dresel, E.I.(1960) "Pseudouroporphyrin, and enzymic and non-enzymic porphyrin formation *in vitro*". Biochim Biophys Acta. **39** 458-462.

Ferreira, G.C. (1995) "Heme Biosynthesis: biochemistry, molecular biology y relationship to disease". J. Bioenerg. Biomembr. **27** 147-150.

Ferreira, G.C.; Neame, P.J. & Dailey, H.A. (1993) "Heme biosynthesis in mammalian systems: evidence of a Schiff base linkage between the pyridoxal 5'-phosphate cofactor and a lysine residue in 5-aminolevulinate synthase". Protein Sci. **2**(11) 1959-1965.

Fumagalli, S.; Kotler, M.; Rossetti, M. & Batlle, A. (1985) "Human red cell Porphobilinogen Deaminase. A simpler method of purification and some unusual properties". Int. J. Biochem. **17** 485-494.

Furuyama, K.; Kaneko, K. & Vargas, P.D. (2007) "Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis". Tohoku J Exp Med. **213(1)** 1-16.

Gibson, K.; Lover, W. & Neuberger, A. (1958) "Initial stages in the biosynthesis of porphyrins 2. The formation of δ-aminolevulinic acid from glicine and succinyl coenzyme A by particles from chiken erythrocytes". Biochem J. **70** 71-78.

Grandchamp, B. & Nordman, Y. (1977) "Decreased lymphocyte coproporphyrinogen III oxidase activity in hereditary coproporphyria". Biochem. Biophys. Res. Comm. **74** 1089-1095.

Granick, S. (1966) "The induction *in vitro* of the synthesis of delta-aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria: a response to certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals". J Biol Chem. **241**(6) 1359-1375.

Granick, S. & Bogorad, L. (1953) "Porphobilinogen a monopyrrole". J. Am. Soc. **75** 3610

Granick, S. & Sassa, S. (1971) δ-Aminolevulinic acid synthetase and the control of heme and chlorophyll synthesis. In Metabolic Regulation. Ed JH Vogel. , pp77. New York; Academic Press

Greenawalt, J. (1974) "The isolation of outer and inner mitochondrial membranes". Methods of Enzymology **31** 310 Edited by Sidney Fleischer, Lester Packer, Elsevier Inc., Academic Press, USA.

Hamilton, J.W.; Bement, W.J; Sinclair, P.R., Sinclair, J.F; Alcedo, J.A. & Wetterhahn, K.E. (1991) "Heme regulates hepatic 5-aminolevulinate synthase mRNA expression by decreasing mRNA half-life and not by altering its rate of transcription". Arch Biochem Biophys. **289**(2) 387-392.

Hanson, J. & Dailey, H. (1984) "Purification and characterization of chicken erythrocyte ferrochelatase". J. Biol. Chem. **222** 695-700.

Harel, E.; Ne'eman, E. & Meller, E. (1983) "Alternative Routes for the Synthesis of 5-Aminolevulinic Acid in Maize Leaves: I. Formation from 2-Ketoglutarate via 4,5-Dioxovaleric Acid" . Plant Physiol. **72** 1056-1061.

Hart, G. & Battersby, A. (1985) "Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase (co-synthetase) from *Euglena gracilis".* Biochem J. **232** 151-160.

Hayashi, N.; Yoda, B. & Kikuchi, G. (1969) "Mechanism of allylisopropyl acetamide induced increase of δ-aminolevulinate synthetase in liver mitochondria IV: Accumulation of the enzyme in the soluble fraction of rat liver". Arch. Biochem. Biophys. **131** 83-91.

Hayashi, N.; Terasawa, M. & Kikuchi G. (1980) "Immunochemical studies of the turnover of delta-aminolevulinate synthase in rat liver mitochondria and the effect of hemin on it". J Biochem. **88**(4) 921-926.

Hayashi, S. & Noguchi, T. (1983) "Response to light of a specific aminotransferase for delta-aminolevulinate formation in higher plants". J. Biol. Chem. **258** 13693-13696.

Hoare, K. & Datta, K. (1990) "Characteristics of L-alanine:4,5-dioxovaleric acid transaminase: an alternate pathway of heme biosynthesis in yeast". Arch. Biochem. Biophys. **277** 122-129.

Jacobs, N. & Jacobs, J. (1975) "Fumarate as alternate electron acceptor for the late steps of anaerobics synthesis in *Escherichia coli*". Biochem. Biophys. Res. Comm. **65** 435-441.

Jacobs, N. & Jacobs, J. (1979) "Microbial oxidation of protoporphyrinogen, an intermediate in heme and chlorophyll biosynthesis". Arch Biochem Biophys. **197**(2) 396-403

Johnson, A. & Jones, O. (1964) "Enzymic formation of hemes and other metalloporphyrins". Biochim. Biophys. Acta **93** 171-175.

Jones, M. & Jones, O. (1969) "The structural organization of heme synthesis in rat liver mitochondria". Biochem. J. **113** 507-511.

Jones, R. & Jordan, P. (1994) "Purification and properties of porphobilinogen deaminase from *Arabidopsis thaliana*". Biochem. J. **299** 895-902.

Juknat, A.; Dornemann, D. & Senger, H. (1989a) "Different porphobilinogenases in cytoplasm and isolated chloroplasts from light grown *Euglena gracilis*". Z.Z. Naturforsch **43** 357-362.

Juknat, A.; Kotler, M.; Koopmann, G. & Batlle, A. (1989b) "Porphobilinogenase from *Rhodopseudomonas palustris*". Comp Biochem Physiol B. **92(2)** 291-295.

Juknat, A.; Dornemann, D. & Senger, H. (1994) "Purification and kinetic studies on a porphobilinogen deaminase from the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*". Plant **193** 123-130.

Kawanishi, S.; Seki, Y. & Sano, S. (1983) "Uroporphyrinogen decarboxylase. Purification, properties, and inhibition by polychlorinated biphenil isomers". J. Biol. Chem. **258** 4285-4292.

Kikuchi, G.; Kumar, A.; Talmage, P. & Shemin, D. (1958) "The enzymatic synthesis of ∂-aminolevulinic acid". J. Biol. Chem. **233** 1214-1219.

Kohashi, M.; Clement, R.; Tse, J. & Piper, W. (1984) "Rat hepatic uroporphyrinogen III co-synthase. Purification and evidence for a bound folate coenzyme participating in the biosynthesis of uroporphyrinogen III." Biochem. J. **220** 755-765.

Koopmann, G. E.; Juknat de Geralnik, A.A. & Batlle, A. (1986) "Porphyrins biosynthesis in *Rp palustris*. -VI Purification of porphyrinogrn decarboxylase and some unusual properties." Int. J. Biochem. **18** 935-944.

Koopmann, G. & Batlle, A. (1987) "Biosynthesis of porphyrins in *Rp palustris*. -VI The effect of metals, thiols, and other reagents on the activity of uroporphyrinogen decarboxylase." Int. J. Biochem. **4** 373-377.

Llambías, E.B. & Batlle, A.M. (1970) " Porphyrin biosynthesis in soybean callus. V. The porphobilinogen deaminase-uroporphyrinogen cosynthetase system". Kinetic studies.Biochim Biophys Acta. **220(**3) 552-559.

Llambías, E.B. & Batlle, A. M. (1971) "Porphyrin biosynthesis. VIII. Avian erythrocyte porphobilinogen deaminase-uroporphyrinogen 3 cosynthetase, its purification, properties and the separation of its components". Biochim Biophys Acta. **227**(1) 180-191.

Lombardo, M.E.; Araujo, L.; Juknat, A. & Batlle, A. (1988) "Effect of illumination on growth, chlorophyll content and δ-ALA synthesis in *Euglena gracilis*." Comp. Biochem. Physiol. **91B** 279-287.

Lombardo, M.E.; Araujo, L.S. & Batlle, A. (2003) "5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*." Int J Biochem Cell Biol. **35(8)**1263-1271.

Marver, H.; Tschudy, D.; Perlroth, M. & Collins, A. (1966) " Delta aminolevulinic acid synthetase: I-Studies in liver homogenates.' J. Biol. Chem. **241** 2803-2809.

Mauzerall, D. & Granick, S. (1958) "Porphyrin biosynthesis in erythrocytes III. Uroporphyrinogen and its decarboxylase." J.Biol. Chem. **232** 1141-1162.

Mc Kay, R.; Druyan, R.; Getz, G. & Rabinovitz, M. (1969) "Intramitochondrial localization of δ-aminolevulinic synthetase and ferrochelatase in rat liver." Biochem. J. **114** 455-460.

Medenica, R.; Lazovic, G.; Huschart, T.; Mukerjee, S.; Long, P.; Corbitt, W. & Powell, D.(1997) Polypeptide levels increase during acute onset of hepatic porphyrias. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).**43**(1) 9-27.

Menon, I & Shemin, D. (1967) "Concurrent decrease of enzymic activities concerned with the synthesis of coenzyme B 12 and of propionic acid in propionibacteria." Arch Biochem Biophys. **121** 304-310.

Miller, J. W. & Teng, D. (1967) Proc. Plenary Sess. Int. Congr., Biochem. 7th, p. 1059.

Morton, K.; Kushner, J.; Straka, J. & Burnham, B. (1983) "Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid and heme from 4,5-dioxovalerate in the rat." J. Clin. Invest. **71** 1744-1749.

Müller-Eberhard, U. & Fraig, M. (1993) " Bioactivity of heme and its containment ". Am. J. Hematol. **42**(1) 59-62.

Munakata, H.; Sun, J.Y; Yoshida, K.; Nakatani, T.; Honda, E.; Hayakawa, S.; Furuyama, K. & Hayashi, N. (2004) "Role of the heme regulatory motif in the heme mediated inhibition of mitochondrial import of 5-aminolevulinate synthase". J. Biochem. (Tokyo) **136 (2)** 233–238.

Navone, N.; Afonso, S.; Polo, C. & Batlle. A. (1992) "Uroporphpyrinogen decarboxylase from mouse mammary carcinoma and liver of normal and tumor-bearing mice." Comp. Biochem. Physiol. **B 102** 87-92.

Neuberger, A. & Scott, J (1953) "Aminolaevulinic acid and porphyrin biosynthesis." Nature **172** 1093-1094.

Ohashi, A. & Kikuchi, G. (1979) "Purification and some properties of two forms of δ-aminolevulinate synthase from rat liver cytosol". J. Biochem. **83** 239-247.

Patton, G.M. & Beattie; D.S. (1973) "Studies on hepatic -aminolevulinic acid synthetase". J Biol Chem. **248**(12) 4467-4474.

Piccinelli, P. & Samuelsson, T. (2007) "Evolution of the iron-responsive element". RNA **13**(7) 952-966.

Ponka, P. (1999) "Cell biology of heme". Am. J. Med. Sci. **318** 241–256.

Porra, R. & Jones, O. (1963) "Studies on ferrochelatase. An investigation of the role of ferrochelatase in the biosynthesis of various prosthetic groups". Biochem. J. **87** 186-191.

Porra, R.; Barnes, R. & Jones, O. (1972) "The level and sub-cellular distribution of ∂-aminolaevulinate synthase activity in semi-anaerobic and aerobic yeast". Hoppe Seylers Z Physiol Chem. **353** 1365-1368.

Poulson, R. & Poglase, W. (1974) "Aerobic and anaerobic coproporphyrinogenase activity in extracts from *Saccharomyces cerevisiae*: Purification and characterization". J. Biol. Chem. **249** 6367-6371.

Poulson, R. & Poglase, W. (1975) "The enzyme conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX. Protoporphyrinogen oxidase activity in mitochondrial extracts of *Saccharomyces cerevisiae*." J. Biol. Chem. **250** 1269-1274.

Poulson, R. (1976) "The enzymic conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX in mammalian mitochondria".J Biol Chem. **251**(12) 3730-3733.

Ramaswamy, N. & Madhusadanan Nair, P. (1973) "δ-aminolevulinic acid synthetase from cold stored patatoes". Biochim. Biophys. Acta **293** 269-277.

Rimington, C (1939) "A re-investigation of turacin, the copper porphyrin pigment of certain birds belonging to the mysophagidae". Proc. Roy. Soc. B**. 127** 106.

Ríos de Molina, M.C.; Billi de Catabbi, S.& San Martín de Viale, L.C (1991) "Liver ferrochelatase from normal and hexachlorobenzene porphyric rats. Mechanism of drug action". Int. J. Biochem**. 23** 669-673.

Rossetti. M.; Juknat de Geralnik, A.; Araujo, L.; Lombardo, M. & Batlle, A. (1986) "Porphyrin biosynthesis in *Euglena gracilis.*- V: Soluble and particulate deaminase". Comp. Biochem. Physiol. **85** 451-458.

Salzman, T. & Batlle, A. (1986) "Heme synthetase in *Trypanosoma cruzi*." Comp. Biochem. Physiol. **85** 537-541.

Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1969) "Porphyrin biosynthesis VI- Separation and purification of PBG deaminase and Urogen III cosynthetase from cow liver. PBGase an allosteric enzyme". Biochim. Biophys. Acta **191** 130-143.

Sassa, S. & Granick, S. (1970) "Induction of δ-aminolevulinic acid synthetase in chick embryo liver cells in cluture". Proc Natl Acad Sci U S A. **67**(2) 517-522.

Sassa, S. & Kappas, A. (1995) "Disorders of heme production and catabolism. In Blood: Principles and Practice of Hematology" (eds. R. I.Handin, T. P. Stossel and S. E. Lux), pp. 1388-1398. Philadelphia: J. B.Lippincott Co.

Shanker, J. & Datta, K. (1986) "Affinity purification and properties of rat liver mitochondrial L-alanine:4,5-dioxovalerate transaminase and its inhibition by hemin." Arch. Biochem. Biophys. **248** 652-657.

Shayeghi, M.; Latunde-Dada, G.O.; Oakhill, J.S.; Laftah, A.H.; Takeuchi, K.; Halliday, N.; Khan, Y.; Warley, A.; McCann, F.E.; Hider, R.C.; Frazer, D.M.; Anderson, G.J.; Vulpe, C.D.; Simpson, R.J. & McKie, A.T. (2005) "Identification of an intestinal heme transportes". Cell **122**: 789-801.

Shemin, D. & Russell, C. (1953) "δ-aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines". J. Am. Chem. Soc. **75** 4873-4874.

Shioi, V.; Nagamine, M. & Sassa, T. (1984) "Purification and properties of L-alanine:4,5-dioxovalerate aminotransferase from *Chlorella regularis*." Arch. Biochem. Biophys. **234** 117-224.

Shioi, Y.; Nagamine, M.; Kuroki, M. & Sasa, T. (1980) "Purification by affinity chromatography and properties of uroporphyrinogen I synthetase from *Chlorella regularis*". Biochim Biophys Acta **616** 300-309.

Singh, N. & Datta, K. (1985) "Purification and characterization of rat kidney L-alanine: 4,5-dioxovalerate transaminase and inhibition by hemin". Biochim. Biophys. Acta **827** 305-309.

Srivastava, G.; Borthwick I.; Maguire, D.; Elfermika, C.; Bawden, M.; Mercer, J. & May, B. (1988) "Regulation of δ-aminolevulinate synthase mRNA in different rat tissues". *J. Biol. Chem.* **263** 5202-5207

Straka, J. & Kushner, J. (1983) "Purification and characterization of bovine hepatic uroporphyrinogen decarboxylase". Biochemistry **22** 4664-4672.

Tait, G. (1972) "Coproporphyrinogenase activities in extracts of *Rhodopseudomonas spheroides* and *Chromatium* strain D". Biochem. J. **128** 1159-1169.

Tait, G. (1973) "Aminolaevulinate synthetase of *Micrococcus denitrificans*. Purification and properties of the enzyme, and the effect of growth conditions on the enzyme activity in cells". Biochem. J. **131** 389-403.

Taketani, S. & Tokinaga, R. (1981) "Rat liver ferrochelatase purification, properties and stimulation by fatty acids". J. Biol. Chem. **256** 12748-12753.

Taketani, S. (2005) "Acquisition, Mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation". Tohoku J. Exp. Med. **205** 297-318.

Tsiftsoglou, A.S.; Tsamadou, I.A. & Papadopoulous, C.L. (2006) "Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects". Pharmacol. Ther. **111** 327-345.

Varticovski, L.; Kushner, J.P.; Burnham, B.F. (1980) "Biosynthesis of porphyrin precursors. Purification and characterization of mammalian L-alanine:gamma,delta-dioxovaleric acid aminotransferase". J. Biol. Chem. **255**(8) 3742-3747.

Viale, A.; Wider, E. & Batlle, A. (1980) "Porphyrin biosynthesis in *Rhodopseudomonas palustris* -II Evidence on the existence of a factor regulating aminolevulinate synthase activity." Int. J. Biochem. **12** 729-733.

Volland, C. & Felix, F. (1984) "Isolation and properties of 5-aminolevulinate synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". Eur J Biochem. **142** 551-557.

Wandersman, C. & Stojiljkovic, I. (2000) "Bacterial heme sources: the role of heme, hemeprotein receptors and hemophores". Curr. Opin. Microbiol. **3** 215-220.

Whiting, M.J. & Elliott, W.H. (1972) "Purification and properties of solubilized mitochondrial -aminolevulinic acid synthetase and comparison with the cytosol enzyme". J Biol Chem. **247**(21) 6818-6826.

Wider de Xifra, E.; Batlle, A. & Tigier, H. (1971) "δ-aminolaevulinate synthase in extracts of cultured soybean cells." Biochim. Biophys. Acta **235** 511-517.

Wijayanti, N.; Katz, N. & Immenschuh, S. (2004) "Biology of heme in health and disease". Curr. Med. Chem. **11** 981-986.

With, T.K. (1973) "On porphyrin esterification and ester hydrolysis. Studies on esterification of natural animal porphyrins with various alcohols and the acid hydrolysis of their esters." Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. **134** 3-80.

Woods, J.S. & Murthy, V.V. (1975) "Delta-aminolevulinic acid synthetase from fetal rat liver: studies on the partially purified enzyme". Mol Pharmacol. 11(1) 70-78.

Worthington, M.T.; Cohn, S.M.; Miller, S.K.; Lou, R.Q. & Berg, C.L. (2001) "Characterization of a human plasma membrane heme trnasporter in intestinal and hepatocyte cell lines". Am. J. Physiol. **280**: G1172-G1177.

Yamamoto, M; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1982) “Evidence for the transcriptional inhibition by heme of the synthesis of delta aminolevulinate synthase in rat liver”. Biochem. Biophys. Res. Commun. **105** 985-990.

Yamamoto, M.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1983) “Translational inhibition by heme of the synthesis of hepatic delta-aminolevulinate synthase in a cell-free system”. Biochem. Biophys. Res. Commun. **115**: 225-231.

Yamauchi, K.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1980) “Translocation of delta-aminolevulinate synthase from the cytosol to the mitochondria and its regulation by hemin in the rat liver”. J. Biol. Chem. **255** 1746-1751.

Yoshinaga, T. & Sano, S. (1980) “Coproporphyrinogen oxidase I. Purification properties, and activation by phospholipids.” J. Biol. Chem. **225** 4722-4726.

Yoshino, K.; Munakata, H.; Kuge, O.; Ito, A. & Ogishima T. (2007) “Haem-regulated degradation of delta-aminolevulinate synthase 1 in rat liver mitochondria”. J Biochem. **142**(4) 453-458.

Xu, W.; Kozak, C.A; & Desnick, R.J. (1995) Uroporphyrinogen-III synthase: Molecular cloning, nucleotide sequence, expression of a mouse full-length cDNA, and its localization on mouse chromosome 7. Genomics. **26** 556-562.

CAPÍTULO II

δ-AMINOLEVÚLICO DEHIDRASA

II.1. INTRODUCCIÓN

La enzima objeto de este estudio, la δ-aminolevúlico dehidrasa o 5-aminolevúlico dehidrasa (ALA-D), es también conocida como porfobilinógeno sintetasa (PBG-S). Cataliza la formación del porfobilinógeno (PBG), primer compuesto cíclico del camino biosintético de los tetrapirroles y único monopirrol natural, mediante la condensación en forma asimétrica de dos moléculas de ALA; en este proceso se pierden dos moléculas de agua, y de allí su identificación con una dehidrasa.

En forma casi simultánea con el hallazgo del ALA como intermediario clave en la síntesis de porfirinas, del cual provienen todos los átomos de carbono que dan origen a al anillo tetrapirrólico, varios grupos de investigación dilucidaron la estructura del PBG (Cookson & Rimington, 1953; Kennard, 1953; Shemin & Russel, 1953). Este monopirrol había sido aislado por Westall (1952) de la orina de pacientes con PAI y su participación como intermediario en la síntesis de porfirinas fue confirmada mediante estudios *in vitro* (Bogorad & Granick, 1953; Dresel & Falk, 1953, Schmid & Shemin, 1955), y empleando marcación isotópica (Shemin, 1989).

La estequiometría de la condensación asimétrica de las dos moléculas de ALA según se muestra en la Figura II.1, fue establecida por Schmid y Shemin (1955) y confirmada por Gibson *et al.* (1955) y Granick & Mauzerall (1958).

La existencia de una enzima que cataliza la conversión de ALA en PBG fue postulada por Dresel & Falk (1953) y Granick (1954). A partir de allí, varios laboratorios comenzaron a describir esta conversión en preparaciones crudas de hígado de buey, eritrocitos de pollo y de pato (Dresel & Falk, 1953, Granick 1954, Gibson *et al.*, 1955, Schmid & Shemin, 1955).

La enzima está ampliamente distribuída en la naturaleza, habiendo sido aislada y estudiada en diversos organismos, tanto eucariotas como procariotas. En bacterias: *Corynebacterium diphteriae* y *Bacterium cadaveris* (Gibson *et al.*, 1955), bacteria propiónica (Walerych, 1963), *R. spheroides* (Gajdos & Gajdos-Török, 1955, 1956;

Burnham & Lascelles, 1963); *R. capsulata* (Nandi & Shemin, 1973), *Pseudomonas aeruginosa* (1999); hongos: *U. sphaerogena* (Komai & Neilands, 1969), *N. crassa* (Muthukrishnan *et al.*, 1972, Chandrika & Padmanaban, 1980), *levadura* (Barreiro, 1967, 1969); algas: *Chlorella* (Bogorad & Granick, 1953); *E. gracilis* (Hovenkamp-Obbema *et al.*, 1974); en plantas: espinaca (Schneider, 1970; Liedgens, 1980), hojas de trigo (Nandi & Waygood, 1967), hojas de haba (Steer & Gibbs, 1969), hojas de tabaco (Shetty & Miller, 1969a), callos de soya (Tigier *et al.*, 1968, 1970), cotiledones de rábano (Shibata & Ochiai, 1977); tejidos animales: hígado de vaca (Batlle *et al.*,, 1967; Wilson *et al.*, 1972, Jordan & Seehra, 1986), insectos: *Pieris brassicae* (van Gessel & Kayser, 2007), hígado de ratón (Colemall, 1966; Doyle, 1971), de perro (Zeitler *et al.,* 1982), eritrocitos de rata y conejo (Fujita *et al.*,, 1981), eritrocitos humanos (Anderson & Desnick, 1979).

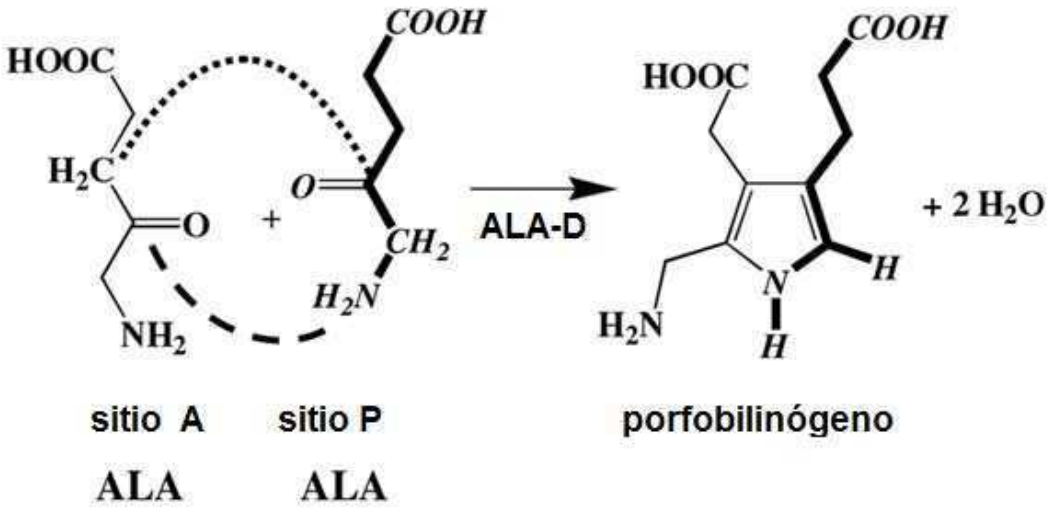


Figura II.1: Condensación de dos moléculas de ALA.

II.2 CARACTERISTICAS Y PROPIEDADES

II.2.1 Localización subcelular

Si bien se acepta ampliamente que el ALA-D es una enzima soluble de localización citoplasmática, en plantas superiores se ha demostrado actividad de esta enzima en

proplástidos y etioplastos (Schneider, 1970; Sluiters-Scholten *et al.*, 1973, Shibata & Ochiai, 1976). En proplástidos aislados de hojas de tabaco, habas y cebada, Granick (1961) observó la transformación de ALA exógeno a compuestos porfirínicos. A su vez, Rebeiz & Castelfranco (1971) demostraron que a partir de ^{14}C-ALA los etioplastos son capaces de sintetizar protoclorofilida marcada. Estas evidencias indican que además del citoplasma, la enzima para la síntesis de clorofila se localiza en los proplástidos y cloroplastos (Shibata & Ochiai, 1976).

II.2.2 Especificidad de sustrato

ALA-D es una enzima cuyo único sustrato es el ALA. Gibson y col (1955) encontraron en la enzima bovina, que no son sustratos la aminocetona, el ácido ε-amino-δ-cetohexanoico ni el α-δ-diamino-γ-cetopentanoico. Granick & Mauzerall (1958), no detectaron productos de condensación cuando incubaron mezclas de aminocetona y ALA-D de conejo, además el ácido levulínico y el succinato semialdehído actuaron como inhibidores competitivos.

Aminocetoácidos estructuralmente relacionados con el ALA, tales como el ácido 6-amino-6-cetohexanoico, el α-δ-diamino-β-metil-levulínico, el δ-amino-α-metil-levulínico y el δ-amino-δ-metil-levulínico, inhibieron la enzima de *Rp. spheroides* en forma competitiva, pero ninguno de ellos pudo actuar como sustrato (Lartillot & Baron, 1967). Algunos autores reportaron que en la enzima de fuente bacteriana, el ácido levulínico y sus ésteres metilo y etilo, forman una base de Schiff con la enzima, pero solo el ácido libre actúa como un inhibidor competitivo (Nandi & Shemin, 1968b, Ho & Lascelles, 1971, Yamasaki & Moriyama, 1971). Cuando se incubó el preparado enzimático de *Rp. spheroides* con el metil-éster del ALA, no se detectó la formación del pirrol hasta que ocurrió la hidrólisis del éster, sugiriendo que el grupo carboxilo libre es esencial para el sustrato (Nandi *et al.*, 1968).

II.2.3 Propiedades moleculares

La enzima es oligomérica y su peso molecular oscila entre 220 y 320 KDa según la fuente. Para la enzima aislada de la bacteria fotosintética *Rp. spheroides*, se reportó un peso molecular de 220-250 KDa, determinado por análisis de sedimentación en gradiente de sacarosa, filtración por geles y equilibrio de sedimentación (Nandi *et al.*,

1968). Se observó que en presencia de iones potasio, la enzima formaba rápidamente agregados moleculares, todos ellos con actividad enzimática. Por dilución en ausencia de potasio, o en solución de urea 1 M, la enzima se disociaba en una proteína de peso molecular 120 KDa; en presencia de SDS, se formaban subunidades de 40 KDa, según se determinó por PAGE. De acuerdo a estos resultados, van Heyningen & Shemin (1971b) concluyeron que la enzima es un hexámero con las seis subunidades dispuestas con una simetría dihedral en trímeros, pudiendo disociarse en subunidades monoméricas o agregarse en oligómeros de mayor peso molecular. Esta estructura hexamérica fue confirmada más recientemente por Bollivar *et al.* (2004) en *R. capsulatus.*

En plantas se han descripto valores entre 280 KDa (callos de soya, Tigier *et al.*, 1970; hojas de soya, Schneider, 1975; cotiledones de rabano, Shibata & Ochiai, 1977) y 324 KDa (hojas de espinaca, Schneider, 1976). Liedgens *et al.* (1983) interpretaron que la enzima de hojas de espinaca está compuesta por 2 capas de tres subunidades formando una estructura hexamérica.

En insectos se determinó que el ALA-D de *Pieris brassicae* es un octámero de 293,3 kDa (van Gessel & Kayser, 2007)

En hígado de ratón, el peso molecular obtenido mediante sedimentación por difusión, centrifugación en gradiente de sacarosa y filtración por geles, fue de 200 a 270 KDa. El tratamiento con SDS y β-mercaptoetanol (β-Me) disoció la enzima nativa en cadenas polipeptídicas de 39,5 KDa, indicando que la enzima está compuesta por seis subunidades idénticas (Coleman, 1966, Doyle & Schimke, 1969, Doyle, 1971).

En hígado bovino se observaron valores entre 250 y 280 KDa (Gurba *et al.*, 1972, Wilson *et al.*, 1972, Cheh & Neilands, 1973). En la enzima de esta fuente, el tratamiento con guanidina 7,3 M y DTT, produjo una disociación en subunidades de 35,5 kDa. Mediante microscopia electrónica, Wu *et al.* (1974) hallaron estos mismos valores, y además visualizaron cuatro lóbulos discretos dispuestos en las cuatro esquinas de un cuadrado, concluyendo que la enzima es un octámero con las ocho subunidades dispuestas en los vértices de un cubo, y con una simetría dihedral D4; las subunidades son indistinguibles según los ensayos de equilibrio de sedimentación en guanidina 6 M o por PAGE en presencia de SDS.

La estructura octamérica fue confirmada por Kreutzer *et al.* (1977) en hígado bovino, y por Anderson & Desnick (1979) en eritrocitos humanos.

La discrepancia en los valores de pesos moleculares no se deberían tanto a la fuente enzimática, sino más bien, a las condiciones experimentales bajo las cuales se realizó la determinación (Stafforini *et al.*, 1980).

Utilizando la técnica de inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos como Sepharosa, Gurne *et al.*, 1977, reportaron que por tratamiento de la enzima inmovilizada con urea 4M se removían 4 subunidades por octámero, las cuales podían reasociarse formando nuevamente un octámero, tanto en solución como inmovilizada en el soporte, recuperando la actividad enzimática inicial. Empleando esa misma técnica experimental Batlle *et al.* (1978) propusieron el dímero como mínima unidad funcional.

En contraste con la mayoría de las ALA-Ds que son octaméricas, en *R. capsulatus* se encontró que es predominantemente hexamérica (Bollivar *et al.*, 2004).

II.2.4 Grupos sulfhidrilos

Ya desde los primeros trabajos de Gibson y col (1954) y Granick y Mauzerall (1958), quedó claro que ALA-D requiere reductores de grupos tioles para expresar actividad *in vitro*. Esto se ha observado tanto en la enzima de mamíferos, como en bacterias y plantas. Correspondientemente, reactivos específicos que bloquean la acción de los grupos tioles como iodoacetamida, NEMI, PCMB, DTNB, o metales pesados como plomo, mercurio, cadmio, inhiben la enzima, reafirmando la importancia de los grupos sulfhidrilos en la catálisis del ALA-D.

En hígado bovino, Batlle *et al.* (1967) determinaron un total de 11 grupos tioles por mol de enzima. Unos años después, Wilson *et al.* (1972) detectaron 20 a 26 grupos SH libres, y 56 residuos cisteína; resultados similares fueron informados por Kreutzer y col (1977). Gore & col (1976) mediante un análisis cinético, encontraron 16 grupos tioles por mol de enzima altamente reactivos, y 8 adicionales de menor reactividad. De manera similar, Barnard *et al.* (1977) observaron que la inactivación por agentes como iodoacetato y iodoacetamida ocurría solo si la enzima se trataba previamente con reductores tiólicos.

Seehra & Jordan (1981) utilizando agentes alquilantes estructuralmente relacionados con el sustrato: los ácidos 5-halolevulínico y 3-halolevulínico, concluyeron que la oxidación de la enzima no impedía la reacción con estos reactivos.

Realizando un análisis detallado con la enzima bovina conteniendo ocho átomos de Zn por mol, Tsukamoto *et al.* (1979), establecieron, sobre la base de la reactividad hacia el DTNB, una clasificación de los grupos tioles en tres tipos: dos altamente reactivos que se modificaban en el término de un minuto (grupos -SH tipo I), tres cuya modificación se completaba en una hora (tipo II) y finalmente tres grupos que se detectaban sólo si se realizaba previamente un tratamiento con SDS (tipo III), es decir, un total de ocho grupos tioles por mol de enzima. Hallaron que la enzima conservaba su actividad en tanto los dos grupos -SH tipo I permanecían reducidos, aún en ausencia de zinc. La oxidación de estos grupos llevaba a la pérdida del zinc y de la actividad catalítica. Seehra *et al.* (1981) detectaron la presencia de cuatro grupos SH: dos altamente reactivos, uno de mediana reactividad y un cuarto de baja reactividad.

Posteriormente, Jaffe *et al.* (1984) obtuvieron una enzima modificada en sus grupos tioles con el reactivo metil-metano-tiosulfonato (MMTS), que, al ser una molécula pequeña, lograba modificar la enzima sin interferir con la estructura secundaria o terciaria. Encontraron que en la holoenzima se incorporaban tres grupos tiometilo por subunidad, y en la apoenzima libre de zinc se revelaron dos grupos -SH por subunidad. Por lo tanto, la enzima contiene dos grupos -SH estrechamente relacionados con la actividad catalítica de la enzima, ubicados en o muy cercanamente al sitio activo. Además la modificación de la enzima con MMTS era reversible, y dos de los grupos SH que reaccionaban con el reactivo se identificaron como Cys119 y Cys223 (Markham *et al.*, 1993).

II.2.5 Iones metálicos

Gibson y col (1955), habían encontrado que la enzima se inhibía por el quelante EDTA. Esta inhibición se observó en la enzima de diversas fuentes: reticulocitos de conejo y de pollo (Granick & Mauzerall, 1958), levadura (Barreiro, 1967), plantas (Nandi & Waygood, 1967; Shetty & Miller, 1969; Schneider, 1970; Shibata & Ochiai, 1977), hongos (Komai y Neilands, 1969; Muthukrishnan *et al.*, 1969), bacterias (Yamasaki & Moriyama, 1971), a excepción de *Rp. spheroides* y *R. capsulatus* (Burnham & Lascelles, 1963; Nandi & Shemin, 1973).

En *Rp. spheroides*, se observó que cationes bivalentes como Mg^{++} y Mn^{++} restauraban la actividad perdida por diálisis (Nandi & Shemin, 1968), si bien más

recientemente, Bollivar *et al.* (2004) reportaron que la enzima de *R. capsulatus* no requiere iones metálicos.

En hojas de trigo se encontró que Ca^{++}, Mg^{++} y Mn^{++} activaban la enzima, Pb^{++}, Ni^{++}, Co^{++} y Fe^{++} no tenían efecto, en cambio Cu^{++} y Hg^{++} eran inhibitorios; el Zn^{++} a una concentración 10^{-2} M inhibió un 60% (Nandi & Waygood, 1967).

En otros sistemas como *M. phley* (Yamasaki & Moriyama, 1971) y hojas de tabaco (Shetty & Miller, 1969), el Mg^{++} parece ser un requerimiento absoluto. En este último tejido, la actividad enzimática perdida por diálisis contra EDTA, se recupera por adición de Mg^{++} o Mn^{++} en cambio Fe^{++}, Cu^{++} y Hg^{++} resultaron inhibitorios.

En callos de soya Tigier *et al.* (1970) hallaron que el Fe tanto di como trivalente no modificaban significativamente la actividad de la enzima; el Zn^{++} a una concentración 10^{-6} M en el medio de crecimiento estimuló su actividad, concentraciones mayores o la ausencia de este catión en el medio de cultivo, produjeron una actividad menor.

En *U. sphaerogena*, Komai & Neilands, (1969) reportaron que además del EDTA, o-fenantrolina, 2-2'-bipiridina y 8-hidroxiquinolina producían una inhibición de la enzima, que pudo revertirse parcialmente con iones Zn^{++}. Sin embargo, investigando la acción de agentes quelantes de Cu^{++}, como el disulfonato sódico de baticuproína junto con un análisis de absorción atómica, llevaron a estos autores a proponer al Cu^{++} como metal involucrado en la actividad del ALA-D de esa fuente. Sin embargo, la pérdida de actividad no se restauraba por la adición de iones Cu^{++}, sino con iones Zn^{++}.

La enzima purificada más de 700 veces del alga verde *Chlorella regularis* presentó una muy baja actividad luego de una diálisis contra buffer Tris-HCl conteniendo betamercaptoetanol (β-Me), la que se recuperó por el agregado de Mg^{++} o Mn^{++}; Fe^{++} y Ni^{++} fueron menos efectivos, en tanto que Co^{++}, Zn^{++}, Cu^{++} y K^{+} no tuvieron efecto (Tamai *et al.,* 1979).

En la enzima aislada de hígado bovino y de rata, se encontró inhibición por EDTA y otros agentes quelantes como 8-hidroxiquinolina, o-fenantrolina y 2-2'-bipiridina (Gurba *et al.,* 1972; Wilson *et al.,* 1972), y reversión de la misma por acción del Zn, sugiriendo que iones metálicos bivalentes están involucrados en el sitio activo de la enzima. Resultados similares encontraron Anderson & Desnick (1979) y Gibbs *et al.* (1985) en eritrocitos humanos. Anderson & Desnick (1979) purificaron la enzima eritrocitaria 38 mil veces, y encontraron que el Zn^{++} activaba a concentraciones entre 20 y 100 μM, pero

concentraciones del orden milimolar eran inhibitorias; el Pb^{++} actuaba como un potente inhibidor que afecta el Km y la V_{max}, en tanto que el Fe^{++} inhibió disminuyendo sólo la velocidad.

Finelli *et al.* (1974, 1975) informaron que la actividad de ALA-D de eritrocitos e hígado de rata, dependía de los niveles dietarios de Zn^{++} y que tanto el ALA-D de eritrocitos de ratones controles como intoxicados por Pb^{++}, es activada tanto *in vitro* como *in vivo* por el Zn, con una máxima reactivación a una concentración 10^{-4} M. También Haeger-Aronsen & Schütz (1976) encontraron una fuerte activación de la enzima por el Zn^{++} *in vivo*, en conejos, capaz de revertir la inhibición por el Pb.

En eritrocitos de rata ALA-D se activó en forma aditiva por Zn^{++} y Al^{+++}, y este último metal logró revertir la inhibición por Pb^{++} (Meredith y col., 1977). Calissano y col. (1966) observaron que la enzima de glóbulos rojos humanos se activaba tanto con Fe^{++} como con Zn^{++}, en cambio Collier (1971) encontró activación por Mn^{++} y Mitchell *et al.* (1977) hallaron que el efecto estimulante podía ser producido por el Hg^{++}, el Cd^{++} y el Zn^{++}.

En hemolizados de sangre entera de adultos normales, Davis & Avram (1978) encontraron que el Cd^{++} activa a una concentración 100 veces menor que el zinc, revirtiendo·*in vitro* la inhibición por Pb^{++}, también a concentraciones 100 veces menores que las del Zn^{++}, por lo que, resultó ser un activador más potente que el Zn^{++}. En cambio, a altas concentraciones, el Cd^{++} actúa inhibiendo un 50% la actividad de la enzima a una concentración aproximadamente 20 veces mayor que la del Pb^{++}, y esa inhibición no es revertida por la adición *in vitro* de Zn^{++}. Los autores sugirieron que ambos metales tienen un rol estructural relacionado con su unión a grupos sulfhidrilos periféricos. Estos mismos autores investigaron 14 iones metálicos y examinaron su efecto sobre la enzima normal e inhibida en un 50% por Pb^{++}. Clasificaron los iones según sus estados de oxidación, número y geometría de coordinación, y sus características de ácidos de Lewis duros y blandos, de manera tal de determinar sus propiedades físicas y químicas asociadas con la capacidad de un ion metálico para activar o inhibir la enzima (Davis & Avram 1980). Encontraron que, de todos los iones metálicos estudiados, sólo Zn^{++} y Cd^{++} (que es isoeléctrico con el zinc) fueron capaces de activar la enzima y prevenir la inhibición *in vitro* producida por el Pb^{++}. De acuerdo a estos resultados, los autores propusieron que la activación o inhibición del ALA-D por iones metálicos, se debe a una interacción del

catión con una base de Lewis blanda de la enzima, como lo sería por ejemplo un grupo sulfhidrilo.

En médula ósea de ratas, Dresner *et al.,* (1982) hallaron que el Cd^{++}, a una concentración 5 x 10^{-6} M producía una inhibición del 47% y no revertía la inhibición por Pb, sino que por el contrario, tenía una acción sinérgica. Cu^{++}, Mn^{++}, Fe^{++} y Au^{++} también fueron inhibitorios, el Zn^{++} logró revertir la inhibición por Cd^{++} y Pb^{++}. Dado que el ditiotreitol (DTT) lograba reactivar la inhibición producida por el Cd y el Cu pero no la de Au^{++} y Mn^{++}, postularon que la reactividad de los mismos ocurre en sitios diferentes, siendo la de Cd^{++} y Cu^{++} a nivel de los grupos -SH.

En la enzima de hígado bovino, se había reportado inicialmente un contenido significativo de Cu^{++} (Iodice *et al*., 1958), pero años más tarde, Gurba *et al*. (1972) hallaron que la enzima purificada contenía cantidades estequiométricas de zinc en una relación de un zinc por mol de enzima, y pequeñas cantidades no estequiométricas de Fe^{++} y Co^{++}. Dado que encontraron entre 6 y 7 sitios de bases de Schiff para el sustrato por mol de enzima, pero un solo Zn^{++}, los autores sugirieron la posibilidad de reacciones parciales catalizadas por el ALA-D, una de las cuales requiere los 6-7 sitios de unión de bases de Schiff, y otras, como podría ser la eliminación de agua, que requiere un Zn^{++} por mol de enzima; o que alternativamente, el Zn^{++} podría tener un rol estructural lejos del sitio activo.

Para Cheh & Neilands (1973) en cambio, el contenido de Zn^{++} era de 0,5 a 2,0 átomo-gramos de Zn^{++} por mol de enzima, y prepararon una apoenzima que contenía menos del 10% del Zn^{++} inicialmente presente y con una actividad casi nula. La enzima nativa con 1,2 Zn^{++} por mol, tenía un 85% de la máxima actividad observada, luego de la saturación por Zn^{++}, que se lograba con 5 a 6 átomo-gramos de Zn^{++} por mol. La actividad también se recuperó con Cd, en cambio Co y Mn restauraron menos del 20% mientras que Ni^{++}, Fe^{++} y Fe^{+++} , Cu^{+} y Cu^{++}, Mn^{++}, Ca^{++} y Cr^{++} no fueron efectivos. Los autores consideraron que la enzima tiene un requerimiento absoluto por el Zn^{++}, describiéndola como una metaloenzima atípica que pierde Zn^{++} durante el curso de la purificación.

Wilson *et al.* (1972) hallaron que el Pb^{++} es un inhibidor no competitivo y que el Zn^{++} es el único metal capaz de revertir la inhibición por EDTA, pero que a concentraciones superiores a 1 mM actúa como un inhibidor competitivo, además del Zn^{++} ensayaron

Fe^{++}, Cu^{++}, Mg^{++} y Ca^{++}, que no fueron efectivos. El Cd^{++} presentó un comportamiento particular ya que a concentraciones de sustrato por debajo de la saturación era inhibitorio, en cambio a concentraciones de sustrato saturantes, era activante.

Tsukamoto *et al.* (1979, 1980) purificaron ALA-D de hígado bovino en presencia de Zn^{++} y DTT y hallaron que contenía un átomo de Zn^{++} por subunidad de 33 kDa, teniendo en ese caso un máximo de actividad. Sugirieron que el Zn^{++} no es absolutamente esencial para la catálisis, pero este metal sería necesario para prevenir la autooxidación de los sulfhidrilos. La modificación de los grupos sulfhidrilos por oxidación con aire, reacción con DTNB o 1,3-dibromoacetona, o formación de mercapturos con metales pesados como el plomo, producía una disminución de la actividad enzimática con la liberación simultánea de Zn^{++}. A su vez, por fotooxidación, se destruyeron residuos histidina esenciales para la actividad (Tsukamoto *et al.* 1975), lo que produjo una pérdida concomitante de Zn^{++} (Tsukamoto *et al.*, 1979), necesitando la apoenzima oxidada de un activador tiólico para incorporar el zinc. Estos resultados sugieren que el zinc interacciona con los grupos SH esenciales de mayor reactividad frente al oxígeno o al DTNB, coordinándose también con los residuos histidina.

Bevan *et al.* (1980) a su vez, hallaron que con 4 átomos de Zn^{++} por octámero, la enzima era completamente activa, y para estos autores, a diferencia de lo propuesto por los autores antes mencionados, el Zn^{++} es absolutamente necesario, sugiriendo que la actividad presente en la apoenzima reducida se debía a una contaminación de Zn^{++} en los reactivos. Sin·embargo, sí estaban de acuerdo con los resultados de Tsukamoto *et al.* (1979) en que los grupos -SH de la enzima debían estar reducidos, para que el Zn^{++} interaccione. Analizando el contenido de Zn^{++} de varias preparaciones enzimáticas, encontraron en promedio 2 átomo-gramos de Zn^{++} por octámero. Los intentos por reactivar la apo-ALA-D con otros iones metálicos tales como Ag^{+}, Ca^{++}, Co^{++}, Cu^{+}, Mg^{++} Mn^{++}, Pb^{++}, Al^{+++} fueron infructuosos; sólo el Cd^{++} logró una máxima estimulación de la actividad enzimática con 4 átomo-gramos de Cd^{++} por mol. Los estudios de unión indicaron que el Zn^{++} no se requiere para la unión del sustrato a la enzima, aunque es probable que esté localizado en el sitio activo y cumpla un rol en la catálisis.

Por su parte, Gibbs & Jordan (1981) investigaron la unión ^{65}Zn-apoenzima, encontrando una incorporación de 8 átomos de Zn^{++} por octámero. La incubación de la ^{65}Zn-holoenzima a temperatura ambiente en anaerobiosis no liberaba la marca, pero

había un intercambio si se agregaba Zn^{++} frío. El Cd^{++} (que se había reportado como un metal alternativo del Zn^{++}) y el Pb desplazaban la marcación pero metales como el Mg^{++} que no activan ni inhiben a la enzima, no tenían ese efecto. Al tratar la enzima con DTNB o exponerla al oxígeno, se observaba una liberación de ^{65}Zn.

A diferencia de lo expuesto anteriormente, Sommer y Beyersman (1984) aislaron la enzima de hígado bovino sin el agregado de metales, y observaron que el contenido de Zn^{++} por masa proteica aumentaba durante el curso de la purificación, sin llegar a tener una relación estequiométrica. Una concentración de Zn 10^{-5} M produjo activación, concentraciones mayores fueron inhibitorias. Utilizando la técnica de equilibrio de diálisis, hallaron una relación de 7,4 átomos de Zn^{++} por octámero, y 17 sitios adicionales de unión inespecífica, que estarían relacionados con la inhibición observada a altas concentraciones de Zn^{++}. La enzima sin Zn^{++}, lograba reactivarse con Cd^{++}, y el sitio del sustrato, del Zn^{++} y de los grupos -SH esenciales se encontrarían en estrecha proximidad en el sitio activo de la enzima (Beyersmann y Cox, 1984)

Jaffe *et al.* (1984) modificaron la enzima en sus grupos tioles por tratamiento con el reactivo MMTS, observando que se liberaba el Zn^{++} unido, dando lugar a una apoenzima catalíticamente inactiva, conteniendo menos de 0,1 átomo-gramos de Zn^{++} por mol de octámero; pudieron reconstituir completamente su actividad con β-Me y Zn^{++} . También ensayaron reconstituir y/o reactivar la apoenzima modificada con MMTS, con Cd^{++}, Va^{++}, Ni^{++}, Co^{++}, Pb^{++} y Mn^{++}, pero sólo lo lograron con el Cd^{++}. Estabilizaron la base de Schiff formada entre la enzima y una de las moléculas del sustrato ([4-^{14}C] ALA) con $NaBH_4$, en la holoenzima activa, la apoenzima inactiva y la apoenzima modificada con MMTS, también inactiva, y encontraron una marcación correspondiente a 2,3; 3,5-4,0, y 3,4 bases de Schiff por octámero de holoenzima, apoenzima, y apoenzima modificada con MMTS, respectivamente. Los resultados son consistentes con cuatro sitios activos por octámero, o reactividad de mitad de sitios y sugieren además que la formación de la base de Schiff entre el sustrato y la enzima no requiere Zn^{++} ni grupos -SH reducidos (Jaffe & Hanes, 1986). Por un lado coincidieron con Bevan *et al.* (1980) en que 4 Zn^{++} por octámero son necesarios para una actividad catalítica completa, siendo el Zn^{++} absolutamente esencial, y por otro, con Tsukamoto *et al.* (1979, 1980) en que la holoenzima aislada en presencia de Zn^{++} contiene 8 átomos por octámero, por lo que sugirieron que los cuatro sitios de unión adicionales no serían importantes en la catálisis.

