

Tesis de Posgrado

Saccharomyces cerevisiae : biosíntesis de tetrapirroles en una cepa salvaje y su mutante hemo deficiente

Araujo, Lidia Susana

1992

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

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

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

Cita tipo APA:

Araujo, Lidia Susana. (1992). Saccharomyces cerevisiae : biosíntesis de tetrapirroles en una cepa salvaje y su mutante hemo deficiente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2546_Araujo.pdf

Cita tipo Chicago:

Araujo, Lidia Susana. "Saccharomyces cerevisiae : biosíntesis de tetrapirroles en una cepa salvaje y su mutante hemo deficiente". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2546_Araujo.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

SACCHAROMYCES CEREVISIAE:
BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES EN
UNA CEPA SALVAJE Y SU MUTANTE HEMO DEFICIENTE

por:

LIDIA SUSANA ARAUJO

DIRECTOR: Dra. María Victoria Rossetti

CONSEJERO: Dr. Julio Azcurra

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

Tesis presentada para optar al título de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1992

Tesis.
2546
ej 2.

a mi hermana

a Elisa

INDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	
ABREVIATURAS	
INTRODUCCION	1
- CAPITULO I: PORFIRINAS: PROPIEDADES CARACTERISTICAS Y ORIGEN BIOSINTETICO.	4
I.1. Descripción estructural y propiedades.	5
I.2. Enzimas e intermediarios del camino biosinté- tico de las porfirinas.	8
I.3. Origen biosintético de distintas porfirinas e interés bilógico.	35
- CAPITULO II: REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PORFI- RINAS.	46
II.1. Mecanismos de control en la mayoría de los tejidos.	47
II.2. Aspectos regulatorios de la biosíntesis de hemo-proteínas en <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .	52
- CAPITULO III: ALTERACIONES EN EL CAMINO METABOLICO DEL HEMO: PORFIRIAS HUMANAS Y EXPERI- MENTALES.	56
III.1. Porfirias humanas. Descripción, clasifica- ción y naturaleza enzimopatológica.	57
III.2. Porfirias experimentales.	60

	Página
- CAPITULO IV: OBJETIVO Y FUENTE EXPERIMENTAL EMPLEADA.	65
IV.1. Objetivos.	66
IV.2 Fuente experimental empleada: <u>S.cerevisiae</u> .	67
 MATERIALES Y METODOS	 80
- CAPITULO V: MATERIALES Y METODOS.	80
V.1. Materiales.	81
V.2. Métodos.	82
 RESULTADOS Y DISCUSION	 91
- CAPITULO VI: ASPECTOS MAS SALIENTES DE LAS CEPAS D273-10B Y B231 DE <u>SACCHAROMYCES</u> <u>CEREVISIAE</u> .	 91
VI.1. Variación de la densidad celular con el tiempo de crecimiento	92
VI.2. Acumulación y síntesis de precursores y porfirinas.	93
VI.3. Actividad de Porfobilinogenasa y Decarboxilasa en ambas cepas de <u>S. cerevisiae</u>	99
VI.4. Conclusiones parciales.	100
- CAPITULO VII: PORFOBILINOGENASA: PROPIEDADES DE LA ENZIMA DE AMBAS CEPAS DE <u>SACCHAROMYCES</u> <u>CEREVISIAE</u> .	 102
VII.1. Determinación de las condiciones óptimas para la medición de actividad.	103
VII.2. Caracterización de la Porfobilinogenasa.	112
VII.3. Conclusiones parciales.	140
- CAPITULO VIII: CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA CEPA B231. PROBABLE MODELO DE PORFIRIA EXPERIMENTAL.	 144
VIII.1. Actividad del ALA-Sintetasa.	145
VIII.2. Actividad del ALA-Dehidrasa.	146

	Página
VIII.3. Caracterización bioquímica.	149
VIII.4. Algunos aspectos acerca de la regulación del camino metabólico del hemo en levaduras.	152
VIII.5. Cepa B231 como modelo de porfiria experimental.	154
VIII.6. Conclusiones parciales.	155
- CAPITULO IX: CONCLUSIONES FINALES.	156
- CAPITULO X: REFERENCIAS.	160

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco a la Dra. Alcira Batlle por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por iniciarme en el campo de la investigación y por el constante apoyo que me brindó durante todos estos años.
- Agradezco a la Dra. María Victoria Rossetti por haber aceptado ser mi Directora, por haberme guiado en la realización de este trabajo, demostrándome constantemente que podía contar con todo su apoyo intelectual y científico, como así también con su afecto, su comprensión y su cariño.
- Agradezco al Dr. Julio Azcurra por haber aceptado ser mi Consejero de Estudios y por el estímulo que de él recibí a lo largo de este trabajo.
- Agradezco a la Dra. María Elisa Lombardo por haber participado en la realización de gran parte de este trabajo, discusión y presentación de los resultados. Fuera del ámbito profesional no encuentro palabras para expresar mi gratitud hacia su franca e invaluable amistad.
- Agradezco a todos mis compañeros del CIPYP, con quienes compartí momentos de alegría durante todos estos largos y difíciles años. Deseo enfatizar mi reconocimiento al apoyo constante que me brindaron la Dra. Ana María Stella, Dra. Victoria Parera y Lic. Viviana Melito, así como también a la Dra. Susana Afonso por participar en la medición de la Uro-D, además de haber estado siempre dispuesta a brindarme su ayuda, desinteresadamente.
- Fuera del ámbito profesional, agradezco a mi hermana por el empeño que puso en el tipeado y la realización de los dibujos de este trabajo, así como también a su incansable dedicación, su constante apoyo, a su tolerancia y a su ayuda incondicional, demostrando a través de sus actos todo el cariño que siente por mí.
- Agradezco a mis familiares por haber esperado pacientemente la concreción de este trabajo y a Carlos por brindarme todo su estímulo y comprensión.
- Agradezco al Dr. James Mattoon por haberme cedido gentilmente las cepas de S. cerevisiae con las que lleve a cabo este trabajo, como así también por el interés demostrado a lo largo de la evolución del mismo.
- Agradezco a la Universidad de Buenos Aires, al CONICET, a la SUBCYT, a la Secretaria de Salud Pública del Ministerio de Bienestar Social, al Banco de la Nación Argentina y al Banco de Galicia y Buenos Aires, por los subsidios otorgados.

ABREVIATURAS

ALA-S	5-Aminolevúlico Sintetasa
DOVA-T	4,5-Dioxoalérico Transaminasa
ALA-D	5-Aminolevúlico Dehidrasa
PBG-Deaminasa	Porfobilinógeno-Deaminasa
PBGasa	Porfobilinogenasa
Uro-D	Uroporfirinógeno Decarboxilasa
Coprogenasa	Coproporfirinogenasa
PTG-ox	Protoporfirinógeno Oxidasa
Hemo-S	Hemo Sintetasa
ALA	Acido 5-aminolevúlico
DOVA	Acido 4,5-dioxoalérico
PBG	Porfobilinógeno
Urogen	Uroporfirinógeno
Coprogen	Coproporfirinógeno
Protogen	Protoporfirinógeno
Proto	Protoporfirina
PCE	Porfiria Congénita Eritropoyética
PPE	Protoporfiria Eritropoyética
CPE	Coproporfiria Eritropoyética
PAI	Porfiria Aguda Intermitente
PV	Porfiria Variegata o Mixta
CPH	Coproporfiria Hereditaria
HP	Hardero Porfiria
NPA	Nueva Porfiria Aguda
PCT	Porfiria Cutanea Tarda
PHE	Porfiria Hepatoeritropoyética
TCA	Acido Tricloroacético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

I N T R O D U C C I O N

Comparando la estructura de compuestos tales como el hemo, las clorofilas, los citocromos podremos observar la gran semejanza que existe entre ellos (Figura 1). Todos tienen en común un núcleo tetrapirrólico cíclico que corresponde a la unidad constitutiva básica de una serie de compuestos conocidos con el nombre de porfirinas.

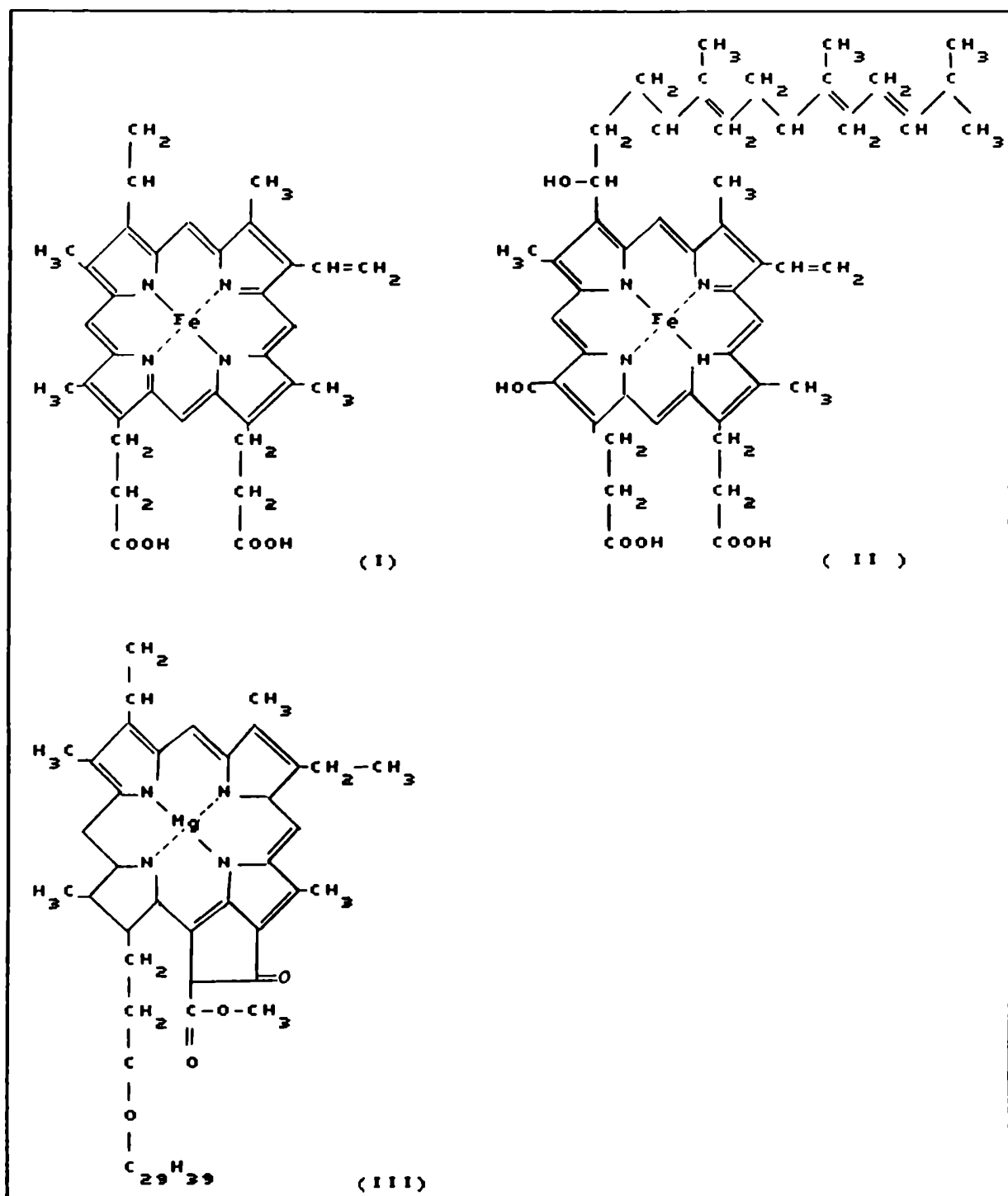


Figura 1: Estructuras del hemo (I), grupo prostético del citocromo aa_3 (II) y clorofila a (III)

La importancia de la existencia de porfirinas en la naturaleza se debe a que estos pigmentos llevan a cabo diversas funciones biológicas vitales (Tabla 1).

TABLA 1: Clasificación de las porfirinas de acuerdo a su función biológica.

Tipos	Ejemplos	Función y localización
Proteínas transportadoras	Hemoglobina Mioglobina Citocromos	<ul style="list-style-type: none"> - Transporta el oxígeno en la sangre de los vertebrados. - transporta y almacena oxígeno en el músculo. - Transporte de electrones, se encuentran sólo en las células aeróbicas.
Pigmentos fotosintéticos	Clorofilas Bacterioclorofilas	<ul style="list-style-type: none"> - Captan la energía solar en plantas superiores y algas. - Captan la energía solar en bacterias.
Enzimas	Triptofano-oxigenasa Catalasa Peroxidasa	<ul style="list-style-type: none"> - Cataliza una etapa de la degradación oxidativa del triptofano: $\text{Triptofano} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{N-formil quinurenina}$ - Catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno: $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ - Catalizan la oxidación de toda una serie de compuestos (ac.grasos, fenoles, indoles, aminas) por peróxido de hidrógeno. $\text{AH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{A} + 2\text{H}_2\text{O}$
Cofactores	Vitamina B ₁₂	<ul style="list-style-type: none"> - Es esencial para el desarrollo y normal maduración de los eritrocitos.

Las porfirinas pueden biosintetizarse por prácticamente todas las células. Sólo unos pocos microorganismos, tales como las bacterias del género Hemophilus y un número de protozoos parásitos de la sangre, no pueden sintetizar el anillo porfirínico por sí

mismos, requiriendo el agregado de hemo o un derivado del mismo, para su crecimiento (1). Según estudios realizados sobre el origen y evolución de la vida (2), se considera como paso clave la formación de un primer compuesto con estructura porfirínica relacionado muy probablemente con los citocromos, esto habría conducido al desarrollo de una partícula transportadora de electrones, capaz de realizar la fosforización oxidativa, permitiendo así el empleo de fuentes de energía no utilizables por fosforización a nivel de sustrato.