Un estudio del efecto de los iones metálicos sobre la reactividad de los grupos sulfhidrilos del ALA-D de eritrocitos humanos, empleando la técnica de medición de cinética rápida por detención de flujo, reveló que la remoción del zinc aumentaba la reactividad de los grupos sulfhidrilos altamente reactivos, los que en cambio no son afectados por la presencia de Pb^{++}, por lo que ambos metales interactuarían en sitios diferentes (Gibbs *et al.*, 1985b). Esto estaría apoyado además por el hecho de que a altas concentraciones, el Zn^{++} inhibe, sugiriendo entonces que primero ocuparía su propio sitio y luego al aumentar la concentración, un segundo sitio que probablemente es el mismo al que se une el plomo. El sustrato o su análogo, el ácido levulínico, o el producto PBG, no afectan la reactividad de la enzima frente al 5-5´ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), por lo que consideraron que el Zn^{++} participa en forma estructural y no catalítica. También observaron que la protección del Zn^{++} frente al DTNB es instantánea, lo que sugiere una interacción directa del metal con los grupos sulfhidrilos de tipo I. Como el Zn^{++} también protege de la inactivación por oxígeno, en ausencia de tioles exógenos, debe tener un rol crítico en mantener el residuo sulfhidrilo esencial reducido. Estos resultados confirman lo hallado por Tsukamoto *et al.* (1979) y Bevan *et al.* (1980).

Hasnain *et al.* (1985) investigaron la coordinación del Zn^{++} en el ALA-D mediante el estudio de la estructura fina por Rayos X (exafs), en una muestra que contenía un átomo de Zn^{++} por subunidad de 35 kDa. Hallaron que en la enzima nativa, el Zn^{++} se coordina con cuatro ligandos: tres azufres y un átomo de bajo Z, que podría ser oxígeno o nitrógeno. Al oxidarse, la enzima sigue coordinada a tres azufres y a un nitrógeno, además de un átomo de bajo Z, probablemente un nitrógeno.

El ácido 2,bromo-3-(5-imidazoil)propiónico produjo cambios significativos en el exafs, consistentes con una coordinación con tres átomos de azufre, un nitrógeno y otro nitrógeno que sería del inhibidor. La unión del sustrato a la enzima oxidada inactiva, induce un ligero cambio en el entorno del Zn^{++}, donde además de los cinco ligandos. coordinados en la enzima oxidada, estaría presente un sexto átomo de bajo Z. Si bien el método no pudo detectar si el Zn^{++} está en contacto directo con un oxígeno del ALA, los autores se inclinan por considerar que no hay una unión directa del metal al sustrato en acuerdo con los hallazgos de Bevan *et al.* (1980), de que el análogo del sustrato, el ácido levulínico, puede unirse a la apoenzima libre de Zn^{++}, y a los de Sommer & Beyersmann

(1984) de que los iones Zn^{++} tienen una influencia limitada sobre la saturación de la enzima (la diferencia de Km entre la apo y la holoenzima es de 60 veces a favor de esta última, en tanto que la V_{max} sólo se duplica) y de que aniones tales como el cianuro no la inhiben. Los resultados son compatibles con la idea de que el sitio del Zn^{++} y el del azufre están en el mismo dominio, y en apoyo a ello, la inhibición por el ácido 2-bromo-3-(5-imidazoil)propiónico es función del contenido de Zn^{++} de la enzima, y esa inhibición es prevenida por la unión del ALA (Beyersmann & Cox, 1984). Para Hasnain *et al.* (1985) entonces el Zn^{++} tiene un rol estructural, permitiendo a la enzima adoptar la conformación requerida para la actividad, sin unirse o activar al sustrato directamente.

Analizando el rol del Zn^{++} en la catálisis de la enzima bovina, Dent *et al.* (1990) sugirieron la existencia de dos posibles sitios para la unión del zinc: uno importante para la actividad catalítica, y otro que estabiliza la proteína y la protege de la desnaturalización. El sitio catalítico involucraría 2-3 residuos histidina, 1-2 aspartatos y/o tirosina o agua, y una cisteína coordinada al Zn^{++}. Para el segundo sitio, 4 cisteínas proveen los puntos de coordinación.

Se encontró una gran similitud entre la enzima de *E. coli* y la de hígado bovino, en lo que se refiere a requerimientos de zinc y de grupos SH libres, inhibición por o-fenantrolina, estabilidad térmica, así como en los espectros ^{13}C-RMN de las enzimas unidas a [3,5-^{13}C]PBG, de donde se deduce que la enzima de bacterias y mamíferos funcionan mediante un mecanismo similar. A pesar de que ALA-D de *Escherichia coli* no contiene sitios de unión para Mg^{++} como ocurre en guisantes (Boese *et al.*, 1991) este ion produce una estimulación de la Zn-enzima de *E. coli*, lo que no ocurre con la enzima de origen bovino.

Basados en estudios realizados sobre el ALA-D de distintas fuentes se ha asignado al catión metálico divalente una variedad de diferentes roles que afectan tanto la estructura como la actividad de la proteína. Estas enzimas se han clasificado en cuatro tipos (I-IV) según el número de Zn^{++} y/o Mg^{++} que se unen en tres sitios de unión de metal diferentes A, B, y C (Jaffe, 2000). En *Bradyrhizobium japonicum* se purificó y se caracterizó la enzima en un sistema de sobreexpresión en *Escherichia coli* (Chauhan & O'Brian, 1995). En este organismo, la enzima representa una nueva clase de proteína ALA-D tipo IV, que utiliza un Mg^{++} catalítico presente en una estequiometría de 4/octámero (MgA), un Mg^{++} alostérico presente en una estequiometría de 8/octámero

(MgC), y un ión metálico monovalente, que sería el K^+, pero no estaría presente el MgB, que sí se encontró en otras ALA-Ds, además de haber perdido un ZnA catalítico. Sin embargo, puede unir Zn^{++} presumiblemente como ZnA, con una estequiometría de 4/octámero con un Kd de 200 µM; concentración muy elevada que carece de sentido fisiológico (Petrovich *et al.*, 1996).

Por espectroscopía de absorción atómica, se encontró que la enzima de *Pseudomonas aeruginosa* une sólo cuatro iones Mg^{++} por octámero, los que estimulan alostéricamente una actividad catalítica independiente de ión metálico. De acuerdo a ello, ALA-D de *Ps. aeruginosa* representaría un nuevo tipo V de enzima que tiene la capacidad de sintetizar PBG de manera independiente del ion metálico (Frankenberg *et al.*, 1999).

La secuencia proteica de ALA-D contiene una región de unión a metal que se ha postulado determina un uso catalítico exclusivo ya sea de Zn^{++} o de Mg^{++}, y también posiblemente K^+. Esa secuencia es DXCXCX(Y/F)X(3)G(H/Q)CG ; en algunas ALA-Ds las cisteínas de dicha secuencia unen un zinc catalítico, en otras, la secuencia es DXALDX(Y/F)X(3)G(H/Q)DG y se ha postulado que los residuos aspárticos unen Mg^{++} y/o K^+ esencial para la catálisis.

Se prepararon proteínas quiméricas en las que se incorporaron secuencias de ALA-D de guisante y de *Ps. aeruginosa* ricas en aspartato, en el sitio en que ocurre naturalmente la secuencia rica en cisteína en la enzima humana. Se encontró que esas proteínas quiméricas presentan actividades específicas significativamente menores que la enzima humana, y son activadas sustancialmente por Mg^{++} y K^+, pero no por Zn^{++}. Una mutación de la Arg 221 por lisina redujo la actividad de ambas enzimas (Jaffe, 2003).

Jaffe (2003) analizó la utilización de metales en esta enzima, desde archaea a eucarya, encontrando que todas las ALA-Ds contienen una secuencia de unión a metal en el sitio activo; .aquellas ALA-Ds que no requieren Zn^{++}, utilizan Mg^{++} y/o K^+. Mediante mutagénesis sitio-dirigida, se transformó la enzima Zn^{++}–independiente de *Ps. aeruginosa*, en una enzima Zn^{++}-dependiente, y se la comparó con la enzima Zn^{++} de *E. coli*. Los resultados permitieron a los autores sugerir una potencial transformación evolutiva desde una enzima no dependiente a una enzima dependiente de Zn^{++} (Frere *et*

al. 2005), relacionada con el pasaje de una atmósfera anaerobia a una aeróbica y la aparición de la fotosíntesis.

En las enzimas provenientes de animales, hongos, archae y algunas bacterias, que representan cerca de la mitad de las ALA-D que conformaban las bases de datos, se encuentra un Zn^{++} esencial en el sitio catalítico, que sería crucial en la unión y reactividad de la molécula de ALA que da origen en el PBG al residuo acetilo (sitio A) y determina el valor de Km. Respecto de las que no utilizan Zn^{++}, algunas usarían un catión monovalente en el sitio activo, otras podrían usar Mg^{++} y otras ningún catión. Por otro lado existe un sitio de unión alostérico para Mg^{++} que no intervendría directamente en la catálisis sino que modularía la actividad afectando la movilidad de la "tapa" del sitio activo (Jaffe, 2004).

II.2.6. Mecanismo

La formación de PBG a partir de dos moléculas de ALA es esencialmente una síntesis de Knorr, en la que están involucradas tres reacciones diferentes: a) una condensación aldólica, b) la eliminación de una molécula de agua entre el átomo de carbono que lleva el nuevo grupo hidroxilo formado y un átomo de carbono adyacente y c) la formación de una base de Schiff por eliminación de otra molécula de agua entre el carbonilo de una molécula de ALA y el amino de la otra.

La reacción total requiere la ruptura y formación de por lo menos ocho uniones, y como se ve en la Figura II.1 una molécula de ALA aporta la cadena propiónica de PBG (sitio P) con su nitrógeno amino incorporado en el anillo pirrólico, y la otra molécula de sustrato aporta la cadena acetilo (sitio A) reteniendo el grupo amino libre.

Nandi & Shemin (1968) demostraron la formación de pirroles heterólogos entre el levulínico y su éster, y el ALA. Estos autores propusieron que la molécula de ALA que va a dar lugar a la cadena acética del PBG es la que se une en primer lugar a la proteína a través de una unión base de Schiff (sitio A) con el grupo ε-amino de un residuo lisina, en tanto que la segunda molécula de sustrato, que va a formar la cadena propiónica, se ubica en el sitio P.

Jordan & Seehra (1980), empleando espectroscopia RMN con ^{13}C y medición de cinética rápida por el método de detención de flujo, consideraron que el orden de adición de las moléculas de ALA en la enzima era inverso.

Tsukamoto *et al.* (1975) establecieron que dos residuos histidina y dos residuos cisteína (Gore *et al.*, 1976; Shemin, 1976; Barnard *et al.*, 1977) son esenciales para la actividad.

Barnard *et al.* (1977) propusieron que esos grupos podían participar en una catálisis ácido/base, proponiendo entonces un mecanismo que tuvo en cuenta esos hechos, en el cual ocurren una serie de protonaciones-desprotonaciones a través de grupos tioles y regeneración del estado inicial mediado por el sistema imidazólico del residuo histidina.

Experiencias realizadas en los laboratorios de Shemin, mostraron que sólo 4 de las 8 subunidades octaméricas unen las moléculas de sustrato, sugiriendo que la enzima exhibe una reactividad de mitad de sitios.

Estudios de disociación y reasociación de ALA-D de hígado bovino inmovilizada sobre Sepharosa (Batlle *et al.*, 1978), parecieron indicar que si bien cada subunidad octamérica contiene un sitio catalítico, la mínima unidad funcional sería la conformación dimérica, en la cual, ambas subunidades si bien de idéntica composición, tendrían sin embargo un rol diferente en la síntesis de PBG. Teniendo en cuenta ésto, Batlle & Stella (1978), en un esquema que respeta los lineamientos básicos propuestos por Shemin (1968), pero que introduce las características mencionadas, propusieron un mecanismo en el cual una subunidad forma una base de Schiff con una molécula de ALA, mientras una segunda subunidad está involucrada en una unión no covalente con la otra molécula de sustrato. Las autoras sugirieron que entre ambas subunidades podrían existir sitios de contacto en los que están involucrados distintos tipos de interacciones, entre los que se incluyen la posibilidad de grupos tioles y no descartan la acción de iones metálicos tales como el Zn^{++}. En este esquema también se tuvo muy en cuenta la participación de un residuo histidina en lugar de los grupos tioles en cada subunidad, que jugaría un rol importante en el proceso de transporte de protones desde y hacia una región hidrofóbica a una hidrofílica, durante la secuencia de reacciones que llevan a la formación del PBG, y que implican una serie de protonaciones y desprotonaciones.

A su vez, Tsukamoto *et al.* (1979) obtuvieron una apoenzima libre de Zn^{++} que presentaba la misma actividad que la holoenzima mientras tuviera dos grupos tioles esenciales reducidos; la apoenzima oxidada y la holoenzima con el Zn^{++} sustituído por Pb^{++}, eran inactivas. Sugirieron entonces, una estrecha correlación entre un átomo de Zn^{++}, dos residuos cisteína adyacentes y dos residuos histidina, asignando al Zn^{++} un rol

protector de los grupos tioles esenciales de la autooxidación, presumiblemente coordinándose a uno de los grupos sulfhidrilos vecinales, evitando así la formación de una unión disulfuro. Esta hipótesis está apoyada por la observación de que cuando se elimina el Zn^{++} tiene lugar una rápida formación de una unión disulfuro. En el mecanismo de acción propuesto por Tsukamoto *et al.* (1980), un grupo imidazol de un residuo histidina en el sitio activo participa en la catálisis ácido-base favoreciendo la formación de un carbanión sobre una primera molécula de ALA. En un segundo paso, el grupo sulfhidrilo esencial que se encuentra protonado a pH neutro, forma una unión puente de hidrógeno con el carboxilo de una segunda molécula de ALA facilitando su polarización; teniendo lugar luego el ataque nucleofílico del carbanión sobre el carbonilo.

Si bien para Bevan *et al.* (1980) el Zn^{++} no participa en la unión del sustrato ni tampoco en el mantenimiento de la estructura cuaternaria de la enzima, estudios de marcación por afinidad con ácido 2-bromo,3-(5-imidazoil) propiónico, que es un reactivo tiólico y de Zn^{++}, indicaron que el sitio del Zn^{++}, del sustrato y los grupos sulffhidrilos esenciales se encuentran en estrecha proximidad en el sitio activo (Beyersmann y Cox., 1984; Gibbs *et al.* 1985a).

Jaffe & Hanes (1986) emplearon una enzima modificada en sus grupos sulfhidrilos con MMTS, para estudiar las primeras etapas de la síntesis del PBG. Observaron que el borohidruro de sodio llevaba a la formación de una base de Schiff entre la enzima y el ^{14}C-ALA aún bajo condiciones en que no podría formarse el producto por falta de disponibilidad de Zn^{++} (ya que este metal no podia unirse a la enzima) y que el intermediario también se formaba con la apoenzima modificada por MMTS. Mediante una espectroscopia RMN con ^{13}C, observaron al agregar ^{13}C-ALA a la holoenzima una señal que atribuyeron al PBG unido a la enzima (Jaffe & Markham, 1987). Para el conjunto formado por interacción del ^{13}C-ALA y la apoenzima modificada con MMTS, que no puede formar producto, detectaron una señal que adjudicaron al sustrato unido por una base de Schiff. Si a ese complejo agregaban Cd^{++} y β-Me, obtenían un espectro que coincidía con el de la holoenzima, y que tenía además la señal correspondiente al PBG libre, lo que interpretaron como que se había logrado reconstituir a la holoenzima. Con estos resultados, Jaffe y sus colaboradores consideran que ni el Zn^{++} ni los grupos sulfhidrilos esenciales están involucrados en la etapa de formación de la base de Schiff. Para estos autores, la enzima tiene un absoluto requerimiento por Zn^{++}, siendo

necesarios los grupos sulfhidrilos reducidos para la formación del sitio de unión del metal.

En la enzima purificada a partir de hígado porcino, conteniendo 0,3 átomo-gramos de Zn/subunidad, el tratamiento con el reactivo dietilpirocarbonato (DEP) modifico tres residuos histidina/subunidad, con una pérdida completa de actividad cuando se modificaba el primer residuo, indicando la presencia de un residuo histidina esencial para la actividad catalítica de la enzima. Tanto el zinc como el sustrato ALA protegieron la enzima de la inactivación por el DEP en forma pH dependiente. Se ensayaron diferentes iones metálicos como Cd^{++}, Mn^{++}, Pb^{++}, Hg^{++}, Se^{++} y Sn^{++}, y ninguno de ellos protegió de la inactivación. Estos resultados sugieren que en el sitio activo de la enzima, el sitio de unión del Zn^{++} y el residuo histidina esencial para la actividad, se encuentran próximos, participando la histidina de una serie de protonaciones y desprotonaciones (Fukuda *et al.*, 1988).

La formación de la base de Schiff con al menos una de las moléculas de sustrato ocurriría con la intervención de al menos una de las lisinas del sitio activo. Se ha establecido que la primera interacción entre la enzima y las moléculas de sustrato ocurre con la molécula de ALA que origina el sitio P, a través del C4 formando una base de Schiff con la enzima. Este sitio de unión está filogenéticamente conservado y por análisis de la estructura de esta enzima se sabe que se encuentra ubicado más internamente en el sitio activo que el de unión del ALA que originará el sitio A en el PBG (Jaffe, 2004).

Estudios computacionales indicaron que el mecanismo en el cual la unión intersubstrato C-N se forma en primer lugar, tiene una barrera limitante de la velocidad menor que aquel en el cual se forma primero la unión intersubstrato C-C (17,5 kcal/mol frente a 22,8 kcal/mol) (Erdtman *et al.*, 2010).

Las subunidades que conforman el homooctámero de ALA-D, si bien idénticas, serían subunidades conformacionalmente heterogéneas en la estructura terciaria. Cuando la enzima se activa con un reductor e iones cinc, el Zn^{++} coordinado por la Cys 223 es transferido en el sitio activo y pasa a ser coordinado por Cys 122, Cys 124 y Cys 132 (Sawada *et al.*, 2005). Los cambios conformacionales producidos al reducir y activar con iones cinc, estudiados mediante ultracentrifugación analítica, microscopía electrónica y electroforesis, indican que el componente principal de la enzima es un octámero, y un porcentaje menor de hexámeros; la reducción y adición de un ión Zn^{++} produce una

activación de la enzima con cambios en el arreglo espacial de las subunidades, con un clivaje de la unión disulfuro entre las Cys122, 124 y 132 (Sawada *et al.*, 2011).

II.2.7. Ontogénesis y ALA-D

La actividad del ALA-D está estrechamente relacionada con la madurez general de un organismo, así como con el tipo de tejido y la maduración de sus células. Su actividad es máxima en eritroblastos, células que presentan una elevada síntesis de hemo. Como no posee mitocondrias, el eritrocito humano maduro no contiene las enzimas particuladas del camino del hemo, pero sí contiene las enzimas citoplasmáticas, entre las que se encuentra ALA-D. Como esas células son anucleadas y no hay por consiguiente síntesis de hemo, es probable que en ellas la enzima no tenga una importancia funcional.

La actividad de la enzima exhibe cambios marcados durante el desarrollo animal. En hígado fetal de ratones es elevada y decrece inmediatamente luego del nacimiento, volviendo a aumentar unas semanas después (Doyle & Schimke, 1969, Weissberg & Voytek, 1974). Es probable que estos cambios estén relacionados con la alta proporción de células eritroides en el hígado fetal.

De acuerdo a los análisis inmunológicos, la enzima fetal y adulta son antigénicamente indistinguibles, si bien la enzima fetal es, catalíticamente, más efectiva que la de adulto (Doyle & Schimke, 1969). Esto podría deberse a varias razones: la presencia de un activador, la formación de una estructura terciaria más efectiva, o alguna modificación en la estructura primaria que afecte la actividad catalítica pero no la antigénica.

En ratas adultas se ha encontrado una actividad de ALA-D reducida respecto de la de los animales más jóvenes. Inmediatamente luego del parto presentan una alta actividad, luego decrece durante el primer período de crecimiento, si bien es cuatro veces mayor que en individuos adultos. (Abdulla *et al.*, 1978).

También en humanos se ha encontrado que la actividad de la enzima es menor en los adultos. Se ha observado además una gran variación en los niveles de actividad de ALA-D eritrocitaria en la población humana, y habría un control genético de la sensibilidad de ALA-D compatible con una herencia autosómica dominante (Sassa *et al.*, 1973); por otra parte, la enzima presente en varios tejidos es producto de un mismo gen.

En plantas y otros organismos fotosintéticos la formación de PBG está controlada por la luz (Hovenkampp-Obbema *et al.*, 1974). Se ha descripto que la actividad de ALA-D aumenta durante el desarrollo de los cloroplastos cuando se produce una rápida acumulación de clorofila causada por la iluminación de plantas etioladas. Batlle *et al.* (1975) observaron en callos de soya un paralelismo entre el aumento de la actividad de la enzima y el incremento de clorofila cuando se pasaban los callos crecidos en oscuridad, a la luz. Efectos similares fueron observados en otros tejidos vegetales (Ebbon & Tait, 1969, Schneider, 1971).

En cotiledones de rábano, se observó luego del verdeo por iluminación continua durante dos días, el contenido total de clorofila permanece constante, pero la actividad de ALA-D comienza a decrecer, indicando un sistema regulatorio de la enzima, que estaría relacionada con la regulación de la síntesis de clorofila (Shibata & Ochiai, 1976). El aumento de la actividad de ALA-D bajo la influencia de la luz se debería a una síntesis de la enzima regulada por la luz, más que por la activación de la enzima pre-existente. En los cotiledones de rábano, se encontró que la luz roja lejana estimulaba la síntesis de *novo del ALA-D* (Huault *et al.,* 1984).

II.2.8. ALA-D y el camino de biosíntesis de hemo

Se acepta en general que ALA-D no es una enzima limitante en la síntesis de hemo. Su actividad en la mayoría de los tejidos es mucho más alta que la de la enzima limitante, ALA-S. Comparada con las otras enzimas del camino, ALA-D posee una actividad y cantidad elevadas, de manera tal que es necesaria una muy profunda inhibición para que afecte significativamente la producción de hemo. Esto último se ha encontrado en algunos individuos donde la actividad del ALA-D eritrocitaria y de médula ósea se encuentra severamente afectada, siendo de sólo un 13% respecto de los valores normales. Como presentan un aumento de la excreción urinaria de ALA y síntomas clínicos neurológicos típicos de una PAI, se la denominó nueva porfiria aguda (NPA) (Doss *et al.*, 1979, 1980).

En algunos pocos organismos se ha propuesto que esta enzima podría estar cumpliendo una función regulatoria: *Sacharomyces cerevisiae* (Barreiro, 1967), *Neurospora. crassa* (Muthukrishnan *et al.*, 1972)*, Propionibacterium shermanii* (Menon & Shemin, 1967), *Euglena. gracilis* (Ebon & Tait, 1969). En *E. gracilis*, se reportó que tanto

in vivo como *in vitro*, Copro III, Proto IX y hemina, junto con los correspondientes porfirinógenos, inhibían la enzima, siendo su efecto mayor *in vitro* (Stella, 1977).

Nandi *et al.* (1968) la propusieron como un segundo punto de regulación en la síntesis de tetrapirroles en *Rp. spheroides*, donde presentó características alostéricas y fue inhibida por Proto y hemina.

II.2.9. ALA-D y plomo

Las primeras evidencias acerca de un efecto inhibitorio directo del Pb^{++} sobre el ALA-D *in vitro,* fueron descriptas por Gibson *et al.* (1955) y Dressel & Falk (1956). Unos años más tarde, Lichtman & Feldman (1963) demostraron que la actividad enzimática en eritrocitos de pacientes intoxicados por Pb, estaba disminuída.

Se ha encontrado que para un amplio rango de concentración de Pb^{++} en sangre existe una correlación negativa entre la actividad de ALA-D y los niveles de Pb^{++} (*et al.*, 1968; Hernberg & Nikkanen ,1970; Batlle *et al.*, 1987). La sensibilidad de la actividad de la enzima frente a un contaminante ambiental como lo es el plomo, llevó a muchos autores a postular la medición de ALA-D en eritrocitos humanos, como biomarcador de exposición a dicho metal. Así por ejemplo se ha evaluado los niveles de plomo en niños mediante la medición de la actividad de enzimas, entre ellas ALA-D (Martinez *et al.*, 2013).

Mediante técnicas de radioinmunoensayo, Fujita *et al.* (1981, 1982) determinaron que en las intoxicaciones por plomo hay un aumento en la cantidad de ALA-D eritrocitaria, probablemente como respuesta a un aumento en la síntesis de la enzima en las células de la médula ósea durante la exposición al metal.

La actividad disminuída de ALA-D puede recuperarse *in vivo* por tratamiento con GSH (Lichtman & Feldman, 1963), cisteína (Heilmeyer, 1966), DTT (Granick *et al.*, 1973); Zn^{++} (Finelli *et al.*, 1975, Haeger-Aronsen & Schütz, 1976), Zn^{++} y GSH (Mitchell *et al.*, 1977), Zn^{++} y DTT (Sakai *et al.*, 1981), calentamiento de los hemolizados (Chiba, 1976).

Mediante la producción de mutantes de la enzima humana que carecían de los sitios de unión para el Zn A, predominantemente unido a través de ligandos sin SH, o el Zn B unido principalmente mediante ligandos SH, se demostró que la variante que carece del sitio de unión para el Zn B era mucho menos activa que la enzima nativa. Por otro lado se demostró que si bien el Pb^{++} interactuaba con ambos tipos de ligandos para

Zn^{++}, lo hacía preferencialmente con los ligandos del Zn B.(Jaffe *et al.*, 2001) La arquitectura poco usual formada por las Cys 122, Cys 124 y Cys 132 como ligandos del Zn^{++} en el sitio de unión del ALA que genera el residuo A en el PBG, hace del ALA-D un blanco primario para la inhibición por Pb^{++} que posee una coordinación estereoquímica inusual (Jaffe, 2004).

Algunos autores han propuesto que el genotipo del ALA-D puede modificar la toxicidad por el plomo (Shaik & Jamil, 2008; Sobin *et al.*, 2009), así por ejemplo, según Tian *et al.* (2013) el genotipo de ALA-D modifica la toxicocinética y la toxicodinamia de la contaminación por plomo.

II.2.10. Secuencia y estructura. Alosterismo

La enzima ALA-D es altamente conservada respecto tanto de su secuencia como de su estructura. Las más distantes filogenéticamente poseen alrededor del 35% de homología. El sitio activo se encuentra en el centro de una estructura tipo barril αβ. Existe una zona móvil de la proteína que funciona como una tapa para el sitio activo que permite el acceso del solvente al mismo.

La estructura cristalina de la enzima nativa estudiada en variadas fuentes muestra que, a excepción de los aminoácidos ligandos del Zn^{++} catalítico presentes en la enzima de algunas especies y algunos residuos que constituyen la tapa móvil del sitio activo, los aminoácidos que constituyen el sitio activo del ALA-D son filogenéticamente invariantes. A pesar de esta conservación, la dicotomía que surge por los diferentes requerimientos por el Zn^{++} en la catálisis plantea una diversidad filogenética en su mecanismo de reacción (Jaffe, 2004).

Como parte del control de la síntesis de tetrapirroles, ALA-D desarrolló un mecanismo de regulación alostérico en el que intervienen diferentes ensambles multiméricos, de arquitecturas tan distintas que requieren disociarse como parte de la interconversión entre las especies activas e inactivas. Este novedoso aspecto ha llevado a definir un modelo de alosterismo de morfeinas. Esta regulación variable probablemente haya evolucionado como consecuencia de los diferentes entornos en los que se desarrollan los organismos y por la variación filogenética de la ubicación subcelular de la enzima, citosólica o particulada.

El ALA-D está codificada en un gen, y cada multímero está compuesto de múltiples copias de la misma proteína. Cada subunidad consiste en un dominio de barril αβ de 300 residuos, con su sitio activo situado en el centro del mismo y un dominio de 25 residuos ubicado en el extremo N-terminal. La transición entre la forma activa e inactiva de los multímeros se relaciona con la orientación del dominio barril αβ respecto del dominio de 25 residuos en el extremo N-terminal. Como muchas enzimas que poseen un barril αβ el acceso del sustrato al sitio activo está mediado por una tapa móvil en la misma subunidad; la regulación alostérica para el ALA-D podría describirse como las interacciones entre subunidades que estabilizan una conformación ordenada de esta tapa de acceso al sitio activo. En el multímero activo el residuo N-terminal de una subunidad interactúa con los barriles αβ de otras dos subunidades. Similarmente cada barril αβ lo hace con los residuos N-terminales de otras dos subunidades adyacentes. De esta forma la transición entre las formas activas e inactivas implican cambios conformacionales que afectan el tráfico de ligandos hacia dentro o fuera del sitio activo. La forma activa es un octámero mientras que la inactiva es un hexámero; la transición entre ellas requiere la disociación a un dímero, el cual existe en un equilibrio entre conformaciones, uno puede ensamblarse con el octámero y el otro con el hexámero (Jaffe & Lawrence, 2012).

II.3 REFERENCIAS

Anderson, P.M. & Desnick, R.J. (1979) "Purification and properties of delta-aminolevulinate dehydrase from human erythrocytes". J Biol Chem. **254** 6924-6930.

Barnard, G.F.; Itoh, R.; Hohberger, L.H & Shemin D. (1977) "Mechanism of porphobilinogen synthase. Possible role of essential thiol groups". J Biol Chem. **252**(24) 8965-8974

Barreiro, O.L. (1967) "5-aminolevulinate hydro-lyase from yeast. Isolation and purification". Biochim. Biophys Acta **139** 479-786

Batlle, A.M. & Stella, A.M. (1978) "Delta aminolaevulinate dehydratase: its mechanism of action". Int J Biochem. **9** 861-864.

Batlle, A.M; Ferramola, A.M. & Grinstein, M. (1967) "Purification and general properties of δ-aminolaevulate dehydratase from cow liver". Biochem J. **104** 244-249.

Batlle, A. Llambias, E.; Wider de Xlfra, E. & Tigier, H. (1975) "Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system XV. The effect of growth conditions". Int. J. Biochem. **6** 591–606.

Batlle, A.M.; Stella, A.M.; Ferramola, A.M.; Sopena, Y.; Xifra, E.A. & Sancovich, H.A. (1978) "Porphyrin biosynthesis-immobilized enzymes and ligands-X. A novel approach to the study of

the relationship between the quaternary structure of aminolaevulinate dehydratase and its activity". Int J Biochem. **9** 401-406.

Batlle, A.M.; Fukuda, H.; Parera, V.E.; Wider, E. & Stella, A.M. (1987) "In inherited porphyrias, lead intoxication is a toxogenetic disorder". Int J Biochem **19** 717-720.

Bevan, D.R.; Bodlaender, P. & Shemin, D. (1980) "Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn^{2+} for enzyme activity". J Biol Chem. **255** 2030-2035.

Beyersmann, D. & Cox, M. (1984) "Affinity labelling of 5-aminolevulinic acid dehydratase with 2-bromo-3-(5-imidazolyl)propionic acid". Biochim Biophys Acta. **788** 162-166.

Boese, Q.F.; Spano, A.J.; Li, J.M. & Timko, M.P. (1991) "Aminolevulinic acid dehydratase in pea (Pisum sativum L.). Identification of an unusual metal-binding domain in the plant enzyme". J Biol Chem**. 266** 17060-17066.

Bogorad, L. & Granick, S. (1953) *"*Protoporphyrin precursors produced by a *Chlorella mutant* ". J Biol Chem. **202**(2) 793–800 .

Bollivar, D.W.; Clauson, C.; Lighthall, R.; Forbes, S.; Kokona, B.; Fairman, R.; Kundrat, L.; & Jaffe, E.K. (2004) "*Rhodobacter capsulatus* porphobilinogen synthase, a high activity metal ion independent hexamer". BMC Biochem. **5** 17-24.

Burnham, B.F. & Lascelles J. (1963) "Control of porphyrin biosynthesis through a negative-feedback mechanism. Studies with preparations of d-aminolaevulate synthetase and d-aminolaevulate dehydratase from *Rhodopseudomonas spheroids*". Biochem. J. **87** 462–470

Calissano, P.; Cartasegna, C. & Bonsignore, D. (1966) "Effect of control of heme synthesis by a feed-back type of inhibition on human erythrocytic delta-aminolevulinic acid dehydratase". Boll Soc Ital Biol Sper. **42**(9):508-512

Chandrika, S.R. & Padmanaban, G. (1980) "Purification, properties and synthesis of delta-aminolaevulinate dehydratase from *Neurospora crassa*". Biochem J. **191** 29-36.

Chauhan, S. & O'Brian, M. R. (1995) "A *mutant Bradyrhizobium japonicum* delta-aminolevulinic acid dehydratase with an altered metal requirement functions in situ for tetrapyrrole synthesis in soybean root nodules". J. Biol. Chem. **270** 19823-19827

Cheh, A. & Neilands, J.B. (1973) "Zinc, an essential metal ion for beef liver delta-aminolevulinate dehydratase". Biochem Biophys Res Commun. **55** 1060-1063.

Chiba, M. (1976) "Activity of erythrocyte delta-aminolevulinic acid dehydrase and its change by heat treatment as indices of lead exposure". Br J Ind Med **33** 36-42.

Coleman, D.L. (1966) "Purification and properties of delta-aminolevulinate dehydratase from tissues of two strains of mice". J Biol Chem **241** 5511-5517

Collier, H.B. (1971) "A study of the determination of 5-aminolevulinate hydro-lyase (delta-aminolevulinate dehydratase) activity in hemolysates of human erythrocytes". Clin Biochem. **4** 222-232.

Cookson, G.H. & Rimington, C. (1953) "Porphobilinogen; chemical constitution". Nature. **171**(4359) 875-876.

Davis, J.R. & Avram, M.J. (1978) "A comparison of the stimulatory effects of cadmium and zinc on normal and lead-inhibited human erythrocytic delta-aminolevulinic acid dehydratase activity *in vitro"*. Toxicol Appl Pharmacol **44** 181-190.

Davis, J.R. & Avram, M.J. (1980) "Correlation of the physicochemical properties of metal ions with their activation and inhibition of human erythrocytic delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) *in vitro"*. Toxicol Appl Pharmacol. **55** 281-290.

De Barreiro, O.L.(1969) “Effect of sulphydryl groups on 5-aminolaevulinate dehydratase activity”. Biochim Biophys Acta. **178**(2) 412-415.

Dent, A.J,; Beyersmann, D.; Block, C. & Hasnain, S.S. (1990) “Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinate dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure”.. Biochemistry. **29**(34) 7822-7818.

Doss, M.;von Tiepermann, R.;Schneider, J. & Schmid, H. (1979) “New type of hepatic porphyria with porphobilinogen synthase defect and intermittent acute clinical manifestation”. Klin Wochenschr. **57**(20)1123-1127.

Doss, M.; von Tiepermann, R. &, Schneider, J. (1980) “Acute hepatic porphyria syndrome with porphobilinogen synthase defect“. Int J Biochem. **12**(5-6) 823-826.

Doyle, D. (1971) “Subunit structure of δ-aminolevulinate dehydratase from mouse liver”. J Biol Chem. **246** 4965-4972.

Doyle, D. & Schimke, R.T. (1969) “The genetic and developmental regulation of hepatic delta-aminolevulinate dehydratase in mice”. J Biol Chem. **244** 5449-5459.

Dresel, E.I. & Falk, J.E. (1953) “Conversion of δ-aminolaevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system”. Nature. **172** 1185.

Dresel, E.I. & Falk, J.E. (1956) “Studies on the biosynthesis of blood pigments. 5. Intermediates in haem biosynthesis“. Biochem J. **63**(3):388-95.

Dresner,D.L.; Ibrahim, N.G.; Mascarenhas, B.R. & Levere, R.D. (1982) “Modulation of bone marrow heme and protein synthesis by trace elements”. Environ Res. **28** 55-66.

Ebbon, J.G. & Tait, G.H. (1969) “Studies on S-adenosylmethionine-magnesium protoporphyrin methyltransferase in *Euglena gracilis* strain Z”. Biochem J. **111** 573-582.

Erdtman, E.; Bushnell, E.A.; Gauld, J.W. & Eriksson, L.A. (2010) “Computational insights into the mechanism of porphobilinogen synthase”. J Phys Chem B **114**(50):16860-16870

Finelli, V.N.; Murthy, L.; Peirano, W.B. & Petering, H.G. (1974) “Delta-aminolevulinate dehydratase, a zinc dependent enzyme”. Biochem Biophys Res Commun. **60** 1418-1424.

Finelli, V.N.; Klauder, D.S.; Karaffa, M.A. & Petering, H.G. (1975) “Interaction of zinc and lead on delta-aminolevulinate dehydratase”. Biochem Biophys Res Commun. **65** 303-312.

Frankenberg, N.; Heinz, D.W. & Jahn, D. (1999) “Production, purification, and characterization of a Mg2+-responsive porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa*”.Biochemistry. **38** 13968-13975.

Frère, F.; Reents, H.; Schubert, W.D.; Heinz, D.W. & Jahn, D. (2005) “Tracking the evolution of porphobilinogen synthase metal dependence *in vitro*”. J Mol Biol. **345** 1059-1070.

Fujita, H.; Orii, Y. & Sano, S. (1981) “Evidence of increased synthesis of delta-aminolevulinic acid dehydratase in experimental lead-poisoned rats”. Biochim Biophys Acta.; **678** 39-50.

Fujita, H.; Sato, K. & Sano, S. (1982) “Increase in the amount of erythrocyte delta-aminolevulinic acid dehydratase in workers with moderate lead exposure”. Int Arch Occup Environ Health. **50** 287-297.

Fukuda, H.; Paredes, S.R. & Batlle, A.M. del C. (1988). “Active site histidine in pig liver aminolevulinic acid dehyratase modified by ditethylpytocarbonate and protected by Zn^{2+} ions”. Comp Biochem Physiol **91** 285-291.

Gajdos, A. & Gajdos-Török M. (1955) “Porphyrin synthesis from 5-aminolevulinic acid by various rat organs”. C R Seances Soc Biol Fil. **149** 1932-1933.

Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1955) “Action of some inhibitors and activators on D-amino acid-levulin dehydrogenase”. C R Seances Soc Biol Fil.**149** 2138-2140.

Gajdos, A. & Gajdos-Torok, M. (1956) “Porphobilinogen metabolism. I. Synthesis of porphobilinogen; action of certain effectors”. Rev Fr Etud Clin Biol. **1** 966-972.

Gibbs, P. N. B. & Jordan, P. M. (1981) “-Aminolevulinate dehydratase: zinc-65 binding and exchange with the enzyme from human erythrocytes”. Biochem. Soc. Trans.**9** 232-233.

Gibbs, P.N.; Chaudhry, A.G. & Jordan, P.M. (1985a) “Purification and properties of 5-aminolaevulinate dehydratase from human erythrocytes”. Biochem J. **230** 25-34.

Gibbs, P.N.; Gore, M.G. & Jordan, P.M. (1985 b) “Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolaevulinate dehydratase”. Biochem J. **225** 573-580.

Gibson, K.D.; Neuberger, A. & Scott, J.J. (1954) “The enzymic conversion of delta-aminolaevulic acid to porphobilinogen”. Biochem J. **58** xli-xlii.

Gibson, K.D.; Neuberger, A. & Scott, J.J. (1955) “The purification and properties of delta-aminolaevulic acid dehydrase”. Biochem J. **61** 618-629.

Gore, M.G.; Jordan, P.M. & Chaudhry, A.G. (1976) “The resolution of two kinetically distinct types of 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)-titrating groups in 5-aminolaevulinate dehydratase from cow liver”. Biochem Soc Trans **4** 762

Granick S. (1954) “Enzymatic conversion of delta-amino levulinic acid to porphobilinogen”. Science. **120**(3131) 1105-1106.

Granick, S. (1961) “Magnesium protoporphyrin monoester and protoporphyrin monomethyl ester in chlorophyll biosynthesis”. J Biol Chem. **236** 1168-1172.

Granick, S. & Mauzerall, D. (1958).”Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting gamma-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen”. J Biol Chem. **232** 1119-1140.

Granick, J.L.; Sassa, S.; Granick, S.; Levere, R.D. & Kappas, A. (1973) “Studies in lead poisoning. II. Correlation between the ratio of activated to inactivated delta-aminolevulinic acid dehydratase of whole blood and the blood lead leve” I. Biochem Med. **8** 149-159

Gurba, P.E.; Sennett, R.E. & Kobes, R.D. (1972) “Studies on the mechanism of action of -aminolevulinate dehydratase from bovine and rat liver”. Arch Biochem Biophys **150** 130-136.

Gurne, D.; Chen, J. & Shemin, D. (1977) “Dissociation and reassociation of immobilized porphobilinogen synthase: use of immobilized subunits for enzyme isolation”. Proc Natl Acad Sci U S A. **74** 1383-1387.

Haeger-Aronsen, B. & Schütz, A. (1976) “Antagonistic effect *in vivo* of zinc on inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase by lead”. Arch Environ Health. **31** 215-220.

Hasnain, S.S.; Wardell, E.M.; Garner, C.D.; Schlösser, M. & Beyersmann, D. (1985) “Extended-X-ray-absorption-fine-structure investigations of zinc in 5-aminolaevulinate dehydratase”.Biochem J. **230** 625-33

Heilmeyer L. (1966) “On erythropoietic porphyria” Wien Med Wochenschr. **116(1)** 12-17

Hernberg, S.; Nikkanen, J.; Mellin, G. & Lilius, H. (1970) “Delta-aminolevulinic acid dehydrase as a measure of lead exposure”. Arch Environ Health. **21**(2) 140-145

Ho, Y.K. & Lascelles, J. (1971) “5-aminolevulinic acid dehydratase of *Spirillum itersonii* and the regulation of tetrapyrrole synthesis”. Arch Biochem Biophys **144**(2) 734-740.

Hovenkamp-Obbema, R.; Moorman, A & Stegwee, D (1974) “Aminolebulinate dehydratase in greening cells of *Euglena gracilis*”. Z. Pflanzenphysiol. **72** 277-286

Huault,C.; Bruyant, P. & Balange, A.P. (1984) “Stimulation par la lumiere rouge lointain de la synthese de la 6-aminolevulinate deshydratase des cotyledons de radis”. Physiol Plant **81**: 469-473.

Jaffe, E. K. (2000) “The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes“. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. **56** 115-128.

Jaffe, E.K. (2003) “Investigations on the metal switch region of human porphobilinogen synthase”. J Biol Inorg Chem. **8**(1-2) 176-184.

Jaffe, E.K. (2004) “The porphobilinogen synthase catalyzed reaction mechanism”. Bioorg Chem. **32**(5):316-325. Review.

Jaffe, E.K. (2013) “Impact of quaternary structure dynamics on allosteric drug discovery”. Curr Top Med Chem. **13**(1) 55-63.

Jaffe, E.K. & Hanes, D. (1986) “Dissection of the early steps in the porphobilinogen synthase catalyzed reaction”. Requirements for Schiff's base formation”. J Biol Chem. **261**(20):9348-53.

Jaffe, E.K. & Markham, G.D. (1987) “^{13}C NMR studies of porphobilinogen synthase: observation of intermediates bound to a 280,000-dalton protein”. Biochemistry. **26**(14) 4258-4264.

Jaffe, E.K. & Lawrence, S.H. (2012) “Allostery and the dynamic oligomerization of porphobilinogen synthase”. Arch Biochem Biophys. **519**(2) 144-153.

Jaffe, E.K.; Salowe, S.P.; Chen, N.T. & DeHaven, P.A. (1984) “Porphobilinogen synthase modification with methylmethanethiosulfonate. A protocol for the investigation of metalloproteins”. J Biol Chem. **259**(8) 5032-5036.

Jaffe, E.K.; Martins, J.; Li, J.; Kervinen, J. & Dunbrack, R.L. Jr. (2001) “The molecular mechanism of lead inhibition of human porphobilinogen synthase”. J Biol Chem. **276**(2):1531-7.

Jordan, P.M. & Seehra JS. (1980) “13C NMR as a probe for the study of enzyme-catalysed reactions: mechanism of action of 5-aminolevulinic acid dehydratase”. FEBS Lett. **114**(2) 283-286.

Jordan, P.M. & Seehra, J.S. (1986) “Purification of porphobilinogen synthase from bovine liver”. Methods Enzymol. **123** 427-434.

Kennard, O. (1953) “X-ray crystallographic determination of molecular weight”. Nature **171**(4359) 876-877.

Komai, H. & Neilands, J.B. (1968) “Effect of zinc ions on delta-aminolevulinate dehydratase in *Ustilago sphaerogena*”. Arch Biochem Biophys. **124**(1) 456-461.

Komai, H. & Neilands, J.B. (1969) “The metalloprotein nature of *Ustilago* delta-aminolevulinate dehydratase”. Biochim Biophys Acta **171**(2) 311-312.

Kreutzer, M.; Schmidt, M.; Stadler, E. & Zeitler, H.J. (1977) “Purification and characterization of animal porphobilinogen synthases”. I. Bovine liver porphobilinogen synthase”. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. **358**(9) 1081-91.

Lartillot, S. & Baron, C. (1967) “Specificity of *Rhodopseudomonas spheroides* delta-aminolevulinate-dehydratase with respect to aminoacetoacids related to delta-aminolevulinic acid. Study of inhibition by these compounds”. Bull Soc Chim Biol (Paris) **49**(1) 81-87.

Lichtman, H.C. & Feldman, F. (1963) “*In vitro* pyrrole and porphyrin synthesis in lead poisoning and iron deficiency”. J Clin Invest. **42** 830-839.

Liedgens, W.; Grützmann, R.; Schneider, H.A. (1980) “Highly efficient purificaton of the labile plant enzyme 5-aminolevulinate dehydratase (EC 4.2.1.24) by means of monoclonal antibodies”. Z Naturforsch C. **35**(11-12) 958-962.

Liedgens, W.; Lütz, C. & Schneider, H.A. (1983) “Molecular properties of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Spinacia oleracea*”. Eu. J.Bioch. **135** 75–79

Martínez, S.A.; Simonella, L.; Hansen, C.; Rivolta, S.; Cancela, L.M. & Virgolini, M.B. (2013). “Blood lead levels and enzymatic biomarkers of environmental lead exposure in children in Cordoba, Argentina, after the ban of leaded gasoline”. Hum Exp Toxicol. **32**(5) 449-463

Menon, I.A. & Shemin, D. (1967) “Concurrent decrease of enzymic activities concerned with the synthesis of coenzyme B 12 and of propionic acid in propionibacteria”. Arch Biochem Biophys. **121**(2) 304-310.

Markham,G.D.; Myers,C.B.; Volin,M. &Jaffe, E.K. (1993) “Spatial proximity and sequence localization of the reactive sulfhydryls of porphobilinogen synthase”. Protein Sci. **2**(1): 71–79

Meredith, P.A.; Moore, M.R. & Goldberg, A. (1977) “Effects of aluminium, lead and zinc on delta-aminolaevulinic acid dehydratase”. Enzyme. **22**(1) 22-27.

Mitchell, R.A.; Drake, J.E.; Wittlin, L.A. & Rejent, T.A. (1977) “Erythrocyte porphobilinogen synthase (delta-aminolaevulinate dehydratase) activity: a reliable and quantitative indicator of lead exposure in humans”. Clin Chem. **23**(1) 105-111.

Muthukrishnan, S., Padmanaban, G. & Sarma, P.S. (1969) “Regulation of heme biosynthesis in *Neurospora crassa*”. J Biol Chem **244**(15):4241-4246.
Muthukrishnan, S.; Malathi, K. & Padmanaban, G. (1972) “Delta-aminolaevulinate dehydratase, the regulatory enzyme of the haem-biosynthetic pathway in *Neurospora crassa*”. Biochem J. **129**(1) 31-37.

Nakao, K.; Wada, O. & Yano, Y. (1968) “Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes for the evaluation of lead poisoning”. Clin Chim Acta. **19**(2) 319-25.

Nakao, K.; Wada, O. & Yano, Y. (1968) “Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes for the evaluation of lead poisoning”. Clin Chim Acta **19**(2) 319-325

Nandi, D.L. & Waygood, E.R. (1967) “Biosynthesis of porphyrins in wheat leaves. II. 5-aminolaevulinate hydro-lyase”. Can J Biochem. **45**(2) 327-336.

Nandi, D.L.; Baker-Cohen, K.F. & Shemin, D. (1968a) “Delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodopseudomonas spheroides*”. J Biol Chem. **243**(6) 1224-1230.

Nandi, D.L. & Shemin, D. (1968b) “Delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodopseudomonas spheroides*. 3. Mechanism of porphobilinogen synthesis”. J Biol Chem. **243**(6) 1236-1242.

Nandi, D.L. & Shemin, D. (1973) “δ-Aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodopseudomonas capsulata*”. Arch Biochem Biophys. 1**58**(1) 305-311.

Petrovich, R.M.; Litwin, S. & Jaffe, E.K. (1996) “*Bradyrhizobium japonicum* porphobilinogen synthase uses two Mg(II) and monovalent cations”. J Biol Chem. **271**(15) 8692-8699.

Rebeiz, C.A. & Castelfranco, P.A. (1971) “Protochlorophyll biosynthesis in a cell-free system from higher plants”. Plant Physiol. **47**(1) 24-32.

Rilk-van Gessel R, Kayser H. (2007) “Porphobilinogen synthase from the butterfly, *Pieris brassicae*: purification and comparative characterization”. J Insect Sci. **7**:1-13

Sakai, T.; Yanagihara, S. & Ushio, K. (1981) "Erythrocyte factors concerned in the inhibition of ALA-D by lead". Br J Ind Med. **38**(3) 268-274.

Sassa, S.; Granick, J.L.; Granick, S.; Kappas, A. & Levere, R.D. (1973) "Studies in lead poisoning. I. Microanalysis of erythrocyte protoporphyrin levels by spectrophotometry in the detection of chronic lead intoxication in the subclinical range". Biochem Med. **8**(1) 135-148.

Sawada, N.; Nagahara, N.; Arisaka, F. & Mitsuoka, K. & Minami, M. (2011) "Redox and metal-regulated oligomeric state for human porphobilinogen synthase activation". Amino Acids **41**(1) 173-180.

Sawada, N.; Nagahara, N.; Sakai, T.; Nakajima, Y.; Minami, M. & Kawada, T. (2005) "The activation mechanism of human porphobilinogen synthase by 2-mercaptoethanol: intrasubunit transfer of a reserve zinc ion and coordination with three cysteines in the active center. J Biol Inorg Chem. **10**(2) 199-207.

Schmid, R. & Shemin, D. (1955) The "Enzymatic Formation of Porphobilinogen from δ-Aminolevulinic acid and Its conversion to Protoporphyrin". J. Am. Chem. Soc. **77** 506–507

Schneider, H.A.W. (1970) "Purification and properties of δ-aminolevulinate dehydratase from spinach (*Spinacea oleracea*) leaves". Z. Planzenphysiol. **62** 328–342

Schneider, H.A.W. (1971) "Porphyrins synthesis in isolated particles from tissue cultures of Tabaco". Z. Naturforsch **26B** 908-912

Schneider, H. (1975) "Chlorophylle: Aspekte der Biosynthese und ihrer Regulation". Ber. Deutsch. Bot. Ges **88** 83-123.

Schneider, H.A.W. (1976) "Enzymic capacities for chlorophyll biosynthesis. Activation and *de novo* synthesis of enzymes". Z. Naturforsch. **31**c, 55–63

Seehra, J.S. & Jordan, P.M. (1981) "5-Aminolevulinic acid dehydratase: alkylation of an essential thiol in the bovine-liver enzyme by active-site-directed reagents. Eur J Biochem. **113**(3) 435-446.

Seehra, J.S.; Gore, M.G.; Chaudhry, A.G. & Jordan, P.M. (1981) "5-Aminolevulinic acid dehydratase. The role of sulphydryl groups in 5-aminolevulinic acid dehydratase from bovine liver". Eur J Biochem. **114**(2) 263-269.

Shaik, A.P. & Jamil, K. (2008) "A study on the ALAD gene polymorphisms associated with lead exposure". Toxicol Ind Health **24**(7) 501-506.

Shemin D. (1968) "Mechanism and controlf pyrrole synthesis". Biochem Soc Symp.**28** 75-89

Shemin, D (1976) "Proceedings: Structure, function and mechanism of delta-aminolevulinic acid dehydratase". J Biochem. **79**(4) 37P-38P.

Shemin, D. (1976) "5-Aminolaevulinic acid dehydratase: structure, function, and mechanism". Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. **273**(924) 109-115.

Shemin, D. (1989). "An illustration of the use of isotopes: the biosynthesis of porphyrins". Bioessays. **10**(1):30-35. Review

Shemin, D. & Russell, C. (1953) "δ-Aminolevulinic Acid, its Role in the Biosynthesis of Porphyrins and Purines". J. Am. Chem.Soc **75** 4873–4874

Shibata, H., Ochiai, H. (1976) "Studies on δ-aminolevulinic acid dehydratase in radish cotyledons during chloroplast development. Plant & Cell Physiol. **17** 281–288.

Shibata, H. & Ochiai, H. (1977) "Purification and properties of δ-aminolevulinic acid dehydratase from radish cotyledons". Plant Cell Physiol **18** (2): 421-429.

Sluiters-Scholten, C.M.Th., van den Berg, F.M. & Stegwee, D. (1973) "Aminolaevulinate dehydratase in greening leaves of *Phaseolus vulgaris* L. Z. Pflanzenphysiol. **69**, 217–227 (1973)

Sobin, C.; Gutierrez, M. & Alterio, H. (2009) "Polymorphisms of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) and peptide transporter 2 (PEPT2) genes in children with low-level lead" exposure". Neurotoxicology. **30**(6)881-887

Sommer, R. & Beyersmann, D. (1984) "Zinc and cadmium in 5-aminolevulinic acid dehydratase. Equilibrium, kinetic, and ^{113}Cd-nmr-studies". J Inorg Biochem. **20**(2):131-45.

Stafforini, D.M., Polo, C.F.; Stella, A.M., Wider de Xifra, E. & Batlle, A.M. (1980) "Pig liver aminolevulinate dehydratase. II. Studies on different conditions influencing its molecular weight determination". Int J Biochem. **12**(5-6) 757-60.

Steer, B. T. & Gibbs, M. (1969) "Delta-aminolevulinic acid dehydrase in greening bean leaves". Plant Physiol. **44** 781-783.

Stella AM. (1977) PhD Thesis: "Estudios sobre la enzima δ-aminolevúlico dehidrasa". Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina;

Tamai, H.; Shioi, Y. & Sasa, T. (1979) "Purification and characterization of δ-aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*". Plant and Cell Physiology **20** 435-444

Tian, L.; Zheng, G.; Sommar, J.N.; Liang, Y.; Lundh, T.; Broberg, K.; Lei, L.; Guo, W.; Li, Y.; Tan, M.; Skerfving, S.; Jin, T. & Bergdahl, I.A. (2013) "Lead concentration in plasma as a biomarker of exposure and risk, and modification of toxicity by δ-aminolevulinic acid dehydratase gene polymorphism". Toxicol Lett. **221**(2) 102-109

Tigier, H.A., Batlle, A.M. & Locascio, G. (1968) ''Porphyrin biosynthesis in soybean callus tissue system. Isolation, purification and general properties of delta-aminolaevulinate dehydratase".

Tigier, H.A.; Batlle, A.M. & Locascio, G.A. (1970) ''Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system. II. Improved purification and some properties of delta aminolaevulic acid dehydratase". Enzymologia **38**(1) 43-56.

Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1975) "Evidence for histidine as another functional group of delta-aminolevulinic acid dehydratase from beef liver". Biochem Biophys Res Commun. **67**(1) 294-300

Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1979) "The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. Biochim Biophys Acta. **570**(1) 167-178.

Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T & Sano S. (1980) "Zinc and cysteine residues in the active site of bovine liver delta-aminolevulinic acid dehydratase". Int J Biochem. **12**(5-6) 751-756.

van Gessel; R. & Kayser H. (2007) *"*Porphobilinogen synthase from the butterfly, *Pieris brassicae*: purification and comparative characterization". Journal of Insect Science **7** 62-74

van Heyningen S y Shemin D. (1971) *"*Quaternary structure of -aminolevulinate dehydratase from *Rhodopseudomonas spheroides"*. Biochemistry. **10**(25) 4676-4682

Walerych, W. (1963) "5-Aminolevulinic acid dehydratase from propionic acid bacteria". Acta Biochim Pol. **10** 243-252.

Weissberg, J.B.& Voytek, P.E. (1974) "Liver and red-cell porphobilinogen synthase in the adult and fetal guinea pig". Biochim Biophys Acta. **364**(2):304-319.

Westall, R.G. (1952) "Isolation of porphobilinogen from the urine of a patient with acute porphyria". Nature **170**(4328) 614-616.

Wilson, E.L.; Burger, P.E. & Dowdle, E.B. (1972) ''Beef-liver 5-aminolevulinic acid dehydratase. Purification and properties. Eur J Biochem. **29**(3) 563-571.

Wu, W.H.; Shemin, D.; Richards, K.E., Williams RC. (1974) ''The quaternary structure of delta-aminolevulinic acid dehydratase from bovine liver". *Proc Natl Acad Sci USA*. **71**(5):1767-1770.

Yamasaki, H. & Moriyama, T. (1971) "Delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Mycobacterium phlei"*. Biochim Biophys Acta. **227**(3) 698-705.

Zeitler, H.J., Kreutzer, M.; Andondonskaja-Renz, B. (1982) "Purification and characterization of animal porphobilinogen synthases--II. Dog liver porphobilinogen synthase". Int J Biochem. **14**(9) 787-795.

CAPÍTULO III

DIMORFISMO EN HONGOS. *Mucor rouxii*

III.1 DIMORFISMO EN HONGOS

Una gran variedad de especies fúngicas presentan dualidad fenotípica en sus células. El dimorfismo puede definirse como el proceso por el cual células de morfología hifal o filamentosa se transforman a levaduriformes o unicelulares en respuesta a cambios en las condiciones del cultivo o del medio ambiente. Esta interconversión es reversible.

Experimentalmente los factores externos que se modifican más a menudo para promover el crecimiento de micelio o levadura, o para controlar la transición morfológica desde un tipo celular a otro, son la composición del medio de crecimiento, de la atmósfera y la temperatura (Cihlar, 1985, Orlowski, 1991).

La capacidad para transformarse de levadura a hifas provee un sistema muy ventajoso para investigar los mecanismos bioquímicos y moleculares que operan durante la diferenciación.

III.2 DIMORFISMO EN *Mucor*

El género *Mucor* se ubica dentro de la clase *Zygomycetes* cuya principal característica es la producción de una espora de pared delgada denominada cigospora, que se desarrolla en un cigosporangio formado luego de la fusión de 2 gametangios.

La clase *Zygomycetes* está dividida en varios órdenes, dentro de los cuales se encuentra el *Mucorales.* Este orden posee la mayor diversidad morfológica y número de especies dentro de la clase.

A este orden pertenecen varias familias, entre las cuales se incluye *Mucoraceae*, una de las más grandes de *Mucorales*. Finalmente la familia *Mucoraceae* está compuesta por varios géneros entre los que se encuentra *Mucor*.

Este género es objeto de estudio de un considerable número de microbiólogos y micólogos tanto en el área de la investigación biológica básica como en la aplicada. Algunas especies son utilizadas en la industria para la producción de ácidos orgánicos, pigmentos, alimentos fermentados, alcoholes y esteroides modificados (Moore-Landecker, 1996; Capel *et al.,* 2011; Moussa *et al*., 2011).

Entre las especies que pertenecen a este género, se han descripto sólo unas pocas como causantes de la infección fúngica oportunista denominada mucormicosis (Baker, 1970; Whiteway *et al*., 1979; Gomes *et al*., 2011). La severidad de estas afecciones varía desde una afección dermatológica débil hasta invasiones sistémicas pulmonares o del sistema nervioso central (Josefiak, *et al*, 1958; Emmons *et al*, 1977; Lehrer, 1980; Xia *et al*., 2013).

Algunos organismos pertenecientes al género *Mucor* han sido fuente de estudios de mecanismos biológicos de regulación a nivel molecular: se ha utilizado *Mucor racemosus* para estudiar la relación entre la velocidad de crecimiento celular, la síntesis de proteínas y la función de los ribosomas (Orlowski 1981; Ross & Orlowski, 1982; Chapman *et al*, 1991). Asimismo *Mucor rouxii* se ha empleado para elucidar el rol de los quitosomas en la síntesis de la pared celular (Bartnicki-Garcia, 1981). En *Mucor circinelloides* se ha estudiado el metabolismo de la calcineurina (Lee *et al*., 2013) y diferentes isoformas de la subunidad regulatoria de la proteína kinasa A (Ocampo *et al*., 2012)

Varias especies del género presentan una característica particular que hace que se diferencien de otros zygomicetes: el dimorfismo. En general se acepta que sólo aquellos que pueden crecer en forma de levadura esféricas multipolares son dimórficos. Dentro de esta categoría se encuentran *Mucor racemosus, Mucor rouxii, Mucor genevensis, Mucor baciliformis* y algunas cepas de *Mucor subtilissimus* (Orlowski, 1991)

Existe una creencia generalizada entre aquellos que estudian las fases de transición en hongos dimórficos según la cual el mecanismo que gobierna el proceso morfogenético debe tener muchos puntos en común, si no es universal, en todos estos microorganismos. De ser esto así, la elucidación de los eventos subcelulares y moleculares relevantes en *Mucor* brindarían mucha información acerca del control de la morfología celular y la infectividad en muchos de los patógenos dimórficos de

humanos y plantas (Orlowski, 1991). Muchos hongos patógenos son dimórficos. La interconversión entre las formas mórficas afecta la interacción entre el huésped y el patógeno, lo cual puede resultar crítico para la patogenicidad. En los zygomicetes el rol del dimorfismo en la virulencia del microorganismo aún no ha sido establecido (Lee *et al*., 2013)

El dimorfismo en *Mucor* presenta algunas ventajas para su estudio que no poseen otros sistemas eucariotas y procariotas. En general los estudios acerca del desarrollo en microorganismos estaban limitados a la producción de esporas, las cuales aparecen generalmente en respuesta a deficiencias nutricionales; en contraste, la transformación de levadura a hifas en *Mucor* depende de las condiciones de crecimiento y en este sentido tienen mayor similitud al desarrollo de células eucariontes superiores. Dentro del género *Mucor*, las especies *Mucor rouxii, Mucor racemosus* y *Mucor circinelloides* han sido estudiadas en detalle. El sistema *Mucor* es especialmente interesante ya que la transición levadura-micelio puede ser inducida (Bartnicki-Garcia & Nickerson 1962a; Mooney & Syphard 1976) o inhibida (Larsen & Sypherd, 1974; Ito *et al*., 1982) por varias vías, lo cual permite distinguir entre las alteraciones directamente relacionadas con la morfogénesis y las que se producen en respuesta a las condiciones de crecimiento

Las especies del género *Mucor* son ejemplo de eucariotas facultativos anaeróbicos mediante los cuales se podría describir el patrón de desarrollo de la mitocondria en respuesta al ambiente, hecho que revelaría interesantes estrategias alternativas para regular la biosíntesis de estas organelas (Orlowski, 1991).

Estos microorganismos tienen la habilidad de crecer bajo dos formas distintas según el medio en el cual se halle. En ambiente aeróbico, ya sea en medio sólido o líquido, desarrolla un micelio cenocítico típico que produce estructuras de reproducción vegetativa denominadas clamidosporas. En los extremos de las hifas pueden formarse, bajo ciertas condiciones, esporangios que portan esporas asexuales o esporangiósporas. Dentro de este género se encuentran especies homotálicas y heterotálicas, éstas últimas se reproducen sexualmente por copulación gametangial generando una cigospora típica (Figura III.1). También son capaces de producir estructuras de supervivencia bajo condiciones ambientales desfavorables denominadas artrosporas. En atmósfera anaeróbica desarrolla como levadura

esféricas, de gran tamaño, multinucleadas que crecen y se reproducen por gemación múltiple (Orlowski, 1991).

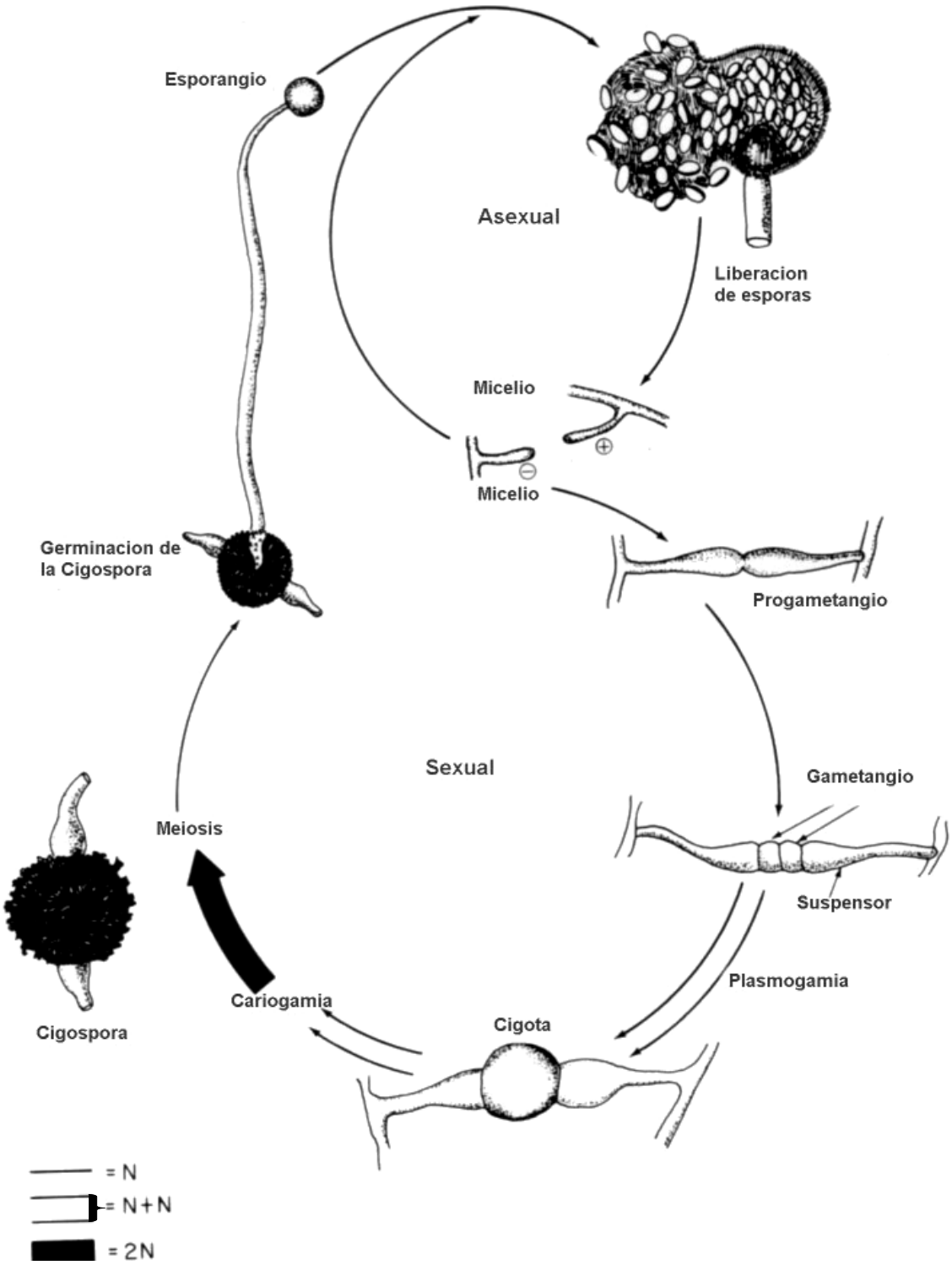


Figura III.1: Ciclo de vida de un zygomicete típico

III.2.1. Dimorfismo celular

En las especies dimórficas de *Mucor*, la fase asexual del ciclo de vida puede dividirse en tres estadíos (Sypherd, 1978; Orlowski, 1991): germinación de esporas, crecimiento vegetativo y esporogénesis.

- **Germinación de esporas:**

Este proceso puede dividirse en dos etapas (Bartnicki-Garcia, 1968):

- ♦ Crecimiento de la espora generando una gran célula esférica.
- ♦ En el desarrollo de levadura aparece una yema de forma esférica. y si el crecimiento es filamentoso se produce la emergencia del tubo germinativo (Figura III.2).

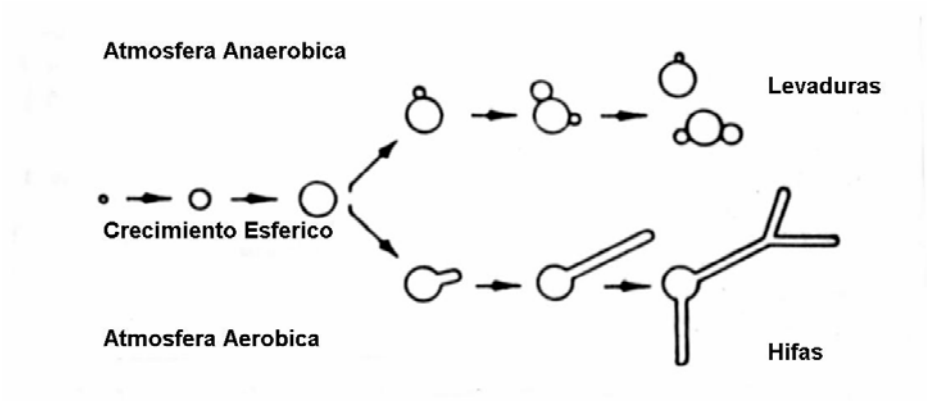


Figura III.2: Vías alternativas morfogenéticas de esporangiosporas de *Mucor spp.* (Orlowski, 1991)

Durante la fase 1 hay un gran incremento en la síntesis de proteínas (Bartnicki-Garcia, 1968) y tiene lugar la síntesis *de novo* de la pared celular, física y químicamente diferente de la pared original de la espora. En este período el área superficial de la espora aumenta considerablemente con un decrecimiento concomitante del espesor de la pared. Si la espora genera una célula levaduriforme entonces la nueva pared es considerablemente más delgada que si la espora fuera a dar lugar a la aparición del tubo germinativo; además difiere en su estructura microfibrilar.

Los eventos que ocurren durante la fase 2 difieren dependiendo de cuál será la morfología celular final. Si va a desarrollar micelio, se produce polarización de la síntesis de la pared dando por resultado la ruptura de la pared de la espora y la aparición, en la zona apical, del tubo germinativo (Bartnicki-Garcia, 1968a). Por otro lado, si la espora va a generar una célula de levadura, la síntesis de la pared no está polarizada y la ruptura de la pared de la espora es seguida por la aparición de un brote esférico en el cual la síntesis de la pared celular es uniforme (Figura III.2).

Crecimiento vegetativo:

- **Micelio**: el crecimiento de las hifas se produce mediante el desarrollo apical de la pared celular (Bartnicki-Garcia & Lippman, 1969). El ancho, largo y grado de desarrollo de las hifas depende de las condiciones de crecimiento. En *Mucor racemosus* la generación de hifas largas y finas se produce en medios de crecimiento que contienen xilosa como fuente de carbono, mientras que en medios con glucosa se obtienen hifas más gruesas. Es común la aparición de artrosporas por septación de las hifas, que pueden ser confundidas con levadura por su geometría esférica, pero que no generan brotes (Figura III.3) El desarrollo de micelio tiene lugar en una amplia variedad de fuentes de carbono y puede generarse utilizando las sales de amonio como única fuente de nitrógeno
- **Levadura:** este tipo de crecimiento se caracteriza por la presencia de yemas esféricas multipolares. Es común la observación de más de 10 brotes generándose a partir de la misma célula parental. (Figura III.3). Las condiciones para el crecimiento en levadura son más exigentes; se requiere una hexosa como fuente de carbono además de una compleja fuente de nitrógeno orgánico y atmósfera anaeróbica. Como el dimorfismo en *Mucor* es reversible los cambios morfológicos pueden producirse en ambos sentidos. Cuando las levaduras son inducidas a formar hifas pueden aparecer uno o varios tubos germinativos por polarización de la síntesis de la pared celular. En el caso inverso, aparecen yemas esféricas desde los lados y extremos de las hifas; algunos elementos de naturaleza hifal permanecen en el cultivo aún después de largos períodos. Todos estos cambios indican claramente una respuesta adaptativa de *Mucor* al medio.

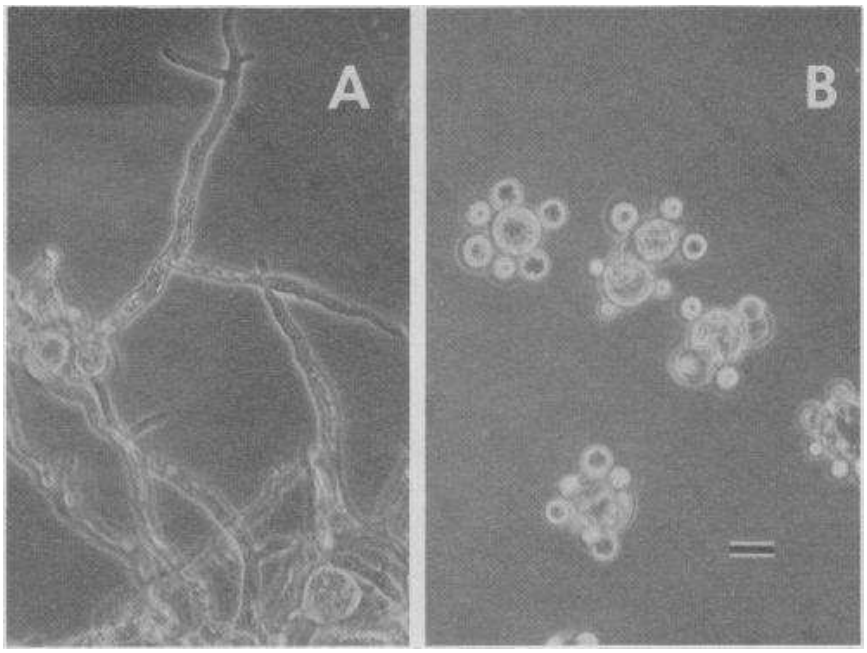


Figura III.3: Micelio cenocítico (A) y levadura (B) en el género *Mucor* spp. (Orlowski, 1991)

- **Esporogénesis:** Bajo determinadas condiciones, el micelio es capaz de producir esporangióforos, en los cuales comienza a formarse el esporangio por dilatación de su extremo. Una gran cantidad de citoplasma que fluye hacia el mismo, llevando numerosos núcleos, se concentra en la periferia del esporangio dejando una parte central estéril denominada columela. Las esporangiósporas aparecen por división del protoplasma de la zona periférica en gran cantidad de secciones uni o multinucleadas que luego se rodean de pared redondeándose y madurando para dar las esporangiósporas que son liberadas por ruptura de la pared del esporangio (Figura III.4).

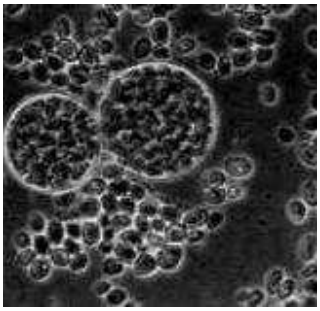


Figura III.4: Esporgangióforo y esporangióspora de *Mucor mucedo* (Orlowski, 1991)

III.2.2 Factores nutricionales y ambientales

Existen diversos factores que afectan el fenómeno del dimorfismo, siendo los más importantes el metabolismo respiratorio y el requerimiento por hidratos de carbono.

- **Metabolismo respiratorio**

El desarrollo de levadura requiere la presencia de una hexosa fermentable y ocurre en atmósfera de dióxido de carbono o una mezcla de dióxido de carbono con nitrógeno (Orlowski; 1991; McIntyre, 2002). Por otro lado el crecimiento de la forma miceliar se produce cuando se estimula la capacidad respiratoria. En *Mucor rouxii* se ha demostrado que la presencia de agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa inhibían la morfogénesis (Terenzi & Stork, 1969; Friedenthal, 1974). La inhibición de la biosíntesis de proteínas mitocondriales fundamentales como la citocromo oxidasa y citocromo b con cloramfenicol también favorece el crecimiento de levadura (Zorzópulos *et al*., 1973; Clark-Walker, 1973).

Paznokas & Sypherd (1975), demostraron que la respiración puede separarse del crecimiento hifal, por lo que la morfogénesis no sería consecuencia de la capacidad respiratoria. Sin embargo estudios relacionados con la síntesis de lípidos durante la transición levadura-hifa en *Mucor racemosus* (Ito *et* al., 1982) sugieren que la mitocondriogénesis sería importante en la respuesta dimórfica. La capacidad respiratoria podría no ser un determinante crítico de la morfología (Orlowski, 1991). Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* sobre mutantes de *Mucor rouxii* resistentes a los alcoholes alílicos indicaron que el desarrollo como levadura y la fermentación son eventos independientes y que la enzima alcohol deshidrogenasa es fundamental para el desarrollo del hongo en ausencia de oxígeno (Torres-Guzman *et al.,* 1994).

En síntesis, aunque la respiración no fuera un prerrequisito para el desarrollo de hifas, no se puede excluir la importancia que otras funciones mitocondriales podrían tener en el desarrollo de éstas.

- **Hidratos de Carbono**

Se ha demostrado que, en general, para obtener crecimiento puramente levaduriforme se requiere una concentración mínima de una hexosa fermentable (Bartnicki-Garcia, 1968; Friedenthal *et al.,* 1974; Sypherd *et al*., 1978) y que a medida

que ésta disminuye las células se tornan más filamentosas. Clark-Walker (1972) y Paznokas & Sypherd (1975) establecieron que en *Mucor* no existe represión de la mitocondriogénesis por glucosa. En *Mucor genevensis,* crecido aeróbicamente en presencia de un exceso de glucosa, su capacidad respiratoria es alta, sin embargo para células esencialmente fermentativas la velocidad de respiración es baja (Rogers et al, 1974). Bajo estas condiciones la morfología celular es levaduriforme.

Sin embargo debe tenerse en cuenta que al estudiar diferentes especies de *Mucor* en variadas condiciones experimentales, se ha encontrado que las mismas no responden igualmente a los factores ambientales a las que fueran expuestas (Orlowski, 1991)

III.2.3. Dimorfismo y AMPc

El nivel intracelular del 3'-5'adenosin monofosfato cíclico (AMPc) tiene una influencia crucial en la morfología celular. Trabajos realizados en *Mucor racemosus* (Larsen y Sypherd, 1974) y en *Mucor rouxii* (Paveto *et al* 1975; Orlowski, 1980; Pereyra *et al*., 2006) demostraron que este metabolito es significativamente mayor en células de levadura. Este aumento fue atribuído a un incremento en la actividad de la fosfodiesterasa en células de micelio. Estos autores determinaron que el agregado de dibutiriladenosin monofosfato cíclico (Bt_2AMPc) a cultivos de levadura, que además fueron aireados, mantenía el crecimiento levaduriforme. Por otra parte para que estos cambios ocurran era necesaria la presencia de un azúcar fermentable en el medio de cultivo. Orlowski (1980) examinó el desarrollo de hifas a partir de esporangiosporas de *Mucor genevensis* y *Mucor mucedo*, observando que los niveles del nucleótido cíclico se incrementaban durante los primeros estadíos de la germinación de la espora para caer abruptamente antes de la aparición de los tubos germinativos, atribuyéndole un rol en la regulación del pool intracelular de AMPc a la actividad de adenilato ciclasa. También se demostró que el desarrollo de hifas en estas condiciones se podía bloquear por el agregado de AMPc exógeno.

La regulación del dimorfismo, como ya se mencionó, es el resultado de la interacción de varios factores nutricionales y ambientales en los cuales el AMPc juega un rol importante posiblemente a través de la regulación de las kinasas dependientes

de este metabolito (Forte & Orlowski, 1980; Rossi & Moreno, 1994; Ocampo *et al.*, 2009, Ocampo *et al.*, 2012).

III.2.4. Síntesis de proteínas y dimorfismo

Algunos autores han investigado la biosíntesis de proteínas y otras macromoléculas durante el proceso de transición de levadura a hifas.

En *Mucor racemosus* se estudió la velocidad de síntesis proteica durante la germinación aeróbica de esporas y durante la diferenciación de hifas inducida por aireación del cultivo (Orlowski & Sypherd, 1977, 1978). Se observó que la velocidad de acumulación de proteínas durante la morfogénesis se correspondía con el aumento en la velocidad de crecimiento debida a la aparición de los tubos germinativos; sin embargo la determinación de la velocidad instantánea de síntesis proteica reveló un aumento rápido en la producción de proteínas, seguida por un decrecimiento gradual, mientras que el crecimiento de las hifas continuaba desarrollándose. Posteriormente estas variaciones se atribuyeron a fluctuaciones en la velocidad con que los ribosomas se unen al RNA mensajero (Orlowski & Sypherd 1978). Aunque podría haber un posible mecanismo regulatorio en la síntesis de proteínas en *Mucor*, estas alteraciones no tienen una influencia directa sobre la morfogénesis y posiblemente sean un reflejo de los cambios en la velocidad de crecimiento (Ross & Orlowski, 1982). Varios parámetros pueden estar relacionados con la regulación de la síntesis de proteínas durante la morfogénesis en *Mucor* (Orlowski, 1991).

Otros estudios han analizado el grado de metilación de las proteínas. Cuando se determinó el contenido intracelular de la S-Adenosil-L-Metionina (SAM), donor de grupos metilos en la célula, se encontró que estaba aumentado 3 veces durante la aparición de los tubos germinativos, también se observó un aumento de magnitud similar en el grado de metilación de proteínas durante este período. La electroforesis bidimensional de proteínas marcadas por adición de L-[metil ^{3}H] metionina demostró que cierto número de proteínas presentaba mayor grado de metilación a medida que aparecían los tubos germinativos (Garcia *et al.*, 1980) y también se observaron cambios cualitativos en el espectro de las proteínas que se metilaban. Estos cambios estarían relacionados con el proceso de desarrollo en sí mismo y no con una adaptación al ambiente.

III.2.5. Actividad enzimática y morfogénesis

Se han investigado una gran cantidad de enzimas en función de su posible relación con la morfogénesis, tanto en términos del rol fisiológico que podrían tener en la misma, como con respecto a los mecanismos que pueden controlar su expresión. En muchos casos no se conoce si los cambios en la actividad de una enzima son esenciales para un programa morfogenético específico o si es simplemente una adaptación al ambiente (Orlowski, 1991).

Estos estudios incluyen enzimas del metabolismo de los hidratos de carbono (Paznokas & Sypherd, 1977; Inderlied & Sypherd, 1978; Borgia & Mehnert, 1982), del nitrógeno (Peters & Sypherd, 1979) y de la biosíntesis de poliaminas (Inderlied *et al.*, 1980; Garcia *et al.*, 1980).

Debido al requerimiento estricto de una hexosa fermentable durante el crecimiento de levadura se pensó que alguna alteración del flujo de carbono en la ruta catabólica de la glucosa podría identificar algún metabolito o enzima clave en el desarrollo de levadura a micelio (Inderlied & Sypherd, 1978).

La PKA juega un rol fundamental en el desarrollo de las hifas o en la germinación de la esporangióspora de *Mucor* (Pereyra, 2000; Lübbehüsen, 2004). En una mutante de *Mucor circinelloides*, carente del gen que codifica para la subunidad regulatoria de la enzima, se encontraron diferencias fenotípicas en características tanto macroscópicas como microscópicas del hongo. En mutantes de otras especies fúngicas fueron hallados diferentes grados de cambios, lo cual avala que el metabolismo de la PKA ejerce un rol diferente en la morfología de hongos (Ocampo, 2009).

En diferentes mutantes en las que se estudió la actividad de PKA, también se han encontrado resultados diversos, en los que la actividad de la enzima de la mutante podía ser mayor o menor que la de la cepa salvaje. (D'Souza, 2001; Liebmann, 2004; Cervantes-Chavez, 2007).

En *Mucor circinelloides* fueron purificadas 4 diferentes subunidades regulatorias de PKA, cuyos genes se expresan en forma morfológica-específica. La PKA está involucrada en múltiples procesos fisiológicos en este microorganismo. (Ocampo *et al.,* 2009; Ocampo *et al.*, 2012).

La naturaleza de la fuente de nitrógeno disponible en *Mucor* también es clave para determinar el crecimiento de levadura o hifas. En general, el crecimiento de la forma levaduriforme requiere una fuente de nitrógeno orgánica, mientras que el desarrollo de hifas puede manifestarse utilizando una fuente de nitrógeno inorgánico. Se ha demostrado en *Mucor racemosus* que un medio mínimo conteniendo alanina, aspartato, glutamato y cloruro de amonio satisface los requerimientos de nitrógeno para ambos tipos celulares (Peters & Sypherd, 1978). Por otro lado en un medio que carecía de glutamato, se inhibió completamente el desarrollo de levadura. Basándose en esta observación se estudió la regulación de la glutamato deshidrogenasa (GDH) durante la morfogénesis (Peters & Sypherd, 1979). Estos investigadores encontraron que la actividad de esta enzima era NAD^+ y $NADP^+$ dependiente en ambos tejidos, sin embargo sólo la enzima dependiente de NAD^+ aumentaba su actividad luego de la inducción al desarrollo de hifas por aireación de un cultivo de levadura. Este aumento de la actividad enzimática se producía antes de la aparición de los tubos germinativos y no se observaba cuando a los cultivos de levadura se les agregaba Bt_2AMPc conjuntamente con la aireación de los mismos. Estos hallazgos llevaron a la conclusión que en *Mucor racemosus* la GDH era un parámetro bioquímico válido para correlacionar la transición de levadura a hifas, aunque no se le puede asignar un rol directo en este proceso.

También se ha examinado el posible papel que tendrían las poliaminas y las enzimas involucradas en su biosíntesis en la morfogénesis de *Mucor.*

Se encontró que los niveles de putrescina eran aproximadamente 5 veces mayores en micelio, mientras que los de espermidina eran constantes y similares en ambos tipos celulares (Garcia *et al.,* 1980); en tanto que no se detectó la presencia de espermina.

La actividad de ornitina decarboxilasa (ODC), primera enzima de la ruta de síntesis de poliaminas, también se estudió durante la transformación morfogenética de levadura a hifas en *Mucor racemosus* (Inderlied *et al.,* 1980). Se halló un aumento de 30-50 veces en la actividad de esta enzima durante las 2 a 3 horas posteriores a la aireación de la atmósfera de incubación.

El agregado de Bt_2AMPc, putrescina o cerulenina al medio de cultivo impidió el aumento en la actividad de ODC (Ito *et al.*, 1982)

Utilizando mutantes monomórficas de *Mucor bacilliformis* incapaces de formar hifas se realizaron otra serie de experiencias acerca de la morfogénesis (Ruiz-Herrera *et al.,* 1983). Se aislaron 14 mutantes que se caracterizaron en relación a su capacidad respiratoria, actividades de ODC y GDH, y a los niveles intracelulares de AMPc, luego de crecimiento en aerobiosis o anaerobiosis. Ninguno de los mutantes exhibió un metabolismo oxidativo normal. Los espectros de citocromos estaban alterados y se puso de manifiesto una aparente diferencia de sensibilidad del metabolismo respiratorio al cianuro o al ácido salicilhidroxámico en todas excepto una de las mutantes, para la que se postuló una deficiencia en algún aspecto de la transducción de energía. Se observó también una estricta correlación entre los bajos niveles de actividad de ODC y la incapacidad para formar hifas, mientras que sólo dos de los casos estudiados mostraron bajos niveles de actividad de GDH NAD^+ dependiente cuando crecían en ambiente aeróbico. Cuando se analizó el contenido de AMPc durante el crecimiento aeróbico de las mutantes (levadura), se encontró que eran comparables a los de la cepa salvaje crecida bajo las mismas condiciones (micelio).

El análisis de estos resultados sugieren que en *Mucor bacilliformis* tanto la función mitocondrial como la actividad de ODC serían de importancia en la morfogénesis. Con respecto a los resultados encontrados en relación a los niveles de AMPc y la actividad de GDH, no puede descartarse su influencia sobre la morfogénesis, pero su participación tendría lugar en la primera parte de la cascada de eventos que conducen al desarrollo de las hifas.

En *Mucor circinelloides* se ha demostrado que los niveles del mRNA para ODC presenta un máximo durante la transición que se correlaciona con el aumento de actividad de esta enzima durante el cambio dimórfico. La expresión de este gen estaría regulada a nivel transcripcional, en contraste con otros hongos dimórficos donde se ha propuesto que la regulación sería a nivel post-transcripcional (Blasco, 2002).

Posteriormente se ha determinado que el grado de metilación del DNA en cepas de *Mucor rouxii, Yarrowia lipolytica,* y *Ustilago maydis* en las que se obtuvieron células de levadura en condiciones de crecimiento hifal por inhibición o anulación de la actividad de ODC, era idéntico al de la cepa salvaje, indicando su relación con la transición dimórfica. En este trabajo también se confirnó el rol de las poliaminas en la metilación del DNA en relación a la transición (Reyna López, 2004).

En el hongo dimórfico *Mucor circinelloides* se ha determinado que, en presencia de un inhibidor de la fosfoproteína calcineurina, presenta únicamente crecimiento como levadura. Sin embargo mutaciones en la subunidad regulatoria o en el dominio de unión del inhibidor de la subunidad catalítica da como resultado un crecimiento como hifa. Estos resultados indican que la ruta metabólica de esta fosfatasa tiene un rol clave en la transición de levadura a hifas. La menor virulencia de la levadura en este microorganismo indica que la transición levadura-micelio está asociada a esa propiedad (Lee *et al.*, 2013).

III. 3 REFERENCIAS

Baker, R. (1970) "The phycomycoses". Ann. N. Y. Acad. Sci. **174** 2-16.

Bartnicki-Garcia, S. (1981) "Role of chitosomes in the synthesis of fungal cell walls" En D. Schlessinger (ed.), Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 238-241.

Bartnicki-Garcia, S. & Nickerson, W. (1962) "Induction of yeast-like development in *Mucor* by carbon dioxide". *J. Bacteriol.* **84** 820-840.

Bartnicki-Garcia, S. & Nickerson, W. (1962) "Nutrition growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*". J. Bacteriol. **84** 847-858.

Bartinicki-Garcia, S. (1968) "Control of dimorphism in *Mucor* by hexoses: inhibition of hyphae morphogenesis". J. Bacteriol. **96** 1586-1594.

Bartnicki-Garcia, S & Nickerson, W. (1968) "Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi". Annu. Re. Microbiol. **22** 87-108.

Bartnicki-Garcia, S. & Lippman, E. (1969) "Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*". Science (Washington D.C.) **165** 302-304.

Blasco, J.L.; García-Sánchez, M.; Ruiz-Herrea, J.; Eslava, A.P. & Iturriaga, E.A. (2002) "A gene coding for ornithine decarboxylase (odcA) is differentially expressed during the *Mucor circinelloides* yeast-to-hypha transition". Res Microbiol. **153** 155-164.

Borgia PI, Mehnert DW. (1982) " Purification of a soluble and a wall-bound form of beta-glucosidase from *Mucor racemosus Borgia PI*, *Mehnert DW*". J Bacteriol. **149**(2) 515-522.

Capel, C.S.; de Souza, A.C.; de Carvalho, T.C.; de Sousa, J.P.; Ambrósio, S.R., Martins, C.H.; Cunha, W.R.; Galán, R.H. & Furtado, N.A. (2011) "Biotransformation using *Mucor rouxii* for the production of oleanolic acid derivatives and their antimicrobial activity against oral pathogens". J Ind Microbiol Biotechnol. **38** 1493-1498.

Cervantes-Chavez, J. A & Ruiz-Herrera, J. (2007) "The regulatory subunit of protein kinase A promotes hyphal growth and plays an essential role in *Yarrowia lipolytica*". FEMS Yeast Res. **7** 929-940.

Chapman, C.; Ross, J. & Orlowski, M. (1991) “Regulation of macromolecular synthesis during nutritional shift-up in the fungus *Mucor* ”. Curr. Microbiol. **22** 321-325.

Cihlar, R. (1985) "Morphogenesis and dimorphism of *Mucor*” en J. Bennett y L. Lasure (ed.) “Gene Manipulations in Fungi", Academic Press, Inc**.** Orlando, Fla. **18** 449-467.

Clark-Walker, G. (1972) “Development of respiration and mitochondria in *Mucor genevensis* after anaerobic growth absence of glucose”. J. Bacteriol. **109** 399-408.

Clark-Walker, G. (1973) "Relationship between dimorphology and respiration in *Mucor genevensis*. Studies with chloramphenicol". J. Bacteriol. **116** 972-980.

D'Souza, C. A.; Alspaugh, J. A.; Yue, C.; Harashima, T.; Cox, G. M.; Perfect, J. R. & Heitman,J.. (2001) “Cyclic-AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*”. Mol. Cell. Biol. **21** 179-191.

Emmons, C.; Binford, C.; Utz, J. & Kwon-Chung, K. (1977) en “Medical Micology”, 3ra edición, Lea y Febiger, Philadelphia.

Forte, J. & Orlowski, M. (1980) "Profile of cyclic adenosine 3',5' monophosphate binding proteins during the conversion of yeasts to hyphae in the fungus *Mucor*”. Exp. Mycol. **4** 78-86.

Friedenthal, M.; Epstein, A & Passeron, S. (1974) “Effect of potassium cyanide, glucose and anaerobiosis on morphogenesis of *Mucor rouxii*”. J. Gen. Microbiol. **82** 15-24.

Garcia, J., Hiatt, W.; Peters, J. & Sypherd, P. (1980) "S-adenosylmethionine levels and protein methylation during morphogenesis of *Mucor racemosus*”. J. Bacteriol. **142** 196-201.

Gomes, M.Z.; Lewis, R.E. & Kontoyiannis, D.P. (2011) "Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-*Rhizopus*, -*Mucor*, and -*Lichtheimia* species”. Clin Microbiol Rev. **24**(2) 411-445.

Inderlied, C. & Sypherd, P. (1978) "Glucose metabolism and dimorphism en *Mucor*.” J. Bacteriol. **133** 1282-1286.

Inderlied, C.; Cihlar, R. & Sypherd, P. (1980) "Regulation of ornithine decarboxilase during morphogenesis of *Mucor racemosus*". J. Bacteriol. **141** 699-706.

Ito, E.; Cihlar, R. & Inderlied C. (1982) "Lipid synthesis during morphogenesis in *Mucor racemosus*". J. Bacteriol. **152** 880-887.

Josefiak, E.; Foushee, J. & Smith, L. (1958) “Cutaneous mucormycosis”. Am. J. Clin. Pathol. **30** 547-552.

Larsen AD, Sypherd PS. (1974) "Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and morphogenesis in *Mucor racemosus*". J Bacteriol. **117**(2) 432-8.

Lee, S.; Li, A.; Calo, S & Heitman, J (2013) “Calcineurin plays key koles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*” PLoS Pathog. **9**(9) e1003625

Lehrer, R. (1980) “Mucormycosis” Ann. Intern. Med. **93** 93-108.

Liebmann, B.; Muller, M.; Braun, A. & Brakhage, A. (2004) “The cyclic AMP-dependent protein kinase A network regulates development and virulence in *Aspergillus fumigates*”. Infect. Immun. **72** 5193-5203

Lübbehüsen, T.; González-Polo, V.; Rossi, S.; Nielsen, J.; Moreno, S.; McIntyre, M. & Arnau, J.. (2004) “Protein kinase A is involved in the control of morphology and branching during aerobic growth of *Mucor circinelloides*”. Microbiology **150** 143-150

McIntyre, M.; Breum , J.; Arnau, J. & Nielsen, J. (2002) “Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides* (syn. racemosus) during submerged batch cultivation” . Appl Microbiol Biotechnol. **58** 495-502.

Mooney, D.T. & Sypherd, P.S. (1976) “Volatile factor involved in the dimorphism of *Mucor racemosus*”. J Bacteriol.**126**(3) 1266-1270.

Moore-Landecker, E. (1996) en “Fundamentals of the Fungi”, 4ta edición, **4,** 82-102.

Moussa, S.; Ibrahim, A.; Okba, A.; Hamza, H.; Opwis, K. & Schollmeyer, E. (2011) “Antibacterial action of acetic acid soluble material isolated from *Mucor rouxii* and its application onto textile”. Int J Biol Macromol. **48**(5) 736-741

Ocampo, J.; Fernandez Nuñez, L.; Silva, F.; Pereyra, E.; Moreno, S.; Garre, V. & Rossi, S (2009) “A subunit of protein kinase A regulates growth and differentiation in the fungus *Mucor circinelloides*”.Eukaryot. Cell. **8** 933-944.

Ocampo, J.; McCormack, B.; Navarro, E.; Moreno, S.; Garre, V. & Rossi, S. (2012) “Protein kinase A regulatory subunit isoforms regulate growth and differentiation in *Mucor circinelloides*: essential role of PKAR4”. Eukaryot Cell. **11** 989-1002.

Orlowski, M. (1980) "Cyclic adenosine 3',5' monophosphate and germination of sporangiospores from the fungus *Mucor*". Arch. Microbiol. **126** 133-140.

Orlowski, M. (1981) “Growth-rate dependent adjustment of ribosome function in the fungus *Mucor racemosus”*. Biochem. J. **196** 403-410.

Orlowski, M. (1991) “*Mucor* dimorphism”. Microbiological Reviews **55** 234-258.

Orlowski, M. & Sypherd, P. (1977) "Protein synthesis during morphogenesis of *Mucor racemosus*". J. Bacteriol. **132** 209-218.