Una vez formadas las hierro-porfirinas (citocromos), el paso siguiente podría haber sido la sustitución del hierro por el magnesio produciendo clorofila. Pudo entonces haberse dado una gran explosión de vida como consecuencia de la transformación de enormes cantidades de energía solar en energía química y la evolución de oxígeno merced al proceso de fotosíntesis, ocasionando efectos profundos en los acontecimientos evolutivos posteriores.

Dada la función biológica vital que desempeñan las porfirinas (Tabla 1), cualquier trastorno o desorden, ya sea hereditario o adquirido que se observe en el metabolismo de las mismas, da origen a un grupo de enfermedades denominadas porfirias.

Refiriéndonos específicamente a las porfirinas, a continuación describiremos sus propiedades características y origen biosintético (Capítulo I), los mecanismos de control que actúan sobre su formación (Capítulo II), cómo se originan las porfirias o alteraciones del camino metabólico del hemo (Capítulo III), y por último estableceremos los objetivos de este trabajo y daremos una breve reseña de los aspectos más salientes de la fuente experimental empleada (Capítulo IV).

CAPITULO IPORFIRINAS: PROPIEDADES CARACTERISTICAS Y ORIGEN BIOSINTETICO

	Página
I.1 Descripción estructural y propiedades.	5
I.2 Enzimas e intermediarios del camino biosintético de las porfirinas.	8
I.2.1. Biosíntesis del ALA: 5-aminolevúlico sintetasa (ALA-S) y 4,5-dioxovalérico transaminasa (DOVA-T).	10
I.2.2. Formación de PBG: 5-aminolevúlico dehidrasa (ALA-D).	18
I.2.3. Obtención de uroporfirinógenos: Porfobilinógeno Deaminasa (PBG-Deaminasa) y Cosintetasa.	22
I.2.4. Decarboxilación de uroporfirinógeno: Uroporfirinógeno decarboxilasa (Uro-D).	26
I.2.5. Síntesis de protoporfirinógeno IX: Coproporfirinogenasa (CPGasa).	29
I.2.6. Oxidación del protogen IX a protoporfirina IX: Protoporfirinógeno oxidasa (PBG-ox).	32
I.2.7. Obtención de hierroprotoporfirina IX: Ferroquelatasa o hemosintetasa.	33
I.3. Origen biosintético de distintas porfirinas de interés biológico.	35

I.1 - Descripción estructural y propiedades.

En la Figura 2 se esquematiza el macrociclo característico de las porfirinas. Los cuatro anillos pirrólicos (A,B,C y D) se unen entre sí a través de puentes meteno (α , β , γ y δ) originando una estructura con dobles enlaces, rígida y plana, que según los sustituyentes laterales que presente en los átomos de carbono numerados del 1 al 8, formará los distintos tipos de porfirinas. (Figura 2).

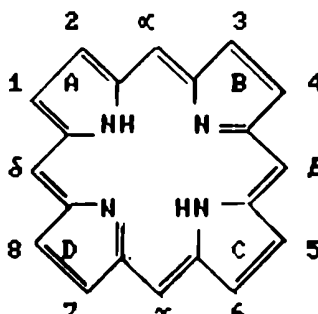
(I)	(II)								
	Porfirinas	Posición							
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Uroporfirina	I	A	P	P	P	A	P	A	P
	II	A	P	P	A	A	P	A	P
	III	A	P	A	P	A	P	P	A
	IV	A	P	P	A	P	A	A	P
Coproporfirina	I	M	P	M	P	M	P	M	P
	III	M	P	M	P	M	P	P	M
Protoporfirina	IX	M	V	M	V	M	P	P	M

Figura 2: Estructura y nomenclatura de las porfirinas.

(I)- Estructura y nomenclatura, según Fisher (3), del macrociclo de las porfirinas.

(II)- Estructura de algunas porfirinas con sus correspondientes isómeros.

A: $-\text{CH}_2\text{COOH}$; P: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$; M: $-\text{CH}_3$; V: $-\text{CH}=\text{CH}_2$

El tipo y número de cadenas laterales determina las propiedades físicas de las porfirinas resultantes. Cuanto mayor es el número de cadenas laterales ácidas mayor es la solubilidad en agua, justificando de esta forma que la uroporfirina (8 carboxilos) se excrete principalmente por orina, la coproporfirina (4 carboxilos) por orina y heces y la protoporfirina (2 carboxilos) solamente por materia fecal.

sólamente por materia fecal.

Dada su estructura, es posible asignar a las porfirinas diferentes isómeros de posición. Para los que poseen sólo dos tipos de grupos sustituyentes, como en la uro y coproporfirina, hay 4 isómeros posibles, de los cuales únicamente dos, el III y el I se encuentran en la naturaleza, siendo el III el intermediario fisiológico, en tanto que el I es patológico (los isómeros II y IV son productos de síntesis química en el laboratorio). En cuanto a los 15 isómeros posibles para la protoporfirina (3 sustituyentes diferentes) en las células, sólo se ha encontrado el IX, proveniente de uro y coproporfirina tipo III.

La estructura altamente conjugada de dobles enlaces alternados que exhiben las porfirinas es responsable de su coloración, del espectro de absorción característico en la región del visible y ultravioleta cercano (Figura 3) y de la intensa fluorescencia roja que emiten al ser irradiados con luz U.V. Estas propiedades son sumamente útiles para su identificación y cuantificación. Todas las porfirinas exhiben un máximo de absorción espectral entre los 350-450 nm, conocida como la banda de Soret, que es la que se emplea para su determinación.

Es interesante señalar que los tetrapirroles de cadena abierta presentan espectros variables y característicos en la región visible, con una intensa absorción, máxima entre 400 a 650 nm según el compuesto; pero a diferencia de los tetrapirroles cíclicos, no poseen la banda de Soret.

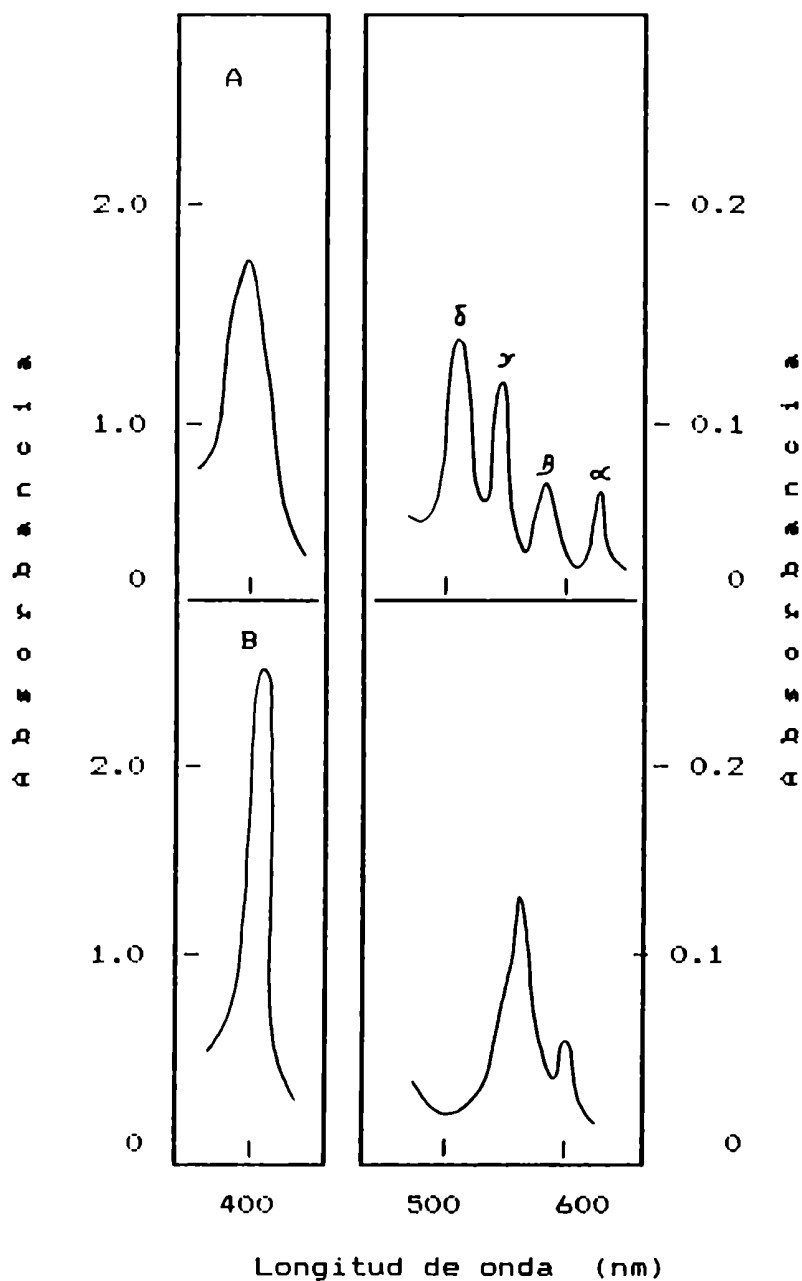


Figura 3: Espectro de absorcion de la protoporfirina IX.

A: Protoporfirina IX dimetiléster en Cl_2CH .

B: protoporfirina IX en HCl 1N.

El espectro de absorción característico de la protoporfirina IX en un solvente orgánico (A) consta de la intensa banda de Soret y cuatro picos más pequeños (α , β , γ y δ) ubicados hacia la zona de mayor longitud de onda. La protoporfirina libre en medio ácido (B) muestra cambios espectrales significativos en esta última zona (500-700 nm).

1.2 - Enzimas e intermediarios del camino biosintético de las porfirinas.

El anillo porfirínico se biosintetiza siguiendo la secuencia de reacciones catalizadas enzimáticamente que se muestran en la Figura 4.

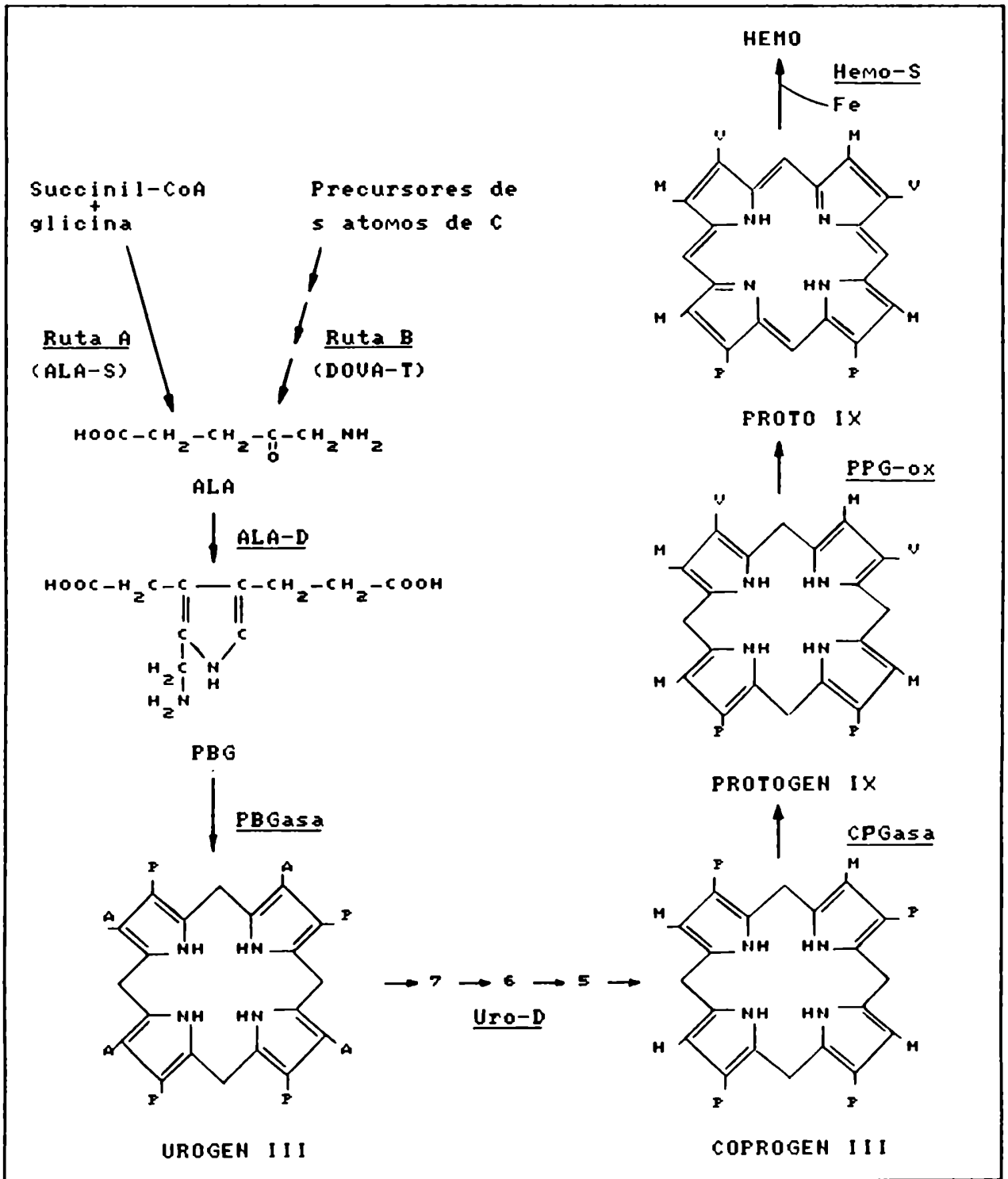


Figura 4: Camino metabólico del hemo.

Estudios efectuados con compuestos radiactivos, provenientes de los laboratorios de Shemin, Rimington, Neuberger y Granick (3), permitieron dilucidar dicha vía, demostrando además que hasta la formación de protoporfirina IX la misma ruta biosintética operaba en todas las formas vivientes, produciéndose luego reacciones específicas dependiendo de cuál fuese el producto final.

Las enzimas involucradas en la biosíntesis del hemo son ocho, la primera y las tres últimas están localizadas en la mitocondria, mientras que las cuatro restantes son citosólicas.

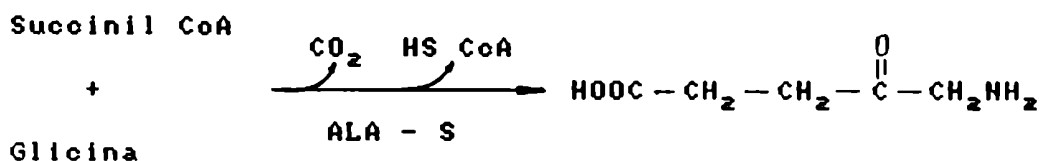
La biosíntesis de porfirinas comienza con la formación del ácido 5-aminolevúlico (ALA) que puede sintetizarse a partir de glicina y succinil Co A, o bien desde precursores de cinco átomos de carbono tales como glutamato, glutamina ó 2-cetoglutanato, a través del ácido 4,5 dioxovalérico (DOVA) como intermediario. Luego dos moléculas de ALA se unen para dar porfobilinógeno (PBG). Por condensación de cuatro moléculas de PBG se forma el uroporfirinógeno (Urogen), pudiéndose obtener los isómeros I y III. Por decarboxilación sucesiva de los cuatro restos acetatos del Urogen, se obtiene el coproporfirinógeno (Coprogen). Mediante decarboxilación oxidativa del Coprogen III, se llega al protoporfirinógeno IX (Proto IX), que por oxidación origina protoporfirina IX (Proto IX). Se ha comprobado que en toda esta secuencia los verdaderos intermediarios son los porfirinógenos los cuales se oxidan fácilmente a porfirinas. La Proto IX y las porfirinas en general se combinan con distintos iones metálicos (hierro, magnesio, zinc, níquel, cobalto, cobre) para formar quelatos tetradentados que darán origen a la gran gama de derivados de las porfirinas.

A continuación describiremos en detalle cada una de las etapas anteriormente citadas.

I.2.1 - Biosíntesis del ALA: 5-aminolevúlico sintetasa (ALA-S)
y 4,5-dioxoalévico transaminasa
(DOVA-T).

El ALA es el primer precursor específico en la biosíntesis de todos los tetrapirroles. Estudios de marcación isotópica demostraron que este compuesto suministra todos los átomos de carbono y nitrógeno necesarios para constituir la estructura tetrapirrólica. En la actualidad se sabe que el ALA puede sintetizarse por dos vías diferentes, ambas catalizadas enzimáticamente, partiendo en un caso de glicina y succinil Co A (Ruta A) y en el otro, de precursores de cinco átomos de carbono tales como glutamato, glutamina o 2-cetoglutarato (Ruta B).

RUTA A :



Esta reacción requiere fosfato de piridoxal como cofactor y la enzima involucrada se denomina 5-aminolevúlico sintetasa (ALA-S). Las primeras evidencias de actividad de esta proteína surgen de mediciones realizadas en bacterias fotosintéticas (4) y eritrocitos de pollo (5). De aquí en más se midió actividad de ALA-S en diversas fuentes de origen animal (6-11), levaduras (12,13), insectos (14) y algas (15-17); sin embargo en tejidos vegetales únicamente pudo detectarse en callos de soya (18) y cáscaras de papas (19).

En general, considerando estudios realizados en Rhodospseudomonas spheroides (20) y en células de animales porfirícos (21,22), se acepta que el ALA-S es la enzima que con

trola la biosíntesis de tetrapirroles, de modo que la cantidad de porfirinas formadas por una célula dada depende de la cantidad y actividad de esta enzima. Otras experiencias demostraron que el ALA-S está sujeta a la mayoría de los mecanismos de control que se conocen, a saber: inducción (23), represión (23,24), inhibición feed back por hemo (25) e inhibición por producto (26) (ver Capítulo II).

Si bien en casi todos los tejidos estudiados el ALA-S se encuentra asociada a la fracción particulada, se puede observar un notable aumento de su actividad en la fracción soluble de hígado y riñón de animales tratados con inductores del ALA-S (27,28), se ha demostrado que la enzima citosólica es una forma inmadura de la proteína en tránsito, desde los polirribosomas libres citoplasmáticos donde se sintetiza, hacia la matriz mitocondrial donde manifiesta su actividad (29-31). Por estudios realizados empleando hígado de rata (32), la enzima se encontraría en el citoplasma formando parte de un agregado (peso molecular 320.000) constituido por: a) una porción catalíticamente activa (110.000) compuesta por dos subunidades idénticas de peso molecular 51.000 y b) dos proteínas inactivas, de 120.000 y 79.000, que actuarían como transportadoras. Estudios inmunológicos (27) y cromatográficos (32) permitieron identificar a la enzima mitocondrial (115 KD) con el dímero catalíticamente activo que formaba parte del agregado citosólico. Posteriormente, mediante el clonado del gen nuclear que codifica para el ALA-S (33-37), se estableció que el precursor citoplasmático contenía de 50 a 60 aminoácidos más de lo que corresponde a la proteína mitocondrial madura (37,38). Dichos aminoácidos se ubican en el

extremo N-terminal de la proteína, dando origen a una pre-secuencia que sería posteriormente clivada por una proteasa localizada en la matriz mitocondrial. La pre-secuencia de naturaleza básica probablemente juegue un rol importante en la interacción del precursor citosólico con algún receptor de la membrana externa de la mitocondria (38).

El ALA-S se caracteriza además por su gran inestabilidad y corta vida media, alrededor de 70 minutos para la enzima mitocondrial de hígado de rata adulta (7), 34 minutos para la de hígado fetal de rata (39) y 160 minutos en hepatocitos de embrión de pollo (23). La vida media del ALA-S citosólica en hígado de rata es de 20 minutos, menor aún que la enzima mitocondrial (40). La vida media corta es una característica importante del ALA-S que posibilita la regulación por inducción o represión de su síntesis.

La baja actividad y concentración de la enzima presente in vivo en condiciones normales dificulta su detección y purificación. El tratamiento previo con inductores del ALA-S tales como 2-alil-2-isopropilacetamida (AIA) ó 1,4-dihidro-3,5- dicarbetoxicolodina (DDC), soluciona en parte este problema. La enzima purificada requiere de la presencia de compuestos sulfhidrúlicos para manifestar su actividad y es además muy específica por sus sustratos. Los valores de la constante de afinidad (Km) para succinil CoA, glicina y fosfato de piridoxal son del orden de 50 a 200 μM , 5 a 20 mM y 1 a 10 μM respectivamente (41).

Por último, en la Figura 5, se esquematiza el mecanismo de acción propuesto para la enzima (42-44). Se parte de la

proteína unida al fosfato de piridoxal mediante el átomo de nitrógeno del anillo pirimidínico y una base de Schiff que se forma entre el aldehído del cofactor y un grupo-ε amino de un residuo lisina de la cadena polipeptídica.

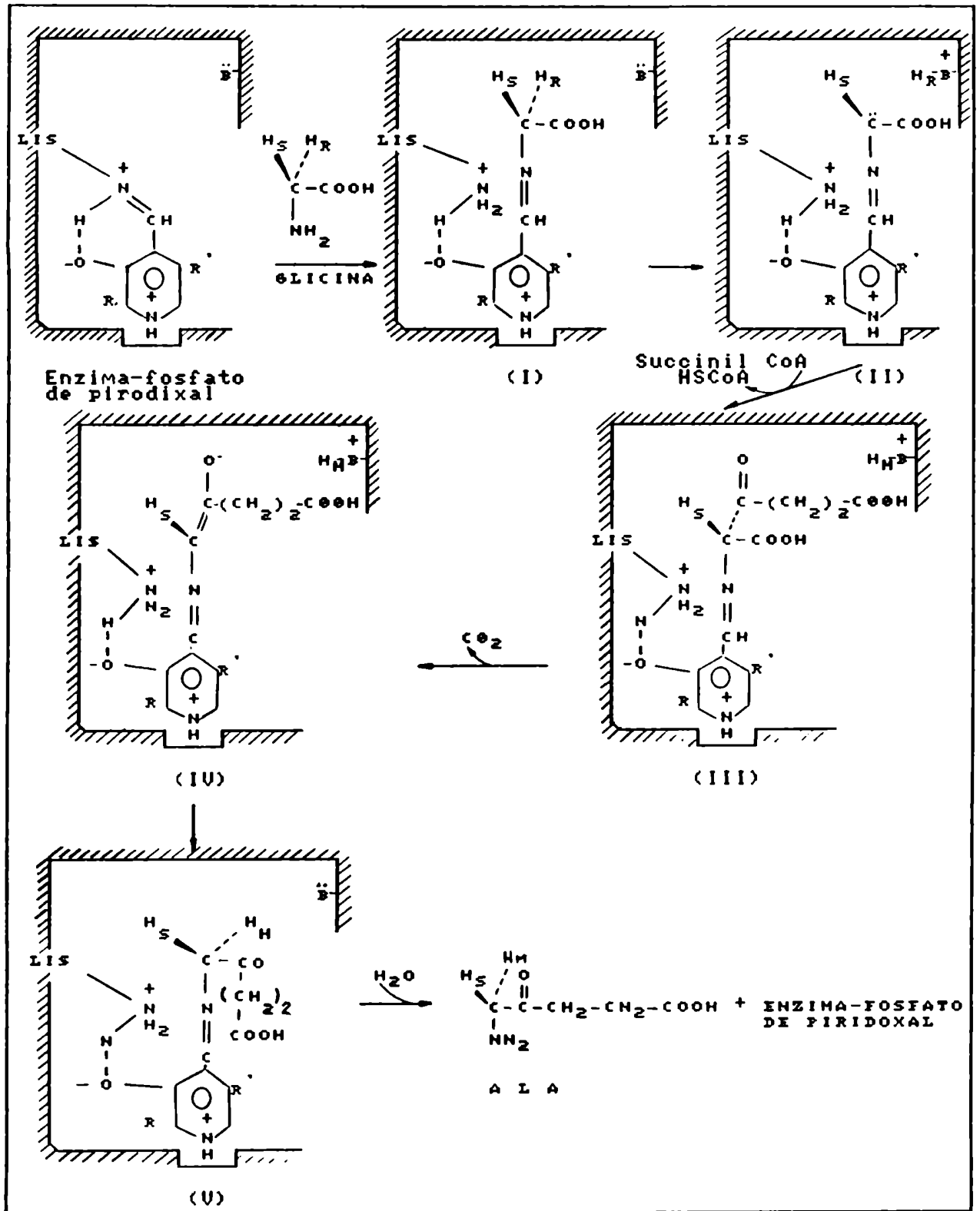
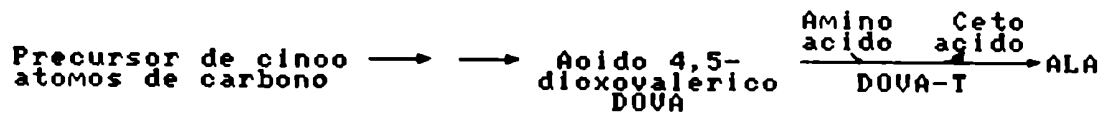


Figura 5: Mecanismo propuesto para la formación de ALA por la vía del ALA-S.

Las reacciones se describen detalladamente en el texto.
R: $-\text{CH}_3$; **R':** $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$.

La reacción comienza cuando la glicina se condensa con el fosfato de piridoxal para formar una nueva base de Schiff (I). Luego el protón H_x de este complejo es liberado y capturado por un grupo básico de la enzima, originándose un carbanión estable (II) que reacciona con el átomo de carbono del carbonilo electrofílico de la succinil CoA para producir un intermediario inestable, el ácido 2-amino-3-cetoadípico (III). Durante esta última conversión el protón H_x unido a la proteína se intercambia con un protón H_H proveniente del medio. A continuación, el ácido 2-amino-3-cetoadípico, aún unido a la enzima, se decarboxila para dar (IV), se adiciona el protón H_H (V) y por hidratación el ALA se libera del complejo enzima-fosfato de piridoxal.

RUTA B :



Esta vía surge como consecuencia de las dificultades encontradas en detectar niveles de actividad de ALA-S en plantas superiores. El ALA se origina a partir de precursores de cinco átomos de carbono (glutamato, glutamina o 2-cetogutarato) a través de una serie de reacciones que se caracterizan por mantener la integridad del esqueleto carbonado inicial. La existencia de esta ruta se confirmó en tejidos de origen vegetal (45-51), algas (15, 52-56) y bacterias (57,58)

Diversos grupos de investigadores trataron de dilucidar la secuencia de reacciones a través de la cual los precursores

res de cinco átomos de carbono se convierten en ALA. A raíz de los resultados obtenidos surge como más probable aquella que postula el ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA) como intermediario (Figura 6). La presencia de una transaminasa (DOVA-T) capaz de producir ALA y un cetoácido, utilizando DOVA y un aminoácido como sustratos, se detectó en bacterias (59-61), algas (17,63-65), hígado y riñón de rata (66-68), hígado de pollo (69), plantas superiores (65, 70-72) y levaduras (73).