Orlowski, M. & Sypherd, P. (1978) "Regulation of translation rate during morphogenesis in the fungus *Mucor*". Biochemistry **17** 569-575.

Paveto, C.; Epstein, A. y Passeron, S. (1975) "Studies on cyclic adenosine 3',5' monophosphate levels, adenylate clyclase and phosphodiesterase activities in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*". Arch. Biochem. Biophys. **169** 449-457.

Paznokas, J. & Sypherd, P. (1975) "Respiratory capacity, cyclic adenosine 3',5' monophosphate and morphogenesis of *Mucor racemosus*". J. Bacteriol.**124** 134-139.

Paznokas ,J.L. & Sypherd, P.S. (1977) "Pyruvate kinase isozymes of Mucor racemosus: control of synthesis by glucose”.J Bacteriol. **130**(2) 661-6.

Pereyra, E., Mizyrycki, C. & Moreno, S. (2000) “Threshold level of protein kinase A activity and polarized growth in *Mucor rouxii*” Microbiology **146** 1949-1958.

Pereyra, E.; Ingerfeld, M.; Anderson, N.; Jackson, S.L. & Moreno, S. (2006) “*Mucor rouxii* ultrastructure: cyclic AMP and actin cytoskeleton”. Protoplasma **228** 189-199

Peters, J. & Sypherd, P. (1979) "Morphology associated expression of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent dehydrogenase in *Mucor racemosus*". J. Bacteriol. **187** 1134-1139.

Reyna-López,G.E. & Ruiz-Herrera, J. (2004) “Specificity of DNA methylation changes during fungal dimorphism and its relationship to polyamines”. Curr Microbiol. **48** 118-123

Rogers, P.; Clark-Walker, G. & Stewart, P. (1974) “Effect of oxygen and glucose on energy metabolism and dimorphism of *Mucor genevensis* in continuous culture: reversibility of yeast-mycelium conversion”. J. Bacteriol. **110** 282-293.

Ross, J. & Orlowski, M. (1982 a) "Growth-rate-dependent adjustment of ribosome function in chemostat-grown cells of the fungus *Mucor racemosus*". J.Bacteriol**. 149** 650-653.

Ross, J. & Orlowski, M. (1982 b) "Regulation of ribosome function in the fungus *Mucor*: growth rate vis-a-vis dimorphism". FEMS Microbiol. Lett. **13** 325-328.

Rossi, S. & Moreno, S (1994) "Regulation of protein kinase A subunits during germination of *Mucor rouxii* sporangiospores".Eur J. Biochem. **222** 501-506

Ruiz-Herrera, J; Ruiz, A & Lopez-Romero, E (1983) "Isolation and biochemical analysis of *Mucor bacillifomis* monomorphic mutants". J Bacteriol. **156** 264-272

Sypherd, P.; Borgia, P. y Paznokas, J. (1978) "Biochemistry of dimorphism in the fungus *Mucor*". Adv. Microbiol. Physiol. **18** 67-104.

Terenzi, H. & Storck, R. (1969) "Stimulation of fermentation and yeast-like morphogenesis in *Mucor rouxii* by phenetyl alcohol". J. Bacteriol. **97** 1248-1261.

Torres-Guzman, J.C.; Arreola-Garcia, G.A.; Zazueta-Sandoval , R.; Carrillo-Rayas, T.; Martinez-Cadena, G. & Gutierrez-Corona, F. (1994) **"**Genetic evidence for independence between fermentative metabolism (ethanol accumulation) and yeast-cell development in the dimorphic fungus *Mucor rouxii***"**. Curr Genet. **26** 166-171.

Whiteway, D.; Virata, R. & Wriss, L. (1979) "Mucormycosis". Arch. Intern. Med. **139** 944-956.

Zorzopulos, J.; Jobbagy, A. & Terenzi, H. (1973) "Effects of ethylene diaminetetracetate and chloramphenicol on mitochondrial activity and morphogenesis in *Mucor rouxii*". J. Bacteriol, **115** 1198-1204.

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO I

MATERIALES

1.1 FUENTE ENZIMÁTICA

Se empleó como fuente enzimática la cepa NRRL 1894 del hongo dimórfico *Mucor rouxii*. La muestra inicial fue cedida gentilmente por la Dra Cristina Paveto, del INGEBI (CONICET-UBA).

1.2 REACTIVOS

Los siguientes reactivos fueron adquiridos a Sigma Chemical Co (St Louis, USA): ALA, fluoruro de p-metilsulfonilo (PMSF), dietilpirocarbamato (DEP), Sephacryl S-300, las proteínas usadas como marcadores de peso molecular, alúmina y los componentes para los medios de cultivos.

Se empleó β-mercaptoetanol (β-me) de Merck.

Los geles de Sephadex G-25, Phenyl-sepharosa, Tiopropil-sepharosa y Q-sepharosa fueron adquiridos a Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia).

Todos los demás reactivos y solventes utilizados fueron de grado analítico P.A. provenientes de distintas fuentes comerciales.

1.3 EQUIPOS

Para desarrollar este trabajo se empleó el siguiente instrumental:

- Estufa de cultivo con agitación rotatoria Lab-Line Orbit
- Autoclave VZ
- Flujo laminar Labconco Purifier Class II
- Flujo laminar Nuaire modelo NO.Nu-201-430E
- Espectrofotómetro Shimadzu UV-1203
- Espectrofotómetro con arreglo de diodos Hewlett-Packard 8452A
- Espectrofluorómetro Shimadzu RF-510
- Colector de fracciones Pharmacia LKB superFracIV
- Bomba peristáltica Gilson Minipulse

CAPÍTULO II

MÉTODOS

II.1 CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE CÉLULAS

Todo el material y medios de cultivo empleados se esterilizaron con vapor a 1 atmósfera.

II.1.1 Obtención y cosecha de esporas

Para el cultivo de esporas se preparó medio sólido que contenía agar 5% y jugo de tomate comercial, libre de conservantes (fungicidas), mezclando partes iguales de ambos componentes. El agar y el jugo de tomates se autoclavaron por separado para evitar la hidrólisis del agar en caliente por la acidez del jugo de tomate. El medio fundido se trasvasó en alícuotas (100 ml) a botellas de Roux, que permanecieron por 24 horas a temperatura ambiente como prueba de esterilidad. Posteriormente se sembró un inóculo de 2 ml que contenía aproximadamente 100 esporas/ml y se dejó crecer en oscuridad a 28 °C durante 4 a 6 días cuando se observó la aparición de esporangios maduros. Las esporas se cosecharon por rastrillado con ansa de vidrio y agua, se filtraron por malla de nylon, se lavaron 2 veces con agua y se centrifugaron a 10.000xg durante 30 minutos. Todos estos procesos se realizaron en condiciones de esterilidad. Las esporas obtenidas se resuspendieron en agua estéril y se contaron utilizando una cámara de Neubauer. La suspensión de esporas se mantuvo a 4 ºC en viales hasta el momento de su utilización.

II.1.2 Obtención de levadura

El medio de cultivo utilizado contenía: 0,3 g de extracto de levadura, 1 g de peptona de soja y 3 g de glucosa cada 100 ml.

Un inóculo de esporas (concentración final 10^6 esporas/ml) se sembró en el medio de cultivo y se dejó crecer durante 30 horas a 28 °C, con agitación, en

anaerobiosis. Las células se cosecharon por decantación y filtración por buchner utilizando papel de filtro, se lavaron con agua fría .y se rompieron por tratamiento con alúmina (1:2 p/p) en mortero de porcelana refrigerado.

II.1.3 Obtención de micelio

El medio de cultivo utilizado contenía: 0,3 g de extracto de levadura; 1 g de peptona de soja y 2 g de glucosa cada 100 ml.

Un inóculo de esporas (concentración final 10^6 esporas/ml) se sembró en el medio de cultivo y se dejó crecer durante 24 horas a 28 °C con agitación en aerobiosis. El tejido se cosechó por decantación y filtración por *buchner* utilizando papel de filtro, se lavó con agua fría y se rompió por tratamiento con aire líquido en recipiente de acero inoxidable.

II.1.4 Morfogénesis

La transformación morfogénica de levadura a micelio se llevó a cabo de la siguiente forma: un inóculo de esporas (concentration final 10^6 esporas/ml) se sembró en el medio de cultivo para levadura. Las células crecieron durante 24 horas con agitación en anaerobiosis y posteriormente se transfirieron estérilmente a otro recipiente en condiciones de crecimiento aeróbico donde se mantuvieron por otras 24 horas. Durante este último período se tomaron muestras a diferentes tiempos: 0 (antes de ser transferidas), 2, 4, 6 y 24 horas.

II.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PORFIRINAS Y PRECURSORES DEL CAMINO METABÓLICO DEL HEMO

II.2.1 Cuantificación de Porfirinas

Los extractos libres de células y sus *pellets* se esterificaron con la mezcla metanol-sulfúrico (90:10, v/v) durante 24 horas en oscuridad (Batlle, 1997). Las porfirinas esterificadas se extrajeron con cloroformo y se cuantificaron fluorométricamente, midiendo los máximos de emisión en un espectrofluorómetro, empleando un ancho de banda de excitación y de emisión de 10 nm, con barrido del espectro entre 600 y 700 nm para una excitación fija de 400 nm.

II.2.2 Cuantificación de ALA

Se empleó el método de Mauzerall & Granick (1956). Una alícuota del homogenato fue desproteinizado con solución saturada de sulfato de cobre y centrifugado a 4.000 rpm. A 0,25 ml del desproteinizado se le agregaron 1,75 ml de buffer acético-acetato de sodio 50 mM pH 4,6 y 0,05 ml de acetilacetona. La mezcla de reacción se calentó en baño de agua a 100 ºC durante 10 minutos, se enfrió y se le agregaron 2 ml del reactivo de Ehrlich (2 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 75 ml de ácido acético glacial y 25 ml de ácido clorhídrico concentrado); el producto obtenido se cuantificó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 555 nm. La concentración de ALA se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{ALA (nmol/ml)} = \frac{(A_{555}-B) \times 4 \times 10^{3}}{a \times Ve}$$

A_{555} : Absorbancia a 555 nm
B: Absorbancia blanco de reactivos
a: 58 mM^{-1} cm^{-1}
Ve: volumen de extracto enzimático

II.2.3 Cuantificación de PBG

La cuantificación se llevó a cabo empleando la metodología de Mauzerall y Granick (1956). Sobre una alícuota del desproteinizado del homogenato se agregó el mismo volumen del reactivo de Ehrlich y se cuantificó midiendo la absorbancia a 555 nm. La concentración de PBG se calculó aplicando la siguiente expresión:

$$\text{PBG (nmol/ml)} = \frac{(A_{555}-B) \times 10^{6}}{a \times PM}$$

A_{555} : Absorbancia a 555 nm
B: Absorbancia del blanco de reactivos
a : 113,6 (absorbancia de una solución de PBG de concentración 1mg/ml)
PM: peso molecular del PBG

II.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRUPOS SULFHIDRILOS

Se efectuó según el método de Ellman (1959) con ligeras modificaciones. Se realizó la curva de calibración a pH 7,4 en lugar de pH 8, que es el empleado por Ellman, utilizando solución de DTT 0,2 mM como estándar. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente agregando solución de ácido 5-5'ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 50 mM, se dejó desarrollar color durante 5 minutos y se cuantificó el producto formado por lectura a 412 nm. El coeficiente de extinción molar obtenido de la curva de calibración fue 11.571 $M^{-1}cm^{-1}$. El coeficiente de extinción molar de bibliografía es de 13.600 $M^{-1}cm^{-1}$ (Ellman, 1959)

Para la determinación del contenido de grupos sulfhidrilos (SH) en el extracto proteico se preincubó la suspensión enzimática con DTT 10 mM y se sembró en una columna de Sephadex G-25 (dimensiones de la columna: 1,1 cm de diámetro interno, 2,5 cm de longitud), equilibrada con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7,4 nitrogenado, para eliminar el exceso de reactivo tiólico. Sobre la fracción proteica recogida se realizó la reacción de Ellman, leyendo a 412 nm desde los 30 segundos y cada 1 minuto hasta lectura de absorbancia constante. Posteriormente se agregaron 0,120 ml de dodecilsulfato de sodio (SDS) 10% determinando la variación de absorbancia como se describió anteriormente.

El número de grupos sulfhidrilos titulables se calculó aplicando la siguiente expresión:

$$\text{Nº SH/subunidad} = \frac{(A_{412}-B)}{a \times g\ \text{proteína}/35000}$$

A_{412} : Absorbancia a 412 nm
B: Absorbancia blanco de reactivos
a: 11.571 $M^{-1}cm^{-1}$
35000: Peso molecular de la subunidad

II.4 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DEL ALA-D

La actividad de ALA-D se determinó según el método descripto por Batlle (1997). El sistema estándar de incubación contenía: fracción enzimática, en el volumen adecuado; 0,025 ml de buffer Tris-HCl 1 M; pH 7,4; 0,025 ml de ALA 50

mM: 5µl de β-Me 1 M y agua hasta completar un volumen final de 0,5 ml. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C y en aerobiosis durante 1 hora con agitación contínua. En todos los casos se efectuaron los blancos de actividad enzimática correspondientes que contenían fracción enzimática, buffer, β-Me y agua. La reacción se detuvo precipitando la proteína y el exceso de reactivo tiólico por agregado de 0,025 ml de solución saturada de sulfato de cobre. La actividad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{U.E./ml} = \frac{(A_{555}-B) \times 10^6 \times V_{final}}{a \times PM \times V_{enzima}}$$

A_{555} : Absorbancia a 555 nm
B: Absorbancia del blanco de reactivos
a : 113,6 (absorbancia de una solución de PBG de concentración 1mg/ml)
PM: peso molecular del PBG
V_{final}: corresponde al volumen de sobrenadante desproteinizado.
V_{enzima}: corresponde al volumen de enzima agregado al sistema de incubación.

II.4.1 Medición de actividad del ALA-D en presencia de dietilpirocarbamato

La enzima purificada se incubó con diferentes concentraciones de dietilpirocarbamato (DEP) a 0 °C, en concentraciones variables entre 0,1 y 0,35 mM.

Las soluciones stock de DEP se prepararon en etanol absoluto y se cuantificaron por reacción con imidazol 10 mM midiendo la absorbancia a 230 nm y utilizando la absortividad molar 3.000 $M^{-1}cm^{-1}$ (Melchior & Fahrney, 1970).

La reacción de etoxiformilación se detuvo por el agregado de imidazol 10 mM a pH 7,4; en ensayos previos se determinó que esta concentración no modifica la actividad de la enzima.

La medición de actividad de ALA-D control para este tratamiento se realizó agregando una alícuota de la proteína al sistema de incubación que contenía DEP e Imidazol como bloqueador de la acción del DEP. Para los estudios de protección por iones Zn, la enzima se pretrató durante 30 minutos a 37 °C con el catión.

La protección por el sustrato se llevó a cabo preincubando la enzima con diferentes concentraciones de ALA durante 10 minutos a 0 °C para minimizar la producción de PBG.

II.4.2 Unidad enzimática

Se define una unidad enzimática (U.E.) como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de PBG por hora en las condiciones estándar de incubación.

La actividad específica (A.E.) se define como las U.E/mg de proteína.

Los valores expresados de actividad enzimática son el promedio ± DE de 3 determinaciones realizadas por duplicado.

II.5 CONTENIDO PROTEICO

Se determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford (1976). A 0,1 ml de una dilución apropiada de la proteína se le agregaron 2,5 ml del reactivo de Bradford (0,01% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 4,7% (p/v) de etanol 95% y 8,5% (p/v) de ácido fosfórico 85%). Se leyó la absorbancia a 595 nm contra un blanco preparado con 0,1 ml de agua y 2,5 ml de reactivo entre los 2 minutos y 1 hora. La cantidad de proteína se calculó según la siguiente expresión:

$$\text{proteína (mg/ml)} = (A_{595}-B) \times f \times Fdil$$

A_{595}: Absorbancia de la muestra
B: Absorbancia del blanco
f : factor obtenido de la curva de calibración realizada con seroalbúmina bovina
F_{dil} : factor de dilución

II.6 PURIFICACIÓN DEL ALA-D

El esquema definitivo para purificar el ALA-D se puso a punto y está descripto en el ítem Resultados. Las condiciones experimentales descriptas fueron las empleadas y en todas las etapas se trabajó a 4 °C, a menos que se indique lo contrario. Los procedimientos utilizados fueron los siguientes:

Homogenato: Las células rotas se extrajeron durante 45 minutos en una solución que contenía: buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4; β-Me 10 mM; acetato de Zn 0,01 mM, cloruro de sodio 0,2 M y PMSF 1 mM, en una relación 1:3 (p/v). Posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 10.000 x g, descartándose el precipitado.

Calentamiento: El sobrenadante proveniente de la etapa anterior se calentó a 60 °C durante 10 minutos, eliminando por centrifugación (30 minutos a 10.000 x g) las proteínas desnaturalizadas.

Fraccionamiento salino: El sobrenadante obtenido en el paso anterior se llevó a 40% de saturación con sulfato de amonio sólido. Se descartó el precipitado obtenido, sin actividad enzimática, y la solución remanente se llevó a 65% de saturación. En ambas precipitaciones se agitó durante 45 minutos luego del agregado de la sal y se centrifugó 30 minutos a 10.000 x g. El precipitado obtenido se disolvió en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 + β-Me 10 mM.

Cromatografía por tamiz molecular Sephacryl S-300: La columna se equilibró con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 + β-Me 10 mM. La proteína se eluyó con 200 ml de buffer con un flujo constante de 0,5 ml/minuto. Dimensiones de la columna: 2,2 cm de diámetro interno, 50 cm de longitud.

Cromatografía de interacción hidrofóbica Phenyl Sepharose: La columna se equilibró con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 + β-Me 10 mM + sulfato de amonio 2 M. La proteína se sembró luego de llevar la suspensión proteica a una concentración final de sulfato de amonio 2 M; se lavó la columna con 15 ml del mismo buffer; y se eluyó con 15 ml de un gradiente lineal de sulfato de amonio (2-0 M) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 + β-Me 10 mM y 30 ml de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 + β-Me 10 mM, a un flujo constante de 0,3 ml/minuto. Dimensiones: 0,95 cm de diámetro interno, 14 cm de longitud.

Cromatografía de intercambio iónico Q Sepharosa: la columna se equilibró con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 + β-Me 10 mM. Una vez sembrada la proteína se agregaron 30 ml del mismo buffer y la elución se realizó con 30 ml de un gradiente lineal de cloruro de sodio (0-1 M) en el buffer de equilibrio. El flujo se mantuvo constante a 0,3 ml/minuto. Dimensiones de la columna: 0,75 cm de diámetro interno, 40 cm de longitud.

Cromatografía de afinidad Tiopropil Sepharosa 6B: La fracción proteica proveniente del fraccionamiento salino, resuspendida y dializada contra buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7,4 para eliminar el exceso de sal, se preincubó con

ditiotreitol (DTT) 10 mM durante 15 minutos a 37 °C. El exceso de reactivo tiólico se eliminó utilizando una columna de Sephadex G-25 (dimensiones de la columna: 1,45 cm de diámetro interno, 25 cm de longitud). eluyendo con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7,4 saturado con nitrógeno (N_2) para mantener condiciones reductoras. La fracción proteica recogida se sembró inmediatamente en la columna de afinidad equilibrada con el mismo buffer, y se eluyó con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7,4 + DTT 25 mM a un flujo constante de 1,0 ml/minuto. Dimensiones de la columna: 1,1 cm de diámetro interno, 2,5 cm de longitud.

II.7 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

II.7.1 Geles desnaturalizantes

Se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Laemmli, 1970). Se utilizaron geles concentradores (4%) y separadores (7,5%). Los geles fueron corridos a temperatura ambiente aplicando una diferencia de potencial de 170 V durante 60 minutos. Las bandas proteicas se revelaron por tinción con reactivo de plata.

II.7.2 Geles nativos. Determinación de la actividad en gel

La proteína fue sembrada en un gel nativo de poliacrilamida (7,5%). Al finalizar la corrida, realizada a 4 °C, uno de los carriles fue teñido con el reactivo de plata y las otras calles se cortaron en tiras de 3 mm de alto. Estas porciones de gel conteniendo proteína se colocaron en tubos Eppendorf con una solución que contenía buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4; ALA 2,5 mM y β-ME 10 mM y se dejaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente se incubó durante 60 minutos a 60 °C, se detuvo la reacción y se cuantificó el producto por el agregado de reactivo de Ehrlich modificado (0,4 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 16,8 ml de ácido acético glacial y 3,2 ml de ácido perclórico).

Se calculó el Rf de la tira de gel que presentó actividad y fue relacionada con la banda proteica revelada por la tinción con plata.

II.7.3 Determinación de la masa molecular relativa mediante geles de PAGE

La masa molecular relativa (Mr) se calculó a través de una corrida en gel desnaturalizante con SDS. Se sembraron las muestras y proteínas estándar de peso molecular conocido.

II.8 DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR RELATIVA MEDIANTE CROMATOGRAFIA POR TAMIZ MOLECULAR

Se utilizó una columna de Sephacryl S-300 a la que se le realizaron corridas individuales de las siguientes proteínas patrones: Tiroglobulina (Mr: 664 kDa), Tiroglobulina + SDS (Mr: 332 kDa) Láctico deshidrogenasa (Mr: 140 kDa) Seroalbúmina bovina (Mr: 67 kDa) .La curva de calibración se obtuvo graficando log de Mr en función de Ve/Vo.

II.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron usando el análisis de varianza para un factor (ANOVA), estableciéndose un nivel de probabilidad menor a 0,05 para considerar diferencias significativas.

II.10 REFERENCIAS

Batlle, A.M. del C. (1997) “Porfirinas y Porfirias. Aspectos Clínicos, Bioquímicos y Biología Molecular”. Actualizaciones Médico-Bioquímicas. Acta Bioquím. Clin. Latinoamer. Suplemento 3.

Bradford, M.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.

Ellman, G.L. (1959) “Tissue sulfhydryl groups”. Arch. Biochem. Biophys. **82** 70-77

Laemmli, U.K. (1970) “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”. Nature **227** 680-685.

Mauzerall, D. & Granick, S. (1956).“The occurrence and determination of delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine”. J. Biol. Chem. **219** 435-46.

Melchior, W.B. Jr. & Fahrney D. (1970) “Ethoxyformylation of proteins. Reaction of ethoxyformic anhydride with alpha-chymotrypsin, pepsin, and pancreatic ribonuclease at pH 4”. Biochemistry **9** 251-258.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA MEDIR ACTIVIDAD DE ALA-D EN MICELIO Y LEVADURA DE *Mucor rouxii*

Se llevaron a cabo una serie de experiencias con el objeto de determinar en ambas fuentes, micelio y levadura, las condiciones óptimas para la extracción de la enzima y la medición de la actividad catalítica.

I.1 OBTENCIÓN DE LA ENZIMA DE MICELIO Y LEVADURA

Se utilizó como fracción enzimática el extracto libre de células.

I.1.1 Micelio

El micelio pulverizado, obtenido según se detalla en Métodos, se resuspendió en una relación 1:3 (p:v), en diferentes soluciones reguladoras con el objeto de establecer la más adecuada para la extracción de la enzima. En la Tabla I.1 se muestran los resultados obtenidos.

Si bien la actividad de la enzima no mostró variación al utilizar buffer Tris-HCl o fosfato de sodio, para evitar la posible interferencia del fosfato en los ensayos con metales e intercambiadores iónicos, se seleccionó para preparar los homogenatos (a menos que se indique lo contrario) al buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4 conteniendo NaCl 0,2 mM, β-Me 10 mM, PMSF 1 mM y acetato de Zn 0,01 mM.

I.1.2 Levadura

La ruptura celular se llevó a cabo de 3 formas diferentes:

a) Sonicación durante 4 minutos a una amplitud comprendida entre 8 y 10μm.

b) Ruptura mecánica en mortero con alúmina 1:2 (p:p).

c) Ruptura mecánica en mortero con perlas de vidrio.

Tabla I.1: Actividad específica de ALA-D del micelio de *Mucor rouxii* en diferentes medios de extracción.

BUFFER	A.E.(%)
Tris-HCl	100,0 ± 2,0
Tris-HCl+β-Me	105,0 ± 2,0
Tris-HCl+β-Me+NaCl	105,0 ± 3,0
Tris-HCl+β-Me+aCl+PMSF	105,0 ± 4,0
Tris-HCl+β-Me+NaCl+PMSF+acetato Zn	105 ± 2,0
Na-PO_4	100 ± 3,0
Na-PO_4+β-Me	106 ± 4,0
Na-PO_4+β-Me+NaCl	106 ± 3,0
Na-PO_4+β-Me+NaCl+PMSF	106 ± 2,0
Na-PO_4+β-Me+NaCl+PMSF+acetato Zn	106 ± 4,0

El sistema de incubación no contenía agregado de β-Me. Los resultados se expresan como porcentaje ± D.E de actividad específica tomando como 100% al valor obtenido en cada buffer sin ningún agregado. pH de los buffers: 7,4; [NaCl]: 0,2 mM; [β-Me]: 10 mM; [PMSF]: 1 mM y [acetato de Zn]: 0,01 mM. A.E: 12,0 ± 0,5 U.E./mg.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I.2. Se observan valores de actividad específica del mismo orden para a) y b). Debido a la mayor simplicidad del tratamiento con alúmina, se eligió este último para la ruptura de células de levadura de *Mucor rouxii.*

Tabla I.2: Actividad específica de ALA-D de levadura de *Mucor rouxii* obtenidas por diferentes métodos de ruptura

TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN	A.E.
Sonicación	3,0 ± 0,4
Alúmina	4,5 ± 0,5
Perlas de vidrio	1,7 ± 0,2

El sistema de incubación se detalló en Métodos. Los resultados representan el promedio ± D.E. de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes,

Luego de la ruptura las células se extrajeron con una solución que contenía buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4+NaCl 0,2 mM+β-Me 10 mM+PMSF 1 mM+acetato de Zn 0,01 mM en una relación 1:3 (p:v) según se detalló en Métodos. La elección del

buffer se realizó en forma análoga a lo descripto para las células de micelio, habiéndose encontrado los mismos resultados.

I.2 CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

I.2.1 Efecto de la concentración de proteínas

La variación de la actividad enzimática en función de diferentes cantidades de proteína (Figura I.1) mostró una buena correlación lineal, con valores de r^2 cercanos a 1 (0,996 y 0,999 para micelio y levadura respectivamente).

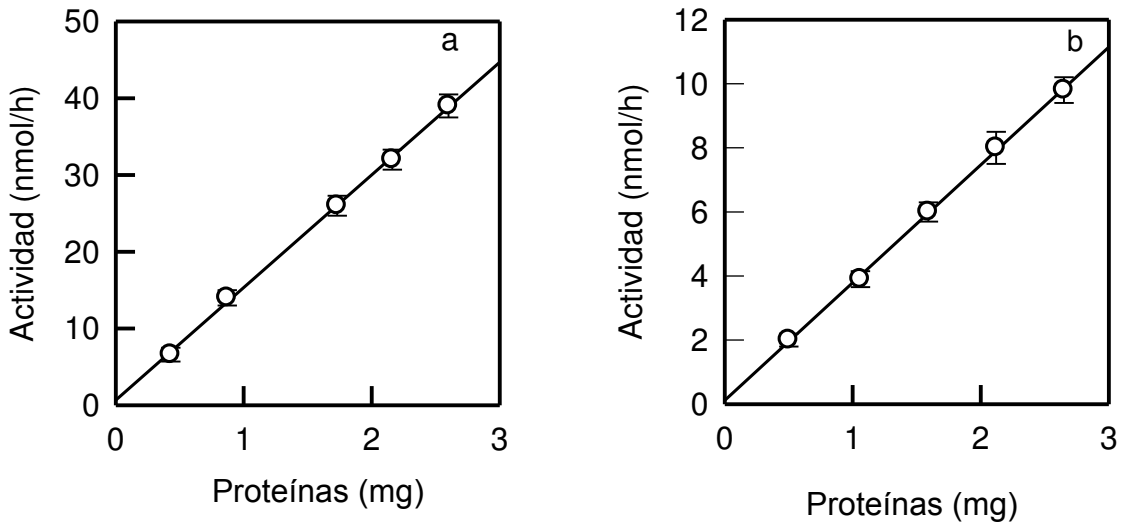


Figura I.1: Efecto de la concentración de proteínas sobre la actividad del ALA-D de micelio (a) y de levadura (b) de *Mucor rouxii*.

La actividad se midió según se describió en Métodos y los resultados se expresaron como en la Tabla I.2.

I.2.2 Efecto del tiempo de incubación

En ambas fuentes, micelio y levadura, se encontró que hasta los 90 minutos de incubación la formación de PBG aumentó linealmente con el tiempo (Figura I.2).

Por lo tanto se tomó como tiempo óptimo de incubación para la determinación de la actividad enzimática 60 minutos.

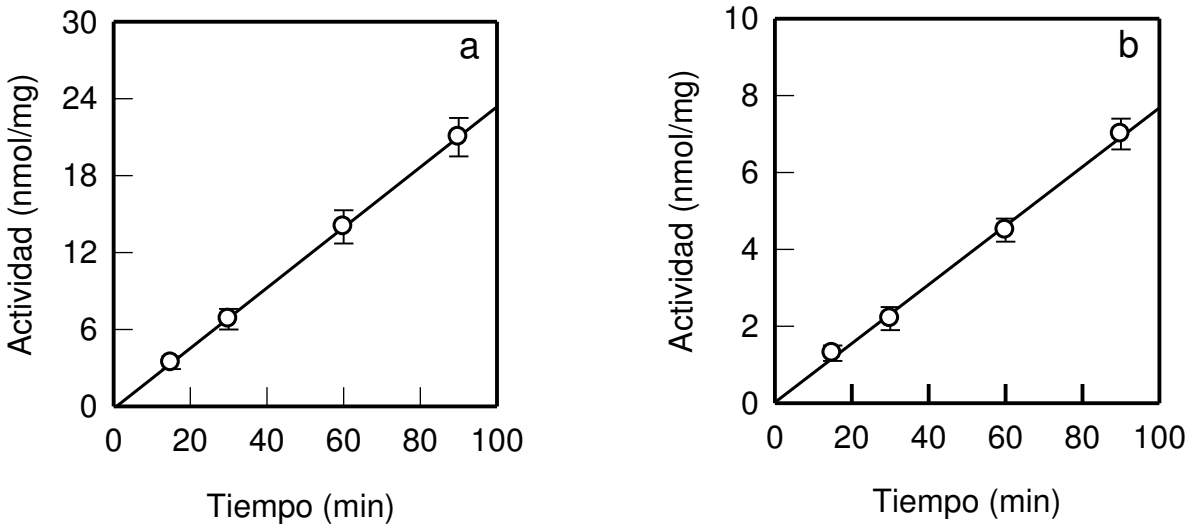


Figura I.2: Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad del ALA-D en micelio (a) y levadura (b).La actividad se midió según se describió en Métodos y los resultados se expresaron como en la Tabla I.2. (a) r^2: 0,995; (b) r^2: 0,997.

I.2.3 Efecto de la temperatura de incubación

El estudio de la relación entre la formación de PBG y la temperatura de incubación dió por resultado un máximo de actividad catalítica bien definido a los 60 °C, tanto en el caso de la enzima de micelio (Figura I.3 a) como de levadura (Figura I.3 b).

Estos resultados corroboran la conocida estabilidad térmica de esta enzima, detectada en la mayoría de las fuentes estudiadas. Dicha propiedad se tuvo en cuenta al momento de purificar el ALA-D de ambas fuentes (Capítulo II de Resultados y Discusión).

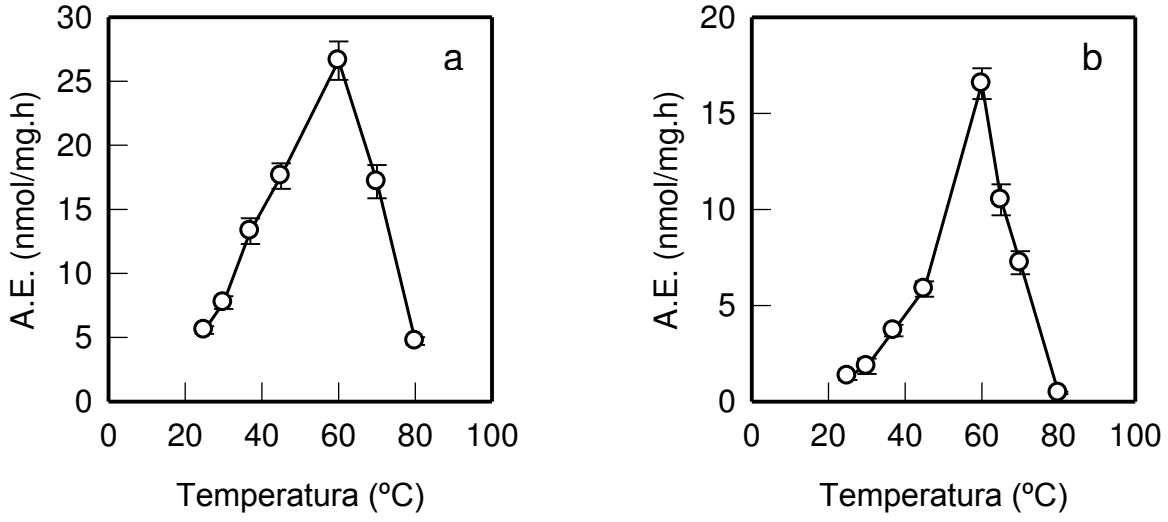


Figura I.3: Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad del ALA-D en micelio (a) y levadura (b).

La actividad se midió según se describió en Métodos y los resultados se expresaron como en la Tabla I.2.

Mediante la Ecuación de Arrhenius y graficando el log de la velocidad de reacción (v) en función de la inversa de la temperatura absoluta, se determinó el valor de la energía de activación de la reacción catalizada por el ALA-D en micelio: E_a: 9,369 kcal/mol (Figura I.4 a) y en levadura E_a: 14,284 kcal/mol (Figura I.4 b).

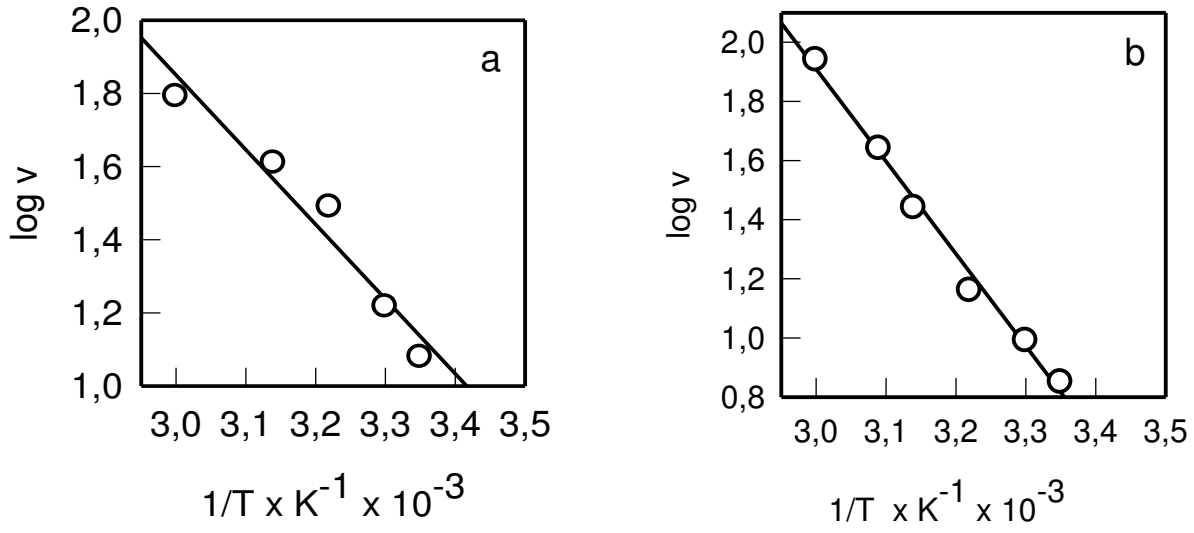


Figura I.4: Gráfico de Arrhenius para el ALA-D proveniente de micelio (a) y levadura (b) Los datos utilizados son los de la Figura I.3 a) y b). (a) r: 0,9492), (b) r: 0,9913.

I.2.4 Efecto del agregado de reactivos tiólicos

Es sabido que la presencia de reactivos tiólicos tales como β-mercaptoetanol (β-Me), cisteína (Cys), ditiotreitol (DTT) y glutation reducido (GSH) estimulan la actividad de enzimas de naturaleza sulfhidrílica como el ALA-D. Luego del agregado de diferentes concentraciones de protectores de grupos SH al medio de incubación de la enzima proveniente de micelio y levadura, se observó un incremento máximo no mayor al 20% en presencia de β-Me 10 mM y de DTT 20 mM. Los resultados se ilustran en la Figura I.5 a y b.

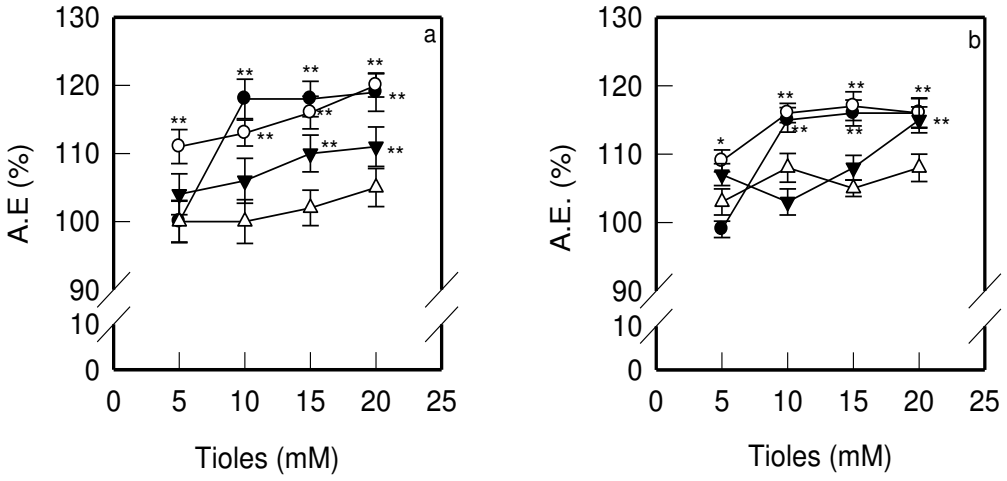


Figura I.5: Efecto de reactivos tiólicos sobre la actividad del ALA-D proveniente de micelio (a) y levadura (b).

Los resultados se expresan como porcentaje ± D.E de actividad específica tomando como 100% la actividad de la enzima sin el agregado de reactivo tiólico. Los detalles experimentales se describen en Métodos. Los resultados representan el promedio ± D.E. de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. Valores medio control: micelio: A.E.=12,8 ±1,1 U.E./mg; levadura : A.E.=4,0 ±0,8 U.E./mg). (▼) Cys, (△) GSH, (O) DTT; (●)β-Me. Diferencia significativa con respecto al control: (*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$.

I.2.5 Efecto de la concentración de sustrato

Se midió la actividad de ALA-D variando las concentraciones de ALA entre 0,025 y 5 mM. Se observó tanto para micelio como para levadura que a una concentración 2,5 mM la enzima está saturada. Se seleccionó esta concentración de sustrato como la óptima para el sistema estándard de incubación.

I.2.6 Determinación del pH óptimo

Se estudió la dependencia de la actividad enzimática con el pH en el rango comprendido entre 6 y 9. En la Figura I.6 se muestran los resultados obtenidos. Se encontró que el pH óptimo fue de 7,4 tanto para micelio como para levadura.

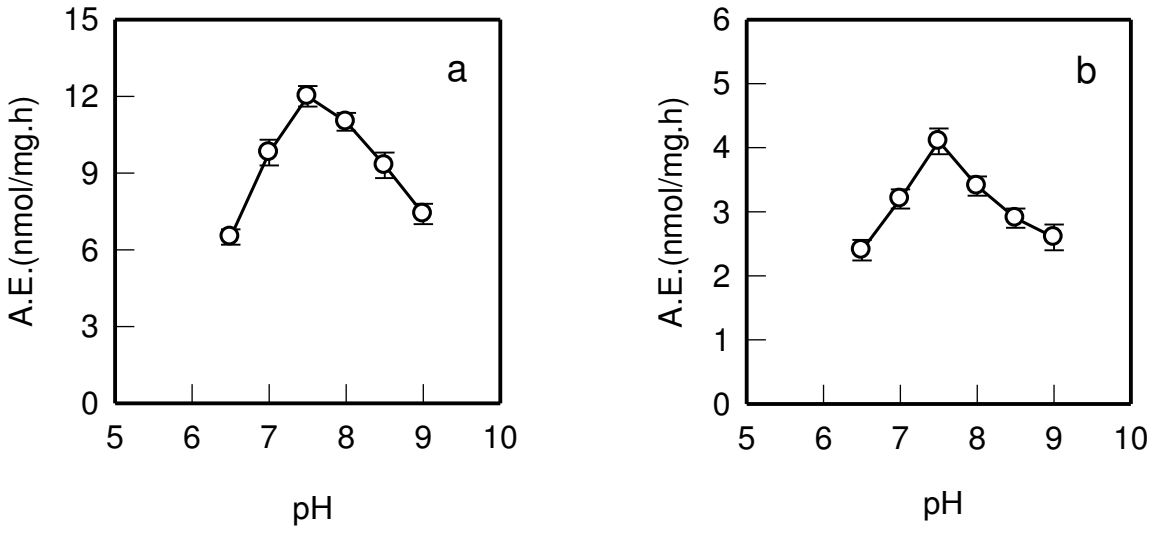


Figura I.6: Determinación del pH óptimo.

La actividad se midió según se describió en Métodos y los resultados se expresaron como en la Tabla I.2.

I.2.7 Efecto del almacenamiento sobre la actividad enzimática.

Se fraccionaron alícuotas del extracto enzimático provenientes de micelio y levadura en tubos eppendorff. Se mantuvieron a 4 °C durante 9 días en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, en presencia y ausencia del inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Los resultados se muestran en la Tabla I.III.

El almacenamiento de los extractos libres de células a 4°C mostró una pérdida en la actividad de la enzima desde el segundo día, en presencia y ausencia de PMSF, mayor en aerobiosis que en anaerobiosis. Esta disminución de actividad fue prevenida parcialmente por el PMSF y tampoco revirtió en las condiciones óptimas de incubación (datos no mostrados). En este caso pueden estar actuando proteasas que no sean inhibidas por PMSF. Entre el quinto y el noveno día fue más evidente el efecto protector del PMSF independientemente de la presencia de

oxígeno. En este intervalo la pérdida actividad se debería principalmente a la acción de proteasas, que de no ser inhibidas por PMSF dejarían una actividad residual de entre el 5 y el 12% al noveno día; con el agregado de este reactivo se conservó entre el 44 al 70 % de actividad.

Tabla I.3: Efecto del estacionamiento sobre la actividad enzimática

ACTIVIDAD ESPECÍFICA (%)				
MICELIO				
Tiempo (días)	Anaerobiosis sin PMSF	Anaerobiosis con PMSF	Aerobiosis sin PMSF	Aerobiosis con PMSF
0	100 ± 3	100 ± 4	100 ± 3	100 ± 5
2	75 ± 4*	85 ± 6*	65 ± 4**	79 ± 3*
5	43 ± 2**	78 ± 5*	41 ± 3**	77 ± 4*
7	20 ± 1**	77 ± 5**	28 ± 2**	73 ± 3*
9	5 ± 1**	70 ± 6*	9 ± 1*	67 ± 5**
LEVADURA				
0	100 ± 4	100 ± 7	100 ± 5	100 ± 3
2	64 ± 2**	75 ± 3*	60 ± 4**	73 ± 4**
5	47 ± 2**	58 ± 3**	51 ± 3**	57 ± 2**
7	23 ± 1**	53 ± 2**	30 ± 4**	55 ± 3**
9	10 ± 1**	44 ± 3**	12 ± 2**	49 ± 2**

Se tomaron las alícuotas de los extractos enzimáticos estacionados a los tiempos indicados, y se determinó la actividad según el procedimiento descripto en Métodos y los resultados se expresaron según la Figura I.5. El 100% corresponde a la actividad enzimática sin el agregado de β-Me. Valores A.E medios control: 11,1 ± 0,8 (micelio) A.E.: 3,1 ± 0,5 (levadura). Diferencia significativa con respecto al control: (*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$.

I.3 CONCLUSIONES

- De los ensayos descriptos en el ítem I.1 se determinó como medio óptimo para la extracción de la enzima de ambas fuentes el siguiente buffer: Tris-HCl 20 mM pH 7,4+NaCl 0,2 mM+β-Me 10 mM+PMSF 1 mM+acetato de Zn 0,01 mM en una relación 1:3 (p:v)
- A partir de los resultados de las experiencias descriptas en el ítem I.2 se estableció, para ambas formas mórficas del ALA-D de *Mucor rouxii*, como composición óptima para el sistema estándar de incubación: Tris HCl 50 mM pH:

7,4; ALA 2,5 mM; β-Me 10 mM; fracción enzimática (mg de proteína capaces de producir entre 3 y 25 nmoles de PBG) y agua csp hasta completar el volumen final. La incubación se llevó a cabo a 37 °C en aerobiosis y en agitación constante durante 1 hora.

- En forma análoga a lo observado en la mayoría de las fuentes estudiadas la enzima presentó su característica termoestabilidad y naturaleza sulfhidrílica.

- El extracto libre de células obtenido tanto de micelio como de levadura, puede ser almacenado a 4ºC durante 48 horas, en ausencia o presencia de oxígeno, conservando entre un 65 y 85% de su actividad cuando la determinación fue realizada sin agregado de protector de grupos –SH. La presencia del inhibidor de proteasas PMSF en el buffer de extracción es necesaria para bloquear la acción de las enzimas proteolíticas, sensibles a este reactivo, presentes en los extractos.

CAPÍTULO II

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ALA-D DE MICELIO Y LEVADURA DE *Mucor rouxii.*

II.1 ENSAYOS PRELIMINARES

II.1.1. Tratamiento térmico

Teniendo en cuenta la naturaleza termoestable de esta enzima en otras fuentes (Batlle *et al.,* 1967) se decidió emplear el tratamiento térmico como una de las etapas iniciales para la purificación del ALA-D de *Mucor rouxii.*

Para estudiar la estabilidad térmica de la enzima, proveniente de ambas fuentes, se preincubó el extracto libre de células, en ausencia de sustrato, en baño de agua con agitación constante, durante 5, 10 y 20 minutos a diferentes temperaturas (37, 45, 60 y 65 ºC) (Figuras II.1 a y b). Finalizados los distintos tiempos de calentamiento, las suspensiones enzimáticas se enfriaron rápidamente en baño de hielo y se centrifugaron a 10.000 x g durante 30 minutos. En los sobrenadantes se determinó actividad enzimática y contenido de proteínas, previo agregado de β-Me 10 mM.

Los resultados obtenidos indicaron que la enzima, tanto en micelio como en levadura, es termoestable y que la temperatura y el tiempo óptimo de calentamiento, para ser utilizados en el esquema de purificación, son de 60 °C y 10 minutos respectivamente en ambas formas mórficas del hongo.

II.1.2. Precipitación con sulfato de amonio

El sobrenadante proveniente del tratamiento térmico se sometió a un fraccionamiento salino con sulfato de amonio para determinar el rango de precipitación óptimo con esa sal. En una primera experiencia, y teniendo en cuenta los rangos de precipitación determinados para la enzima proveniente de otras fuentes (Batlle *et al.,* 1987), la suspensión enzimática se fraccionó con sulfato de

amonio en los siguientes rangos: 0-30%, 30-55%, 55-70% y 70-90%. La proteína precipitada fue resuspendida en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, β-Me 10 mM para determinar su actividad enzimática. Independientemente de trabajar con micelio o levadura, casi el 100% de las unidades precipitaron en el rango 40-65% de saturación (Tabla II.1).

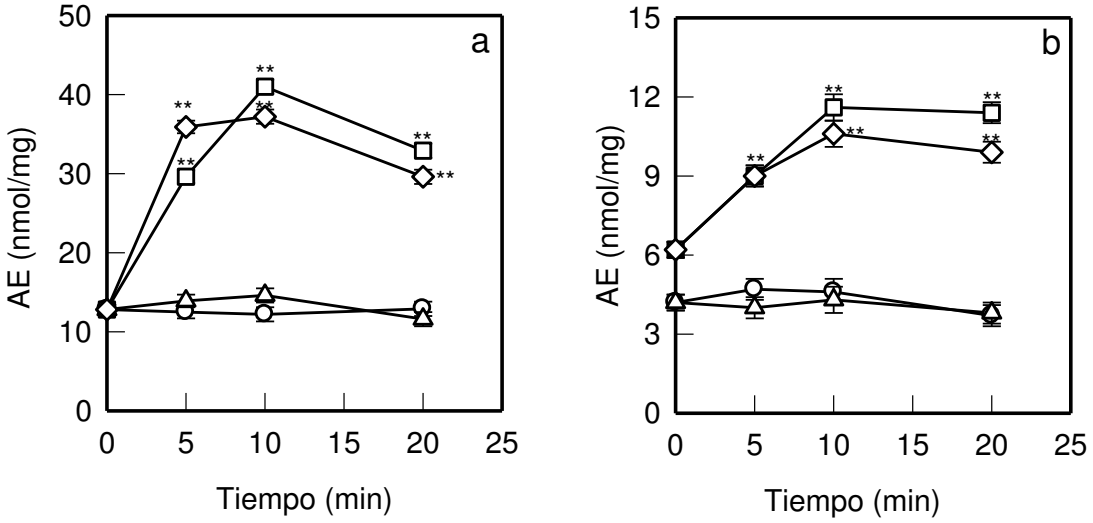


Figura II.1: Estabilidad térmica del ALA-D de micelio (a) y levadura (b) de *Mucor rouxii*.

Luego de la preincubación (○) 37 ºC, (△) 45 ºC, (□) 60 ºC, (◊) 65 ºC, la actividad de la enzima se realizó según se detalló en Métodos. Los resultados representan el promedio ± D.E. de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. Diferencia significativa con respecto al control: (*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$.

Tabla II.1: Fraccionamiento salino del ALA-D de *Mucor rouxii*

% Saturación con $(NH_4)_2SO_4$	ACTIVIDAD (%)	
	MICELIO	LEVADURA
Precipitado 0-40	0,0	0,0
Precipitado 40-65	97,0 ± 4,2	97,5 ± 5,2
Sobrenadante 40-65	3,0 ± 0,4	2,5 ± 0,1

La determinación de la actividad de la enzima (U.E.) se llevó a cabo según lo descripto en Métodos. Los resultados representan el promedio ± D.E. de la actividad obtenidos de tres experimentos independientes.

II.2 PURIFICACIÓN DEL ALA-D DE MICELIO Y LEVADURA DE *Mucor rouxii*

A partir de los resultados obtenidos en los estudios previos y las características físico-químicas de la enzima se decidió emplear, para ambas fuentes enzimáticas, la siguiente secuencia de pasos para su purificación. Todas las operaciones, salvo se indique otra condición, se realizaron a 4ºC.

Homogenato (H): A partir de aproximadamente 30 g de tejido (peso húmedo) para micelio y de 15 g (peso húmedo) para levadura se procedió a la ruptura según se detalló en Métodos. Posteriormente se resuspendieron las células rotas en el buffer adecuado en una relación de 1:3 (p:v), y se centrifugó a 10.000 x g durante 30 minutos; se descartó el precipitado y el sobrenadante corresponde a la fracción H.

Calentamiento (C): La fracción H se calentó durante 10 minutos a 60 ºC, se centrifugó para separar la proteína desnaturalizada y el sobrenadante resultante constituye la fracción C.

Fraccionamiento salino (Fs): La fracción C se trató con sulfato de amonio. Reservando la proteína que precipita en el rango 40-65%. Previa resuspensión en buffer corresponde a la fracción Fs

Cromatografía por tamices moleculares en Sephacryl S-300 (S-300): La suspensión proteica proveniente del fracccionamiento salino fue sembrada en una columna de Sephacryl S-300. En las fracciones eluídas se midió actividad enzimática y proteínas colectando las que presentaron actividad (fracción S-300). La actividad específica de las fracciones S-300 fue 2,9 y 3,2 veces superior a la del paso anterior, para micelio y levadura respectivamente. Los perfiles de elución correspondientes a ambas fuentes enzimáticas se muestran en la Figura II.2

Cromatografía por interacción hidrofóbica en Phenyl-Sepharosa (Ph-Seph): La fracción con actividad eluída de la etapa anterior y concentrada utilizando tubos centripep 10 de Amicon (2 ml), se sembró en la columna de Phenyl-Sepharosa. Siguiendo el proceso descripto en Métodos y determinando en cada fracción el contenido de proteínas y la actividad de ALA-D, se obtuvo el perfil de elución que se muestra en la Figura II.3.

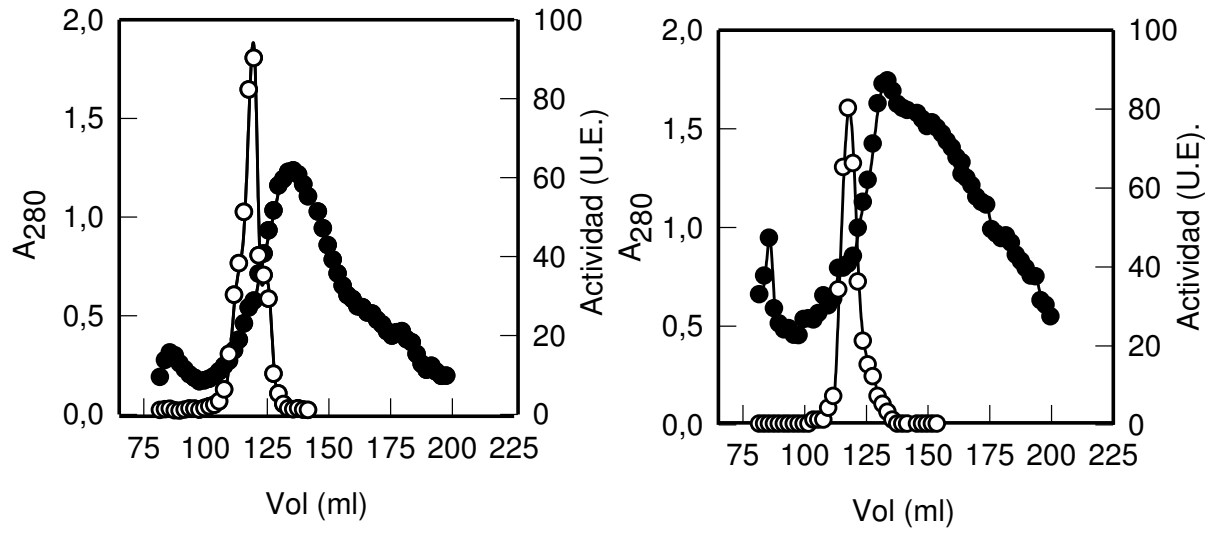


Figura II.2: Perfil de elución para el ALA-D de micelio (a) y levadura (b) de *Mucor rouxii* a través de la columna de Sephacryl S-300.

La elución de la proteína se llevó a cabo empleando buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 + β-Me 10 mM (flujo 0,5 ml/min). En cada fracción se determinó la actividad enzimática (○) y el contenido de proteínas (●) siguiendo la metodología descripta en Métodos.

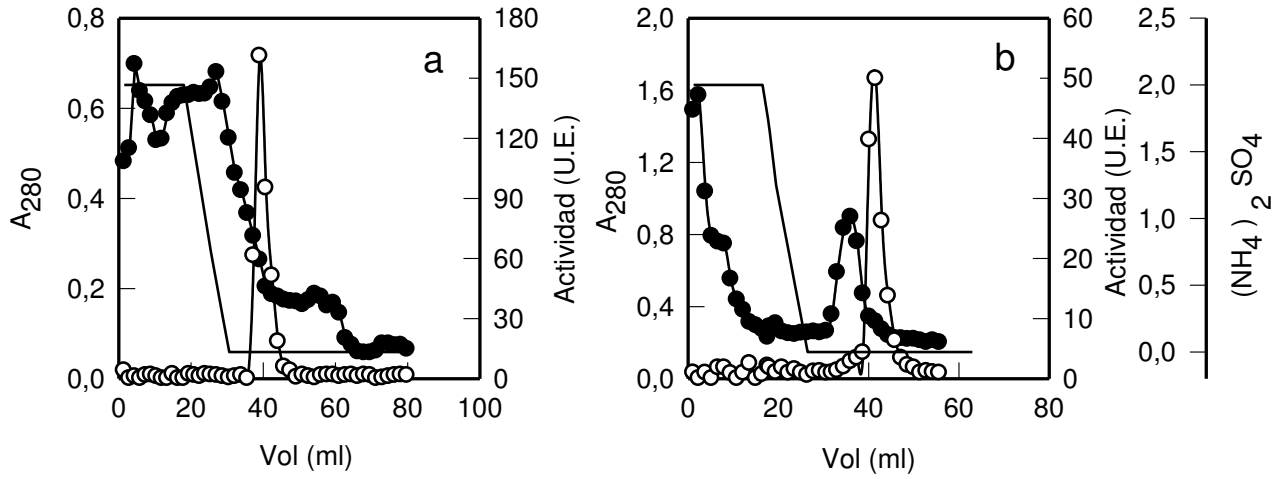


Figura II.3: Perfil de elución del ALA-D de micelio (a) y levadura (b) de *Mucor rouxii* a través de una columna de Phenyl-Sepharosa. La proteína se eluyó, en ambos casos, utilizando un gradiente lineal de sulfato de amonio (2-0 M) (—) y buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 + β-Me 10 mM (flujo 0,3 ml/min). En los eluídos se determinó la actividad de la enzima (○) y el contenido proteico (●) siguiendo la metodología descripta en Métodos.

La enzima eluyó de la columna, en ambos casos, luego de finalizado el gradiente lineal de sulfato de amonio (2-0 M), a un volumen comprendido entre 7 y 14 ml de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 β-Me 10 mM (fracción Ph-Seph), dando cuenta de una fuerte interacción con la matriz hidrofóbica. Esta fracción presentó, respecto de la fracción S-300, una actividad específica 3 y 2 veces superior en micelio y levadura respectivamente.

Cromatografía por intercambio iónico en Q-Sepharosa (Q-Seph): La fracción Ph-Seph fue concentrada alrededor de 8 veces en un tubo centripep 10 de Amicon hasta un volumen aproximado de 1,7 ml y sembrada en la columna de Q-Seph La proteína retenida se eluyó, según se describió en Métodos, por aplicación de un gradiente lineal de NaCl (0-1M) en el buffer de equilibrio de la columna. A una fuerza iónica de 0,6 M en NaCl en un volumen de aproximadamente 10 ml (fracción Q-Seph). En las Figuras II.4 se muestran los perfiles de elución correspondientes. Respecto a la fracción Ph-Seph la proteína eluída mostró un valor de actividad específica 11,5 y 9 veces en micelio y levadura respectivamente.

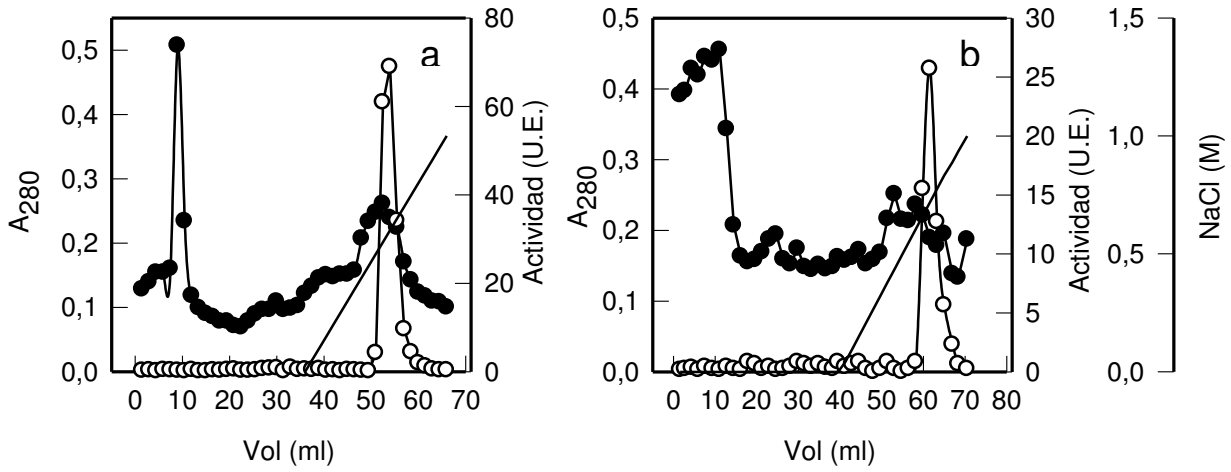


Figura II.4: Perfil de elución del ALA-D de micelio (a) y levadura (b) de *Mucor rouxii* a través de una columna de Q-Sepharosa.

La proteína fue eluída aplicando un gradiente lineal de NaCl (0-1M) (—) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 + β-Me 10 mM (flujo 0,3 ml/min). En los eluídos se determinó el contenido proteico (●) y la actividad de la enzima (○), siguiendo la metodología descripta en Métodos.

En la Tabla II.2 se resumen los resultados obtenidos para purificar el ALA-D de micelio y levadura siguiendo el esquema de purificación descripto.

La proteína proveniente de micelio se consiguió purificar 700 veces, mientras que para la enzima de levadura el grado de purificación fue del órden de 500 veces, con un rendimiento, en ambos casos del 24%. La última etapa fue la que produjo mayor purificación con respecto al paso inmediato anterior.

Tabla II.2: Cuadro de Purificación para el ALA-D de micelio y levadura de *Mucor rouxii.*

FRACCIÓN	Vol (ml)	Proteínas (mg/ml)	Proteínas Totales (mg)	UE/ml (nmol/ml)	UE Totales (nmol)	AE (nmol/mg)	P	R (%)
MICELIO								
H	92,0	1,050	96,600	13,6	1251	12,9	1,0	100,0
C	86,0	0,260	22,400	13,8	1187	53,1	4,1	94,8
Fs	5,6	2,240	12,500	200,0	1120	89,6	6,9	89,5
S-300	23,0	0,097	2,230	24,8	570	255,6	19,8	45,6
Ph-Seph	9,7	0,052	0,500	41,4	402	804,0	62,3	32,1
Q-Seph	10,4	0,003	0,033	28,9	300	9.090,9	704,7	23,9
LEVADURA								
H	100,0	1,595	159,000	7,5	749	4,7	1,0	100,0
C	95,0	0,393	37,300	7,1	679	18,2	3,9	90,6
Fs	6,7	2,270	15,200	90,9	609	40,0	8,5	81,3
S-300	21,7	0,120	2,600	15,5	336	129,2	27,5	44,9
Ph-Seph	9,7	0,102	0,980	27,2	264	269,4	56,7	35,3
Q-Seph	11,9	0,006	0,072	14,9	177	2.458,3	519,7	23,6

U.E.: unidades enzimáticas; A.E.: actividad específica; P: grado de purificación; R: rendimiento

II.3 ETAPAS ALTERNATIVAS DE PURIFICACIÓN DEL ALA-D. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD EN THIOPROPYL-SEPHAROSA 6B

Con el objeto de ensayar otros métodos alternativos de purificación y teniendo en cuenta la naturaleza sulfhidrílica del ALA-D se decidió emplear la inmovilización reversible de proteínas. Se utilizó el reactivo en fase sólida Thiopropyl-Sepharosa 6B (TPS-6B) que contiene, en su forma protegida, grupos α-tiopiridona los cuales en presencia de péptidos y proteínas con grupos sulfhidrilos expuestos son desplazados por un intercambio tiol-disulfuro. Un tratamiento posterior con agentes

reductores permite la separación y recuperación de la proteína o péptido de interés del grupo protector.

La fracción Fs proveniente de micelio de *Mucor rouxii,* fue utilizada como extracto proteico. Previo al pasaje por TPS-6B con el propósito de mantener reducidos los grupos tioles, a través de los cuales se lleva a cabo la interacción con el gel, y lograr así un buen rendimiento de acoplamiento, la fracción Fs fue preincubada con ditiotreitol (DTT) 10 mM durante 15 min. a 37° C. Posteriormente se elimina el exceso de DTT a través de una columna de Sephadex G-25; cuyo perfil de elución se representa en la Figura II.5. Cuantificando los grupos SH con el reactivo de Ellman y las proteínas con la lectura de absorbancia a 280 nm, pudo observarse una eficiente separación del DTT y el pico proteico que se concentró a un volumen de 0,5 ml.

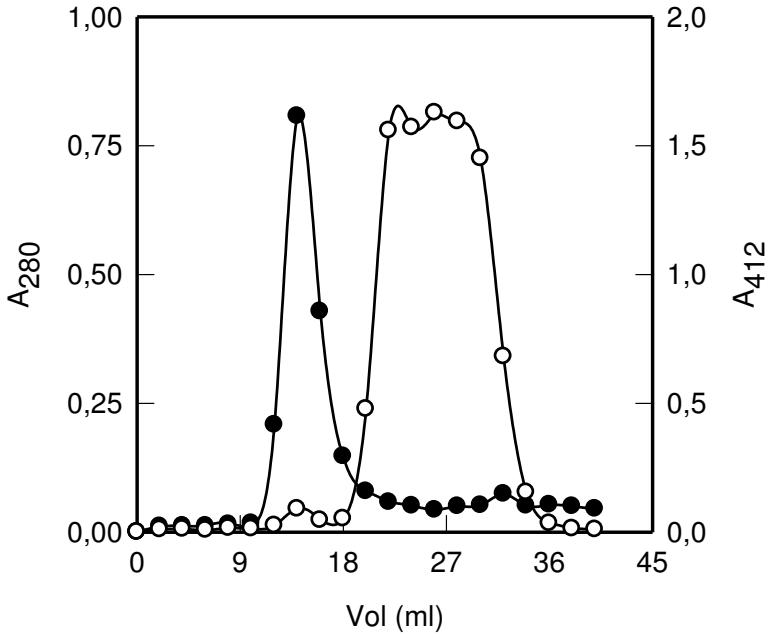


Figura II.5: Perfil de elución de la columna de cromatografía por Sephadex G-25 utilizada para la eliminación del exceso de DTT según la metodología descripta en Métodos. En los eluídos se determinó el contenido de proteínas (○) y de grupos sulfhidrilos (●)

La fracción concentrada se sembró en la columna de TPS-6B. Luego de lavar el gel con buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; la proteína se eluyó, según la metodología

descripta en Métodos, con un flujo de 0,2 ml/min. Tanto en las fracciones de lavado como en las de elución se determinó actividad enzimática y el contenido de proteínas por lectura de la absorbancia a 280 nm. También se analizó el desplazamiento de los grupos tiopiridona del gel de afinidad por lectura de absorbancia a 343 nm.

En la Figura II.6 se muestra el perfil de elución de la columna de TPS-6B. Puede observarse además que el exceso de proteínas y unidades no retenidas son eliminadas junto con los grupos tiopiridona desplazados del gel por el acoplamiento de las proteínas al mismo. Los grupos tiopiridona también son separados durante la elución de la proteína producida por el agregado de DTT como agente desplazante.

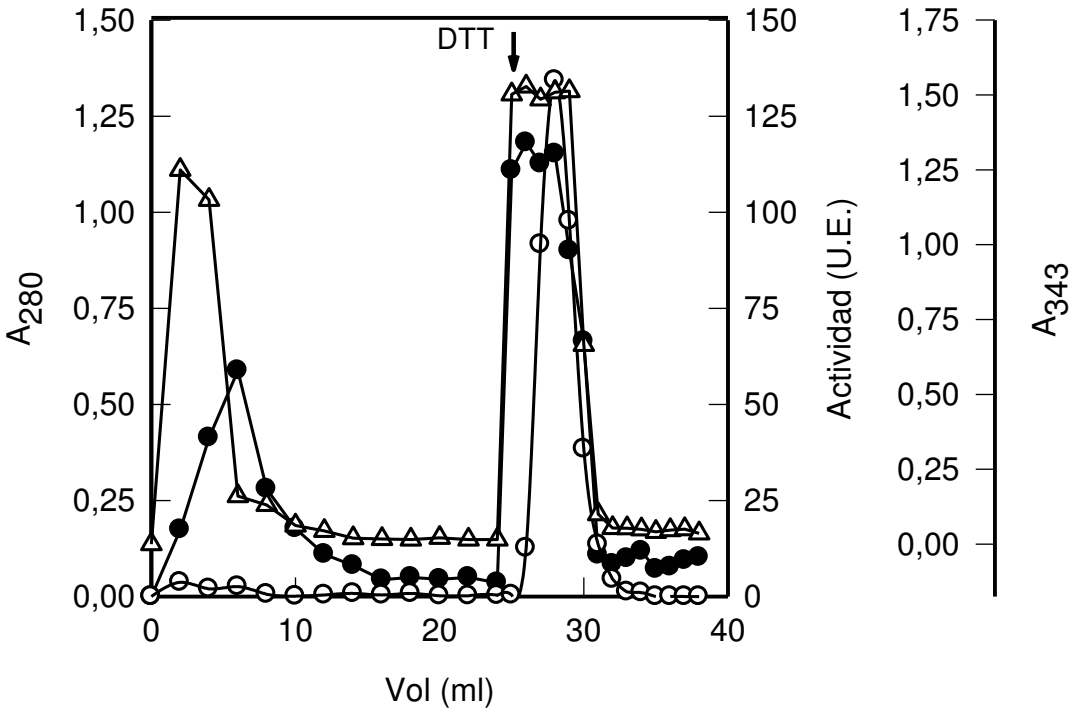


Figura II.6: Cromatografía por afinidad en Tiopropil-Sepharosa 6B.

Perfil de elución para el ALA-D de micelio de *Mucor rouxii* En los eluídos se determinó el contenido de proteínas (●), las unidades enzimáticas (○) y los grupos tiopiridona (△) desplazados durante la unión y liberación de la enzima, según lo descripto en Métodos.

Haciendo el cálculo del grado de purificación y rendimiento (volumen de cada fracción 0,5 ml) que se obtiene por aplicación de esta metodología y refiriéndolo a la

cantidad de material sembrado en la columna se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla II.3. Se logró un acoplamiento muy bueno de las unidades sembradas, así como también una alta recuperación por elución de la columna de afinidad (96%).

Tabla II.3: Cromatografía de afinidad utilizando TPS-6B.

FRACCIÓN	U.E. (nmol/ml)	Proteínas (mg/ml)	A.E. (UE/mg)	R (%)	P
Sembradas	59,5	1,630	36,5	100	1,0
Retenidas	57,2	0,179	319,5	96	8,8
No retenidas	2,2	1,451	1,5	4	--

La fracción a la cual se aplicó este tratamiento corresponde a Fs de micelio. Los detalles de la técnica se encuentran descriptos en Métodos.

Los datos de la Tabla II.3 indican un grado de purificación de aproximadamente 9 veces por aplicación de esta técnica. El bajo porcentaje de la enzima no retenida (4%) dió cuenta de la buena interacción con el gel debido a la naturaleza sulfhidrílica del ALA-D. Por otro lado cuando se midió la actividad enzimática del ALA-D acoplada al gel se pudieron cuantificar tan solo el 52% de las unidades enzimáticas retenidas en la columna de TPS-6B. Este hecho revela que no todas las moléculas de la enzima interactuaron con el gel a través del mismo tipo de grupo SH. El 50% lo hizo mediante grupos SH esenciales para la medición de actividad y el resto a través de otros grupos tioles que no estan involucrados en la catálisis.

Si bien este tratamiento arrojó un buen grado de purificación y un excelente grado de recuperación, presenta sin embargo una serie de desventajas que nos llevaron a descartarlo en el esquema de purificación propuesto. Entre ellas se pueden mencionar: las condiciones de anaerobiosis requeridas para la siembra y separación del exceso de DTT de la columna de Sephadex G-25, el pequeño volumen de extracto enzimático con el que se debe trabajar y la imposibilidad de recuperar el gel de la Tiopropyl-Sepharose 6B luego de su uso.

Se obtuvieron resultados similares cuando este procedimiento se aplicó al extracto Fs de levadura (%R: 90; P: 9,6)

II.4 CARACTERIZACIÓN DEL ALA-D DE MICELIO Y LEVADURA DE *Mucor rouxii*.

II.4.1 Cinética de la reacción

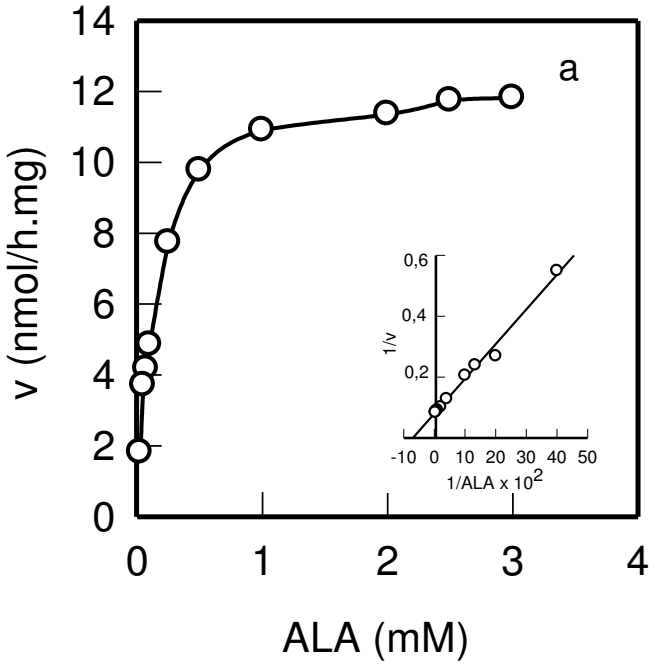
Empleando el extracto libre de células como fracción enzimática, se llevaron a cabo estudios de velocidades iniciales con el objeto de determinar los parámetros cinéticos de la enzima ALA-D proveniente de micelio y levadura de *Mucor rouxii.* También se caracterizó la inhibición por un análogo del sustrato (ácido levulínico).

II.4.1.1 Estudio de velocidades iniciales

La reacción catalizada por el ALA-D, en la que participan 2 moléculas del mismo sustrato (ALA) para generar 1 molécula de producto (PBG), ha sido estudiada en una amplia variedad de fuentes mostrando en la mayoría de los organismos un comportamiento michaeliano.

En la Figura II.7 se representa la velocidad de formación de producto variando la concentración de sustrato, obteniéndose curvas de saturación hiperbólicas en ambos casos; asimismo la saturación se produjo a una concentración de ALA de 2,5 mM. Dado que la reacción enzimática en estudio mostró para todas las concentraciones de sustrato ensayadas una relación líneal entre la cantidad de producto formado y el tiempo, los valores de velocidad correspondientes a una hora de incubación son valores de velocidades iniciales que pueden ser representados en los gráficos de inversas de Lineweaver-Burk (Figura II.7, inset) a partir de los cuales para ambos tipos celulares de calcularon los parámetros cinéticos Km y V_{max}

Para la enzima de micelio los valores hallados fueron de 0,14 ± 0,05 mM y 12,5 ± 1,1 nmol/h.mg para Km y V_{max} respectivamente, mientras que para el ALA-D de levadura el Km fue 0,23 ± 0,04 mM y la V_{max} 4,5 ± 0,7 nmol/h.mg.



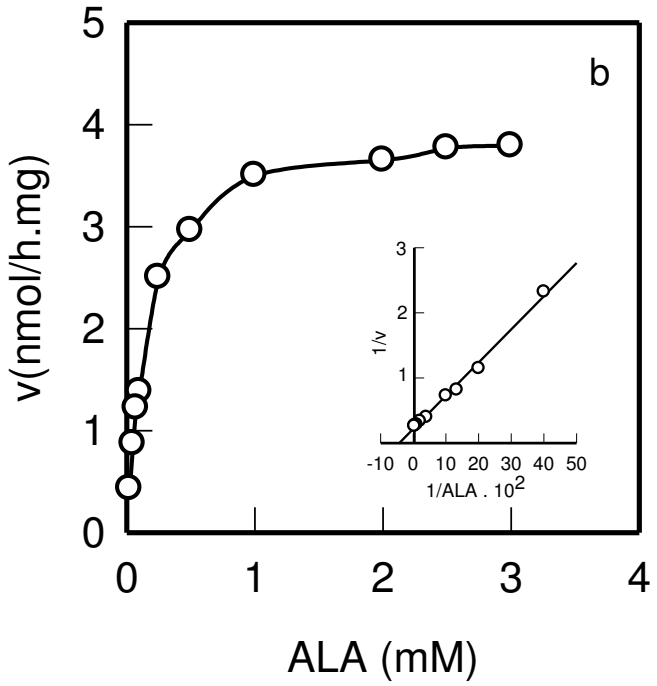


Figura II.7: Curva de saturación por sustrato para el ALA-D de micelio (a) y de levadura (b) de *Mucor rouxii*. **Inset:** Gráficos de inversas de Lineweaver-Burk para la cinética del ALA-D de micelio (a) y levadura (b). La actividad se midió según lo descripto en Métodos.

El ALA-D de micelio y levadura mostró valores de constantes de afinidad por el ALA similares. Si bien los valores de V_{max} no representan parámetros cinéticos para caracterizar la enzima, los mismos se condicen con los valores de actividad específica medidos para ambas formas mórficas del hongo durante la purificación. Los valores de Km obtenidos se encuentran dentro del mismo orden que los reportados en preparaciones provenientes de diferentes fuentes tales como*:* eritrocitos de ave y conejo (0,5 mM) (Granick & Mauzerall, 1958), *Saccharomyces cerevisiae* (1,5 mM) (Barreiro, 1967), hígado bovino (0,15 mM) (Batlle *et al*., 1967), *Chlorella regularis*, (0,5 mM) (Tamai *et al*., 1979), hojas de espinaca (2,4 mM) (Liedgens *et al*., 1983), eritrocitos humanos (0,29 mM) (Gibbs *et al*., 1985 a) y *Pieris brassicae* (0,36 mM) (van Gessel & Kayser, 2007). Paveto *et al*. (1989), trabajando con extractos crudos de micelio y levadura de *Mucor rouxii,* obtuvieron valores de Km similares a los hallados en este trabajo.

II.4.2 Inhibición por ácido levulínico

Se estudió el efecto del agregado de ácido levulínico, un análogo del ALA, sobre la actividad del ALA-D.

II.4.2.1 Curva de inhibición por ácido levulínico sobre la actividad del ALA-D

Se determinó la actividad de la enzima proveniente de ambos tipos celulares, utilizando diferentes concentraciones del inhibidor (0,025-2 mM) para una concentración fija de ALA de 0,25 mM con el objeto de encontrar las concentraciones de ácido levulínico necesarias para la caracterización de la inhibición producida por este compuesto.

En la Figura II.8 se grafica el porcentaje de actividad específica en función de la concentración de inhibidor, observándose un comportamiento similar para la enzima tanto de micelio como de levadura.

Teniendo en cuenta estos resultados se eligieron, para la caracterización de la inhibición, concentraciones de ácido levulínico a partir de 0,25 mM.

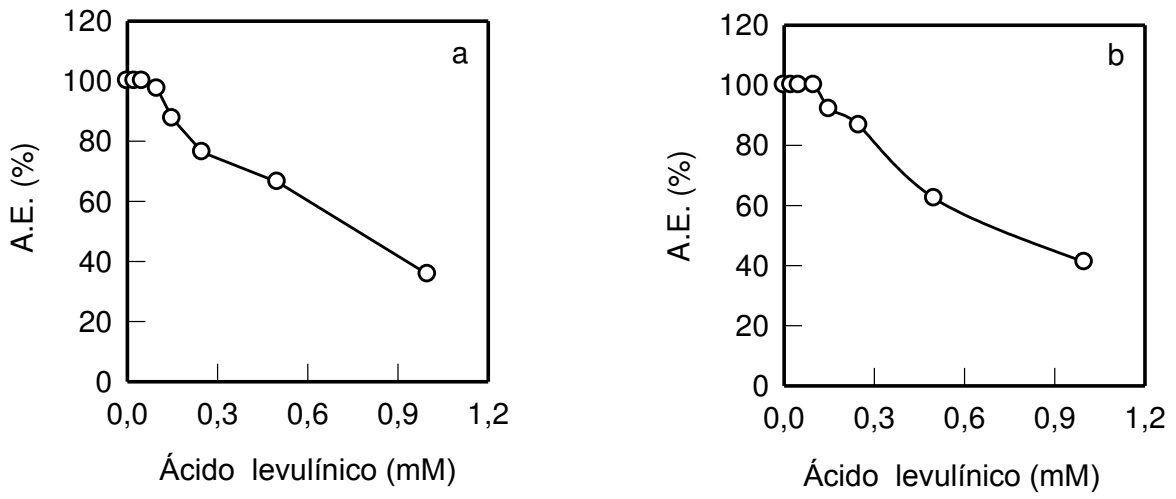


Figura II.8: Efecto del ácido levulínico sobre la actividad del ALA-D de micelio (a) y de levadura (b) de *Mucor rouxii.*

Los resultados representan el promedio del porcentaje de las actividades específicas obtenidas de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la determinación de actividad sin agregado de inhibidor. Valor de A.E. medio control: micelio = 12,5 ± 1,3 nmol/mg. levadura = 4,3 ± 0,3 nmol/mg. Otros detalles experimentales se describen en Métodos.

II.4.2.2 Caracterización de la inhibición por ácido levulínico

Se midió la actividad del ALA-D, proveniente de ambas fuentes enzimáticas, variando la concentración de ALA entre 0,05 y 0,5 mM en ausencia y en presencia de distintas concentraciones fijas inhibidor (0,25; 0,50 y 1 mM).

La representación del gráfico de dobles recíprocas (Figuras II.9 a y II.10 a) de las velocidades iniciales de reacción en presencia de inhibidor indica para el ácido levulínico una inhibición de tipo competitiva. El cálculo de la constante de inhibición (Ki) obtenida a partir del gráfico de las pendientes en función de la concentración de inhibidor (Gráfico de Dixon) dió como resultado un valor de Ki: 0,41±0,04 mM y de 0,37±0,03 mM para la enzima de micelio y levadura respectivamente (Figuras II.9 b y II.10 b).

Al igual que los valores de Km, los valores de Ki hallados no mostraron diferencias significativas.

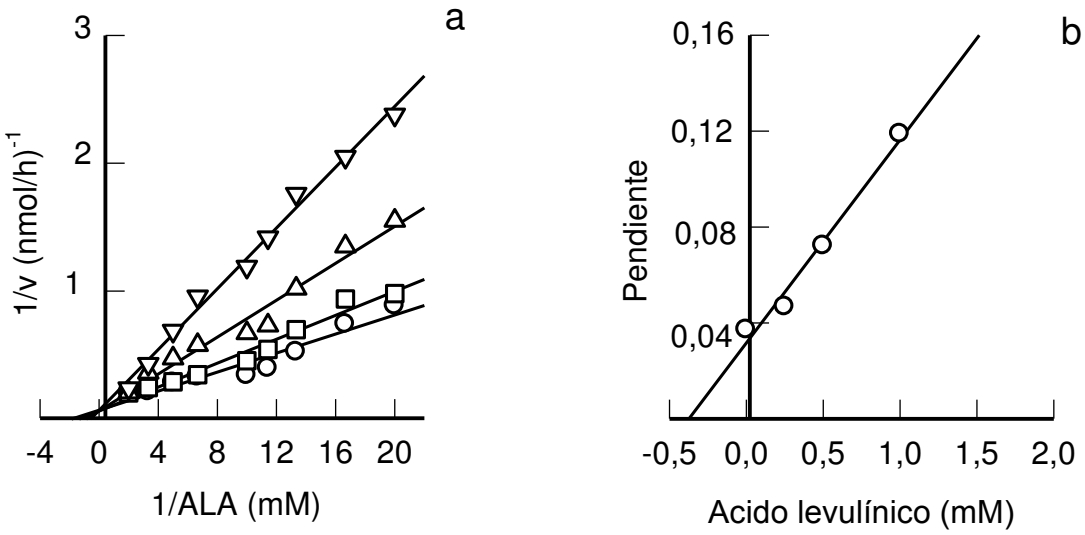


Figura II.9: Gráfico de dobles recíprocas (a) y de Dixon (b) para el ALA-D de micelio de *Mucor rouxii.* Las inversas se calcularon a partir de los valores de velocidades iniciales en ausencia de inhibidor (○) y con 0,25 mM (□), 0,5 mM (△) y 1 mM (▽) de ácido levulínico. Para el gráfico de Dixon se tomaron los valores de las pendientes obtenidas de las rectas de los gráficos de dobles recíprocas versus la concentración de ácido levulínico correspondiente.

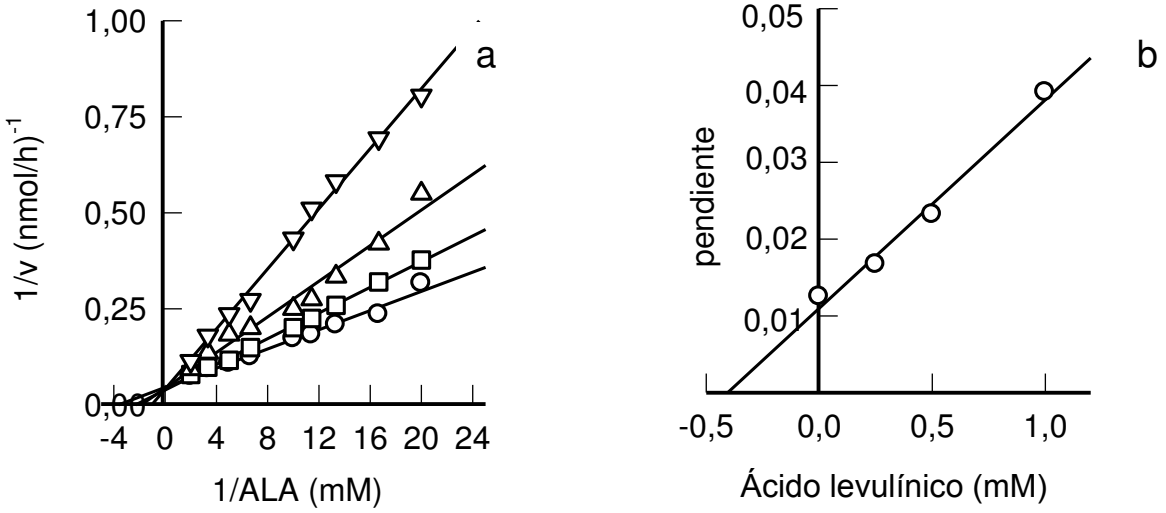


Figura II.10: Gráfico de dobles recíprocas (a) y de Dixon (b) para el ALA-D de levadura de *Mucor rouxii.* Las inversas se calcularon a partir de los valores de velocidades iniciales en ausencia de inhibidor (○) y con 0,25 mM (□), 0,5 mM (△) y 1 mM (▽) de ácido levulínico. Para el gráfico de Dixon se tomaron los valores de las pendientes obtenidas de las rectas de los gráficos de dobles recíprocas versus la concentración de ácido levulínico correspondiente.

II.4.2. Efectores

Como parte de la caracterización del ALA-D y considerando su naturaleza sulfhidrílica se estudió el comportamiento de la enzima frente a diferentes reactivos de grupos tioles y de uniones disulfuro.

II.4.2.1 Reactivos tiólicos

El estudio del efecto de diferentes protectores de grupos sulfhidrilos (β-Me, Cys, DTT y GSH) se discutió en el ítem 1.2.4 del Capítulo 1 de Resultados y Discusión, Determinación de las condiciones óptimas de incubación.

Otra forma alternativa de poner en evidencia la presencia de grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad catalítica de una enzima, es mediante el agregado al medio de incubación de inhibidores específicos de estos grupos. Con este objetivo se estudió el efecto de los agentes alquilantes N-etilmaleimida (NEMI) y p-cloromercuribenzoato (pCMB), formadores de mercaptidas, Iodoacetamida (IA), oxidantes de grupos sulfhidrilos como el ácido 5-5'ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y el ácido iodosobenzoico (IB), en concentraciones de 1 y 10 mM sobre la actividad del ALA-D de *Mucor rouxii.* Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla II.4.

Tabla II.4: Efecto de inhibidores tiólicos sobre la actividad del ALA-D de micelio y levadura de *Mucor rouxii*

EFECTOR	MICELIO		LEVADURA	
	A.E. (%)		A.E. (%)	
	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM
pCMB	69,0 ± 3,2*	1,9 ± 0,4**	38,3 ± 0,4**	1,00 ± 0,10**
NEMI	88,4 ± 5,3	15,8 ± 0,9**	76,0 ± 4,3*	0,50 ± 0,07**
IA	49,0 ± 2,6 **	12,4 ± 0,6**	68,0 ± 1,3**	6,60 ± 0,80**
DTNB	53,7 ± 3,1**	5,3 ± 0,8**	45,6 ± 2,1**	0,30 ± 0,05**
IB	57,2 ± 2,1**	10,0 ± 0,7**	44,1 ± 2,3**	0,50 ± 0,06**

Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes.

El 100% corresponde a la actividad específica de la fracción Fs dializada medida sin agregado de inhibidor, Valores A.E- control promedio: micelio = 90±8 U.E./mg, levadura = 43±3 U.E./mg. La actividad se midió según lo detallado en Métodos. Diferencia significativa con respecto al control: (*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$.

Los agentes alquilantes NEMI y pCMB inhibieron la formación de PBG en forma proporcional a la concentración ensayada. El pCMB fue un inhibidor mas potente y la enzima de levadura la más sensible al inhibidor. Tanto el agregado de IA al medio de incubación como el DTNB y el IB mostraron un potente efecto inhibitorio, aún a la concentración menor, de mayores proporciones en la levadura.

Estos resultados indicaron la presencia de grupos sulfhidrilos esenciales que deben mantenerse en su forma reducida para asegurar la actividad catalítica máxima. En el Capítulo III se presentarán los datos relativos a la caracterización y cuantificación de los grupos sulfhidrilos para esta enzima.

II.4.2.2 Reactivos de grupos disulfuros

Se analizó el efecto del agregado de reactivos que afectan a las uniones de puentes disulfuro como el cianuro de sodio (NaCN), sulfito de sodio (NaS) y tiourea (TU) en concentraciones de 1 y 10 mM. Los resultados se detallan en la Tabla II.5.

Tabla II.5: Efecto de inhibidores de uniones puente disulfuro sobre la actividad del ALA-D de micelio y levadura de *Mucor rouxii.*

Efector	MICELIO		LEVADURA	
	A.E. (%)		A.E. (%)	
	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM
NaCN	99 ± 3	50 ± 4**	100 ± 5	14 ± 2**
NaS	94 ± 4	79 ± 6	90 ± 7	89 ± 5
TU	92 ± 6	56 ± 4**	95 ± 5	10 ± 2**

Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad específica de la fracción Fs dializada medida sin agregado de inhibidor. Valores A.E control promedio: micelio = 90±8 U.E.l/mg, levadura = 43±3 U.E./mg. La actividad se midió según lo detallado en Métodos. Diferencia significativa con respecto al control: (*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$

Tanto para la enzima de micelio como para la de levadura este grupo de reactivos tuvo efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática sólo a la concentración más alta ensayada. El grado de inhibición observado es variable para los distintos reactivos y mayor sobre la enzima de levadura, excepto para el NaS. Esta inhibición puso de manifiesto que la presencia de puentes disulfuros intactos sería también esencial en la catálisis del ALA-D de *Mucor rouxii.*

II.4.2.3. Efecto de diferentes aniones y de cationes monovalentes

Considerando que iones monovalentes como amonio y potasio pueden ejercer, dependiendo de la fuente y concentración, un efecto activante (Nandi et al, 1968), inhibitorio (Tigier *et al*., 1970; Yamasaki & Moriyama, 1971) o ninguno (Nandi & Waygood, 1967; Shetty & Miller, 1969; Tigier *et al*., 1970; Yamasaki & Moriyama, 1971) sobre la actividad del ALA-D, se midió la actividad de esta enzima en *Mucor rouxii* en presencia de diferentes cationes monovalentes, en el rango de concentraciones 10^{-5}-10^{-1} M. Teniendo en cuenta que con el agregado de estos iones se adiciona al sistema un contraión, se estudió también el efecto de diferentes aniones (acetato, sulfato y cloruro).

Los resultados de estas experiencias se detallan en la Tabla II.6.

Del análisis de la Tabla II.6 se concluyó que en la enzima procedente de ambas formas celulares, en las condiciones de ensayo, la presencia de los aniones y cationes agregados no tiene efecto significativo sobre la actividad enzimática. Sólo se observó un 25% de inhibición con el del potasio a una concentración de 10^{-1} M, comparable al descripto en otras fuentes (Tigier et al, 1970; Yamasaki & Moriyama, 1971).

II.4.3. Agentes Quelantes

Los agentes quelantes juegan un rol importante en el reconocimiento del catión divalente constituyente de las metaloenzimas. Estos compuestos actúan inhibiendo la actividad catalítica de estas enzimas, ya sea por liberación del catión o por unión al metal *in situ.* La eficiencia de este proceso depende tanto del quelante como del cofactor metálico.

Se ensayó el efecto de diversos reactivos quelantes de cationes con el objeto de seleccionar el adecuado para la posterior obtención de la apoenzima.

En ambas fuentes enzimáticas se llevó a cabo la determinación de la actividad en presencia de varios agentes quelantes, a diferentes concentraciones. Los quelantes utilizados fueron α-α'dipiridilo (DP), o-fenantrolina (o-Fe), 8-hidroxiquinolina (8-HQ), azida sódica (AS) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en concentraciones que variaron, según los casos, entre 1 y 50 mM.

Tabla II.6: Efecto de diferentes cationes (a) y aniones (b) sobre la actividad del ALA-D de micelio y levadura de *Mucor rouxii.*

a)

Efector (M)	A.E. (%)					A.E (%)				
	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
	Sin β-Me					Con β-Me				
MICELIO										
Sodio	104±8	97±6	100±5	101±7	96±4	103±5	97±6	96±7	99±9	100±8
Amonio	100±7	97±7	98±9	103±9	94±7	103±8	104±7	107±8	99±6	95±6
Potasio	107±8	107±9	103±7	99±7	90±3	101±5	102±6	104±5	98±5	75±3*
LEVADURA										
Sodio	101±5	98±6	100±6	99±3	97±7	101±6	99±3	95±4	100±5	99±4
Amonio	102±6	99±4	97±5	101±4	96±5	102±5	100±4	104±4	97±4	99±3
Potasio	103±5	105±7	101±4	97±4	93±4	104±6	101±5	100±5	99±3	75±4*

b)

Efector (M)	A.E. (%)			A.E (%)		
	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
	Sin β-Me			Con β-Me		
MICELIO						
Acetato	98 ± 7	99 ± 6	100 ± 7	100 ±6	96 ± 7	95 ± 7
Sulfato	107 ± 8	98 ± 5	99 ± 4	99 ± 5	94 ± 5	97 ± 5
Cloruro	103 ± 8	107 ± 7	103 ± 6	101 ± 5	102 ± 6	104 ± 5
LEVADURA						
Acetato	95 ± 5	100 ± 7	99 ± 6	100 ± 6	98 ± 5	96 ± 6
Sulfato	100 ± 6	99 ± 4	97 ± 5	98 ± 4	96 ± 6	95 ± 7
Cloruro	101 ± 6	102± 5	105 ± 8	100 ± 5	104 ± 7	106 ± 8

Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad específica de la fracción Fs dializada medida sin agregado de efector. Valores A.E control promedio: micelio = 88±9 U.E./mg, levadura = 40±4 U.E./mg, La determinación de la actividad se realizó según lo descripto en Métodos. Diferencia significativa con respecto al control: (*) $p<0,05$

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II.7, de ellos se infiere que la actividad del ALA-D, tanto en micelio como en levadura, no fue afectada en forma significativa por el tratamiento con EDTA en ninguna de las concentraciones empleadas, en concordancia con lo descripto para la enzima de *Rp. spheroides* (Nandi et al, 1968) y *Rp. capsulata* (Nandi & Shemin, 1973), y a diferencia de la enzima proveniente de *Sacharomyces cerevisiae* (De Barreiro, 1967), eritrocitos de

ave y conejo (Granick & Mauzerall, 1958), eritrocitos humanos (Gibbs et al, 1985), hígado de rata y bovino (Batlle et al, 1967; Gurba et al, 1972), entre otros.

Tabla II.7: Efecto de Agentes Quelantes sobre la actividad de ALA-D

Quelante	MICELIO				LEVADURA			
	A.E. (%)				A.E. (%)			
	1 mM	5 mM	10 mM	50 mM	1 mM	5 mM	10 mM	50 mM
DP	33±3**	26±2**	nd	nd	31±3**	20±1**	nd	nd
AS	nd	79±5*	73±6**	nd	nd	69±5**	59±4**	nd
o-Fe	30±2**	25±3**	nd	nd	24±1**	20±2**	nd	nd
EDTA	nd	100±7	90±8	nd	nd	96±7	94±6	nd
8-HQ	134±9	124±10	107±9	78±5	110±10	97±8	90±7	65±6**

La incubación se llevó a cabo según lo detallado en Métodos. No se preincubó con los agentes quelantes ni se agregó protector tiólico. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs dializada. Valores A.E control promedio: micelio = 94±7 U.E./mg, levadura = 43±3 U.E./mg. La actividad se determinó según se detalla en Métodos. (nd): no determinado. Diferencia significativa con respecto al control: (*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$.

La actividad fue inhibida fuertemente en presencia de DP, o-Fe y en menor grado por AS. La 8-HQ redujo la actividad sólo un 35% a una concentración de 50 mM, muy superior a la utilizada para los otros agentes quelantes, mientras que a concentraciones menores, entre 1 y 5 mM, mostró un efecto ligeramente estimulador en micelio.