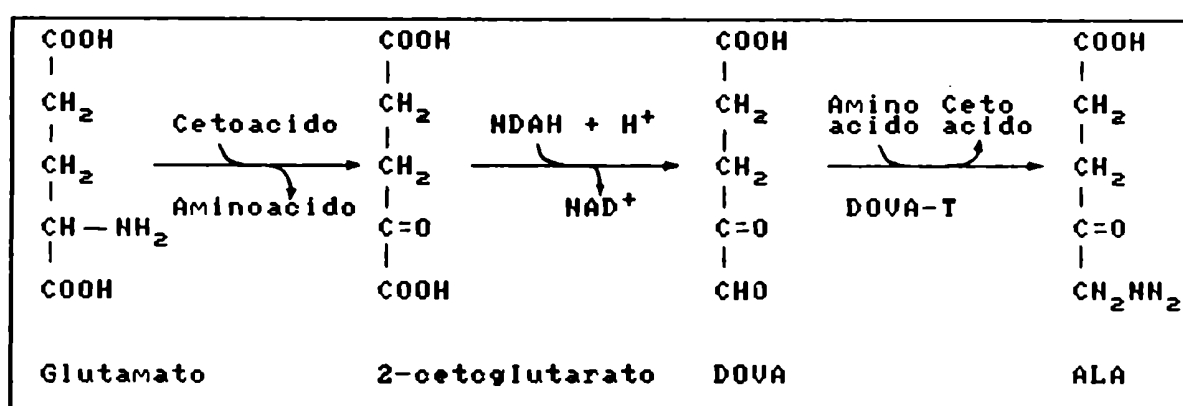


Figura 6: Formación de ALA a partir de precursores de cinco átomos de carbono (glutamato o 2-cetoglutarato)

La reacción catalizada por la DOVA-T requiere fosfato de piridoxal como cofactor y se diferencia de las típicas reacciones de transaminación por su irreversibilidad. Respecto al sustrato donador de grupos amino, estudios de especificidad demostraron que los valores más altos de actividad se obtienen empleando L-alanina o L-glutamato.

Desde el punto de vista conformacional, en la mayoría de las fuentes estudiadas esta enzima se encuentra como un dímero (61, 65, 71), aunque también puede aislarse como monómero (64, 73) o tetrámero (66). No obstante, independientemente del número de subunidades, todos los resultados coinciden en que el peso molecular del protómero oscila entre 55.000 y 60.000, sea cual fuere el método empleado para determi

nar su valor.

En cuanto a la localización celular, la DOVA-T es una enzima asociada a la fracción particulada, su compartimentalización aún no ha sido esclarecida, pero podría ser mitocondrial y/o cloroplástica. Tampoco existe demasiada información respecto a si esta transaminasa posee o no función regulatoria. A pesar de que ciertos trabajos demuestran que la actividad de esta enzima estaría regulada por el contenido intracelular de hemo (74, 75), otros investigadores no han logrado reproducir tales efectos (76).

El mecanismo de acción de esta enzima (Figura 7) corresponde al característico de las transaminasas, tipo ping-pong o de doble desplazamiento (61, 63, 65, 66, 73, 77). Dicho mecanismo consta esencialmente de dos etapas o hemirreacciones:

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

Etapa 2: Aminación del DOVA para formar ALA.

Se parte de la enzima unida al fosfato de piridoxal en forma análoga a lo que ocurría para el ALA-S. La primer etapa comienza cuando el aminoácido sustrato de la reacción se condensa con el fosfato piridoxal para formar una nueva base de Schiff (I). Este complejo experimenta un reordenamiento del enlace imino dando (II), que por hidrólisis libera el cetoácido producto de la reacción y el sistema enzima-cofactor que transporta el grupo amino (Enzima-fosfato de piridoxamina). Así, con esta nueva forma enzimática comienza la segunda etapa, exactamente inversa a la anterior, en la que se establece una base de Schiff (III) entre el grupo amino del cofactor

y el aldehído del DOVA. El complejo III sufre un reordenamiento del enlace imino dando (IV) y éste por hidrólisis libera ALA y la forma enzimática inicial (enzima-fosfato de piridoxal). El resultado neto de este proceso cíclico es la transferencia de un grupo amino del aminoácido dador (L-alanina o L-glutamato) al DOVA que funciona como aceptor.

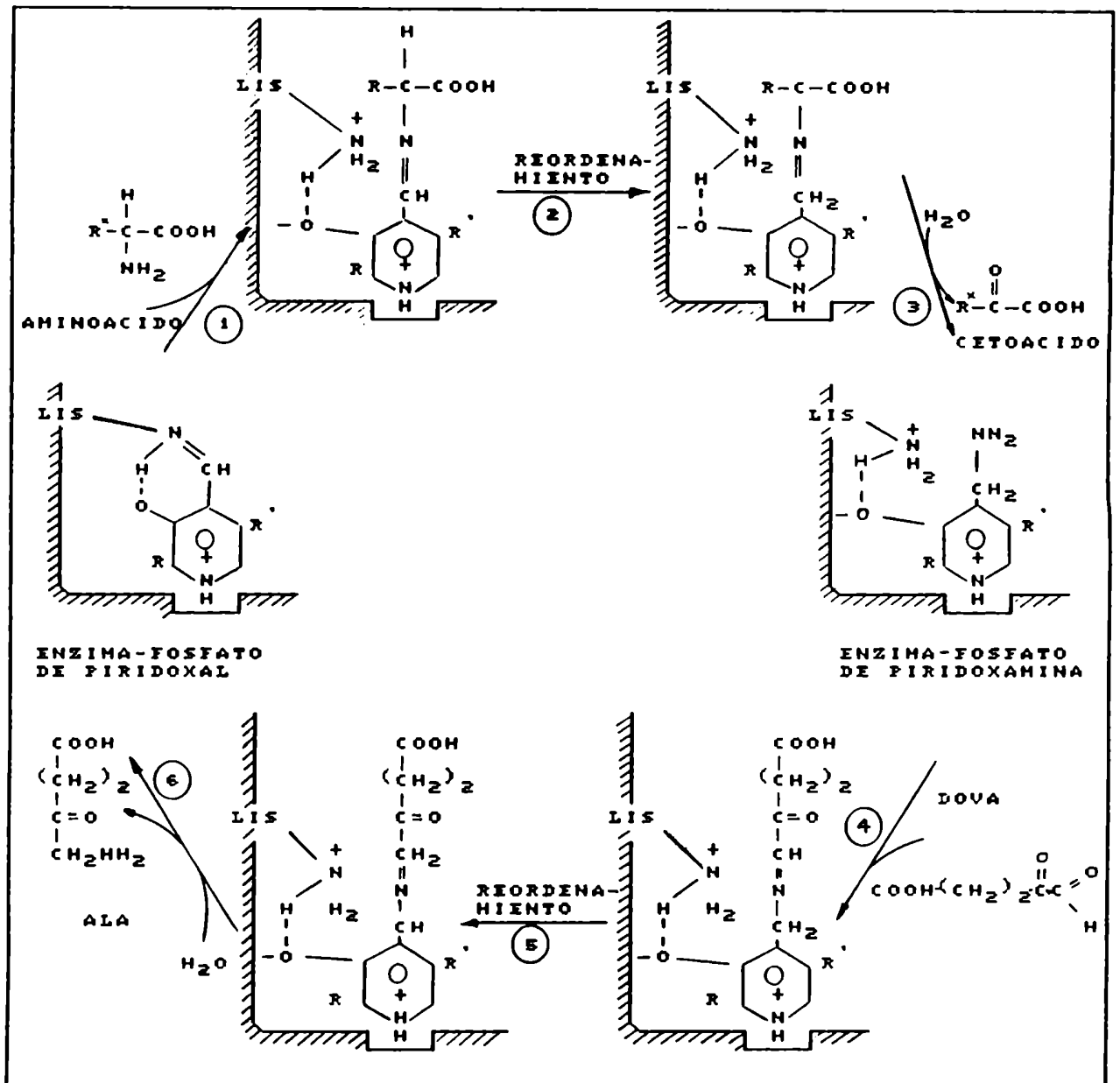


Figura 7: Mecanismo ping-pong o de doble desplazamiento propuesto para la DOVA-T.

El mecanismo consta de dos etapas o hemirreacciones representadas de la siguiente forma: Etapa 1: secuencia 1-2-3; Etapa 2: secuencia 4-5-6. Las modificaciones que ocurren en cada reacción se describen detalladamente en el texto. R : $-\text{CH}_3$; R' : $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$

Por último, para finalizar con la biosíntesis del ALA, en lo que respecta al significado fisiológico que tendría la existencia de dos vías de síntesis, en un principio se pensó que la vía del ALA-S existía únicamente en tejidos animales y bacterias, mientras que la ruta de la DOVA-T operaba exclusivamente en plantas y algas. Hoy se sabe que esto no es así, ya que ambas enzimas se han detectado en un gran número de fuentes de diversos orígenes, y además hay trabajos en los que se demuestra que la existencia de una ruta no excluye la presencia de la otra; es probable entonces que ambos caminos ocurran en la naturaleza, regulados de forma aún no esclarecida.

I.2.2 - Formación de PBG: 5-aminolevúlico dehidrasa (ALA-D)

La enzima 5-aminolevúlico dehidrasa (ALA-D) o Porfobilinógeno-sintetasa (PBG-S) cataliza la condensación asimétrica de dos moléculas de ALA (Figura 8) para formar una de porfobilinógeno (PBG), primer precursor aromático de todas las porfirinas.

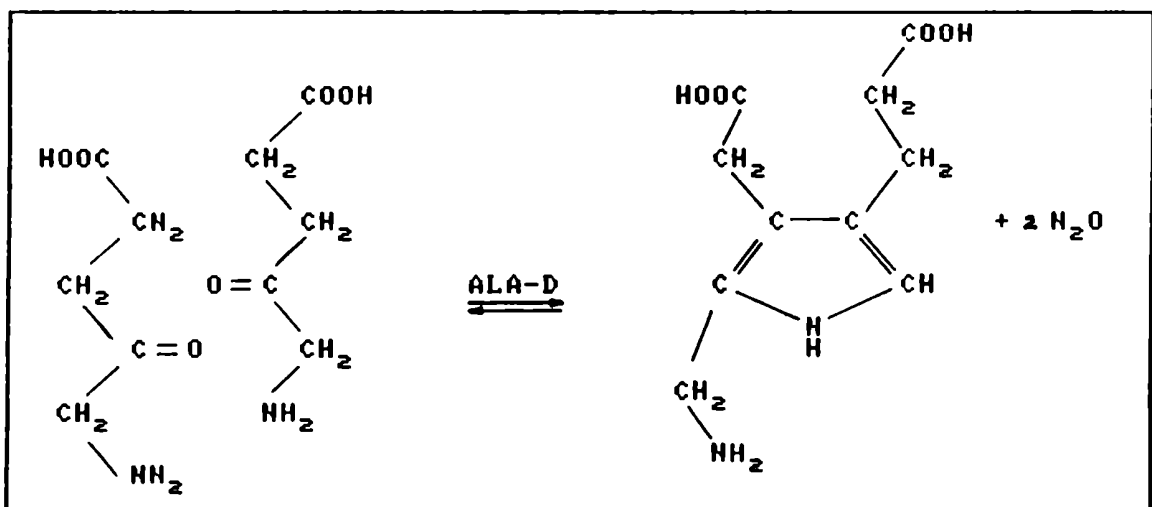


Figura 8: Síntesis de porfobilinogeno por condensación asimétrica de dos moléculas de ácido 5-aminolevulico.

Detectada por primera vez en hemolizados de eritrocitos de ave (78,79) y Chlorella (80) esta reacción ha sido medida en una amplia variedad de fuentes (81 y sus referencias).

Con respecto a la localización celular, el ALA-D es una enzima citosólica, lo que implica que el ALA sintetizado "in vivo" debe atravesar la membrana de la mitocondria para ser convertido en PBG.

En cuanto a sus propiedades, se trata de una proteína termolabile, con características de enzima sulfhidrúlica. Para manifestar su máxima actividad requiere de la presencia de zinc y reactivos tiólicos tales como β -mercaptoetanol, cisteína, glutatión o ditiotreitól (82,83), inhibiéndose por lo tanto, por exposición al aire, bloqueo de grupos sulfhidrilos (por reactivos específicos o metales pesados) y por eliminación del Zn (83).

Se demostró que por sitio activo del ALA-D hay dos grupos cisteína, un átomo de Zn, uno o dos residuos lisina y uno o dos restos de histidina. Las moléculas de lisina como veremos al describir el mecanismo de acción, participan en la unión del ALA a la enzima. Los grupos histidina estarían comprometidos en la unión del Zn al sitio catalítico (83), aunque recientemente se sugirió que también podrían actuar como transportador de protones desde el medio acuoso al sitio activo que es de naturaleza hidrofóbica (84). La función del metal sería proteger los grupos sulfhidrilos esenciales de la oxidación, probablemente por formación de enlaces coordinados (85). El Cd puede mimetizar el efecto protector atribuido al Zn (85).

El ALA-D es una enzima oligomérica de peso molecular 250.000-280.000 formada por ocho subunidades de 35.000 (86). Se ha demostrado que la estructura mínima catalíticamente activa corresponde al dímero de PM 70.000 y que las dos subunidades que lo forman (tipo A y B) serían similares en composición aminoácida.

cida, pero diferentes desde el punto de vista funcional (87). Las subunidades del tipo A estarían involucradas en la formación de una base de Schiff con la primer molécula de ALA, mientras que las subunidades del tipo B unirían no covalentemente la segunda molécula de sustrato.