En base a estos resultados ambas enzimas se trataron con concentraciones apropiadas de aquellos reactivos que inhibían su actividad modificando, además, las condiciones de incubación en cuanto al agregado o no del protector tiólico β-Me 10 mM) y con o sin preincubación durante 30 minutos a 37 ºC con el objeto de seleccionar el quelante que produjera la mejor preparación de la apoenzima. Los resultados se muestran en la Figura II.8.

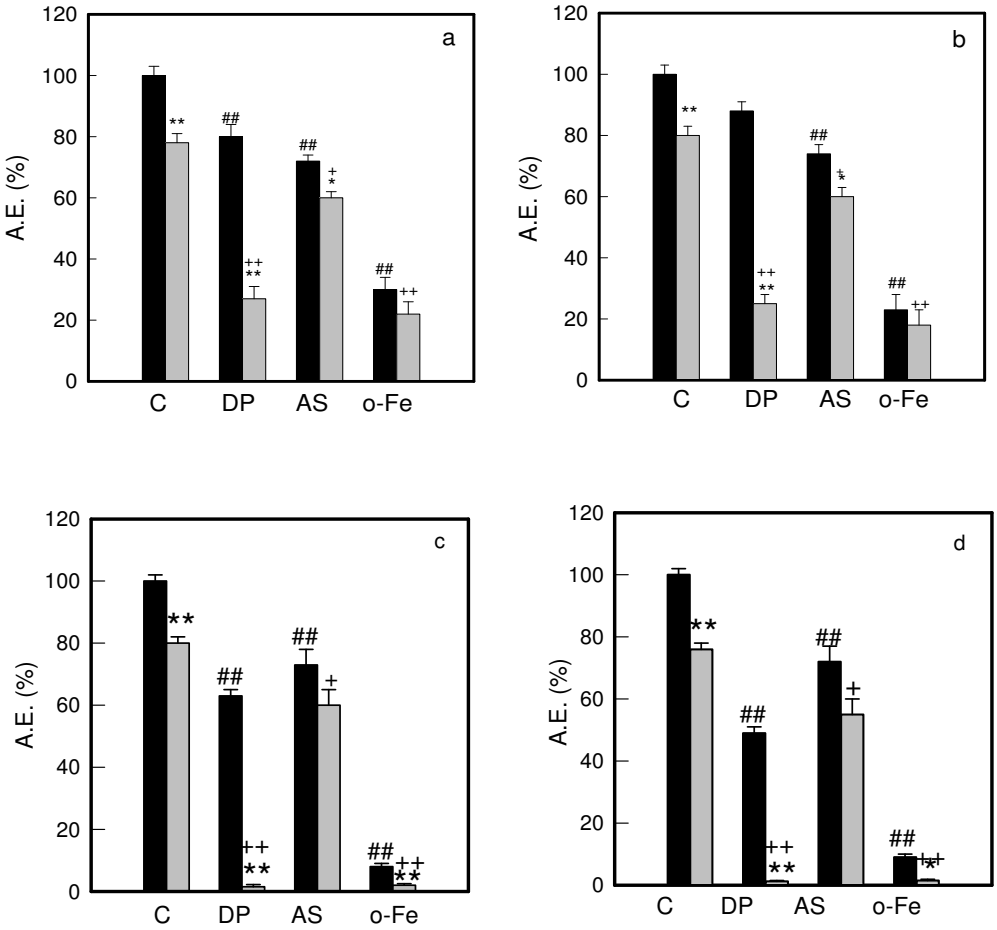


Figura II.11 Tratamiento del ALA-D de micelio (a y c) y levadura (b y d) con agentes quelantes. Los distintos quelantes se agregaron durante la incubación (a y b) o durante 30 minutos previos a la incubación (c y d). Las concentraciones ensayadas fueron DP 1 mM, AS 5 mM y o-Fe 1 mM. La actividad enzimática se midió en presencia (▒) o ausencia (■) de β-Me 10 mM, según lo detallado en Métodos. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs dializada. Valores A.E control promedio: micelio = 86±8 U.E./mg, levadura = 41±5 U.E./mg. Diferencia significativa: sin β-Me 10 mM respecto con β-Me 10 mM :(*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$; con β-Me 10 mM respecto al control con β-Me 10 mM; :(#) $p<0,05$ y (##) $p<0,01$; sin β-Me 10 mM respecto al control sin β-Me 10 mM :(+) $p<0,05$ y (++) $p<0,01$

De la observación de los valores de actividad remanente se concluyó:

- La AS 5 mM produjo el mismo grado de inhibición en micelio y levadura independientemente de que se agregue durante la incubación o con

preincubación y que la actividad se mida en presencia o ausencia de β-Me 10 mM.

- El DP 1 mM mostró mayor efecto inhibitorio cuando el quelante se agregó durante la preincubación y se incubó en ausencia de β-Me 10 mM. Al igual que con AS el comportamiento hallado fue análogo en micelio y levadura.
- La o-Fe 1 mM resultó ser el quelante que produjo el mayor efecto inhibitorio, produciendo una inhibición de casi el 100% cuando se agregó durante la preincubación de la enzima. En presencia de este potente efecto inhibitorio el agregado de β-Me 10 mM no produjo cambios significativos en la actividad ni en micelio ni en levadura.

Del análisis de estos resultados se puede concluir que la preincubación con o-Fe sería el tratamiento más efectivo para atrapar el catión divalente. Lo que resta establecer es si luego de este tratamiento la enzima puede ser reconstituída por el agregado de cationes divalentes. Los datos de estas experiencias se muestran en el Capítulo III de Resultados.

II.4.4 Determinación de la masa molecular relativa del ALA-D

II.4.4.1 Cromatografía en tamices moleculares

Utilizando cromatografía por tamices moleculares en la columna de Sephacryl S-300 (Figura II.2) se determinó la masa molecular relativa (Mr) para el ALA-D de micelio y levadura, a partir de la curva de calibración correspondiente (Figura II.12).

Los resultados obtenidos permitieron estimar para el ALA-D de *Mucor rouxii* una Mr de 280 ± 20 KDa y 260 ± 20 KDa para micelio y levadura respectivamente.

II.4.4.2 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida

Utilizando la fracción proveniente de la última etapa de purificación por cromatografía de intercambio aniónico, se realizó la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Figuras II.13a y II.14a) según lo indicado en Materiales y Métodos. Se sembraron marcadores de Mr y se construyeron las curvas de

calibración correspondientes para poder determinar el Mr de la subunidad del ALA-D de micelio y levadura (Figuras II.13b y II.14b).

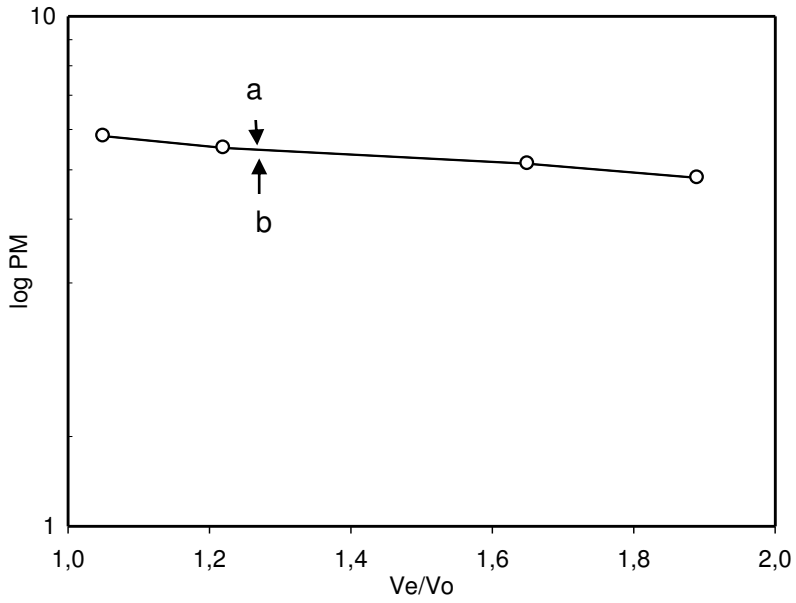


Figura II.12: Curva de calibración con marcadores de PM: Tiroglobulina (664 KDa), Tiroglobulina + SDS (332 KDa), Láctico deshidrogenasa (140 KDa), Seroalbúmina bovina (66 KDa). Las flechas indican el valor de Ve/Vo correspondiente a micelio (a) y levadura (b)

Según nuestros resultados la enzima de *Mucor rouxii* estaría constituída por 8 subunidades de un Mr de 35,5 ± 4,0 KDa y 32,8 ± 4,0 KDa para micelio y levadura respectivamente.

II.4.4.2 Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida.

En la Figura II.15. se muestran los geles nativos de la fracción Q-Sepharose tanto de micelio como de levadura de *Mucor rouxii.* Como fue descripto en Materiales y Métodos los geles se revelaron por tinción con reactivo de plata y en otra calle sembrada en forma paralela, se determinó que banda correspondía a la actividad del ALA-D. La relación de frente (Rf) calculada para la banda con actividad

en cada uno de los geles indicó la misma posición de migración relativa. En ambos casos se encontró un patrón de bandas de otras proteínas que copurificaron con el ALA-D.

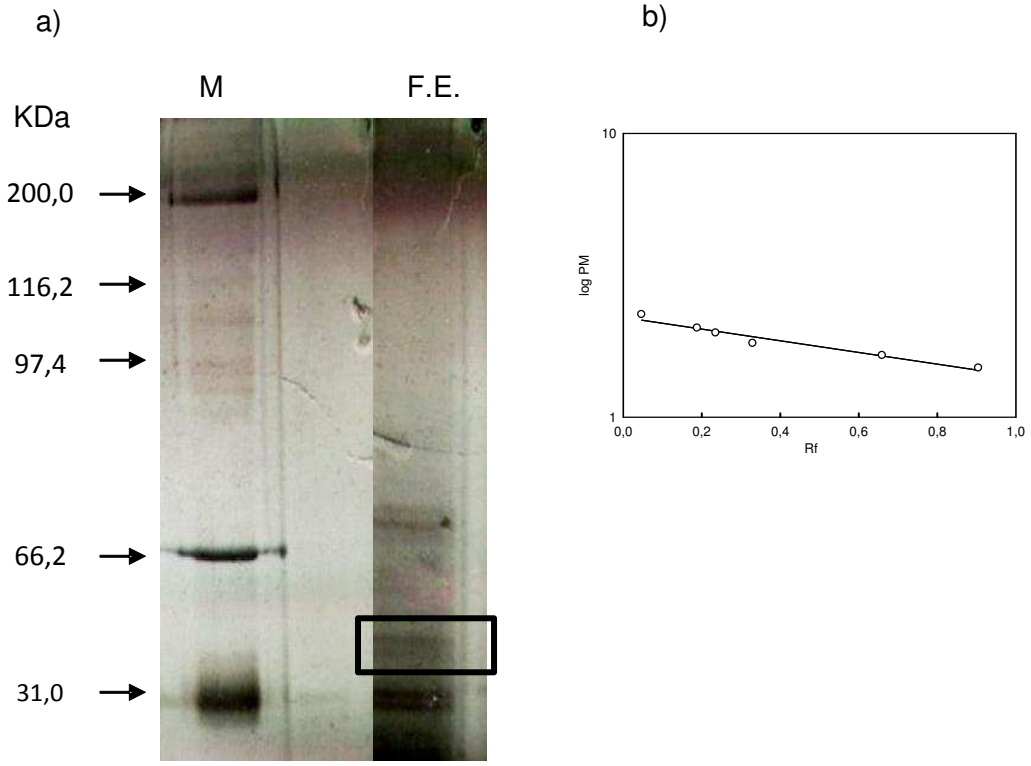


Figura II.13: SDS-PAGE del ALA-D de micelio parcialmente purificada.

a) Patrón de bandas obtenido. La banda recuadrada corresponde al ALA-D.
b) Curva de calibración realizada a partir de los datos obtenidos al sembrar los marcadores de Mr (M): Mioglobina (200,0 KDa), β-galactosidasa (116,2 KDa), Fosforilasa (97,4 KDa), Albúmina bovina (66,2 KDa), Ovoalbúmina (45,0 KDa). Anhidrasa carbónica (31,0 KDa)
La electroforesis se realizó sobre la fracción activa proveniente del pasaje por Q-Sepharosa (F.E.).

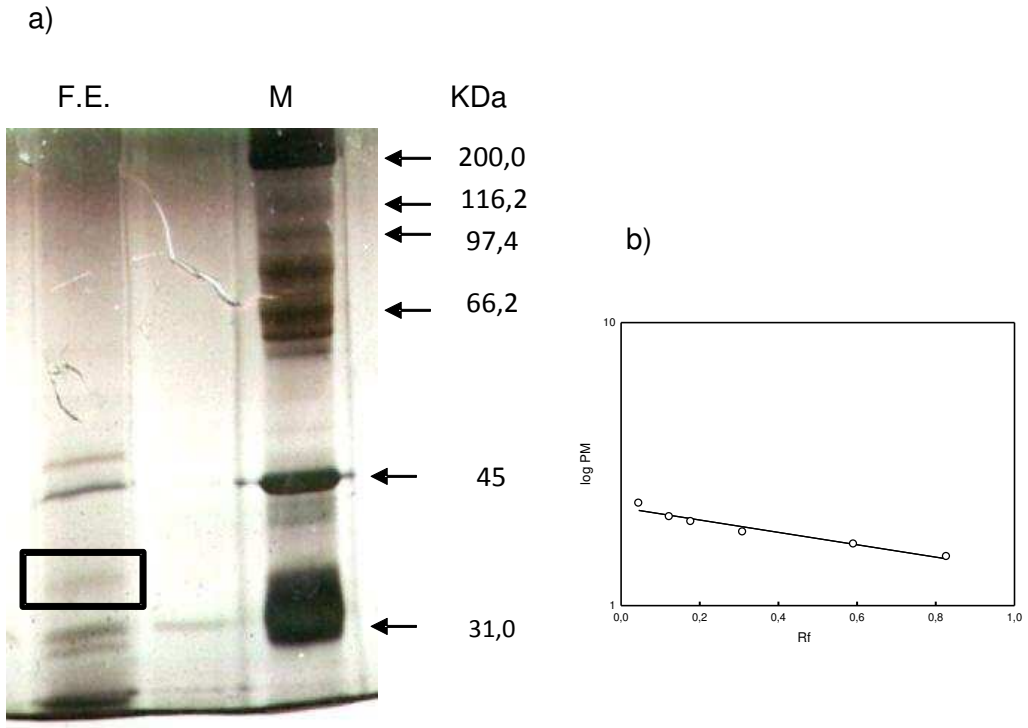


Figura II.14: SDS-PAGE del ALA-D de levadura parcialmente purificada.

a) Patrón de bandas obtenido. La banda recuadrada corresponde al ALA-D.
b) Curva de calibración realizada a partir de los datos obtenidos al sembrar los marcadores de Mr (M): Mioglobina (200,0 KDa), β-galactosidasa (116,2 KDa), Fosforilasa (97,4 KDa), Albúmina bovina (66,2 KDa), Ovoalbúmina (45,0 KDa). Anhidrasa carbónica (31,0 KDa)
La electroforesis se realizó sobre la fracción activa proveniente del pasaje por Q-Sepharosa (F.E.).

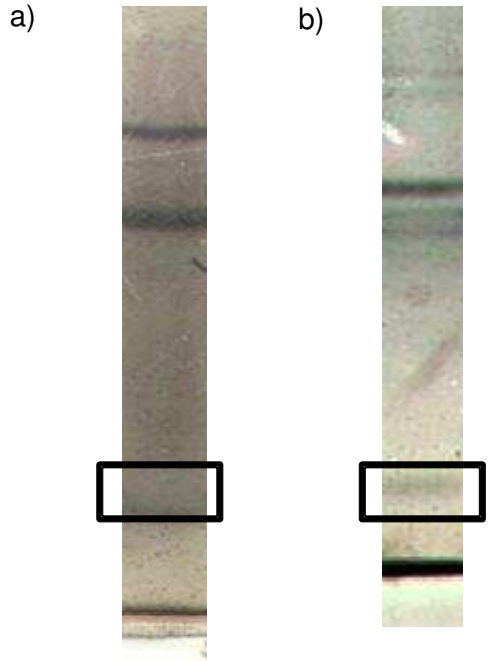
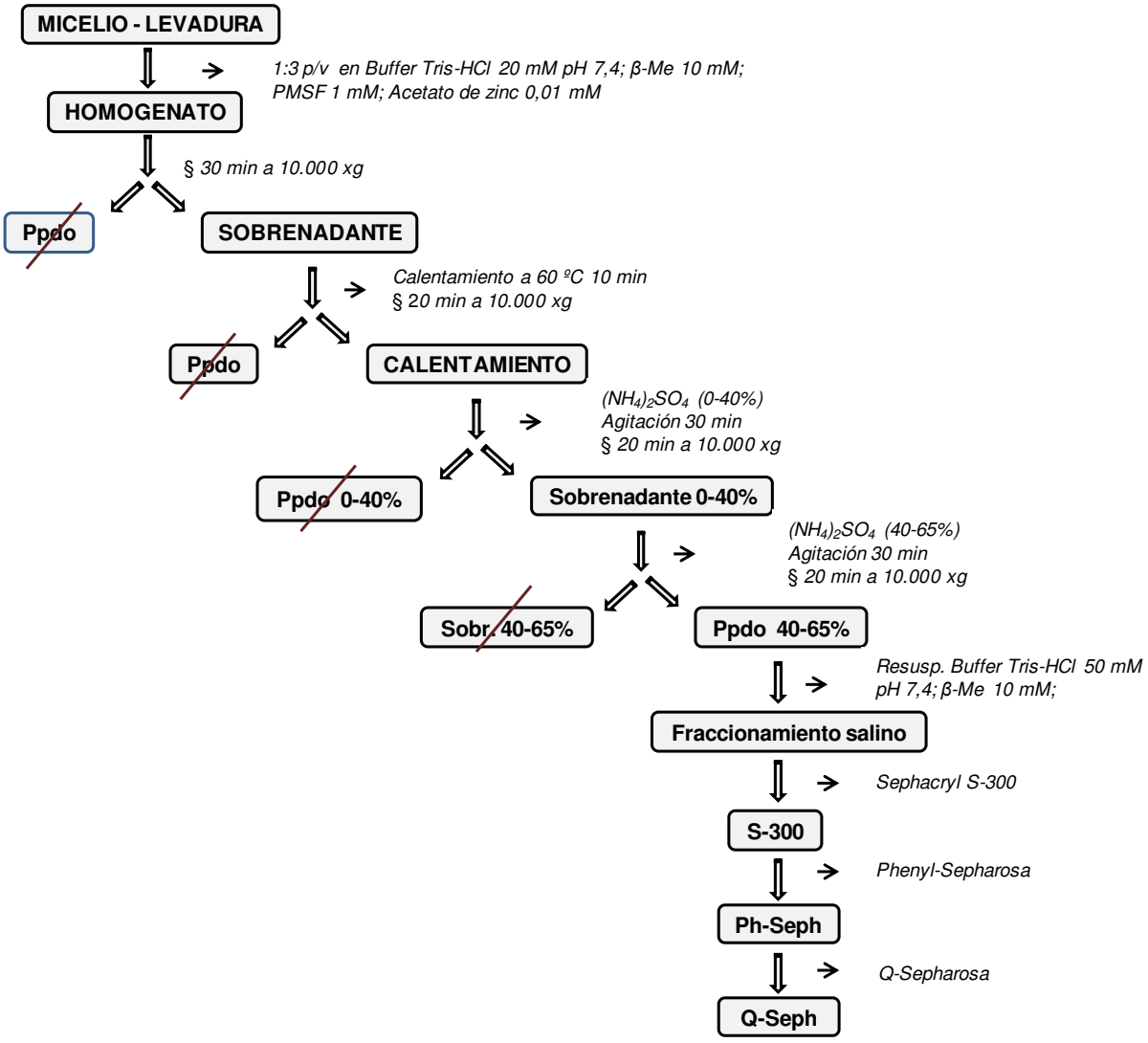


Figura II.15: Electroforesis nativa del ALA-D de micelio (a) y levadura (b).

La electroforesis se realizó sobre la fracción activa proveniente del pasaje por Q-Sepharosa. La banda recuadrada corresponde al ALA-D.

II.5 CONCLUSIONES

- El ALA-D, tanto de micelio como levadura de *Mucor rouxii* es una enzima termoestable.
- Luego de la combinación de diferentes técnicas separativas se determinó el siguiente esquema como el más eficiente para la purificación del ALA-D tanto de micelio como de levadura:



- El resultado final alcanzado luego de los diferentes pasos de purificación arrojó un rendimiento del mismo orden para las dos enzimas y un grado de purificación levemente mayor para la enzima de micelio.

- En ambas fuentes se determinó que el ALA-D posee un pI inferior a 7,4, una Mr de 271±6 kDa para la enzima nativa conformada por subunidades idénticas de un Mr 33,5±4,5 kDa, gran cantidad de grupos hidrofóbicos que pueden ser expuestos en presencia de alta fuerza iónica.
- La fuerte interacción encontrada con la resina de afinidad Tiopropil-Sepharosa confirmó la naturaleza sulfhidrílica del ALA-D de *Mucor rouxii.* La reactividad observada para la enzima inmovilizada puso de manifiesto que parte de los grupos -SH involucrados en la interacción intervienen directamente en la catálisis.
- La cinética de tipo michaeliana y los valores de Km encontrados para esta enzima son del mismo orden que los descriptos para preparaciones de ALA-D obtenidas de otras fuentes. El ácido levulínico, análogo estructural del ALA mostró como era de esperar una inhibición de tipo competitivo.
- Los estudios realizados con inhibidores tiólicos, aportaron una clara evidencia acerca de la presencia de grupos sulfhidrilos reducidos esenciales para manifestar la actividad máxima en esta enzima, ya sea por intervención directa en la catálisis, por ser ligandos del cofactor catiónico o por mantener una determinada conformación dentro o en las inmediaciones del sitio activo. El efecto de estos agentes es dependiente de la concentración y ejercen en general una inhibición mayor en la enzima de levadura.
- El efecto inhibitorio producido por los quelantes de cationes divalentes ensayados indicó que el ALA-D de *Mucor rouxii* podría ser una metaloenzima, como en la mayoría de las fuentes estudiadas.
- De los quelantes estudiados la o-Fe resultó ser la de mayor poder inhibitorio. Su efecto es independiente de la presencia de un agente que asegure la permanencia de los grupos SH en estado reducido. Su acción podría deberse a la liberación y/o bloqueo del metal *in situ*.

II.6. REFERENCIAS

Batlle A.M., Ferramola A.M. & Grinstein M. (1967) "Purification and general properties of delta-aminolaevulate dehydratase from cow liver". *Biochem J.* **104**(1) 244-249.

De Barreiro O.L. (1967) "5-aminolaevulinate hydro-lyase from yeast. Isolation and purification". *Biochim Biophys Acta.* **139**(2) 479-486.

Gibbs P.N., Gore M.G. & Jordan P.M. (1985) "Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolaevulinate dehydratase". *Biochem J.* **225**(3) 573-580.

Granick S. & Mauzerall D. (1958). "Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting gamma-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen". J Biol Chem. **232**(2) 1119-1140.

Gurba P.E, & Sennett R.E. & Kobes R.D. (1972) "Studies on the mechanism of action of 5-aminolevulinate dehydratase from bovine and rat liver". *Arch Biochem Biophys* **150**(1) 130-6.

Nandi D.L. & Waygood E.R. (1967) "Biosynthesis of porphyrins in wheat leaves. II. 5-aminolaevulinate hydro-lyase". Can J Biochem. **45**(2) 327-336.

Nandi D.L., Baker-Cohen K.F. & Shemin D. (1968) "Delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodopseudomonas spheroids*". J Biol Chem. **243**(6) 1224-1230.

Nandi D.L. & Shemin D. (1973) "5-Aminolevulinic acid dehydratase of Rhodopseudomonas capsulate". Arch Biochem Biophys.; 158(1):305-11

Tamai H, Shioi Y. & Sasa T. (1979) "Purification and characterization of δ-aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*". Plant Cell Physiol **20**(2) 435-444.

Liedgens W., Lütz C. & Schneider H.A. (1983) "Molecular properties of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Spinacia oleracea*". Eur J Biochem. **135**(1) 75-79.

Shetty A.S. & Miller G.W. (1969) "Purification and general properties of delta-aminolaevulate dehydratase from *Nicotiana tabacum L. Biochem J.* 114(2):331-337.

Tigier H.A., Batlle A. & Locascio G.A. (1970) Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system. II. Improved purification and some properties of delta amino-laevulic acid dehydratase*". Enzymologia* **38**(1) 43-56.

Yamasaki H. & Moriyama T. (1971) "Delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Mycobacterium phlei*". Biochim Biophys Acta. **227**(3) 698-705

CAPÍTULO III

Caracterización del sitio activo del ALA-D de micelio y levadura de *Mucor rouxii*

En la mayoría de las fuentes estudiadas, se ha establecido claramente que el ALA-D es una metaloenzima, y que en general requiere un metal divalente para manifestar su máxima actividad. Los cationes involucrados han sido identificados como Zn^{++}, Mg^{++} y Mn^{++}, algunas utilizan Zn^{++}, otras Mg^{++} o Mn^{++} y existe un tercer tipo que une ambos metales. Debe mencionarse también que en la enzima aislada de *Rp spheroides* los cationes monovalentes potasio y amonio, bajo determinadas condiciones experimentales, actúan como activadores alostéricos (Jaffe, 2000). En las metaloenzimas una forma de comprender el rol de los cationes que intervienen en el proceso catalítico es a través de la caracterización de los grupos funcionales de los aminoácidos involucrados en los sitios de unión al metal.

Las enzimas que contienen Zn^{++} son catalíticamente sensibles a la presencia de O_2 mientras que las Mg^{++} metaloenzimas no lo son. El Zn^{++}, además, tiene un rol estructural que les confiere resistencia térmica (Chauhan *et al*, 1997). La selectividad por el ión y la sensibilidad al O_2 estaría relacionada con el tipo de ligando para el catión. El Zn^{++} se une a ligandos oxidables como la cisteína, mientras que el Mg interactúa con grupos aspárticos, insensibles a la presencia de O_2. En el sitio activo de muchas metaloenzimas participan aminoácidos con propiedades nucleófilas, cuya principal característica es tener una fuerte tendencia a ser donores de un par de electrones. Entre ellos podemos mencionar el hidroxilo de la serina, el sulfhidrilo de la cisteína, el imidazol de la histidina y el carboxilo del los ácidos aspártico y glutámico.

III.1 GRUPOS SULFHIDRILOS

La titulación de los grupos sulfhidrilos mediante el uso del reactivo de Ellmann permite evaluar tanto aquellos residuos sulfhidrílicos expuestos como los que se revelan por tratamiento con SDS. La correlación entre la oxidación de estos grupos

con los cambios en la actividad enzimática permite inferir la influencia de ellos en la catálisis, ya sea porque intervengan directamente en el proceso catalítico o lo hagan manteniendo una conformación estructural adecuada de la enzima para que manifieste su máxima actividad.

Para estudiar la naturaleza sulfhidrílica del ALA-D se determinó el contenido de grupos SH tanto en la proteína nativa como en la tratada con SDS. Se utilizó la fracción Q-Sepharosa inmediatamente luego de su obtención, concentración y reducción por tratamiento con DTT y posterior eliminación del exceso de este compuesto por cromatografía en Sephadex G-25. Para evaluar la oxidación de los grupos expuestos se utilizaron extractos que se mantuvieron en aerobiosis durante 3 y 24 horas a 4°C. Los resultados se muestran en la Tabla III.1.

Tabla III.1: Titulación de los grupos SH en la proteína nativa y desnaturalizada

Forma dimófica	**Tratamiento**	**Nro de Grupos SH/subunidad**		
		Proteína Nativa	**Proteína Desnaturalizada**	**Nro de Grupos Totales**
Micelio	Anaerobiosis (ambiente reducido)	4	1	5
Levadura		4	1	5
Micelio	Aerobiosis (3 horas)	2	1	3
Levadura		2	1	3
Micelio	Aerobiosis (24 horas)	2	1	3
Levadura		2	1	3

Se titularon en total 5 grupos SH en la enzima proveniente de ambas formas mórficas, 4 de los cuales corresponden a la enzima nativa. El quinto SH se tituló luego del tratamiento con SDS.

Tanto en micelio como en levadura la reacción de los primeros 2 grupos SH con el DTNB se produjo dentro del primer minuto, lo que indica una alta reactividad de los mismos frente al bloqueante de grupos tiólicos. Luego se titularon 2 residuos SH adicionales de mediana reactividad en la enzima nativa y finalmente se detectó un último grupo SH post tratamiento con SDS, de reactividad baja. De acuerdo a la clasificación de Tsukamoto y col (1979) los grupos SH serían de 3 tipos: altamente reactivos que se modifican en el término de 1 minuto: grupos tipo I, aquellos en que la modificación se completa en el término de 1 hora: tipo II y los que se detectan

sólo si existe tratamiento previo con SDS: tipo III. Con esta clasificación, el ALA-D de *Mucor rouxii* posee 2 grupos tipo I, 2 tipo II y 1 tipo III.

La exposición a atmósfera oxidante durante 3 y 24 horas, reduce la cantidad de grupos titulables expuestos tanto en micelio como en levadura. Se pierden 2 residuos -SH, 1 tipo I y otro tipo II. No se encontraron cambios en el contenido de los grupos -SH no expuestos.

Considerando que la actividad enzimática no varió significativamente (20 %) en las condiciones descriptas en la Tabla III.1 se concluyó que los grupos -SH que se oxidan, que corresponden a residuos expuestos de alta y mediana reactividad, no serían esenciales para la catálisis, aunque deben mantenerse reducidos de forma de mantener la estructura que permita manifestar la actividad máxima.

III.2 GRUPOS HISTIDINA

La histidina es uno de los aminoácidos que ha sido propuesto como involucrado directamente en la catálisis del ALA-D a través de la transferencia de protones.

El dietilpirocarbamato (DEP), un agente acilante muy selectivo para residuos histidina accesibles, es utilizado como herramienta para determinar la presencia de este aminoácido en el sitio activo de una enzima merced a la reacción de etoxiformilación sobre el grupo funcional. La formación de la unión carbetoxihistidina, que produce una concomitante inhibición de la actividad enzimática, es la responsable de la observación de un incremento en la absorbancia a 240 nm en función del tiempo. Por otro lado la reversión de este efecto inhibitorio por tratamiento con hidroxilamina a pH neutro, la protección ejercida por el sustrato y el catión divalente, así como también la dependencia de esta inhibición con el pH, son claros indicadores de la participación de grupos histidina en la catálisis de una enzima.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto resultó de interés determinar el rol de la histidina como posible ligando del cofactor catiónico, en la catálisis del ALA-D de *Mucor rouxii.*

Se utilizaron como fuente de enzima las fracciones correspondientes a la cromatografía de intercambio iónico, con un grado de purificación de alrededor de 700 veces para micelio y de 450 veces para levadura.

III.2.1 Determinación de las condiciones óptimas para estudiar el efecto del DEP sobre el ALA-D.

La fracción Q-Sepharosa de micelio y levadura se trató con concentraciones variables de DEP (0,1–0,35 mM) durante 5 minutos a 0°C. La reacción de etoxiformilación se detuvo por agregado de una solución de imidazol 10 mM en buffer Tris-HCl pH 7,4 según se detalla en Materiales y Métodos.

Se observó, frente al DEP, mayor reactividad para la enzima de levadura (Figura III.1 a) que la de micelio (Figura III.1 b). Una concentración de DEP 0,1 mM produjo una inhibición del 50% en levadura mientras que en micelio fue del 25%.

La Figura III.2 representa la cinética de la inhibición causada por distintas concentraciones de DEP sobre la actividad de ALA-D en micelio (Figura III.2 a) y levadura (Figura III.2 b).

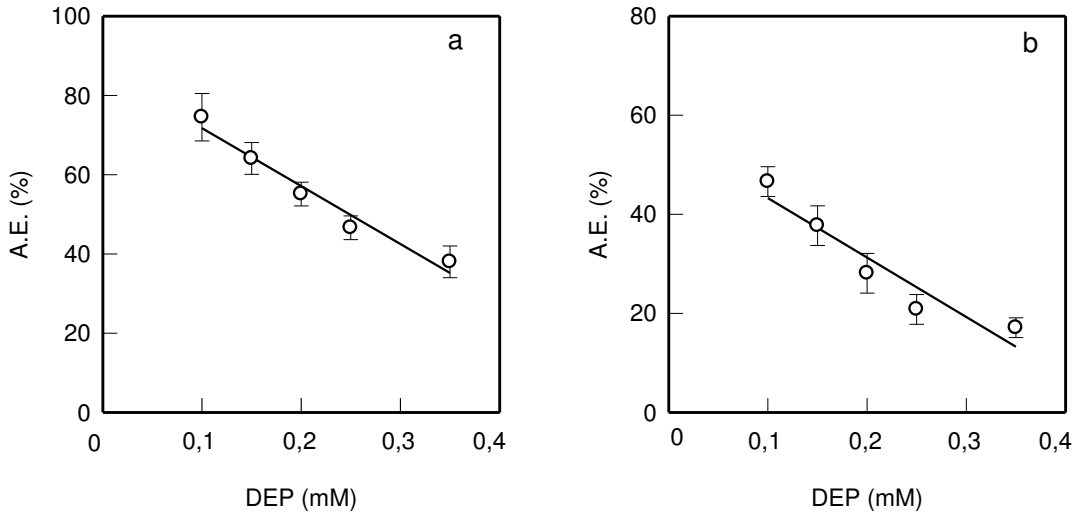


Figura III.1: Cinética de inactivación del ALA-D de micelio (a) y levadura (b) de *Mucor rouxii* por DEP.

El tratamiento se realizó a 0 ºC durante 5 minutos a pH 7,4. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Q-Seph. Valor A.E control promedio: micelio = 8.970 ± 110 U.E./mg, levadura = 2.361 ± 130 U.E./mg. Otros detalles en Métodos.

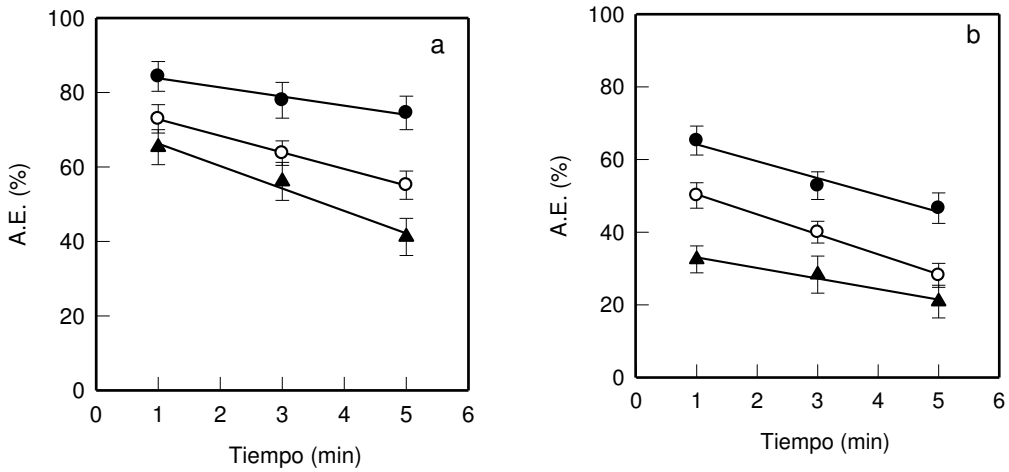


Figura III.2: Modificación de la actividad de ALA-D de micelio (a) y levadura (b) de *Mucor rouxii* por DEP en función del tiempo.

El tratamiento se realizó con concentraciones de DEP variables (mM): 0,10 (●); 0,20 (○) y 0,35 (▲) a pH 7,4 a 0 ºC. Valor A.E.control promedio: micelio = 8.970±110 U.E./mg, levadura = 2.361±130 U.E./mg. Otros detalles experimentales en Métodos y en la Figura III.1

Los resultados encontrados muestran que el agregado de DEP a esta enzima produce una inactivación dependiente del tiempo y la concentración.

Se seleccionó una concentración de DEP 0,2 mM como la apropiada para proseguir con la caracterización de la interacción de este reactivo con los grupos histidina.

En la Figura III.3 se puede ver el efecto de la temperatura de incubación sobre la inhibición de la actividad de ALA-D por tratamiento con DEP, a lo largo de 5 minutos de tratamiento.

Si bien se observa una relación directa entre la inhibición y la temperatura de incubación, se encuentran diferencias significativas únicamente entre los tratamientos realizados a 0 ºC y 37 ºC.

Se eligió para continuar con las experiencias una concentración de DEP 0,2 mM a una temperatura de 0 ºC para minimizar la catálisis cuando se agregue ALA durante el tratamiento con DEP.

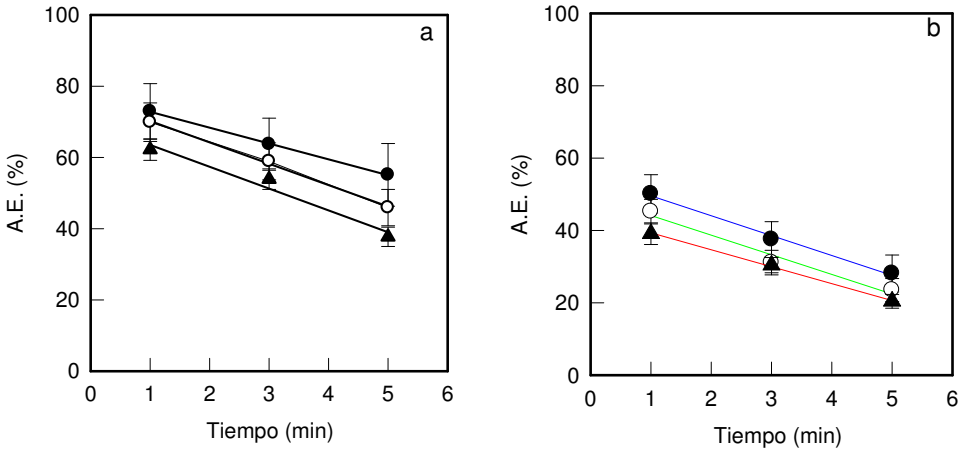


Figura III.3: Inactivación del ALA-D de micelio (a) y levadura (b) de *Mucor rouxii* por DEP en función del tiempo y a diferentes temperaturas.

El tratamiento se realizó con DEP 0,2 mM a pH 7,4 a 0 ºC (●); 18 ºC (○) y 37 ºC (▲). Valor A.E.control promedio: micelio = 8.970±110 U.E./mg, levadura = 2.361±130 U.E./mg. Otros detalles experimentales en Métodos y en la Figura III.1

.

III.2.2 Caracterización de los grupos histidina del ALA-D

Con el objeto de poder dilucidar cuáles y cuántos residuos están involucrados en esta inactivación por DEP se estudió el incremento de la absorbancia a 240 nm correspondiente a la formación del etoxiformilderivado concomitantemente con la variación de la actividad enzimática. Los resultados se muestran en la Figura III.4.

En la enzima de ambas formas del hongo *Mucor rouxii* se encontraron 2 residuos modificados con diferentes velocidades de formación del derivado etoxiformilado. Se observó que la pérdida de actividad, asociada al tratamiento con DEP, corresponde a la inactivación del primer residuo. La inactivación de los 2 residuos se alcanzó transcurridos 40 minutos.

Para continuar estudiando el tipo de interacción que causa la pérdida de actividad de la enzima por efecto del DEP, se llevó a cabo el tratamiento con hidroxilamina 0,7 M. Los extractos de *Mucor rouxii* con actividad de ALA-D, con y sin tratamiento con DEP 0,2 mM, se incubaron con hidroxilamina a temperatura ambiente durante 30 y 60 minutos. Las muestras se dializaron posteriormente para eliminar la hidroxilamina. Los resultados se muestran en la Tabla III.2.

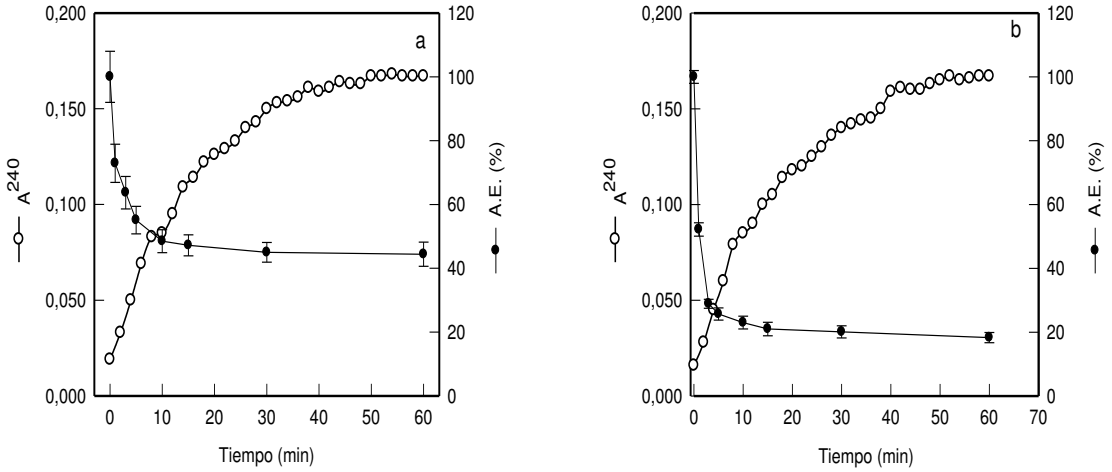


Figura III.4: Modificación de los grupos histidina e inactivación del ALA-D de micelio (a) y levadura (b) de *Mucor rouxii* en función del tiempo.

La enzima se trató con DEP 0,2 mM a pH 7,4 y a 0 ºC. En los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir la actividad enzimática. Una variación de absorbancia de 0,082 corresponde a un residuo de histidina/subunidad. Valor A.E.control promedio micelio = 8.883 ± 120 U.E./mg , levadura = 2.375 ±115 U.E./mg. Otros detalles experimentales en Métodos y en la Figura III.1.

Se observó que el tratamiento con hidroxilamina produce una reversión significativa a los 30 minutos y casi completa a los 60 minutos de la inhibición causada por DEP, lo cual confirmó la participación de grupos histidina en el sitio activo del ALA-D.

Tabla III.2: Reversión por hidroxilamina de la inhibición producida por DEP sobre la actividad del ALA-D en micelio y levadura de *Mucor rouxii*

Tratamiento	**Actividad Específica (%)**			
	Micelio		**Levadura**	
	30 min	**60 min**	**30 min**	**60 min**
Control	100±6	100±5	100±5	100±7
DEP 0,2 mM	55±4**	55±3**	26±2**	26±2**
Hidroxilamina 20 mM	97±4	95±3	95±5	92±4
DEP 0,2 mM + hidroxilamina 20 mM	73±5**	94±6	60±5**	95±7

Valor control promedio A.E: micelio = 8883±120 U.E./mg, levadura = 2.375±115 U.E./mg. Diferencia significativa respecto al control (**) $p<0,01$. Los detalles experimentales están descriptos en Métodos y Figura III.1

Las fracciones enzimáticas conteniendo el ALA-D se preincubaron con ALA (5 y 10 mM) y Zn^{2+} 10^{-4} M durante 10 min a 0°C para minimizar la progresión de la reacción enzimática. Los resultados obtenidos s se muestran en la Figura III.5.

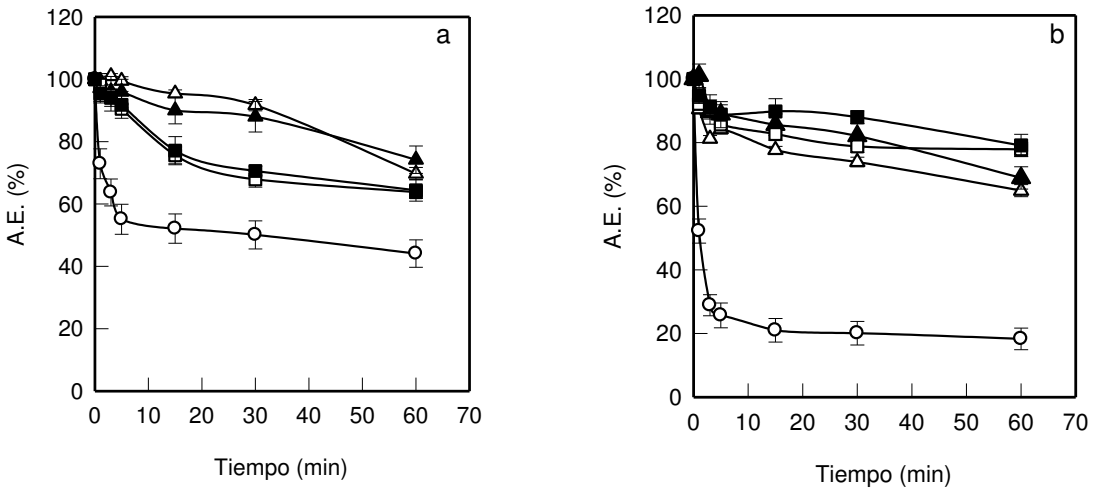


Figura III.5: Inactivación del ALA-D de micelio (a) y levadura (b) de *Mucor rouxii* por DEP y protección por sustrato. Efecto del agregado de Zn

La enzima se trató con DEP 0,2 mM a pH 7,4 y a 0 ºC, en presencia de ALA 5 mM (△ ,▲) y 10 mM (□ , ■), sin (△ ,□) o con (▲ , ■) agregado de Zn 10^{-4} M. En los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir la actividad enzimática. Se consideró control (○) al tratamiento con DEP sin preincubación con el sustrato y/o Zn 10^{-4} M. Valor A.E.control promedio: micelio = 8.992±130 U.E./mg, levadura = 2.465±125 U.E./mg. Detalles experimentales en Métodos y Figura III.1

Se observó que la preincubación con ALA previno la acción del DEP. Este resultado indicaría un efecto de protección mediada por el sustrato, lo que indicaría que un residuo histidina se encuentra involucrado en el sitio activo próximo al sitio de unión del sustrato.

Se estudió el tratamiento de la enzima con DEP con o sin preincubación con Zn 10^{-4} M y a tres valores de pH diferentes: 6,0; 7,4 y 8,0. Los resultados de estas experiencias se muestran en la Figura III.6.

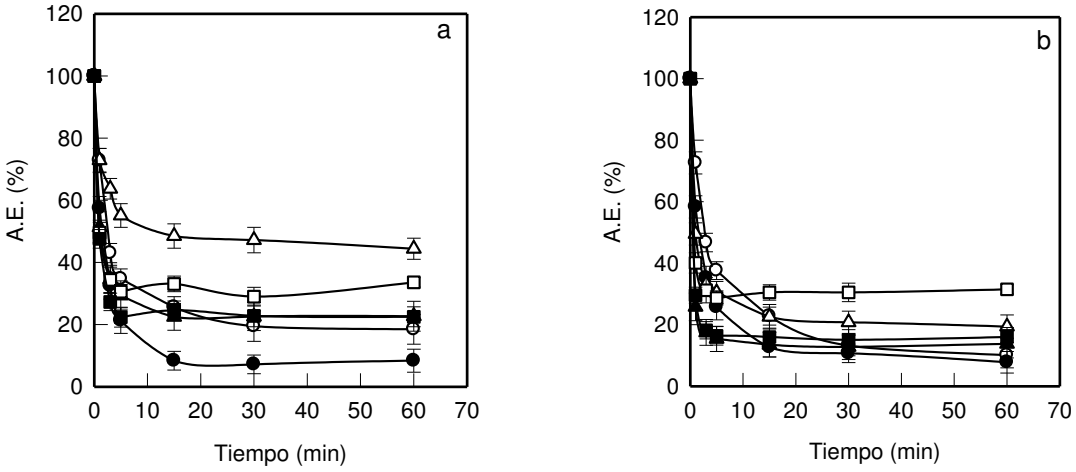


Figura III.6: Inactivación del ALA-D de micelio (a) y levadura (b) de *Mucor rouxii* por DEP a diferentes valores de pH. Efecto del agregado de Zn.

La enzima se trató con DEP 0,2 mM a pH 6,0 (○ , ●); 7,4 (△ , ▲) y 8,0 (□ , ■) a 0 ºC, en ausencia (○, △, □) o presencia (● , ▲ , ■) de Zn 10^{-4} M. En los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir la actividad enzimática, según Métodos. Valor A.E. control promedio: micelio = 9.113±130 U.E./mg, levadura = 2.506±115 U.E./mg. Otros detalles experimentales en Métodos y Figura III.1.

Este resultado confirma la dependencia de esta reacción con el pH, en tal sentido si el residuo histidina está comprometido en la reacción, la inhibición depende del estado de ionización del mismo. Por otro lado cabe mencionar que el hecho de que la inhibición sea máxima a pH 6 corroboraría la participación específica del residuo histidina en el sitio activo, ya que a este pH el DEP reacciona en forma selectiva con este aminoácido.

El hecho de que el Zn^{++} no ejerza un efecto protector durante este tratamiento, podría deberse a que el catión no esté involucrado en esta reacción del DEP con el ALA-D, aunque participe del sitio activo y tenga un rol en la catálisis.

III.3 CATIONES DIVALENTES

En esta sección se muestran los resultados de las experiencias que han permitido poner en evidencia que el Zn^{++} es el catión divalente presente en el sitio activo de la enzima ALA-D de *Mucor rouxi.*

Los estudios se llevaron a cabo en extractos enzimáticos parcialmente purificados (Fs dializado) a partir de levadura y micelio de este microorganismo.

III.3.1 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad del ALA-D

Se estudió el efecto sobre la actividad enzimática de los siguientes cationes divalentes: Mn^{++}; Hg^{++}; Fe^{++}, Cu^{++}, Co^{++}, Zn^{++}, Mg^{++} y Pb^{++} en las concentraciones de 10^{-3} M; 10^{-4} M y 10^{-5} M en presencia del reactivo protector de grupos sulfhidrilos, β-Me 10 mM, de acuerdo al sistema óptimo de incubación, determinado en el Capítulo I de esta sección. Los resultados se representan en la Figura III.7.

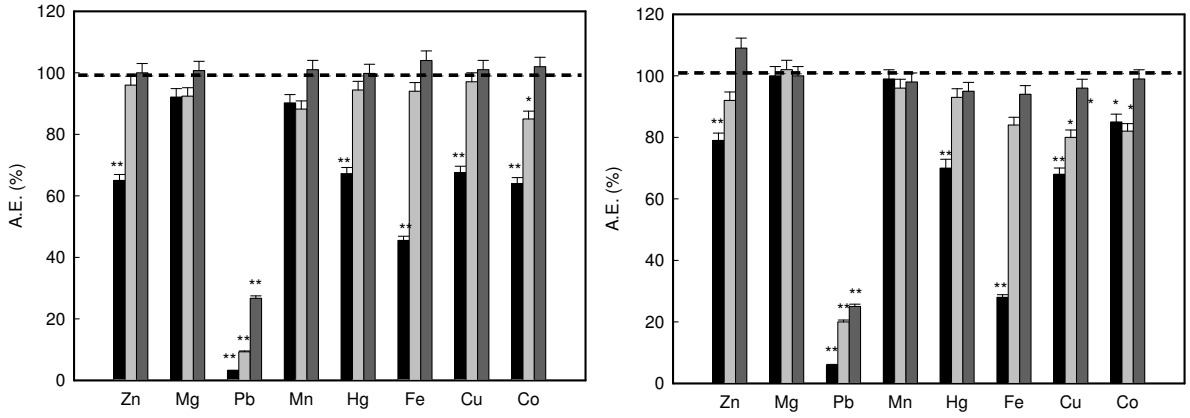


Figura III.7: Efecto de cationes divalentes sobre la actividad del ALA-D de micelio (a) y de levadura (b).

La actividad enzimática se determinó en presencia de β-Me 10 mM y de 3 concentraciones de cationes divalentes: 10^{-3} M ( ), 10^{-4} M ( ) y 10^{-5} M ( ). Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs dializada. (----) A.E control promedio: micelio = 87±10 U.E./mg, levadura = 43±7 U.E./mg. Diferencia significativa: respecto al control:(*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$.

La incubación con los diferentes cationes mostró que ninguno de los metales ensayados es capaz de producir un aumento de actividad significativo respecto del control. A concentraciones de 10^{-3} M aparece una inhibición de alrededor de 30-35% para micelio (Figura III.7 a) y de 20-25% para levadura (Figura III.7 b) para Zn^{++}, Hg^{++}, Cu^{++} y Co^{++}. En cambio el Mg^{++} y Mn^{++} no inhibieron a ninguna de las concentraciones ensayadas. Un comportamiento completamente diferente se

encontró para el Pb^{++} que mostró un importante efecto inhibitorio en todas las concentraciones utilizadas, siendo esta inhibición del 70-75%, tanto para micelio como para levadura a la menor concentración (10^{-5} M). El Fe^{++} en una concentración 10^{-3} M produjo una inhibición significativamente mayor a la observada para los otros metales, a excepción del Pb^{++}.

Se estudió el efecto de estos cationes en concentración 10^{-5} M con y sin agregado de β-Me 10 mM. En la Figura III.8 se muestran los resultados de estas experiencias. La ausencia del protector tiólico es responsable de la pérdida de tan sólo un 20% de actividad que se recuperó únicamente con el agregado de Zn^{++}. Este comportamiento fue análogo tanto para micelio (Figura III.8 a) como para levadura (Figura III.8 b). Para Fe^{++}, Hg^{++} y Cu^{++} se encontró una pérdida de actividad significativamente mayor que la observada por la ausencia de β-Me 10 mM, el resto de los cationes no produjo ninguna alteración.

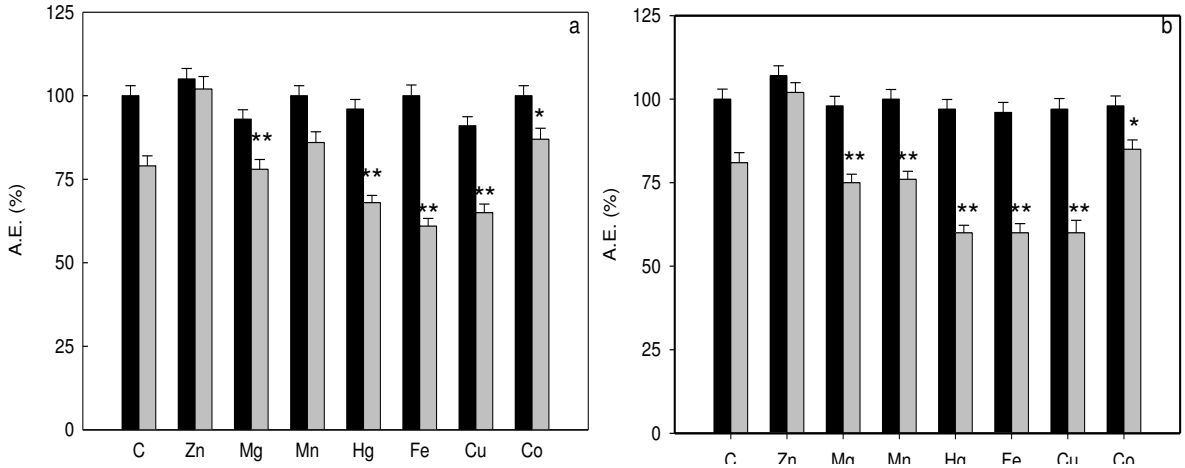


Figura III.8: Efecto de cationes divalentes sobre la actividad del ALA-D en micelio (a) y levadura (b). Efecto del β-Me.

La actividad enzimática se midió en presencia (■) o ausencia (□) de β-Me 10 mM y se expresa como % de la actividad control (C) medida en ausencia de metales. Los cationes se agregaron en una concentración 10^{-5} M. Valores A.E control promedio determinados con β-Me 10 mM: micelio = 87±10 U.E./mg , levadura = 43±7 U.E./mg. Diferencia significativa respecto al control con β-Me 10 mM: (*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$.Otros detalles experimentales se describen en Métodos y en la Figura III.7.

En la Figura III.9 se muestra el efecto de la preincubación con el catión, durante 30 min a 37 ºC sobre la actividad enzimática medida en presencia y

ausencia de β-met 10 mM, en los dos tipos celulares. La preincubación con el metal no alteró los resultados observados en la Figura III.2, a excepción del Cu^{++}, el cual en ausencia de β-Me 10 mM manifestó una inhibición de casi el 100%. Este efecto inhibitorio no se manifestó al incubar en presencia de protector tiólico.

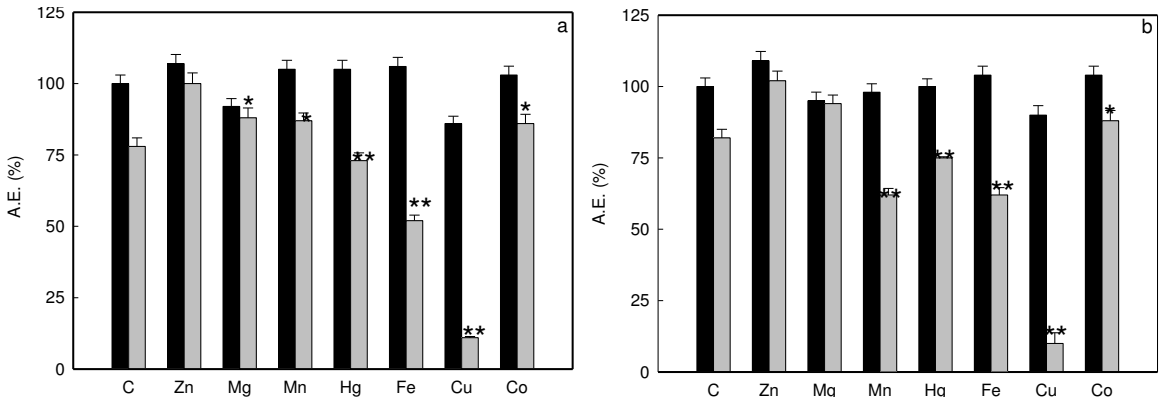


Figura III.9: Efecto de cationes divalentes sobre la actividad del ALA-D en micelio (a) y levadura (b). Efecto de la preincubación con el metal y del β-Me.

La preincubación con los cationes se llevó a cabo por 30 min a 37 ºC. Luego la enzima se incubó en las condiciones estándar (60 min a 37 ºC) en presencia (■) o ausencia (▭) de β-Me 10 mM. Valores de A.E control promedio determinados con β-Me 10 mM: micelio = 87±10 U.E./mg , levadura = 43±7 U.E./mg. Diferencia significativa respecto al control con β-Me 10 mM: (*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$. Otros detalles experimentales se describen en Métodos y en la Figura III.7.

Considerando los resultados de las experiencias con cationes divalentes, se decidió analizar el efecto de concentraciones variables de Zn^{++} (10^{-7}-10^{-2} M) agregadas al sistema de incubación (Figura III.10) o en una preincubación de 30 minutos previa a la determinación de actividad (Figura III.11). Los ensayos se llevaron a cabo en presencia y ausencia de β-Me 10 mM.

Los resultados de la Figura III.10 concuerdan con los obtenidos en las Figuras III.7 y III.8 donde se observó que a una concentración de Zn^{++} 10^{-5} M la enzima tiene su actividad óptima, que en ausencia de Zn se logra con el agregado de β-Me 10 mM. A esta concentración, el Zn^{++} podría estar favoreciendo el mantenimiento en estado reducido de grupos -SH esenciales para expresar el 100% de actividad. Este efecto no se observó a concentraciones menores de Zn^{++}.

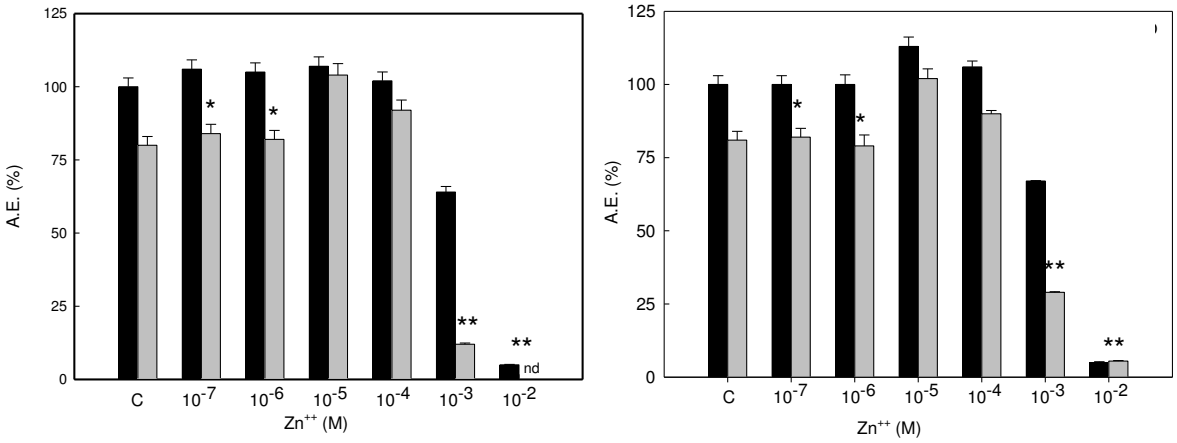


Figura III.10: Efecto de concentraciones variables de Zn^{++} sobre la actividad del ALA-D en micelio (a) y levadura (b). Efecto del β-Me.

La actividad enzimática se midió en presencia (■) o ausencia (▭) de β-Me 10 mM y se expresa como % de la actividad control medida en ausencia de Zn. Valores de A.E control promedio determinados con β-Me 10 mM: micelio = 89±9 U.E./mg , levadura = 41±8 U.E./mg. Diferencia significativa respecto al control con β-Me 10 mM: (*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$.Otros detalles experimentales se describen en Métodos y en la Figura III.7. nd: no detectada.

Para concentraciones de 10^{-3} y 10^{-2} M el catión produjo una significativa inhibición, observada tanto en ausencia como en presencia del protector tiólico. A una concentración 10^{-4} M de Zn^{++}, tuvo lugar un efecto intermedio, no hubo inhibición pero tampoco se logró restaurar al 100% de actividad.

También se encontró inhibición en ausencia de reductor para otros cationes divalentes (Hg^{++}, Fe^{++} y Cu^{++}) a partir de una concentración 10^{-5}M (Figura III.8 y III.9).

Se obtuvieron resultados similares al preincubar con los metales durante 30 minutos previos a la medición de actividad (Figura III.11), lo cual indica que el efecto del Zn^{++} es independiente de la presencia del sustrato.

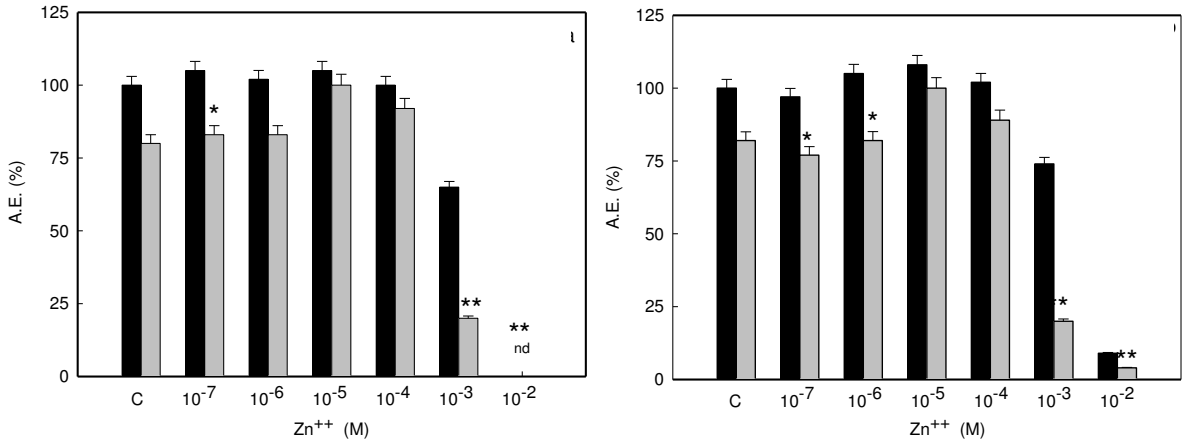


Figura III.11: Efecto de concentraciones variables de Zn^{++} sobre la actividad del ALA-D en micelio (a) y levadura (b). Efecto de la preincubación con el metal y de β-Me.

La preincubación con el Zn^{++} se llevó a cabo por 30 min a 37 ºC. Luego la enzima se incubó en las condiciones estándar (60 min a 37 ºC) en presencia (■) o ausencia (▭) de β-Me 10 mM. C: Actividad control, sin agregado del metal. Valores de A.E control promedio determinados con β-Me 10 mM: micelio = 89±9 U.E./mg, levadura = 41±8 U.E./mg. Diferencia significativa respecto al control con β-Me 10 mM: (*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$.Otros detalles experimentales se describen en Métodos y en la Figura III.7. nd: no detectada.

III.3.2 Tratamiento con agentes quelantes: Efecto del agregado de Zn^{++}

Teniendo en cuenta los resultados de las incubaciones con diferentes agentes quelantes (Figura II.11, Capítulo II de esta sección) y considerando que el Zn^{++} es el único catión capaz de revertir la disminución de actividad producida por la falta de un agente reductor, se estudió el efecto del agregado de este metal divalente en las concentraciones 10^{-5}-10^{-3} M a la enzima tratada con diferentes agentes quelantes: α-α'dipiridilo (DP, 1 mM), azida sódica (AS ,1 mM) y ortofenantrolina (o-Fe, 1 mM).

III.3.2.1 Tratamiento con α-α'dipiridilo

En las Figuras III.12 y III.13 se muestra el efecto del agente quelante DP en una concentración 1 mM agregado antes (30 min a 37 ºC) o durante la medición de la actividad del ALA-D de micelio (Figura III.12) y levadura (Figura III.13) y en presencia y ausencia del agente reductor β-Me 10 mM.

En micelio, el tratamiento con el quelante sin preincubar (Figura III.12 a) y en presencia de protector tiólico produjo una disminución en la actividad del 20% que no se pudo revertir por el agregado de Zn^{++}. En ausencia de β-Me la disminución de actividad producida por DP fue 3 veces mayor y sólo la concentración más alta del metal pudo revertir en un 50% dicho efecto. Cuando se preincubó con DP (Figura III.12 b), la inhibición fue significativamente mayor. En presencia de β-Me se observó una pérdida de actividad del 40%, que sólo se revierte un 25-30% cuando se adiciona Zn^{++} 10^{-4}-10^{-3} M respectivamente. En ausencia del β-Me el quelante inhibió totalmente la actividad de la enzima.

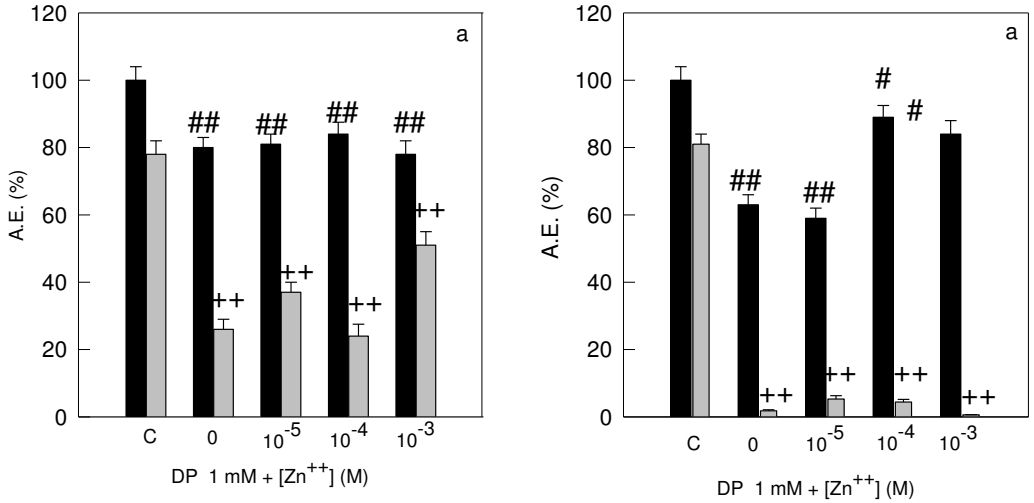


Figura III.12: Efecto de la incubación (a) o preincubación (b) con DP sobre la actividad del ALA-D de micelio. Reversión por Zn^{++}.

El DP (1 mM) se agregó al sistema de incubación o se preincubó 30 min a 37 ºC. La actividad se midió en presencia (■) o ausencia (▭) de β-Me 10 mM. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs dializada. Valor A.E control promedio = 92±7 U.E./mg. Diferencia significativa respecto al control entre: con β-Me 10 mM :(#) $p<0,05$ y (##) $p<0,01$ y sin β-Me 10 mM: (++) $p<0,01$. Los detalles experimentales se describen en Métodos.

Un comportamiento análogo, aunque con una respuesta mayor frente al agregado de Zn^{++}, se encontró en levadura (Figura III.13). El pretratamiento con el quelante en ausencia de protector tiólico inhibe completamente la enzima y no se logró recuperación alguna de la actividad.

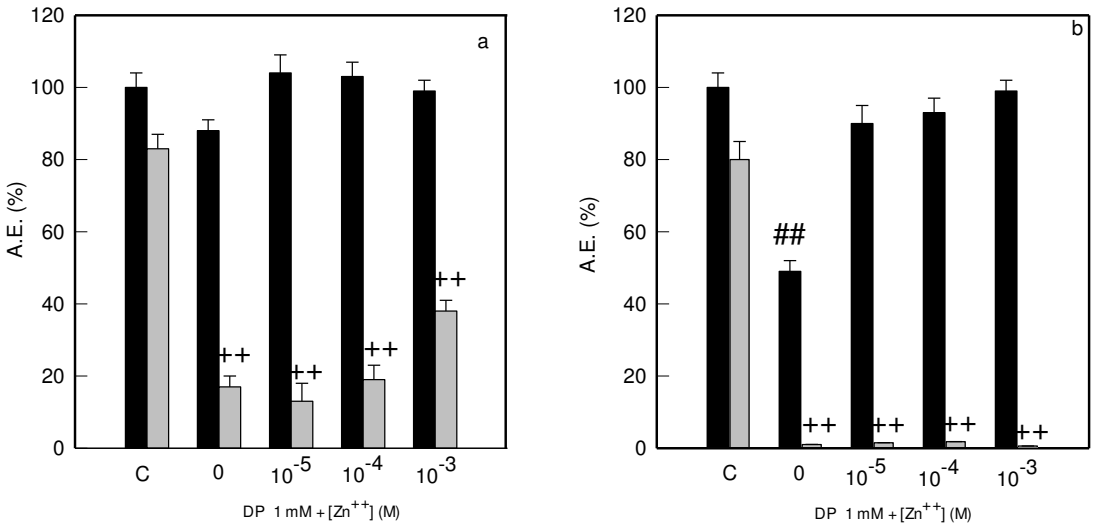


Figura III.13: Efecto de la incubación (a) o preincubación (b) con DP sobre la actividad del ALA-D de levadura. Reversión por Zn^{++}.

El DP (1 mM) se agregó al sistema de incubación o se preincubó 30 min a 37 ºC. La actividad se midió en presencia (■) o ausencia (▭) de β-Me 10 mM. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs dializada. Valor A.E control promedio = 42±8 U.E./mg, Diferencia significativa respecto al control entre: con β-Me 10 mM: (##) $p<0,01$ y sin β-Me 10 mM: (++) $p<0,01$. Los detalles experimentales se describen en Métodos.

En conclusión, el DP agregado durante la preincubación en condiciones no reductoras inhibió irreversiblemente la enzima de ambas formas mórficas.

III.3.2.2 Tratamiento con Azida

Este quelante inhibió 20-30% la actividad del ALA-D tanto de micelio (Figura III.14) como de levadura (Figura III.15) y dicho efecto fue independiente de la presencia o no del agente reductor.

El agregado de Zn^{++} no produjo cambios significativos en los valores de actividad hallados excepto cuando se determinó actividad de la enzima en ausencia de protector tiólico con Zn^{++} 10^{-3} M, en tales condiciones la enzima se inhibió 90%.

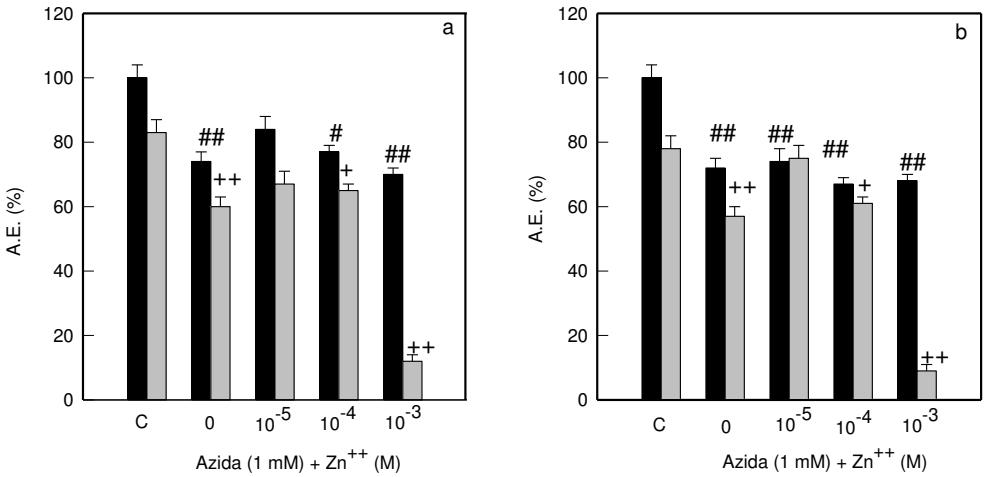


Figura III.14: Efecto de la incubación (a) o preincubación (b) con AS sobre la actividad del ALA-D de micelio. Reversión por Zn^{++}.

La AS (1 mM) se agregó al sistema de incubación o se preincubó 30 min a 37 ºC. La actividad se midió en presencia (■) o ausencia (▭) de β-Me 10 mM. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs dializada. Valor A.E control promedio = 89±7 U.E./mg, Diferencia significativa respecto al control entre: con β-Me 10 mM: (#) p<0,05 y (##) p<0,01 y sin β-Me 10 mM: (+) p<0,05 y (++) p<0,01. Los detalles experimentales se describen en Métodos.

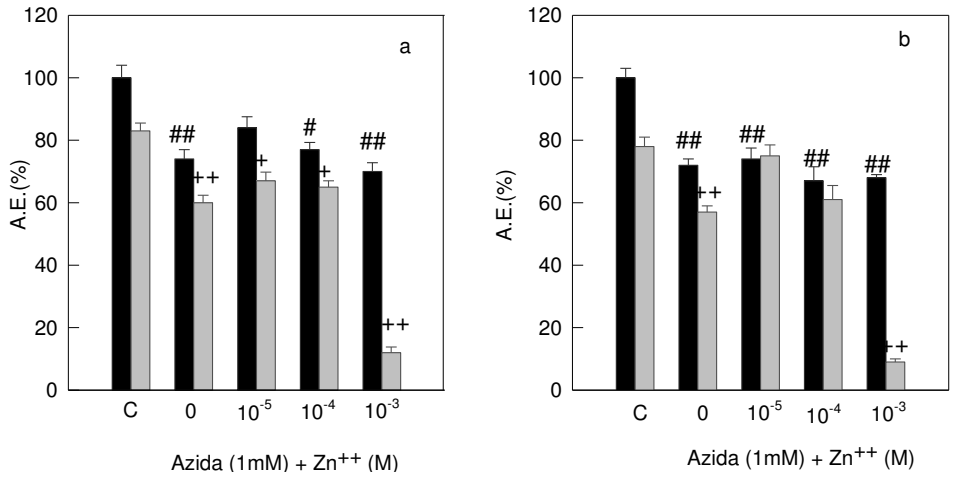


Figura III.15: Efecto de la incubación (a) o preincubación (b) con AS sobre la actividad del ALA-D de levadura. Reversión por Zn^{++}.

La AS (1 mM) se agregó al sistema de incubación o se preincubó 30 min a 37 ºC. La actividad se midió en presencia (■) o ausencia (▭) de β-Me 10 mM.. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs dializada. Valor A.E control promedio = 39±8 U.E./mg, Diferencia significativa respecto al control entre: con β-Me 10 mM: (#) p<0,05 y (##) p<0,01 y sin β-Me 10 mM: (+) p<0,05 y (++) p<0,01. Los detal les experimentales se describen en Métodos.

Aparentemente la AS no fue un complejante tan eficiente para el Zn^{++} como el DP, quedando disponibles mayores concentraciones del metal para manifestar su efecto inhibitorio en condiciones no reductoras. No se podría descartar una acción directa de la AS sobre la proteína.

III.3.2.3 Tratamiento con o-Fenantrolina

Cuando en las mismas condiciones descriptas anteriormente se empleó como agente quelante la o-Fe, se encontró un efecto inhibidor del 70 y 75% en micelio (Figura III.16) y levadura (Figura III.17) respectivamente, independientemente del agregado de β-Me 10 mM, como ya se describió en el Capítulo II. La preincubación con o-Fe aumentó ese efecto al 90-95% de inhibición (Figura III.16 b y III.17 b).

El tratamiento con Zn^{++} 10^{-3} M en condiciones reductoras, sin preincubar con quelante, produjo la recuperación el 100 % de actividad tanto en micelio como en levadura (Figura III.16 a y III.17 a). En las otras condiciones experimentales no hubo respuesta al agregado de Zn^{++}.

En este caso pudo observarse que la inhibición causada por la o-Fe es independiente del agregado β-Me. El efecto causado se pudo revertir totalmente adicionando Zn^{++} 10^{-3} M a la enzima en condiciones reductoras. La preincubación con quelante acentuó su efecto y permitió en presencia de β-Me tan sólo una recuperación del 60 y 40% para micelio y levadura respectivamente luego del agregado de Zn^{++} 10^{-3} M. Este resultado hace evidente el efecto protector que podría ejercer el reductor y la presencia del sustrato durante la incubación.

III.3.2.3.1 Efecto de cationes divalentes sobre la acción de o-Fenantrolina

Los resultados encontrados en las experiencias de tratamiento con los diferentes quelantes y Zn^{++} indicaron que la o-Fe 1 mM causa una importante pérdida de actividad catalítica en la enzima de micelio y levadura, en todas las condiciones experimentales ensayadas. El agregado de Zn^{++} 10^{-3} M simultáneamente con o-Fe 1 mM, sin preincubar y con el protector tiólico β-Me 10 mM fue la única condición experimental en la cual se logró la recuperación total de la actividad enzimática.

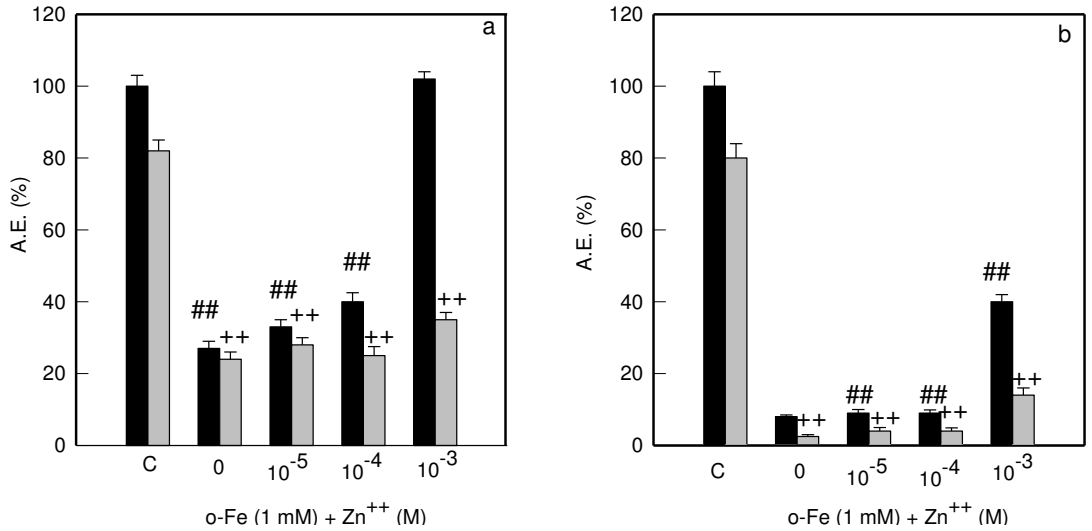


Figura III.16: Efecto de la incubación (a) o preincubación (b) con o-Fe sobre la actividad del ALA-D de micelio. Reversión por Zn^{++}.

La o-Fe (1 mM) se agregó al sistema de incubación o se preincubó 30 min a 37 ºC. La actividad se midió en presencia (■) o ausencia (▭) de β-Me 10 mM. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs dializada. Valor A.E control promedio = 91±10 U.E./mg. Diferencia significativa respecto al control entre: con β-Me 10 mM: (##) p<0,01 y sin β-Me 10 mM: (++) p<0,01. Los detalles experimentales se describen en Métodos.

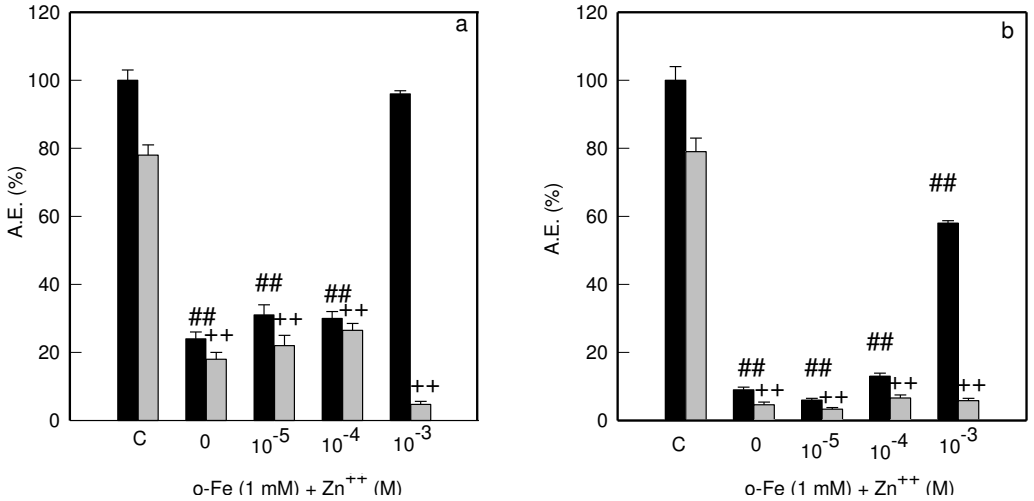


Figura III.17: Efecto de la incubación (a) o preincubación (b) con o-Fe sobre la actividad del ALA-D de levadura. Reversión por Zn^{++}.
La o-Fe (1 mM) se agregó al sistema de incubación o se preincubó 30 min a 37 ºC. La actividad se midió en presencia (■) o ausencia (▭) de β-Me 10 mM. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs dializada. Valor A.E control promedio = 42±8 U.E./mg Diferencia significativa respecto al control entre: con β-Me 10 mM: (##) p<0,01. y sin β-Me 10 mM: (++) p<0,01. Los detalles experimentales se describen en Métodos.

Considerando estos resultados se ensayó la respuesta de la enzima tratada con o-Fe 1 mM frente a diferentes cationes divalentes a una concentración 10^{-3} M, en condiciones reductoras y sin preincubación con el quelante. De esta manera se evaluó si algún otro catión era capaz de ejercer el efecto del Zn^{++}, en relación a la recuperación total de la actividad catalítica.

En la Figura III.18 se demuestra que el Zn^{++} es el único catión capaz de revertir completamente la inhibición del 70% causada por el tratamiento con o-Fe. Con el Mn^{++} y el Co^{++} se alcanzó una recuperación de un 60-65% de la actividad catalítica, mientras que el resto de los cationes estudiados tuvieron un efecto inhibitorio aún mayor al encontrado con la o-Fe sola, en estas condiciones experimentales.

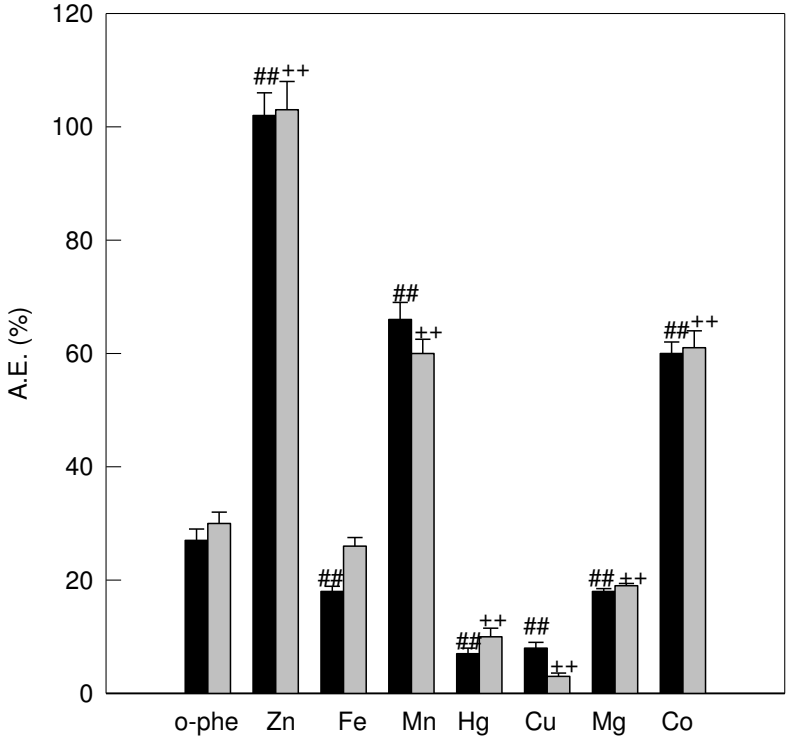


Figura III.18: Efecto de la o-Fe sobre la actividad del ALA-D de micelio y levadura. Reversión por metales.

La o-Fe (1 mM) se agregó al sistema de incubación en micelio (■) y en levadura (■). La actividad se midió en presencia de β-Me 10 mM. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs dializada sin agregado de quelante ni cationes. Valor A.E control promedio micelio = 87±9 U.E./mg, levadura = 44±8. Diferencia significativa respecto al control micelio: (##) $p<0,01$.y respecto al control levadura: (++) $p<0,01$. Los detalles experimentales se describen en Métodos.

III.3.2.3.2 Efecto de la diálisis sobre la enzima tratada con o-Fenantrolina

Para continuar con la caracterización del efecto de la o-Fe, se trató la enzima con el quelante durante 30 minutos y posteriormente se procedió a eliminarlo mediante una diálisis durante 20 hs. Los valores de actividad remanente para la enzima de ambas fuentes se muestran en la Tabla III.1.

Luego de la diálisis, la enzima de ambas fuentes en condiciones estándar de incubación recuperó un 75 – 78 % de su actividad inicial.

Tabla III.1: Actividad del ALA-D en micelio y levadura tratados con o-Fe 1 mM y dializadas.

FUENTE ENZIMÁTICA	A.E. (%) post-diálisis
Micelio	75 ± 6
Levadura	78 ± 5

Los valores de actividad control promedio fueron: A.E. micelio = 94±7 U.E./mg, levadura = 40±9 U.E./mg. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs dializada sin agregado de quelante. Diferencia significativa respecto al control correspondiente: $p<0,05$. Detalles experimentales en Métodos

Estos resultados estarían demostrando la interacción de o-Fe con cationes involucrados en por lo menos dos poblaciones de sitios de unión diferentes: sitio A y sitio B. El sitio A tendría el catión fuertemente asociado a la proteína, el mismo podría ser bloqueado por el quelante (interacción *in situ*), y permanecer unido a la enzima durante la diálisis. La permanencia del catión en este sitio sería responsable de la recuperación de hasta un 75-78% de la actividad. El sitio B sería aquel en el cual el catión estaría débilmente unido y podría eliminarse asociado al quelante durante la diálisis. Estos resultados son consistentes con los postulados para el ALA-D de humanos, levaduras y bacterias donde se ha demostrado la existencia de dos tipos de sitios diferentes para la unión del Zn^{++} (Jaffe, 2000).

III.3.2.3.3 Efecto de cationes divalentes sobre la enzima tratada con o-Fe y dializada.

El extracto enzimático obtenido de micelio y levadura luego del tratamiento con quelante y su posterior eliminación por diálisis, se incubó con diferentes concentraciones de cationes divalentes 10^{-3}, 10^{-4} y 10^{-5} M en presencia de β-Me 10 mM.

Los resultados obtenidos se encuentran graficados en las Figuras III.19 y III.20 para micelio y levadura respectivamente.

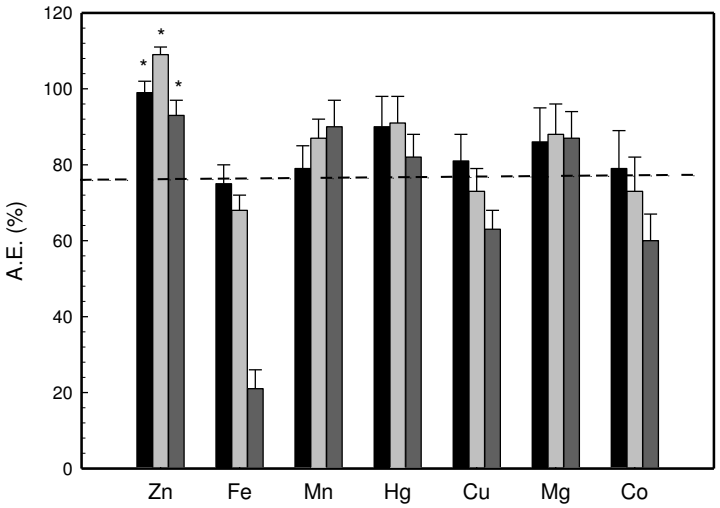


Figura III.19: Efecto de cationes divalentes sobre la enzima de micelio tratada con o-Fe y dializada.

Los metales se agregaron al sistema de incubación. La actividad se midió en presencia de β-Me 10 mM. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs dializada sin agregado de o-Fe y dializada. (---): % A.E. de la enzima tratada con o-Fe y dializada. Valor A.E control promedio = 94±7 U.E./mg. [cationes]: (■) 10^{-5} M, (□) 10^{-4} M, (■) 10^{-3} M. Diferencia significativa respecto a la enzima tratada y dializada (*) $p<0,05$.

Se encontró que la inhibición remanente luego de la diálisis puede revertirse completamente sólo con el agregado de Zn^{++} 10^{-4} y 10^{-5} M.

Para Fe^{++}, Cu^{++} y Co^{++} no sólo no se observó reversión, sino que en altas concentraciones mostraron diferentes grados de inhibición. El Mn^{++}, Hg^{++} y Mg^{++} produjo un incremento de la actividad basal post diálisis que, aunque fue significativo, no revirtió completamente la inhibición.

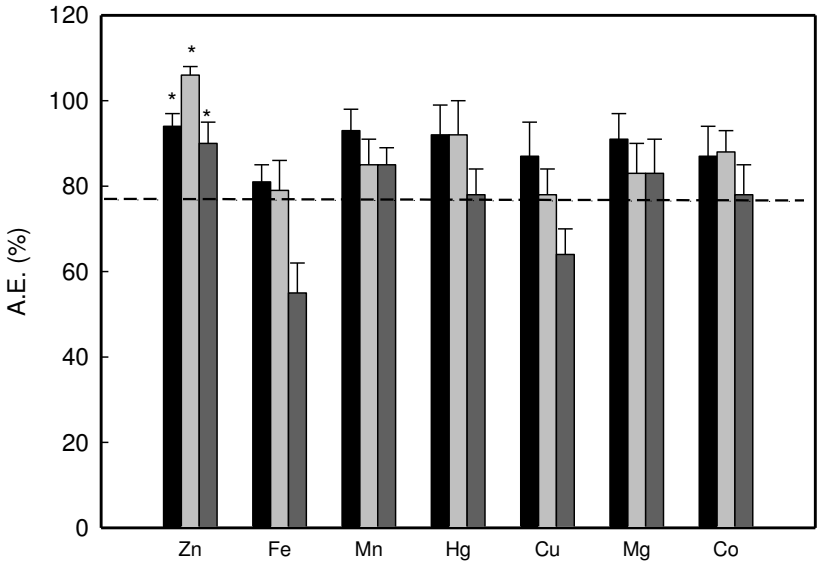


Figura III.20: Efecto de cationes divalentes sobre la enzima de levadura tratada con o-Fe y dializada.

Los metales se agregaron al sistema de incubación. La actividad se midió en presencia de β-Me 10 mM. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs dializada sin agregado de o-fe. (---): % A.E. de la enzima tratada con o-Fe y dializada. Valor A.E control promedio = 40±9 U.E./mg. [cationes]: (■) 10^{-5} M, (□) 10^{-4} M, (■) 10^{-3} M. Diferencia significativa respecto a la enzima tratada y dializada (*) $p<0,05$.

Una explicación a este comportamiento sería considerar que el Zn^{++} restituiría al catión del sitio B, recuperándose así el 100% de actividad. Sin embargo la especificidad por Zn^{++} de este sitio no sería del 100% ya que, aunque en menor grado, puede ser sustituído parcialmente por otros cationes tales como Mg^{++}, Hg^{++} y Mn^{++}.

III.3.2.3.4 **Efecto del Zn en condiciones no reductoras sobre la enzima tratada con o-Fe y dializada**

Se estudió el efecto del protector tiólico durante la incubación de la enzima tratada con o-Fe y dializada. Los resultados se muestran en la Figura III.21.

En ausencia del reductor, de forma similar a lo observado previamente (Figuras III.8 y III.9), se manifestó la pérdida de actividad de alrededor del 20%, tanto para la enzima control como para la tratada con el quelante y dializada, lo cual indirectamente indica que los sitios A y B no estarían involucrados en esta disminución. Este efecto, que persiste desde que se aisla la enzima, podría deberse tanto a la pérdida del entorno reductor como a la pérdida de Zn^{++} que interacciona muy débilmente con la proteína. Si esta última opción es la correcta cabría postular un tercer tipo de sitio (sitios C) donde el Zn^{++} puede interactuar causando el mismo efecto que un reductor.

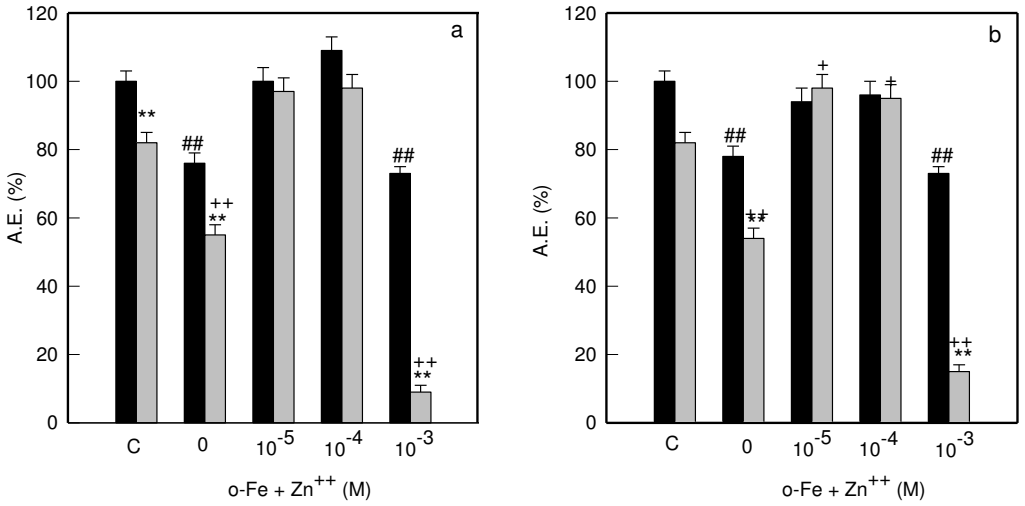


Figura III.21: Efecto del Zn^{++} sobre la enzima de micelio (a) y levadura (b) tratada con o-Fe y dializada.

Los metales se agregaron al sistema de incubación. La actividad se midió en presencia (■) o ausencia (▒) de β-Me 10 mM. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs con β-Me 10 mM y dializada .A.E control promedio: micelio = 90±7 U.E./mg, levadura = 39±7 U.E./mg. Diferencia significativa respecto al control entre: con y sin β-Me 10 mM (**) $p<0,01$; con β-Me 10 mM (##) $p<0,01$ y sin β-Me 10 mM: (++) $p<0,01$. Los detalles experimentales se describen en Métodos.

Post-diálisis y sin agregado de protector tiólico, se observó una inhibición de casi 50% que revirtió a concentraciones de Zn^{++} 10^{-4} y 10^{-5} M. En este caso la pérdida de actividad se debe a las condiciones no reductoras o pérdida del Zn^{++} del sitio C sumada a la pérdida de catión del sitio B. El Zn^{++} agregado ejercería su efecto de recuperación de 100% de actividad inicial actuando a estos dos niveles.

Con estas características se podría asignar al Zn^{++} presente en el sitio A un rol constitutivo y al Zn^{++} del sitio B otro rol, que no sería esencial para la actividad catalítica, ya que la enzima conserva entre un 75-78% de actividad luego de su eliminación (Tabla III.1), pero que es necesario para medir de la actividad máxima.

En base a los resultados obtenidos podríamos postular para los sitios C que el Zn^{++} en ellos podría interactuar con ligandos que contienen azufre, los cuales en ambiente no reductor estarían oxidados causando una pérdida de actividad que se recupera tanto en condiciones reductoras (agregado de β-Me 10 mM) como en presencia sólo del catión en el sistema de incubación (Figura III.8 y III.9). Los ligandos con azufre en ambiente no reductor podrían dar lugar a la formación de puentes disulfuro (-S-S-) que en presencia de un reductor se convierten en –SH. La presencia de Zn^{++} en esos sitios (C) produciría el mismo efecto que el reductor al impedir la formación de los puentes -S-S-, probablemente a través de modificaciones en la estructura que no permitan que la oxidación de los grupos –SH se lleve a cabo.

El rol del Zn^{++} en dicho dominio sería favorecer que la estructura de la proteína adopte la configuración más favorable para la catálisis.