El mecanismo de acción propuesto para esta enzima (Figura 9), postulado inicialmente por Nandi y Shemin (88), luego de la caracterización de la proteína quedaría constituido por las siguientes reacciones:

Etapa 1: la primer molécula de ALA (I) se une covalentemente a la enzima por medio de una base de Schiff que se establece entre el grupo ϵ -amino de un residuo lisina de una subunidad A y el grupo ceto del ALA I.

Etapa 2: el carbanión resultante por medio de una condensación aldólica se une a la segunda molécula de sustrato (II) la cual a su vez por enlaces no covalentes interactúa con residuos positivos y negativos de una subunidad B, que le permiten adoptar la conformación adecuada para que la condensación se produzca.

Etapa 3: se produce la protonación del nitrógeno correspondiente al grupo ϵ -amino del residuo lisina y la eliminación de una molécula de agua.

Posteriormente la transferencia de un protón desde el grupo amino del ALA II al grupo ϵ -amino del sitio activo (Etapa 4), rinde un pirrol que se separa de la enzima (Etapa 5) que luego de una serie de reordenamientos intramoleculares (Etapa 6) forma el producto, PBG.

Cabe aclarar que si bien en la mayoría de los tejidos la actividad de esta enzima es muy superior a la del ALA-S y se considera que no desempeña rol regulatorio, en Propionibacterium shermanii, Neurospora crassa, Ustilago sphaerogena, Euglena gracilis,

I.2.3 - Obtención de uroporfirinógenos: Porfobilinógeno Deaminasa (PBG-Deaminasa) y Cosintetasa (Isomerasa).

La ciclótetramerización enzimática de cuatro moléculas de PBG conduce a la formación de uroporfirinógenos, (Urogens), pudiéndose obtener los isómeros I y III que difieren en la posición relativa de las cadenas laterales.

Como veremos en la Figura 10 la PBG-Deaminasa cataliza la formación de un intermediario inestable el hidroximetilbilano (HMB) o preuroporfirinógeno (90,91) que en ausencia de Isomerasa se cicla no enzimáticamente a Urogen I, mientras que en presencia de la misma, primero se produce un reordenamiento (inversión del anillo D) y luego se cicla a Urogen III.

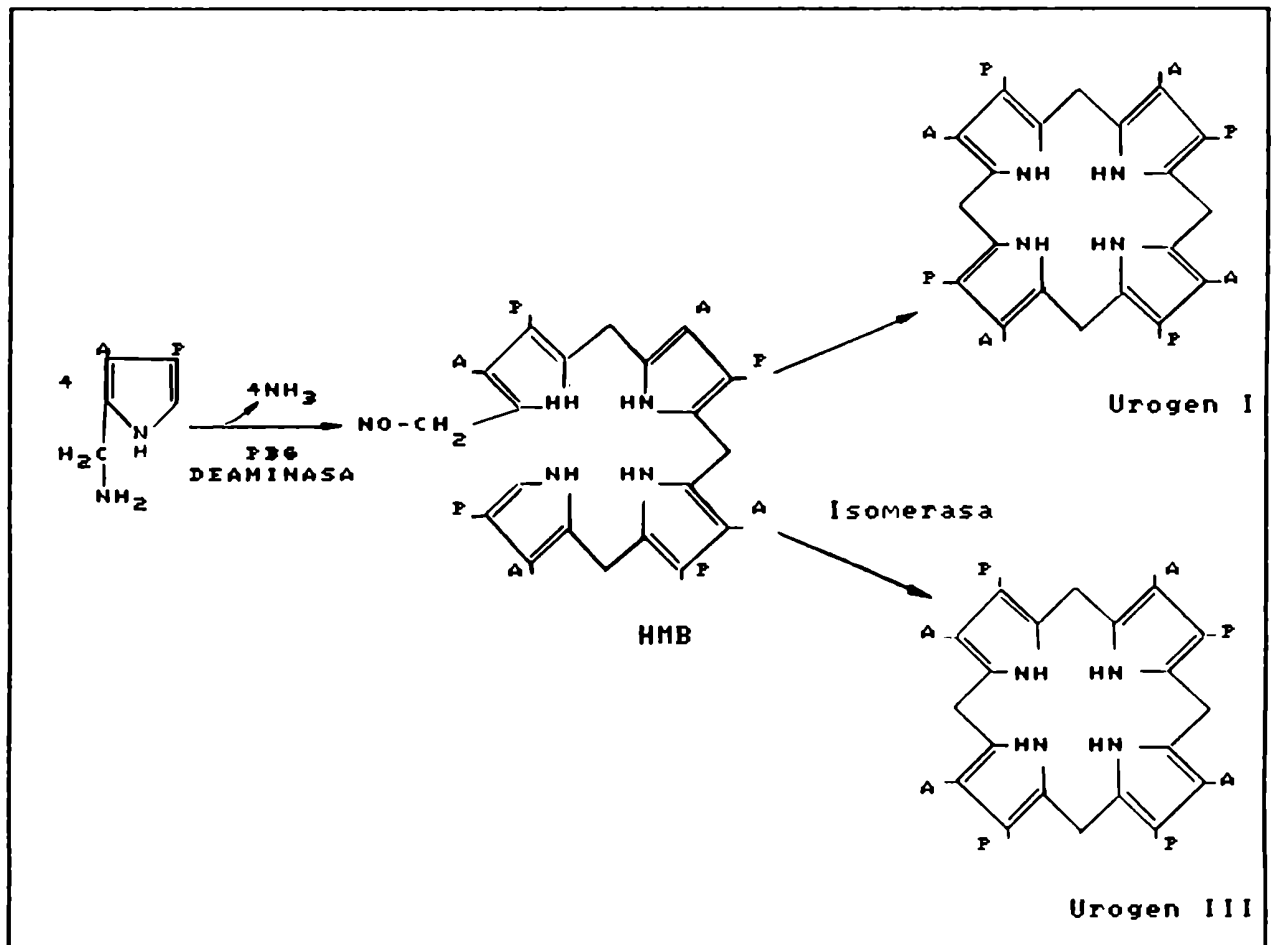


Figura 10: Biosíntesis de uroporfirinógenos catalizada por la PBG-Deaminasa e Isomerasa. A: -CH₂COOH P: -CH₂CH₂COOH.

Si bien ambos isómeros pueden encontrarse "in vivo", en condiciones normales sólo se sintetiza el isómero III; la presencia de Urogen I es indicio de patología correspondiente a un tipo de porfiria caracterizada por una deficiencia a nivel de la Isomerasa. Como veremos, al describir las etapas siguientes, sólo el Urogen III conduce a la formación de protoporfirina IX. Algunos autores postulan que ambas enzimas intervienen en la síntesis de uroporfirinógenos; PBG-Deaminasa e Isomerasa se asociarían "in vivo" formando un complejo denominado Porfobilinogenasa (PBGasa) (92-94). La concentración relativa de ambas enzimas en el complejo gobernaría la relación Urogen III:Urogen I que se sintetiza.

Tanto la Isomerasa como la Deaminasa fueron caracterizadas en muy diversas fuentes. Esta última resultó ser una proteína termoestable, por ejemplo, en Chorella regularis (95) retuvo el 87% de actividad aún luego de preincubar a 75 °C durante una hora. En la mayoría de los tejidos empleados se la aisló como una enzima monomérica con un P.M. que oscila entre 35.000 y 43.000 (95-101).

La Deaminasa se ha extraído (96-98) tanto en estado libre como formando distintos intermediarios enzima-sustrato (ver más adelante mecanismo de acción). Más recientemente se demostró que para manifestar actividad, necesitaba como cofactor un grupo dipirrometano que se forma por condensación de dos moléculas de PBG, en forma análoga a lo que ocurre cuando éste se polimeriza para formar porfirinas, dicho cofactor se mantiene unido a la proteína en todos los ciclos catalíticos, sin renovarse; la unión con la enzima se establece a través de un átomo de S de la cisteína 242 (102, 103).

La Deaminasa presenta una cinética michaeliana con un Km que oscila entre 29 y 80 μ M (95,100,101,104). Se comporta como una proteína ácida con un punto isoeléctrico comprendido entre 4,2

y 4,5 (95,101). En general se observa que esta enzima es inhibida por amonio, hidroxilamina y cationes divalentes (99). La enzima fue aislada de hígado de rata (105), *E. gracilis* (106), eritrocitos humanos (107) y *Escherichia coli* (108).

Respecto a las propiedades de la Isomerasa es una enzima termosestable; en eritrocitos humanos se inactiva el 50 % cuando se la mantiene a 60 °C durante un minuto (107).

Es una proteína monomérica cuyo P.M. oscila entre 29.500 y 42.000 (106,107,109) y su punto isoeléctrico varía desde 4,8 a 5,5 (106,107). En cuanto a los estudios cinéticos efectuados se comporta como una enzima michaeliana con un Km para el hidroximetilbilano que varía de 5 a 40 μ M (106,107).

Los iones Na^{++} , K^{+} , Mg^{++} y Ca^{++} funcionan como activadores, mientras que Cd^{++} , Cu^{++} , Hg^{++} y Zn^{++} inhiben la actividad de Isomerasa (105,107).

Respecto a la inhibición por sustrato y producto la enzima de hígado de rata se inactiva por PBG (105) y la de *Euglena gracilis* por Urogen III (106).

Hay evidencias que sugieren la presencia de un derivado del folato unido a la enzima que actuaría como cofactor (109). Recientemente Juknat y col. identificaron en *Euglena gracilis* a este compuesto con la 6-biopterina (110). Empleando la misma fuente enzimática, el grupo de Battersby no pudo detectar la presencia de este cofactor (106).

La disponibilidad de la Deaminasa e Isomerasa purificadas permitió dilucidar el mecanismo de acción que conduce a la biosíntesis de uroporfirinogéno I y III (Figura 11).

Se parte de la Deaminasa unida covalentemente al cofactor dipirrometano (I). Dicha unión se establece como dijimos entre el átomo de S de la cisteína 242 de la cadena polipeptídica y el car

bono que lleva el grupo amino en la molécula de PBG. La posición α libre de este cofactor constituye el punto de ataque de la primer molécula de PBG originando el complejo enzima-PBG₁ (II). En forma análoga se incorporan sucesivamente las moléculas de PBG restantes (complejos E-PBG₂; E-PBG₃; E-PBG₄), conduciendo a la formación de un tetrapirrol de cadena abierta, el hidroximetilbilano (III), que se libera del complejo enzima-cofactor. Finalmente el hidroximetilbilano puede, en ausencia de Isomerasa ciclarse no enzimáticamente a Urogen I (IV), o bien en presencia de la misma se produce la rotación del anillo D para luego ciclarse originando el Urogen III (V).

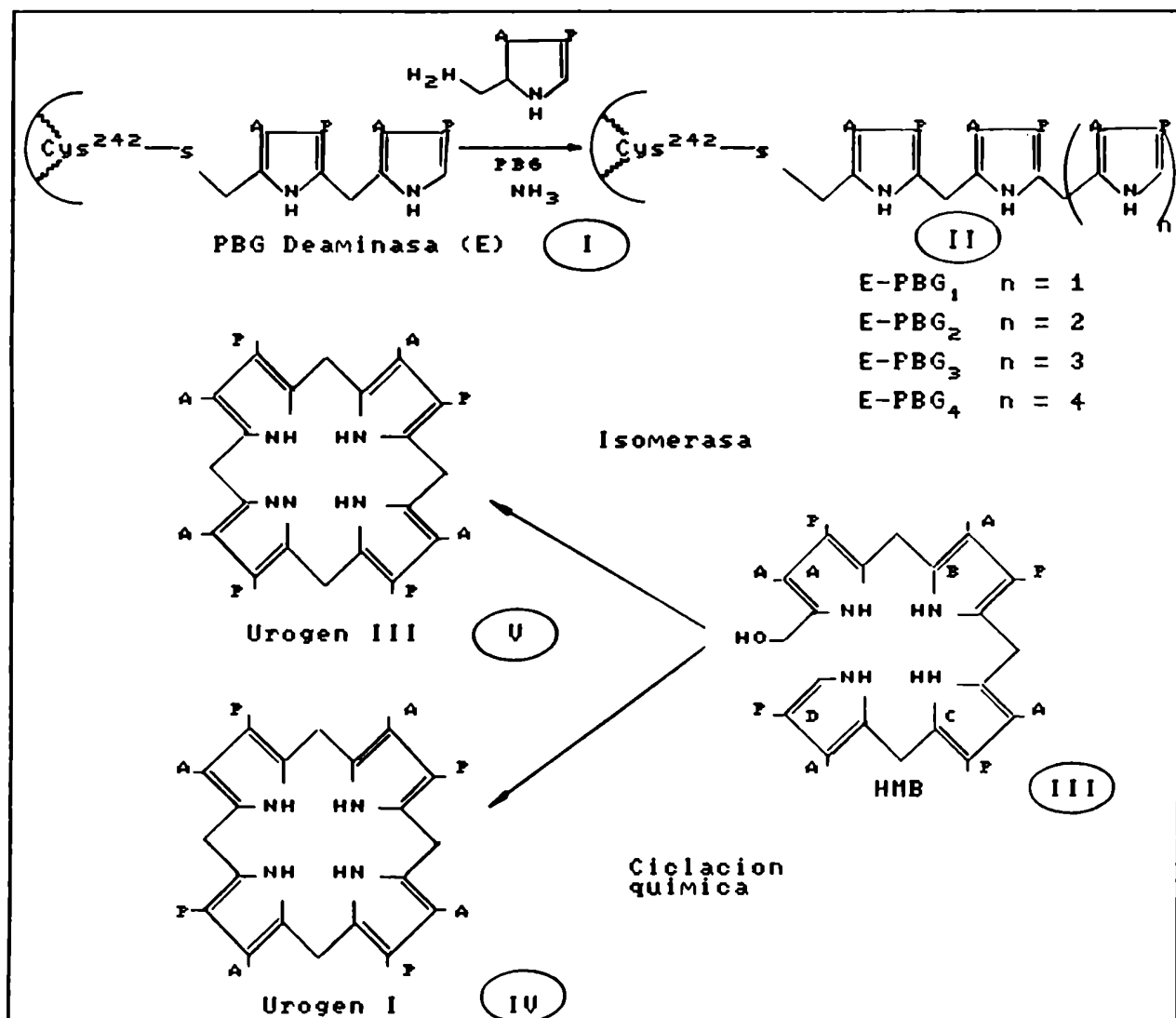


Figura 11: Mecanismo propuesto para la formación de uroporfirino I y III.

Las reacciones se describen detalladamente en el texto.
A: $-\text{CH}_2\text{COOH}$ P: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$.

Por último, el aislamiento de la Deaminasa e Isomerasa con un alto grado de pureza permitió dilucidar las bases moleculares del defecto genético de la porfiria congénita eritropoyética (107).

I.2.4- Decarboxilación de uroporfirinógenos: Uroporfirinógeno Decarboxilasa (Uro-D).

La Uroporfirinógeno Decarboxilasa (Uro-D) cataliza la liberación secuencial de los cuatro grupos carboxilos de las cadenas laterales de acetato presentes en los uroporfirinógenos dando origen a los coproporfirinógenos (Coprogens) correspondientes (Figura 12).

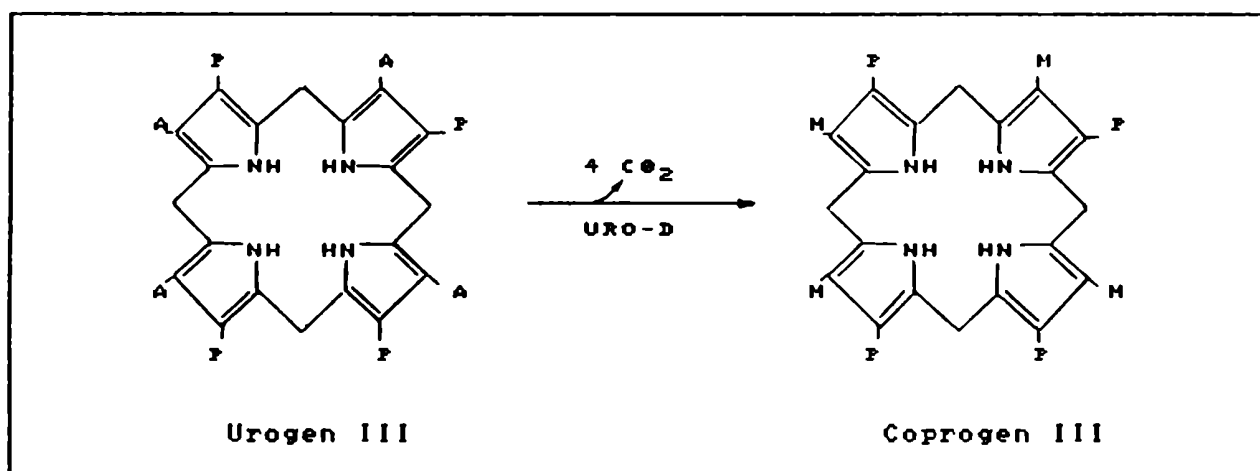


Figura 12: Reaccion catalizada por la Uro-D.

En forma análoga los isómeros I, II y IV del Urogen se convierten en los Coprogen correspondientes.

M: $-\text{CH}_3$ A: $-\text{CH}_2\text{COOH}$ P: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$.

Esta enzima decarboxila los porfirinógenos, pero no actúa sobre las correspondientes porfirinas, lo que justifica su inactivación en presencia de oxígeno. Si bien no es específica para sustratos de un tipo isomérico determinado, la velocidad de reacción es máxima para los isómeros de tipo III, siguiéndole el IV, II y I en orden decreciente de velocidad (41 y referencias).

La Uro-D es una proteína localizada en el citoplasma que ha sido purificada de células bacterianas, eritrocitos humanos y de ave, bazo de ratón, hígado de rata, hoja de tabaco, reticulocitos y S. cerevisiae (3).

Se trata de una proteína ácida con un pI en la zona de 4,5-4,6. En general, es una enzima termoestable, sin embargo, en Rhodopseudomonas palustris el calentamiento a 60 °C durante 15 minutos no sólo no la inactiva sino que incrementa su actividad alrededor de cuatro veces (111).

En todos los tejidos estudiados se aisló como monómero o dímero, con un P.M. para el monómero de aproximadamente 40.000 (111-113).

La actividad de la Uro-D se inhibe por compuestos tales como la iodo acetamida, p-cloromercuribenzoato, Hg^{++} , Cu^{++} y bajo ciertas condiciones Zn^{++} y Fe^{++} esta inhibición puede revertirse por el agregado de cisteína o glutatión indicando que la Uro-D es una enzima sulfhidrúlica (41).

En cuanto a la cinética de la reacción se comprobó que la decarboxilación de los cuatro restos acetato estaría catalizada por una única proteína, aunque aún no está totalmente dilucidado si las cuatro decarboxilaciones tienen lugar en el mismo sitio activo o en cuatro sitios activos diferentes, según sugiere un trabajo llevado a cabo en eritrocitos de glóbulos rojos humanos(114). Se ha propuesto y aceptado que la reacción ocurriría en dos etapas, una rápida y una lenta. En la mayoría de las fuentes, excepto Rp.palustris la etapa inicial rápida, involucraría la decarboxilación del anillo D del Urogen, seguida de una decarboxilación más lenta de los restantes residuos carboxílicos de los anillos A, B y C, y esta secuencia se aplicaría para todos los isómeros del sustrato. El modo de acción descrito (Figura 13), corrobora la existencia de intermediarios hepta, hexa y pentacarboxílicos e indica

además que comenzando con el anillo D las decarboxilaciones se llevan a cabo en el sentido de las agujas del reloj. Para el isómero I también es factible esta secuencia de reacciones en el sentido inverso.

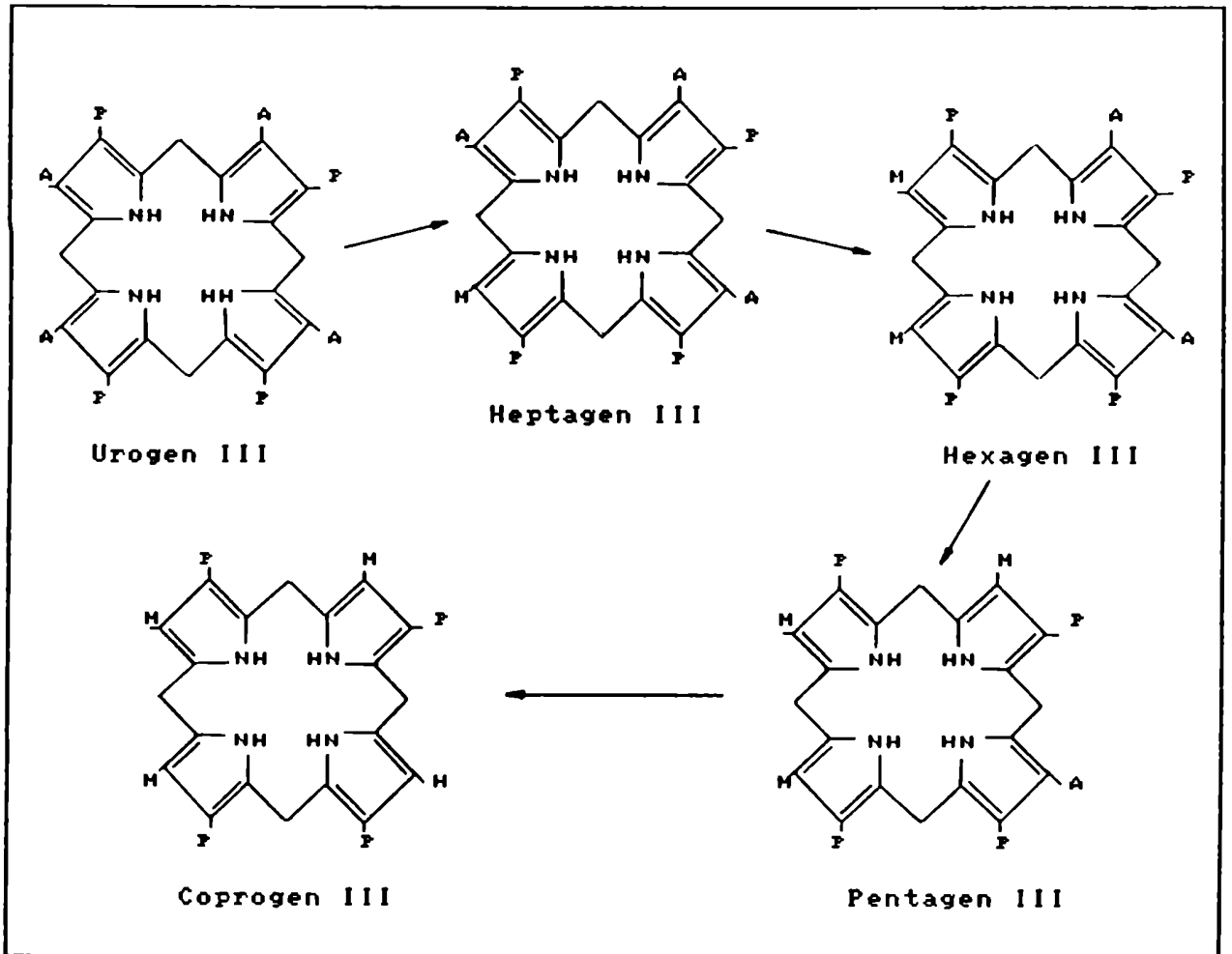


Figura 13: Formación de Coprogen III a partir de Urogen III. La decarboxilación del Urogen III procede en el sentido de las agujas del reloj sobre el ciclo del tetrapirrol, comenzando por el anillo D. M: $-\text{CH}_3$ A: $-\text{CH}_2\text{COOH}$ P: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$.

En humanos una deficiencia en la actividad de esta enzima es lo que provoca una acumulación masiva y/o un aumento en la excreción urinaria de porfirinas altamente carboxiladas que son las responsables de la fotosensibilización que caracteriza a la porfiria cutánea tarda y a la porfiria hepato eritropoyética (ver Capítulo III).

El clonado y secuenciación del gen (115) que codifica para esta enzima contribuyó al esclarecimiento de las alteraciones estructurales y anormalidades funcionales de la Uro-D en pacientes porfíricos. Se ha determinado que el gen codifica una proteína de 367 aminoácidos que es consistente con el P.M. 40.000 y concuerde con la composición total de aminoácidos de la enzima purificada. El análisis de la expresión de este gen indica que hay una sola especie de RNAm presente en tejido no eritroide y eritroide aunque esta enzima se exprese preferentemente en estos últimos.

I.2.5- Síntesis de protoporfirinógeno IX: Coproporfirinogenasa (CPGasa).

Sobre el Coprogen III (Figura 14) actúa la enzima mitocondrial Coproporfirinogenasa (CPGasa) que cataliza la decarboxilación oxidativa de los restos propiónicos ubicados en los anillos A y B, a grupos vinilos formando el protoporfirinógeno IX (Protogen IX).

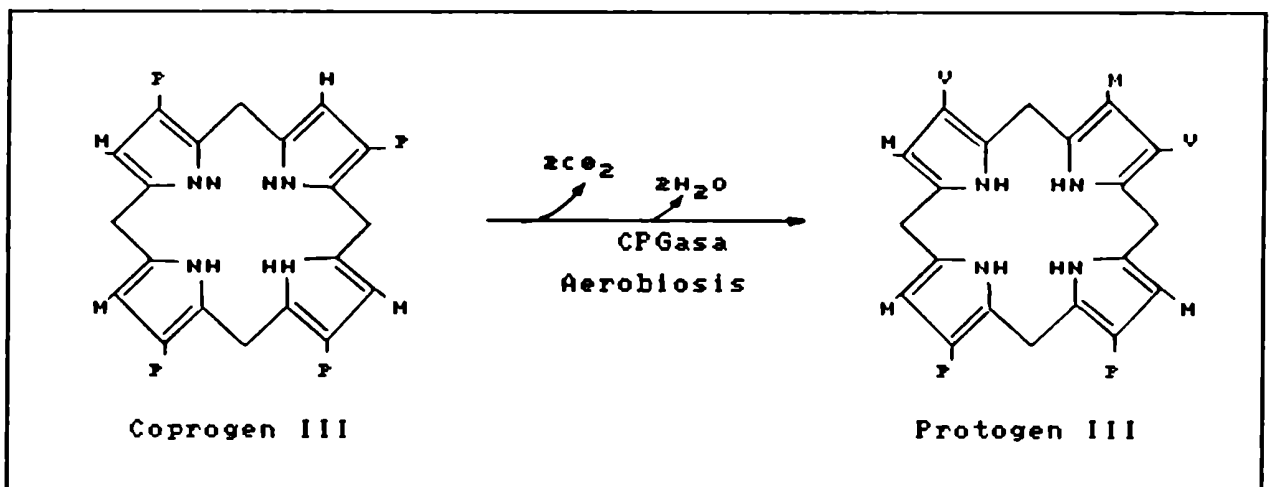
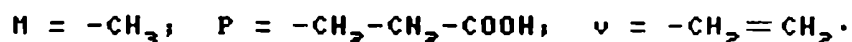


Figura 14: Formación de protogen IX a partir de Coprogen III.