III.3.3 Reversión de la inhibición por Pb mediada por cationes divalentes

El Pb es un potente inhibidor de enzimas con grupos sulfhidrilos en el sitio activo. En el caso de metaloenzimas, su mecanismo de acción implica el desplazamiento del catión divalente del sitio activo, ocasionando la pérdida parcial o total de actividad catalítica. Este efecto puede ser reversible dependiendo de la afinidad específica de la enzima por los cationes divalentes y de las concentraciones de los mismos (Chauhan *et al.,* 1997; Jaffe *et al.*, 2001).

De acuerdo con los resultados encontrados en las experiencias con cationes divalentes (Figura III.7) donde la inhibición causada por incubación con Pb^{++} 10^{-4} M

fue del orden del 90-95%, se estudió el efecto del agregado de cationes divalentes con la misma concentración 10^{-4} M, en presencia de β-Me 10 mM.

Los resultados se muestran en la Figura III.22, donde se puede observar que el único catión capaz de prevenir el fuerte efecto inhibitorio causado por el Pb^{++} es el Zn^{++}, recuperándose entre 70-80% de la actividad inicial, tanto para micelio como para levadura.

Estos resultados estarían indicando que ambos cationes, a las concentraciones ensayadas, estarían interactuando por el o los mismos sitios de interacción.

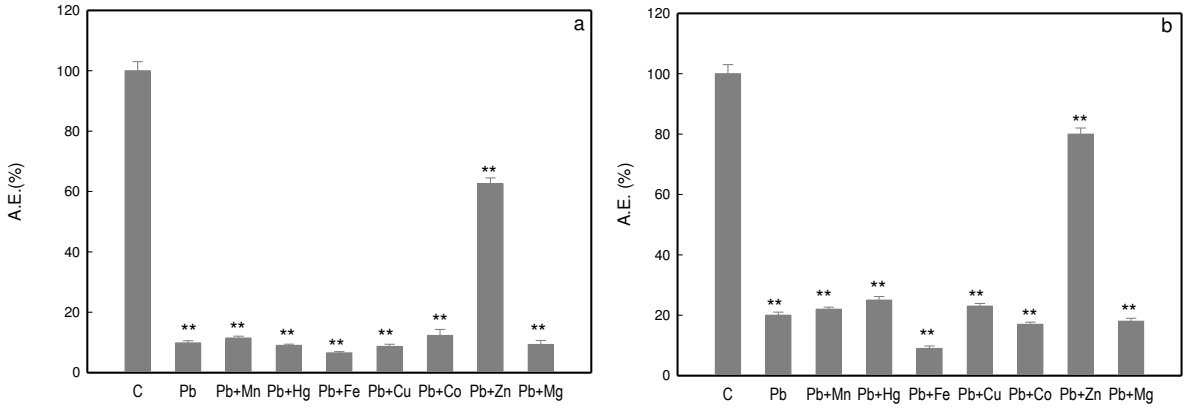


Figura III.22: Efecto del Pb^{++} sobre la enzima de micelio (a) y levadura (b). Reversión por metales.

Los metales se agregaron al sistema de incubación en una concentración 10^{-4} M. La actividad se midió en presencia de β-Me 10 mM. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs sin agregado de Pb^{++} o metales. Valor A.E. control promedio micelio = 91±7 U.E./mg, levadura = 45±6 U.E./mg. Diferencia significativa respecto al control (★★) $p<0,01$.

Teniendo en cuenta la capacidad de recuperación de la actividad enzimática del ALA-D por el Zn^{++}, se realizaron experiencias con Zn^{++} y Pb^{++} solos o combinados en diferentes concentraciones, 10^{-4} M y 10^{-5}M, con y sin agregado de reactivo tiólico. Los resultados obtenidos (Figura III.23) mostraron el efecto protector que el Zn^{++}, en determinadas condiciones experimentales, ejerció frente a la inhibición por Pb^{++}.

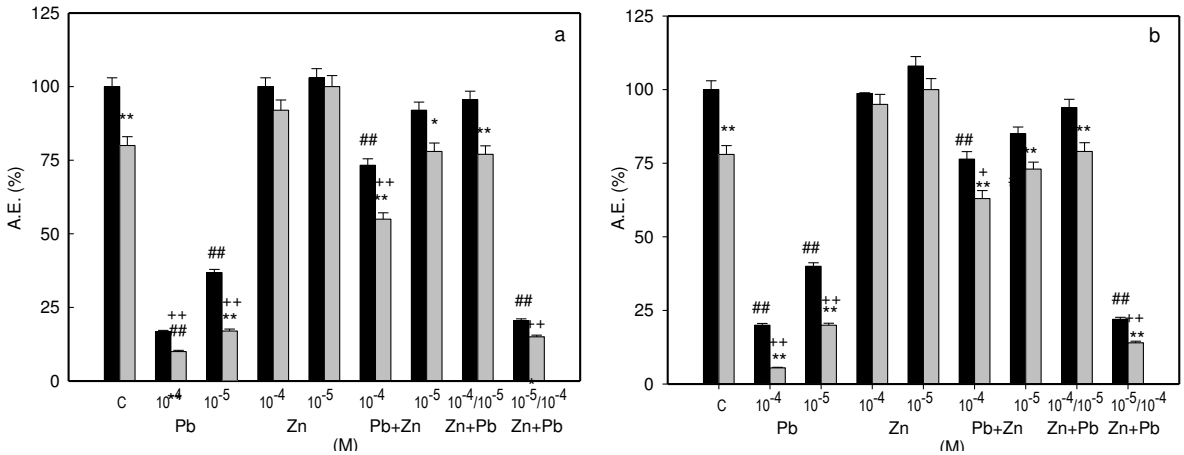


Figura III.23: Efecto del Pb^{++} sólo y combinado con Zn^{++} sobre la enzima de micelio (a) y levadura (b).

Los metales se agregaron al sistema de incubación en una concentración 10^{-4} M y 10^{-5} M. La actividad se midió en presencia (■) o ausencia (▒) de β-Me 10 mM. Los resultados representan el promedio ± D.E. del porcentaje de la actividad específica obtenidos de tres experimentos independientes. El 100% corresponde a la actividad de la enzima de la fracción Fs con β-Me 10 mM sin agregado de Pb^{++} o Zn^{++}. A.E control promedio: micelio = 91±7 U.E./mg, levadura = 45±6 U.E./mg. Diferencia significativa respecto al control entre: con y sin β-Me 10 mM (**) $p<0,01$; con β-Me 10 mM (##) $p<0,01$ y sin β-Me 10 mM: (++) $p<0,01$. Los detalles experimentales se describen en Métodos.

Cuando se incubó la enzima en presencia de Pb^{++} 10^{-5} M y Zn^{++} 10^{-4} M, la protección por Zn^{++} fue superior al 90 %, sin embargo cuando la concentración de Pb^{++} fue superior a la del Zn^{++} este último no manifestó ningún efecto.

En ausencia de β-Me a una concentración de Pb^{++} 10^{-5} M el Zn^{++} aún a una concentración 10 veces mayor, no fue capaz de revertir la pérdida de actividad causada por el Pb^{++}. El Pb^{++} sería capaz entonces de bloquear los sitios C para la unión del Zn^{++} impidiendo que se manifieste el 100% de actividad.

El alto grado de inhibición (70-90%) causado por el Pb^{++} indicaría que este catión compite con todos los sitios de interacción del Zn. en el ALA-D de micelio y levadura de *Mucor rouxii*

III.4 CONCLUSIONES

Los resultados encontrados a partir de la caracterización del sitio activo del ALA-D de micelio y levadura de *Mucor rouxii* son los siguientes:

- Se hallaron 4 residuos sulfhidrílicos por subunidad de ALA-D durante la primera fase de reacción con DTNB, que corresponden a grupos expuestos, 2 tipo I y 2 tipo II. Un quinto residuo tipo III se manifiestó luego del tratamiento con SDS
- Cuando la enzima se estacionó por espacio de 3 y 24 horas, se produjo la pérdida de 2 grupos –SH, tanto en micelio como en levadura, 1 tipo I y 1 tipo II. El residuo que se titulaba post agregado de SDS no mostró cambios, lo que resultó consistente con su calidad de grupo –SH no expuesto.
- La determinación de la actividad de la enzima realizada paralelamente con la titulación mostró una pérdida de la actividad del 20%, lo que indica que esos grupos oxidados no son esenciales para la catálisis pero son necesarios para la manifestación óptima de la actividad.
- El tratamiento con DEP 0,2 mM durante 60 minutos a 0°C inhibió rápidamente la reacción catalítica del ALA-D de levadura y micelio.
- El sustrato demostró ejercer una importante protección sobre esta interacción.
- La reversión de la inactivación de la enzima modificada por la hidroxilamina, así como la dependencia de ésta con el pH, avalaron la existencia de una histidina esencial en la actividad enzimática. Estos resultados sugieren que otros aminoácidos con residuos nucleofílicos, tales como tirosina, serina, lisina y grupos sulfhidrilos no estarían involucrados en la reacción con el DEP.
- La rápida inactivación producida por el DEP se debió a la modificación de un residuo histidina por subunidad, situado en el sitio catalítico de la enzima o en su cercanía.
- En estas condiciones experimentales el Zn^{++} no ejerce un rol protector sobre la actividad de la enzima, indicando que no estaría interactuando con la histidina crítica en la reacción catalítica.
- El agregado de los cationes divalentes Mn^{++}; Hg^{++}; Fe^{++}, Cu^{++}, Co^{++}, Zn^{++}, Mg^{++} y Pb^{++} en las concentraciones de 10^{-3} M; 10^{-4} M y 10^{-5} M en presencia del reactivo β-Me 10 mM no aumentó la actividad de la enzima. Sin embargo se observó una pérdida en la actividad a la concentración más alta de Zn^{++}, Hg^{++} Cu, Fe^{++} y Co^{++}. El Pb^{++}, como se esperaba tuvo un fuerte efecto inhibidor en todas las concentraciones ensayadas.

- Es importante notar que el Zn^{++} 10^{-4} y 10^{-5} M fue capaz de restablecer por completo la actividad enzimática, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, donde se incorporaría a los sitios anteriormente mencionados como B y C
- La actividad de la enzima llevada a cabo con los cationes en una concentración de 10^{-5} M y en ausencia de β-Me, causó una pérdida de actividad del 20%. El Zn^{++} fue capaz de recuperar el 100% de la actividad, mientras que otros cationes causaron una inhibición adicional, que para el caso del Cu^{++} alcanzó el 90% por preincubación con el catión.
- El tratamiento del ALA-D en micelio y levadura con concentraciones variables de Zn^{++} entre 10^{-2} - 10^{-7} M con y sin agregado de β-Me 10 mM y efectuando o no preincubación con el catión, demostró que el Zn^{++} sólo a 10^{-5} M restaura por completo la actividad de la enzima en ausencia del protector. Para las concentraciones menores no se encontró efecto alguno y para 10^{-3} y 10^{-2} M se observó por el contrario una inhibición, que se incrementa en ausencia de β-Me 10 mM.
- Estas experiencias muestran que, en condiciones reductoras, la enzima no necesita del agregado de cationes para manifestar su actividad máxima. Cuando el reactivo tiólico no está en el medio de incubación, hay una pérdida del 20 % que sí es recuperada por el agregado de Zn^{++}. Otros cationes, incluído el Zn^{++}, en esas mismas condiciones y a concentraciones mayores inhiben el ALA-D.
- Se determinó que la o-Fe actuó como un importante inhibidor de la actividad enzimática, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, que pudo revertirse completamente por tratamiento con Zn^{++} 10^{-3} M en presencia de β-Me 10 mM y sin pretratamiento con el quelante. El resto de los cationes divalentes no previnieron ni revirtieron el efecto inactivante del quelante, excepto el Co^{++}.
- Luego de haber eliminado la o-Fe por diálisis, la enzima recuperó un 75% de su actividad inicial, indicando que la acción del quelante había ocurrido *in situ*. Esa pérdida del 25% se recuperó totalmente por tratamiento con Zn^{++} 10^{-4} y 10^{-5} M. Otros cationes tales como el Mn^{++}, Hg^{++} y Mg^{++} recuperaron parcialmente la actividad.

- El tratamiento de las enzimas dializadas, con concentraciones variables de Zn^{++} 10^{-2} - 10^{-7} M, en condiciones reductoras y no reductoras, demostró que el efecto de la ausencia de protector de grupos -SH es independiente de la pérdida de actividad post diálisis y que indica la necesidad de un ambiente reductor para que la actividad sea óptima. El Zn^{++}puede suplir la ausencia del reductor resguardando una conformación favorable para la catálisis.
- La inhibición causada por Pb^{++} en la actividad de ALA-D, indicó que este catión puede unirse a todos los sitios en que lo hace el Zn^{++}.
- Los resultados sugieren la existencia de distintos sitios de unión para Zn^{++}, en concordancia con lo que postulan otros autores: un sitio A, donde el metal se encuentra fuertemente unido, un sitio B, que no es esencial, del cual el catión puede eliminarse por diálisis y ser parcialmente reemplazado por otros cationes y sitios C, donde el Zn^{++} intervendría cuando la enzima se encuentra en medio no reductor.

III.5. REFERENCIAS

Chauhan, S.; Titus, D. & O'Brian, M. (1997) “Metal control activity and expressiopn of the heme biosynthesis enzyme delta-aminolevulinic acid dehydratase in *Bradyrhizobium japonicum*" J Bacteriol. **179** 5516-5520.

Jaffe, E. K. (2000) “The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes“. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. **56** 115-128.

Jaffe, E.K.; Martins, J.; Li, J.; Kervinen, J. & Dunbrack R.L. Jr. (2001) The molecular mechanism of lead inhibition of human porphobilinogen synthase. J Biol Chem. **276** 1531-1537.

Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1979) “The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. Biochim Biophys Acta. **570** 167-178.

CAPÍTULO IV

DIMORFISMO DE *Mucor rouxii* Y BIOSÍNTESIS DEL HEMO

.

Como se indica en el Capítulo III de la Introducción, varias rutas metabólicas han sido evaluadas durante el cambio dimórfico de micelio a levadura y viceversa en diferentes especies del género *Mucor*. El esclarecimiento de los procesos bioquímicos involucrados podría hacerse extensivo y generalizado a todos los microorganismos en los que tiene lugar la transición dimórfica. En el pasaje de levadura a micelio, inducido por la aireación de los cultivos, la mitocondriogénesis adquiere importancia, no sólo por estar asociada a los procesos aeróbicos sino a través de otras funciones mitocondriales. Es de esperar que la síntesis de porfirinas se vea afectada ya que las hemoproteínas, en particular los citocromos, deberían asumir un papel relevante.

En otros microorganismos, que no presentan dimorfismo celular, tales como las levaduras, la síntesis de citocromos depende de las condiciones de crecimiento y la actividad ALA-D se incrementa junto con la mayor formación de mitocondrias (Jarayaman *et al*, 1971). Se ha demostrado además que la biosíntesis del hemo está en relación directa con la biogénesis de esta organela (Sanders et al, 1973). En la mayoría de los tejidos donde se ha estudiado la regulación de la síntesis de porfirinas, la enzima ALA-S es la que controla la velocidad de formación del hemo, está presente en bajas concentraciones y tiene una vida media corta consecuencia del alto “turnover” que le permite adaptarse rápidamente a las necesidades celulares. Estos requisitos no los cumple la enzima ALA-D ya que generalmente se encuentra en exceso y su actividad es alta, comparada con las otras enzimas del camino metabólico del hemo.

Si ALA-S es la enzima regulatoria y ALA-D la enzima mayoritaria, la relación de actividades ALA-D/ALA-S debería ser alta. En *Saccharomyces cerevisiae* (Correa García *et al.*, 1993; Araujo *et al.*, 1998) y *Neurospora crassa* (Chandrika & Padmanaban, 1980) esta relación esta invertida y se observa una menor actividad de ALA-D comparada con otros organismos, postulándose entonces que la enzima podría desempeñar un rol fundamental en la regulación de la biosíntesis de

tetrapirroles. Una serie de trabajos (Carvajal *et al.*, 1990; Correa García *et al.*, 1993) postulan que en levadura tanto ALA-S como ALA-D tendrían un rol regulatorio siendo ambas actividades controladas por hemo, oxígeno y glucosa, indicando que son sensibles a represión por catabolito e inhibición por producto final (hemo).

Tabla IV.1: Actividad específica del ALA-D de diferentes fuentes

FUENTE ENZIMATICA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U.E./mg)	REFERENCIAS
Hígado bovino	37,00	Fukuda 1988
Hígado Porcino	27,00	Fukuda 1988
Eritrocitos humanos	84,00	Bustos *et al.* 1980
Hígado de ratón	23,00	Buzaleh *et al.* 1990
Euglena gracilis	33,00	Stella *et al.* 1977
Mucor rouxii		
micelio	16,50	Paveto *et al.* 1989
levadura	2,60	Paveto *et al.* 1989
Sacharomyces cerevisiae		
Cepa S288-C	4,80	Borralho *et al.* 1983
Cepa GS1-36	4,50	Borralho *et al.* 1983
Cepa D27	1,70	Correa García *et al.* 1993
Cepa D27/C6	1,50	Correa García *et al.* 1993
Cepa D273-10B	1,09	Araujo *et al.* 1998
Cepa B231	2,72	Araujo *et al.* 1998

En *Mucor rouxii* se ha estudiado la variación de la actividad de ALA-D durante la morfogénesis de levadura a micelio por aireación del cultivo, encontrándose un incremento significativo de la actividad catalítica alrededor de 2 horas antes de la emisión de los tubos germinativos que se mantuvo constante hasta la total transformación a micelio (Paveto *et al,* 1989). Al estudiar el efecto del cAMPc, inhibidor del desarrollo de hifas, sobre la actividad del ALA-D a las 4 horas de haberlo agregado al medio de cultivo, se encontró que la aparición de las hifas estaba parcialmente arrestada y era acompañada por una concomitante pérdida de la actividad de ALA-D. En el trabajo mencionado se estableció, teniendo en cuenta la relación de actividades ALA-D/ALA-S, un rol regulatorio para el ALA-D

Con el objetivo de evaluar el camino biosintético del hemo de *Mucor rouxii*, se estudiaron algunos parámetros relacionados con dicha vía metabólica. Para ello se midió el contenido de precursores ALA y PBG, porfirinas y actividad de ALA-D en micelio y levadura. Estos parámetros también fueron estudiados durante el cambio dimórfico de manera de aportar mayores evidencias a cerca del rol regulatorio del ALA-D en *Mucor rouxii*.

IV.1 BIOSÍNTESIS DEL HEMO EN MICELIO Y LEVADURA DE *Mucor rouxii.* EFECTO DEL AGREGADO DE ALA

Se midió el contenido de ALA, PBG, porfirinas y actividad de ALA-D en micelio y levadura, en presencia de distintas cantidades de ALA (10^{-5}-10^{-3} M) adicionado al medio de cultivo.

La captación de ALA fue proporcional a la concentración del metabolito en el medio de cultivo y sensiblemente mayor en micelio que en levadura (Figura IV.1).

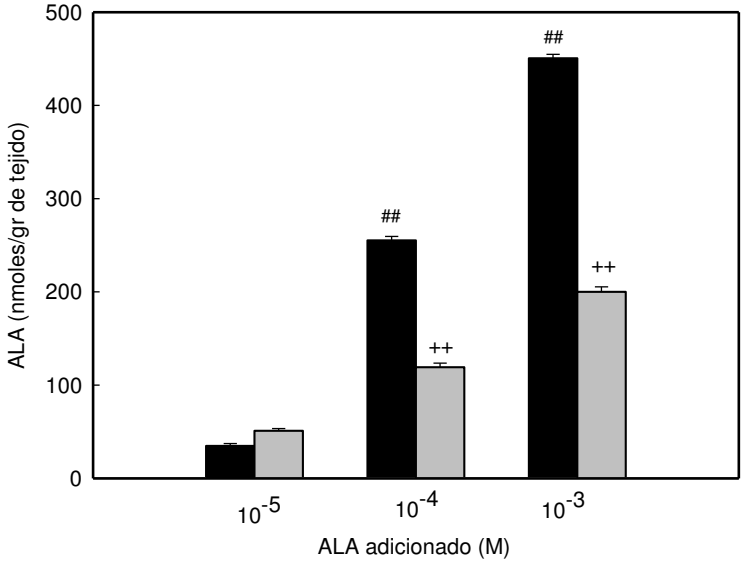


Figura IV.1: Captación de ALA por micelio y levadura de *Mucor rouxii .*

(■) micelio, (□) levadura. Se agregaron cantidades variables de ALA al medio de cultivo. ALA incorporado (nmoles) = nmoles ALA + 2 (nmoles PBG) + 8 (nmoles P). Los resultados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes. Diferencia significativa respecto a las células que contienen 10^{-5} M ALA en el medio de crecimiento (##) $p<0,01$ y (++) $p<0,01$. Otros detalles experimentales en Métodos.

En micelio para concentraciones de ALA 10^{-4} M y 10^{-3} M, hubo una captación 7,3 y 13,0 veces mayor respectivamente a la observada para ALA 10^{-5} M. Para la levadura los aumentos fueron significativamente menores, obteniéndose incrementos de tan sólo 2,2 y 3,1 veces. Dicha captación a favor del gradiente, se sabe que es una difusión facilitada, que en nuestro caso no habría alcanzado la saturación con las concentraciones de ALA ensayadas.

Conjuntamente con la captación de ALA se observa que sólo entre un 12,7–17,3% de este compuesto se acumula como tal (Figura IV.2), el resto se metaboliza a PBG y porfirinas. En micelio, para una concentración de ALA 10^{-5} M, todo el ALA captado se convirtió en porfirinas, sin acumulación de precursores. Para mayores concentraciones de ALA, se acumularon no sólo porfirinas sino también cantidades significativas de ALA y PBG. Para la levadura, el comportamiento fue diferente ya que a concentraciones de ALA entre 10^{-5} M y 10^{-4} M, se observó una acumulación significativa de PBG, de porfirinas sólo a 10^{-3} M mientras que no se evidenció acumulación de ALA. En este caso podríamos pensar que el ALA-D estaría funcionando de forma tal de regular la concentración de ALA intracelular, evitando los efectos citotóxicos derivados de su acumulación. Cuando la concentración de ALA fue de 10^{-3} M, se encontró acumulación significativa de ALA, PBG y porfirinas.

Para las mismas condiciones experimentales se evaluó también la actividad de ALA-D (Figura IV.3). Los valores de actividad enzimática obtenidos *in vitro* (Figura IV.3 a) en los extractos crudos y medida a concentraciones saturantes de sustrato, nos permiten concluir que el agregado de ALA al medio de cultivo no altera la cantidad de enzima presente en el tejido, ya sea micelio o levadura. Los niveles de actividad hallados intracelularmente (Figura IV.3 b) muestran una enzima no saturada, con variaciones significativamente mayores de la actividad en función de las concentraciones de ALA agregado al medio para el micelio que para la levadura.

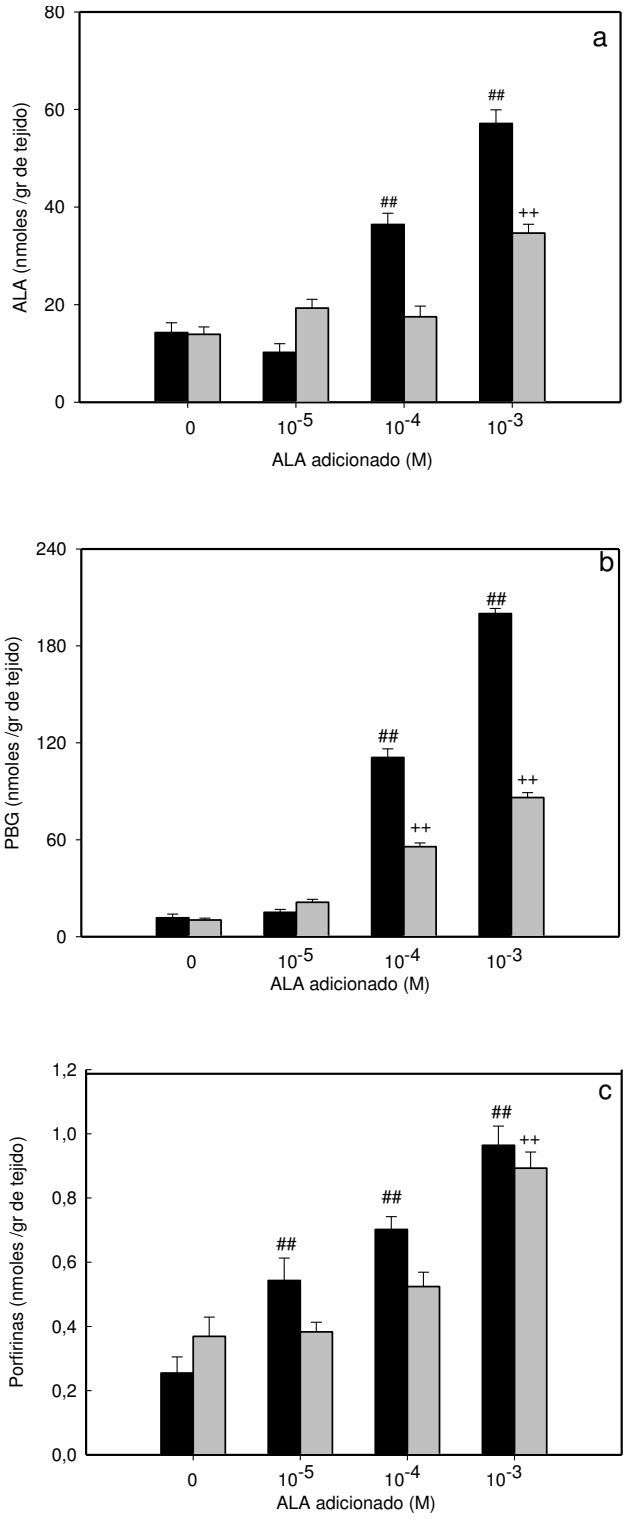


Figura IV.2: Acumulación de ALA (a), PBG (b) y porfirinas (c) por micelio y levadura de *Mucor rouxii*. (■) micelio, (□) levadura.

Se agregaron cantidades variables de ALA al medio de cultivo. Los resultados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes. Diferencia significativa respecto al control correspondiente (##) $p<0,01$ y (++) $p<0,01$. Otros detalles experimentales en Métodos.

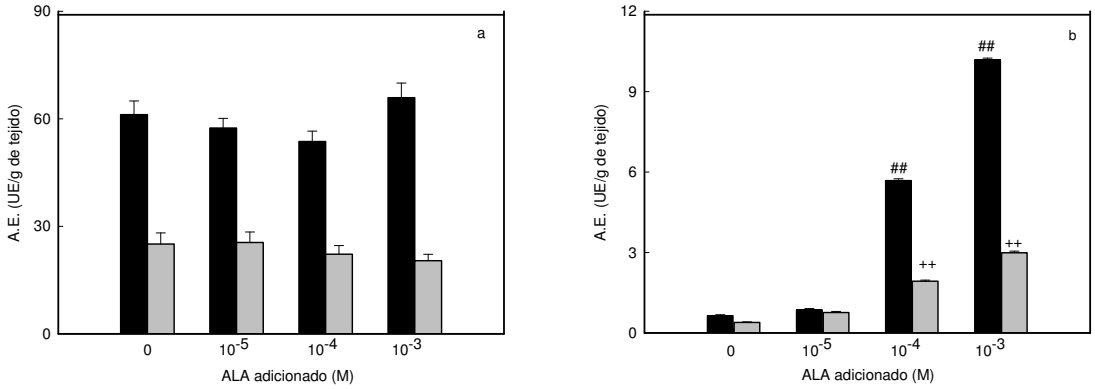


Figura IV.3: Actividad de ALA-D:(a) en extractos libres de células (b) intracelular en micelio y levadura de *Mucor rouxii*. (■) micelio, (▭) levadura.

Se agregaron cantidades variables de ALA al medio de cultivo. La A.E. se calculó: a) a partir de los extractos libres de células; b) utilizando la ecuación U.E= 2 (nmoles PBG) + 8 (nmoles P), donde los nmoles de PBG y de porfirinas se cuantificaron intracelularmente para cada cultivo. Los resultados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes. Diferencia significativa respecto al control correspondiente (##) $p<0,01$ y (++) $p<0,01$. Otros detalles experimentales en Métodos.

IV.2 BIOSÍNTESIS DEL HEMO DURANTE LA TRANSICIÓN DE LEVADURA A MICELIO EN *Mucor rouxii.* EFECTO DEL AGREGADO DE ALA

Caracterizada la respuesta del micelio y la levadura frente a cambios en el metabolismo de las porfirinas, inducidos por el agregado de ALA, se investigaron los mismos parámetros evaluados antes, al inducirse la transformación de levadura a micelio por aireación. Se analizaron tres situaciones experimentales diferentes:

a) Cultivo control: se repican esporas para que se desarrollen como levadura durante 30 horas en anaerobiosis, luego por aireación de los cultivos (tiempo 0) se indujo la morfogénesis durante 24 horas
b) Cultivo 1: desde el momento en que se repican las esporas se agregó al medio ALA $5x10^{-4}$ M; luego se procedió igual que lo descripto para el control
c) Cultivo 2: el ALA fue agregado cuando empieza la aireación (tiempo 0) y se extiende el crecimiento igual que en los casos anteriores por 24 horas.

Cabe aclarar que en los tres cultivos, al finalizar la incubación en aerobiosis se observaba una transformación total de levadura a micelio. Esta transición, manifestada como la aparición de los primeros tubos germinativos en las células levaduriformes, ocurrió en forma sincronizada a partir de las 4 horas de aireación.

La observación al microscopio a tiempo 0 mostró un 100% de células en forma de levadura, redondeadas y algunas en división; a las 2 horas dichas células se vieron alargadas y formando cadenas mientras que a las 4 horas comenzaron a emerger los tubos germinativos. A las 6 horas había una gran proporción de hifas mientras que a las 24 hs el tejido era únicamente micelio.

En la Figura IV.4 se observa como varió en cada cultivo, la acumulación de ALA, PBG y porfirinas durante la transición. La Figura IV.5 completa el estudio mostrando como variaron los niveles de actividad de ALA-D.

El cultivo control puso de manifiesto un camino biosintético del hemo eficientemente regulado. Si bien no se acumularon ni precursores ni porfirinas, el incremento en la actividad del ALA-D, desde la aireación, indicó una correlación entre la biosíntesis de porfirinas y la morfogénesis inducida por aireación.

En el caso del cultivo 1, el agregado de ALA desde la siembra de las esporas produjo una gran acumulación de este metabolito que permaneció constante a partir de las 2 horas de la aireación, mientras que la disminución en la acumulación de PBG se correlacionó con el aumento en el contenido de porfirinas a partir de la cuarta hora de transferencia a la atmósfera aeróbica. En respuesta al agregado de ALA, la actividad de la enzima se encontró elevada desde el tiempo 0 metabolizando el ALA a PBG, que fue eficientemente convertido a porfirinas.

En el cultivo 2 se observó una acumulación de ALA significativa a las 2 horas posteriores de haberlo agregado al medio conjuntamente con la transferencia de las células a condiciones de crecimiento aeróbico. Nuevamente se observó que en respuesta a la aireación se produjo un aumento en la actividad de la enzima. Luego del aumento hallado por incorporación del ALA exógeno, el precursor se mantuvo sin cambios significativos. Después del incremento inicial ni el PBG ni las porfirinas variaron sus niveles. El ALA acumulado fue metabolizado eficientemente a PBG merced a la mayor actividad de la enzima que se produce paralelamente con la aireación, mientras que el PBG siguió el camino hasta porfirinas manteniéndose en niveles comparables hasta las 24 horas. El contenido de porfirinas en este cultivo fue del mismo órden, hasta las 4 horas de aireación, que el observado en el cultivo 1 y, a diferencia de éste último, se mantuvo sin cambios hasta las 24 horas de crecimiento.

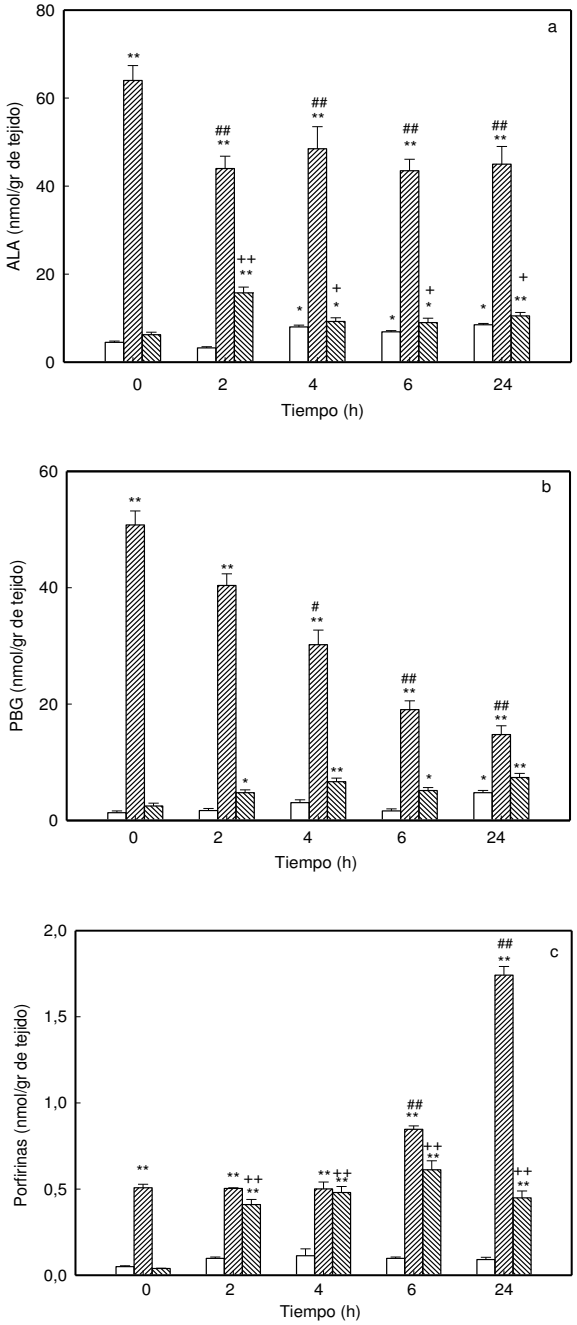


Figura IV.4: Acumulación de ALA (a), PBG (b) y porfirinas (c) durante la transformación de levadura a micelio.
(▭) Cultivo control: sin agregado de ALA. (▨) Cultivo 1: (▧) Cultivo 2: ALA $5x10^{-4}$ M desde la transferencia a aerobiosis. Los resultados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes. Diferencia significativa respecto al cultivo control a tiempo cero: (*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$; diferencia significativa del cultivo 1 respecto al cultivo 1 a tiempo cero: (#) $p<0,05$ (##) $p<0,01$ y diferencia significativa del cultivo 2 respecto al cultivo 2 a tiempo cero: (+) $p<0,05$ (++) $p<0,01$. Otros detalles experimentales en Métodos.

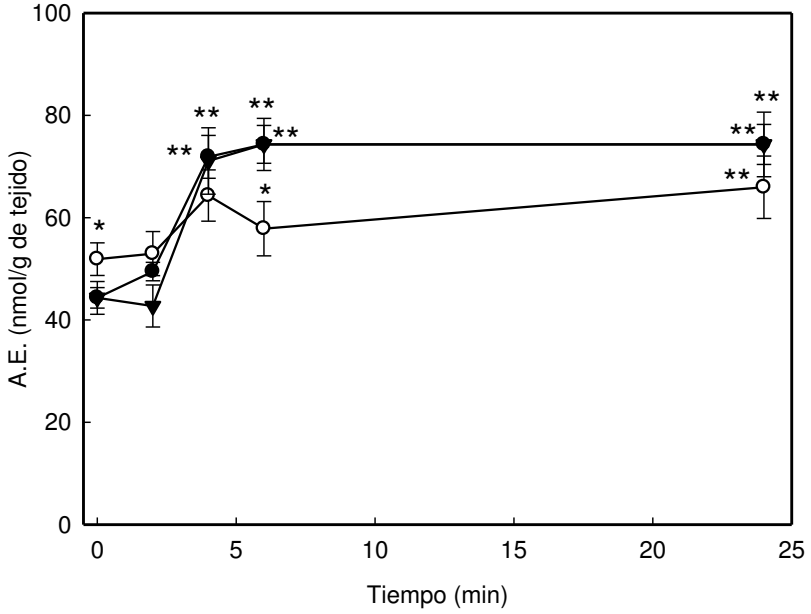


Figura IV.5: Actividad de ALA-D durante la transformación de levadura a micelio.
(●) Cultivo control: sin agregado de ALA: (○) cultivo 1:ALA 5 x10^{-4} M desde la siembra de esporas. (▼) cultivo 2: ALA 5x10^{-4} M desde la transferencia a aerobiosis. Los resultados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes Diferencia significativa respecto al cultivo control a tiempo cero: (*) $p<0,05$ y (**) $p<0,01$. Otros detalles experimentales en Métodos.

La actividad de ALA-D mostró una variación de entre 1,7-1,9 veces de incremento a lo largo de la transición de levadura a hifas, tanto en el cultivo control como en el cultivo 2. Para el cultivo 1 este aumento fue sólo de hasta 1,2 veces, mostrando una menor variación en los valores de actividad a lo largo de toda la transformación. En los 3 cultivos el cambio en la actividad de la enzima comenzó a manifestarse luego de la segunda hora de exposición al oxígeno y alcanzó su valor máximo cuando comenzaron a emerger los tubos germinativos, manteniéndose dentro de los mismos valores hasta las 24 hs en atmósfera aeróbica, donde el tejido estaba compuesto únicamente por hifas.

En concordancia a lo observado al comparar micelio y levadura, la actividad de esta enzima durante la morfogénesis parecería estar regulando los niveles de ALA, convirtiendólo a PBG que mayoritariamente se metabolizó a porfirinas. Este comportamiento estaría indirectamente poniendo de manifiesto las propiedades

regulatorias del ALA-D, que responde a las variaciones en las condiciones de crecimiento mediante cambios en su actividad.

IV.3 CONCLUSIONES

- En ambas formas, micelio y levadura, *Mucor rouxii* presenta un camino metabólico del hemo funcional, que puede ser inducido por concentraciones de ALA 10^{-5} – 10^{-3} M presentes en el medio de cultivo.
- La captación de ALA, acumulación de precursores y porfirinas y la actividad de ALA-D resultó ser significativamente mayor para micelio que para levadura. En el caso del micelio, el crecimiento en condiciones aeróbicas requeriría de mayor contenido de hemoproteínas, fundamentalmente citocromos, y de esta forma se justificaría la presencia de un camino biosintético para las porfirinas más activo en micelio que en levadura.
- Los valores más bajos de actividad de ALA-D en levadura que en micelio, incluso ambos muy inferiores a los de esta enzima en otros tejidos (Tabla IV.1), sumado a su capacidad de regular la concentración de ALA acumulado intracelularmente, sugieren un rol regulatorio para esta enzima en levadura.
- Durante la transición de levadura a micelio, que ocurre como respuesta a la transferencia a una atmósfera aeróbica, se observó un camino del hemo eficientemente regulado.
- Para el cultivo 1, que en el momento de transferir las células a la atmósfera aeróbica tuvo una actividad de ALA-D 30% superior al valor inicial de los cultivos control y 2, mostró menor variación de su actividad durante el cambio dimórfico y metabolizó el ALA exógeno incorporado muy eficientemente; el PBG sintetizado durante el crecimiento levaduriforme fue convertido de manera sincronizada a porfirinas. En el caso del cultivo 2 tuvo una menor acumulación de precursores y porfirinas en relación al cultivo 1, y una variación en la actividad de ALA-D del mismo órden que en el cultivo control. Este cambio en la actividad de la enzima fue consistente con que los niveles de ALA, PBG y porfirinas acumulados *in vivo* se mantuvieron sin cambios a través de toda la transformación dimórfica, de manera análoga a lo encontrado en el cultivo control, pero en valores absolutos

superiores debido a la incorporación inicial de ALA, que se metaboliza y, luego del incremento inicial, se mantiene regulado.

- El aumento en la actividad de ALA-D a partir de la aireación de levaduras, indicó una correlación entre la biosíntesis de porfirinas y la morfogénesis. Su capacidad de regular los niveles de ALA, que se convierte a PBG y luego éste en su mayoría a porfirinas en respuesta a variaciones en las condiciones de crecimiento, es consistente con un rol regulatorio del metabolismo del hemo en este microorganismo.

IV.4 REFERENCIAS

Araujo, L.S.; Lombardo, M.E. & Batlle A.M.(1998) ."Regulatory role of ALA-S and ALA-D in a haem-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*". Cell Mol Biol **44** 591-595.

Borralho, L.M.; Panek, A.D.; Malamud, D.R.; Sanders, H.K. & Mattoon, J.R.(1983)" In situ assay for 5-aminolevulinate dehydratase and application to the study of a catabolite repression-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant".J Bacteriol. **156** 141-147.

Carvajal, E., Panek A.D. & Mattoon, J.R. (1990) "Isolation and characterization of a new mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with altered synthesis of 5-aminolevulinic acid".**172** 2855-2861**.**

Chandrika, S.R. & Padmanaban, G.;. (1980) "Purification, properties and synthesis of delta-aminolaevulinate dehydratase from *Neurospora crassa*". Biochem J.;**191** 29-36.

Correa García, S.; Bermúdez Moretti, M.; Cardalda, C.;Rossetti, M.V. & Batlle A.M (1993) "The role of ALA-S and ALA-D in regulating porphyrin biosynthesis in a normal and a HEM R+ mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*". Yeast.;**9** 165-173.

Jarayaman, J.; Padmanaban, G.; Malathi, K.; & Sarma P. (1971) "Heme biosynthesis during mitocondriogenesis in yeast". Biochem. J. **121** 531-535

Sanders, P.; Mied, H.; Bruquet, M.; Hernández, H.; Rodríguez, H.; Goetal, P. &-Mattoon, J. (1973) "Regulation of mitocondrial biogenesis: yeast mutants deficient in the synthesis of δ-aminolevulinic acid". J. Molec. Biol**. 80** 17-39.

Paveto, C.; Passeron, S., Stella, A. & Batlle, A. (1989) "Regulatory rol of δ-aminolevulic acid dehydratase in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*" Comp. Biochem. Physiol **94** 635-639.

Stella, A.M; Wider de Xifra, E.& Batlle, A.M. (1997) " Porphyrin biosynthesis. Immobilized enzymes. IV. Studies on aminolaevulate dehydratase attached to Sepharose". Mol Cell Biochem. **16** 97-104.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

- Se aisló y purificó por primera vez el ALA-D en un organismo dimórfico, caracterizando la enzima de micelio y levadura.
- Se estableció el sistema estándar de incubación para la enzima de las dos formas de *Mucor rouxii*: micelio y levadura.
- En ambas formas mórficas, ALA-D manifiesta propiedades similares a las encontradas en otras fuentes, tales como:
- Es termoestable, característica para el ALA-D que posee Zn^{++} en su estructura.
- Presenta *in vitro* una máxima actividad en presencia de reactivos protectores de grupos -SH, perdiendo aproximadamente un 20% de su actividad en ausencia de los mismos. Este hecho da cuenta de la naturaleza sulfhidrílica del ALA-D en este organismo.
- La cinética respecto del sustrato ALA es michaeliana. Los valores de Km fueron 0,143 mM en micelio y 0,230 mM en levadura y están dentro del órden del hallado en otras fuentes.
- La inhibición competitiva producida por el ácido levulínico es consistente por tratarse de una molécula estructuralmente similar al sustrato de esta enzima
- Mediante cromatografía por tamices moleculares en Sephacryl S-300, se determinó un peso molecular de 282±25 kDa para micelio y 260±20 kDa, en levadura, en concordancia con el encontrado para esta enzima en otros organismos
- De la fuerte interacción hallada con la columna de Phenyl-Sepharose, se puede inferir que la enzima de *Mucor rouxii* presenta una gran cantidad de grupos hidrofóbicos.
- De acuerdo a su comportamiento frente a la columna de intercambio iónico Q-Sepharosa, se infiere que su pI es inferior a 7,4
- Utilizando el mismo esquema de purificación, el rendimiento fue similar para la enzima de micelio y levadura, pero con un grado de purificación levemente menor para la enzima de levadura.

- Los inhibidores tiólicos afectaron en forma similar a la enzima de ambas fuentes, en una manera concentración dependiente, pero en general fue más sensible la enzima de levadura. La pérdida de actividad encontrada se relaciona con el bloqueo de grupos sulfhidrilos indispensables para la catálisis.
- Los bloqueantes de puentes disulfuros NaCN y TU produjeron una fuerte inhibición, concentración dependiente, de mayor grado en la enzima proveniente de levadura. La presencia de estas uniones disulfuro demuestra ser esencial para que el proceso catalítico sea óptimo.
- La interacción de esta enzima con el soporte de Tiopropyl-Sepharose 6B, tiene lugar a través de los residuos sulfhidrílcos reducidos y suficientemente expuestos La determinación de sólo el 50% de actividad catalítica en la enzima inmovilizada, está indicando que parte de los grupos que intervienen en la interacción con la matriz son necesarios para la catálisis y que hay residuos no expuestos, que no interactúan, pero son necesarios para la reacción catalítica.
- Los agentes quelantes de cationes divalentes: AS, DP, o-Fe, tuvieron efectos inhibitorios, los cuales, en algunos casos, se pudieronfueron prevenir o revertir manteniendo los grupos sulfhidrilos en su forma reducida.
- La titulación de los grupos sulfhidrilos permitió detectar 4 residuos sulfhidrílicos/subunidad altamente reactivos. El tratamiento con SDS permitió detectar un quinto grupo tiólico. Por exposición de las preparaciones enzimáticas al oxígeno, se pierden dos grupos sulfhidrilos en la proteína proveniente de micelio y levadura, que corresponden a residuos altamente reactivos. El grupo sulfhidrilo que no está expuesto permanece inalterado. La determinación de la actividad de la enzima, realizada paralelamente a la titulación, mostró que no hubo cambios significativos en sus niveles, lo que indica que esos residuos oxidados no son esenciales para la catálisis.
- La pérdida de actividad por el tratamiento con DEP, la reversión de la misma por hidroxilamina, así como la dependencia de ésta con el pH avalan la existencia de una histidina esencial para la actividad enzimática

- Otros aminoácidos con residuos nucleofílicos, tales como tirosina, serina, lisina y grupos sulfhidrilos no están involucrados en la reacción con DEP en las condiciones experimentales del ensayo.
- El Zn^{++} no presenta, en estas condiciones experimentales, un rol protector de la acción del DEP sobre la actividad de la enzima, lo que sugiere que no estaría interactuando con la histidina crítica en la reacción catalítica.
- Los resultados de los estudios de cationes divalentes sobre la actividad del ALA-D de *Mucor rouxii* indican que el metal involucrado en la estructura de esta enzima es el Zn^{++}. Se demostró la existencia de por lo menos 3 tipos distintos de sitios de interacción, en concordancia con lo que postulan otros autores a este respecto: un sitio A, donde el metal se encuentra fuertemente unido, un sitio B, del que el catión puede eliminarse por diálisis y ser parcialmente reemplazado por otros cationes y sitios C, donde el Zn^{++} intervendría cuando la enzima se encuentra en un medio no reductor.
- La notable inhibición causada por Pb^{++} en la actividad de ALA-D pone en evidencia, aún en este microorganismo, la conocida sensibilidad de la enzima a este tóxico ambiental. Los resultados indican que este catión puede unirse a todos los sitios en que lo hace el Zn^{++}, coincidiendo con lo hallado por otros autores para la enzima en humanos
- En los estudios realizados modificando las condiciones de crecimiento en ambas formas de *Mucor rouxii*, levadura y micelio, se observó que el camino metabólico del hemo es funcional y se puede inducir por concentraciones de ALA 10^{-5}–10^{-3}M adicionadas al medio de cultivo.
- La captación de ALA, acumulación de precursores y porfirinas y la actividad de ALA-D fue significativamente mayor para micelio. Este hallazgo se asocia al crecimiento en condiciones aeróbicas donde se requiere de un mayor contenido de hemoproteínas, fundamentalmente citocromos. De esta forma se encuentra un camino biosintético para las porfirinas más activo en micelio que en levadura.
- Los niveles de actividad de ALA-D en levadura fueron inferiores que en micelio, demostrándose así su capacidad de regular la concentración de ALA acumulado intracelularmente.

- Durante la transformación dimórfica, inducida mediante aireación del cultivo de levadura, el camino biosintético del hemo está eficientemente regulado. Así el aumento en la actividad de ALA-D en respuesta a la mayor demanda de compuestos tetrapirrólicos y concomitante con el desarrollo de las hifas, no causa una acumulación significativa. ni de precursores ni de porfirinas.
- Se comprobó que el ALA-D en *Mucor rouxii* manifiesta cambios en su actividad que dependen de la morfología del microorganismo y de variaciones en las condiciones de crecimiento. De esta forma esta enzima constituye un parámetro bioquímico válido para correlacionar la transición dimórfica.
- Los resultados hallados en este trabajo permiten asignarle un rol regulatorio al ALA-D de la forma levaduriforme de *Mucor rouxii*.