La Coproporfirinogenasa se ha detectado en una gran variedad de fuentes, la mayor parte del conocimiento de sus propiedades deriva de los estudios llevados a cabo en mitocondria de hígado de

rata (116), hígado bovino (117) y más recientemente de S.cerevisiae (118).

Esta enzima requiere la presencia de oxígeno molecular para manifestar su actividad (116) sin embargo los organismos que crecen en condiciones anaeróbicas también forman protoporfirinas, es obvio entonces, que en ellos funciona otro aceptor de electrones distinto al oxígeno. En Rp.spheroides (119) se ha propuesto que el aceptor estaría constituido por ATP, L-metionina y Mg⁺⁺. Actividad de una CPGasa anaeróbica también se ha detectado en Pseudomonas, Chromatium, levaduras y Rp.palustris (41).

La enzima es altamente específica para el coproporfirinógeno III, de allí que en las células vivientes sólo se encuentre protoporfirina IX. No emplea coproporfirinógeno I ni II como sustratos, pero sí puede utilizar al isómero IV, que de todas formas no es natural y conduce a la formación de un isómero de protoporfirina no fisiológico (120).

La CPGasa de hígado de rata (116) purificada a homogeneidad fue la primera enzima del camino del hemo para la cual se determinó su peso molecular, que resultó ser de 80.000. Valores del mismo orden se encontraron posteriormente para la enzima de hígado bovino y levadura. En esta última fuente datos más recientes dan un valor de 70.000 proponiendo que la CPGasa nativa sería un dímero de dos subunidades idénticas de P.M. 35.000 (118).

Los reactivos de grupos tiólicos inhiben la CPGasa indicando la presencia de restos sulfhidrúlicos en su sitio activo (116, 118).

En lo que concierne al mecanismo de acción de esta enzima, en la Figura 15 se muestran las modificaciones que ocurren sobre el grupo propiónico para ser convertido en vinilo. Los pasos que se esquematizan se producen independientemente y secuencialmente en los anillos A y B. En primer lugar la cadena de ácido propióni

co (I), se convertiría en ácido β hidroxipropiónico (II), luego por deshidratación se produce un acril-derivado (III) que por decarboxilación da origen al sustituyente vinilo (IV).

Posteriormente se demostró la presencia de un residuo tiro-sina en el sitio activo que tendría un papel importante en la reacción de oxidación de la cadena propiónica a hidroxipropiónica (121).

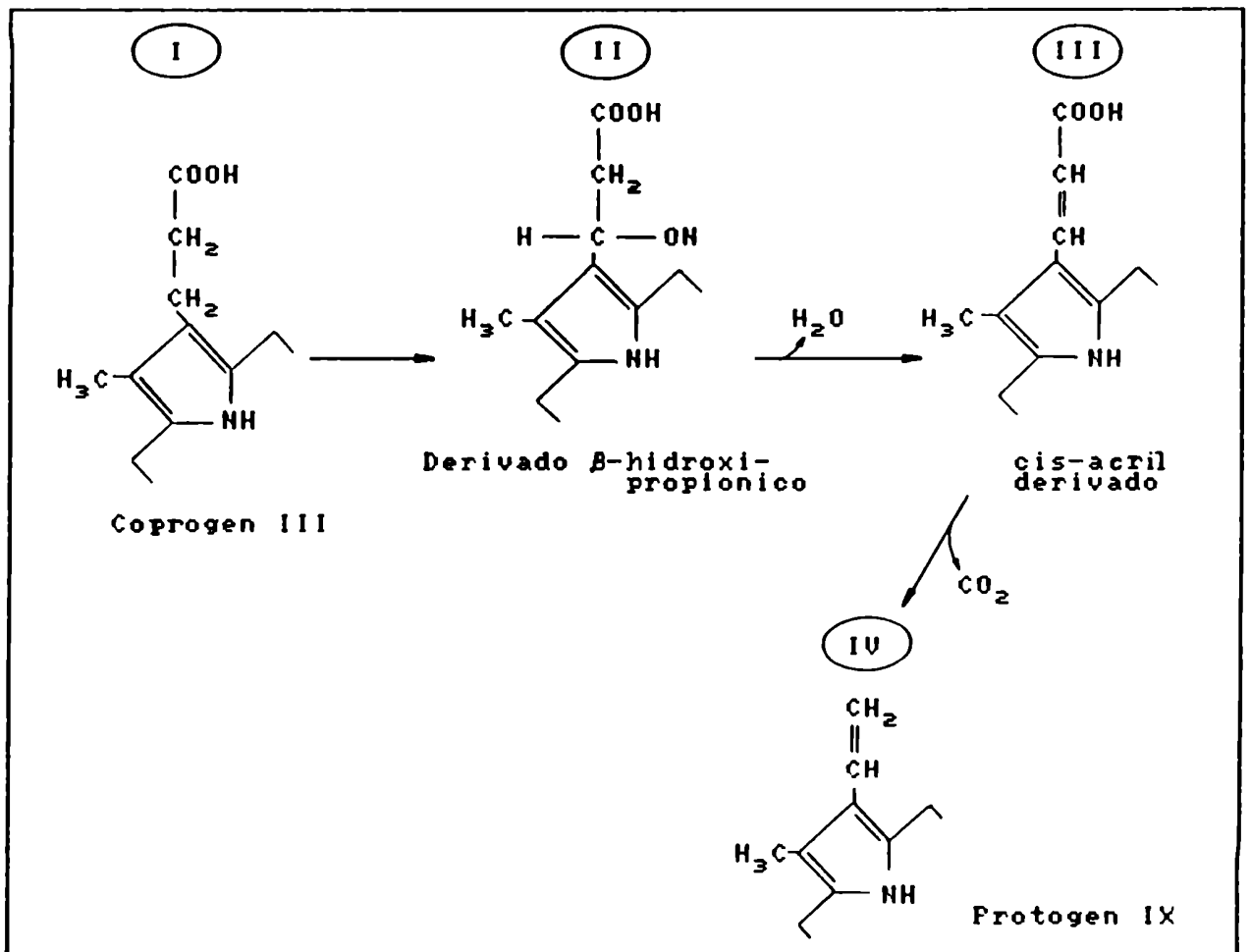


Figura 15: Decarboxilación oxidativa del Coprogen III a Protogen IX.

Estudios realizados con la CPGasa de levadura (122) han demostrado que la síntesis de esta enzima está sujeta a un control negativo por parte del hemo y del oxígeno, constituyendo así un punto de regulación del camino del hemo, característico de este tipo de organismos.

Se ha clonado el cDNA de la CPGasa de levadura, estable

ciéndose la secuencia de bases y a partir de ella la de los aminoácidos, que está de acuerdo con el P.M. determinado para la enzima de esta fuente (118). El clonado del gen de la enzima humana permitiría dilucidar cuáles son las fallas que conducen al tipo de porfirias, en las que esta enzima se encuentra disminuida (coproporfirina hereditaria y hardero-coproporfirina).

I.2.6- Oxidación del protogen IX a protoporfirina IX: Protoporfirinógeno oxidasa (PPG-ox).

La protoporfirinógeno IX oxidasa o Protogen oxidasa (PPG-ox) es la enzima que cataliza la dehidrogenación del Protoporfirinógeno IX a Protoporfirina IX (Proto IX) por pérdida de seis átomos de hidrógeno (Figura 16).

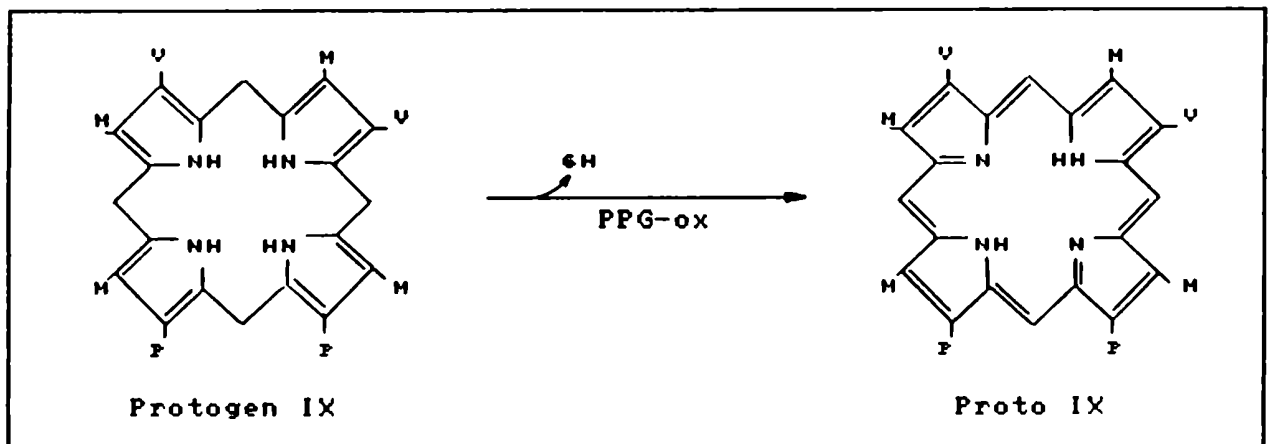


Figura 16: Oxidación de protogen IX a protoporfirina IX.

Esta enzima de localización mitocondrial se detectó en S.cerevisiae (123), Escherichia coli (124,125), hígado de rata (126), en Rp.spheroides (127) y otras fuentes (41).

Se trata de una proteína altamente específica por su sustrato y en la mayoría de los casos dependiente de oxígeno, si bien en E.coli se demostró que el fumarato (125), nitrato (128), y quinonas (129) funcionan en condiciones anaeróbicas como acep

tores de electrones alternativos.

El P.M. obtenido para la PPG-ox varía dentro de un amplio rango, desde 35.000 (126) a 180.000 (123). Si bien no se ha encontrado que esta enzima requiera cofactores, los agentes reductores de grupos tiólicos estimulan su actividad (126).

A partir de estudios cinéticos se determinaron valores para el K_m que oscilan entre 4,8 μM (123) y 11 μM (126). Su mecanismo de acción aún no ha sido dilucidado, sin embargo, se postula que en el sitio activo se encontrarían residuos sulfhidrúlicos que serían importantes para la unión con el sustrato a través de sus grupos vinilos. Se ha demostrado también que la reacción es estereoespecífica y tiene lugar solamente sobre un lado del anillo porfirínico (130).

El defecto enzimático a nivel de la PPG-ox, da origen a la porfiria variegata, se han detectado niveles disminuidos hasta el 5% en cultivos de fibroblastos de piel de pacientes con esta patología (41). La medición de actividad de esta enzima es de suma utilidad para llevar a cabo estudios familiares de estos enfermos.

I.2.7- Obtención de hierro-protoporfirina IX: Ferroquelatasa o hemosintetasa

La inserción de un átomo de hierro (Fe^{++}) en la molécula de Proto IX conduce a la formación del protohemo o hemo. La enzima encargada de catalizar esta reacción se conoce con el nombre de hemosintetasa (Hemo-S) o Ferroquelatasa (Figura 17).

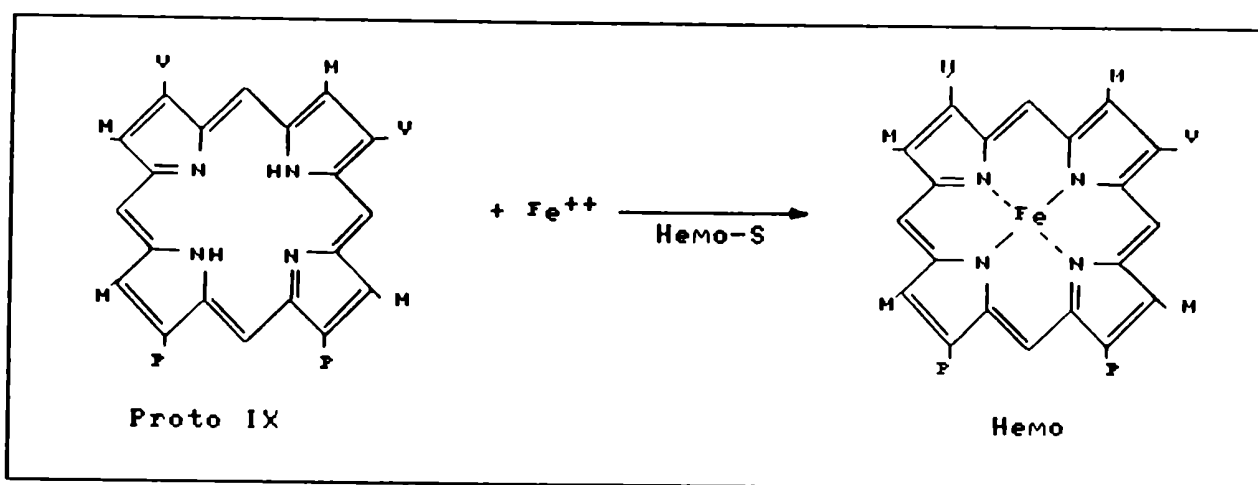


Figura 17: Obtencion de hemo a partir de protoporfirina IX.

La actividad de ferroquelatasa se ha medido en una gran variedad de fuentes (131-138). Se han determinado pesos moleculares de 200.000 a 240.000 para la enzima nativa y de 40.000 a 42.000 para la proveniente del tratamiento con SDS (131, 133, 137, 139). Se trata de una proteína fuertemente asociada a la membrana interna de la mitocondria donde se postula estaría formando un complejo estable con la PFG-ox (140).

La ferroquelatasa es una lipoproteína ya que el agregado de ciertos solventes orgánicos o fracciones lipídicas aumentan su actividad, probablemente facilitando el acceso del sustrato al sitio activo. Se trata de una enzima sulfhidrónica fuertemente inhibida por oxígeno y ciertos metales divalentes como Pb^{++} , Hg^{++} , Mn^{++} y Cu^{++} , con éste último el efecto inhibitorio se manifiesta sólo en presencia de Fe^{++} . (131, 136, 139).

Se ha postulado para esta enzima la presencia de dos sitios activos, uno para el metal y otro para la porfirina, adjudicándole al último un modelo de bolsillo hidrofóbico dado el gran porcentaje (48%) de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica detectados en esa región (131, 141).

Respecto a la especificidad de la ferroquelatasa por sus dos sustratos (41), se sabe que es absolutamente específica por el Fe^{++} como ión metálico, pero en lo que concierne a la porfiri-

na in vitro, pueden funcionar como sustratos, además de la proto-porfirina IX, otras porfirinas dicarboxílicas como meso y deuteroporfirina; en ningún caso pueden actuar como sustratos los correspondientes porfirinógenos.

La ferroquelatasa se encuentra disminuida en pacientes y animales con protoporfiria eritropoyética (41).

I.3 - Origen biosintético de distintas porfirinas de interés biológico.

Tanto la Proto IX como las porfirinas en general, tienen la propiedad de combinarse con distintos iones metálicos y formar complejos que son los que dan origen a la gran gama de tetrapirroles cíclicos de interés biológico. La mayor parte de estos compuestos se forman a partir de Proto IX a excepción de las corrinas que utilizan como precursor el Urogen III. En la Figura 18 se esquematiza la secuencia de formación de los distintos productos finales.

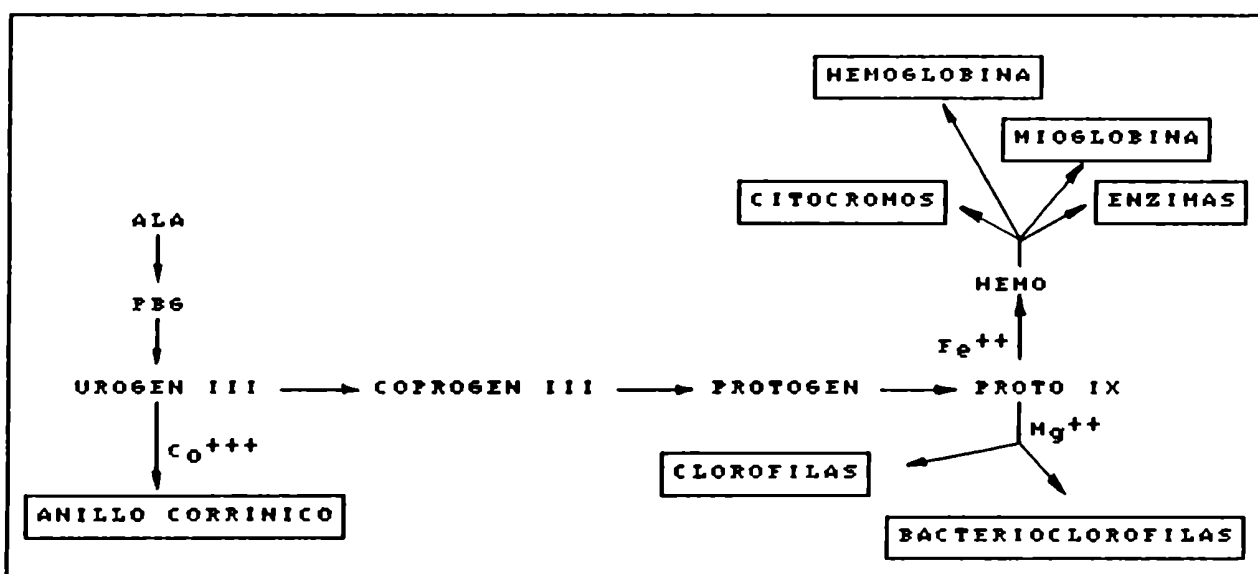


Figura 18: Obtención de las distintas porfirinas de interés biológico.

1) Complejos con hierro: la inserción de un átomo de Fe en la molécula de Proto IX, conduce como ya mencionáramos a la formación de hemo.

El hemo posee una estructura en la cual los cuatro ligandos o grupos coordinantes de la porfirina forman con el Fe (II) un complejo planar cuadrado (Figura 19). Como el metal posee un número de coordinación total de seis, existe la posibilidad de formar otros dos enlaces coordinados que se ubican perpendicularmente al plano anterior y orientados en direcciones opuestas. Cuando estas dos últimas posiciones están ocupadas, la estructura resultante se denomina hemocromo o hemocromógeno (Figura 19).

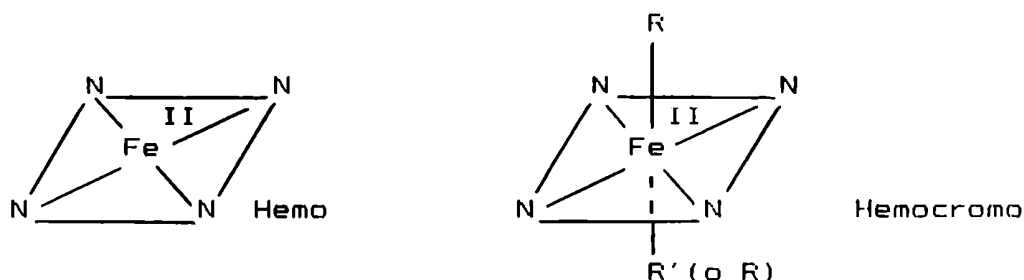


Figura 19: Representación esquemática de los complejos con Fe (II).

La hemoglobina y mioglobina constituyen dos ejemplos de hemoproteínas en los cuales el grupo prostético se encuentra en la forma de hemocromo. En ambos compuestos el quinto enlace de coordinación de cada átomo de hierro se establece con un residuo histidina de la cadena polipeptídica correspondiente a cada proteína, mientras que la sexta posición puede estar desocupada (desoxihemoglobina y desoximioglobina) o bien ocupada por oxígeno (oxihemoglobina y oximioglobina) o por otros ligandos tales como el monóxido de carbono.

En su función normal como transportador de oxígeno, los átomos de hierro de las moléculas de hemoglobina y mioglobina no cambian su estado de oxidación, permaneciendo siempre como Fe (II). Sin embargo, ambas moléculas pueden oxidarse a la forma de

Fe (III), los productos respectivos reciben el nombre de metahemoglobina y metamioglobina, y ya no funcionan como transportadores de oxígeno.

En la Figura 20 se esquematiza la estructura de los complejos correspondientes al Fe (III). La metahemoglobina y metamioglobina constituyen dos ejemplos de hemoproteínas en las cuales el grupo prostético se encuentra en la forma de hemicromo.

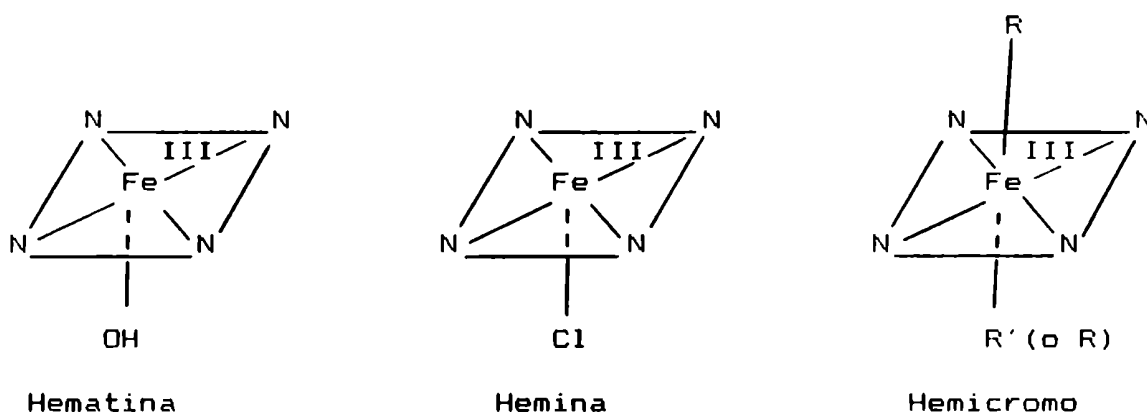


Figura 20: Representación esquemática de los complejos de Fe (III).

Los citocromos son otro ejemplo de proteínas conjugadas con hierro-porfirinas. Los citocromos se clasifican en tres tipos principales: a, b y c, según sus diferentes propiedades espectrales que se deben fundamentalmente a variaciones en los sustituyentes laterales de la molécula de hierro-porfirina y a modificaciones en el modo en que esta última se une al componente polipeptídico (Figura 21).

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

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

Citocromos	Grupo prostético	Unión con la cadena polipeptídica (*)
Tipo a	Hemo a	no covalente
Tipo b	Protohemo	no covalente
Tipo c	Protohemo	covalente (puentes tioeter)

(*) En todos los casos el grupo prostético se une al componente proteico correspondiente mediante la 5ta y 6ta posición de coordinación del hemo.

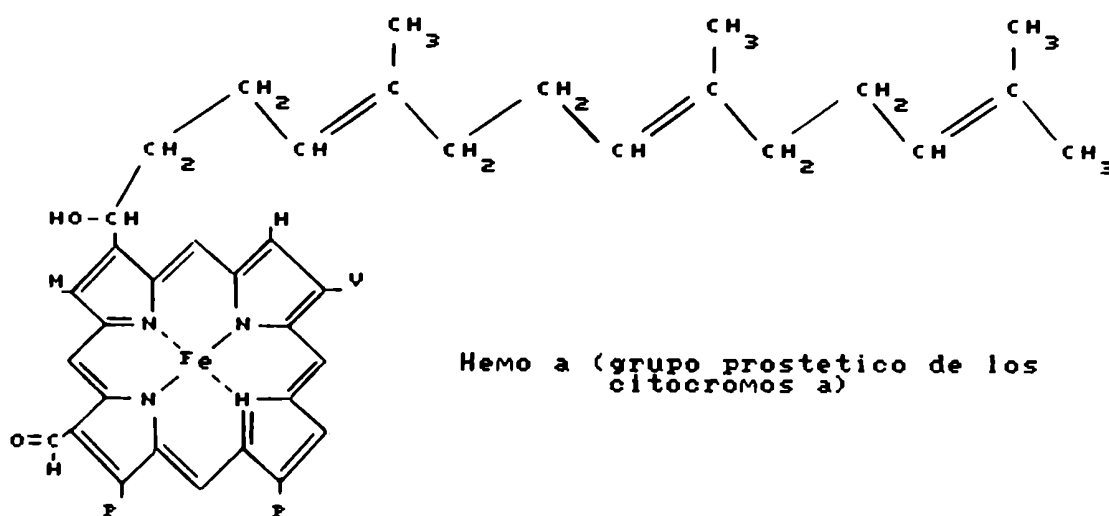
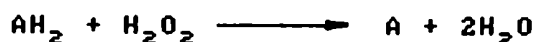


Figura 21: Clasificación y características de los citocromos.

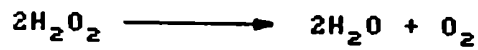
Las peroxidasas catalizan la oxidación de toda una serie de compuestos, por peróxido de hidrógeno:



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

Las catalasas son enzimas que catalizan la descomposición

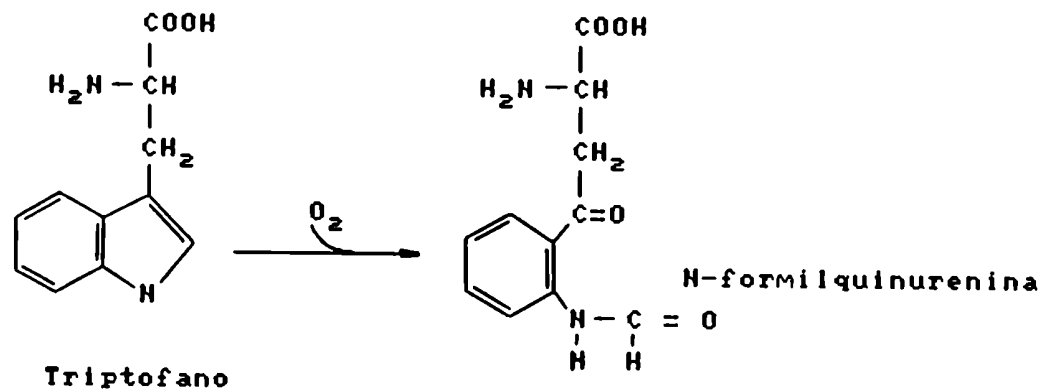
del peróxido de hidrógeno, de acuerdo con la siguiente ecuación:



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

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

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



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

Las clorofilas son los pigmentos fotosintéticos más importantes. En la actualidad se pueden distinguir por lo menos diez tipos de clorofilas (142,143), ampliamente distribuidos entre las plantas superiores, algas y bacterias fotosintéticas (Tabla 2). Los cloroplastos de todas las algas y plantas verdes superiores con

tienen dos clases de clorofila, una de las cuales es siempre la clorofila a, mientras que la segunda es variable (clorofila b, c, d o e), las bacterias fotosintéticas, en cambio, parecen contener un sólo tipo de bacterioclorofila.

Tabla 2: Tipos de clorofilas y distribución de las mismas.

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

Desde el punto de vista estructural, las distintas clorofilas difieren entre sí en los sustituyentes que posee el anillo porfirínico (Figura 22), en tanto que el anillo porfirínico de las clorofilas difiere del grupo hemo en los siguientes aspectos:

- a) El ión metálico coordinado con los cuatro átomos de nitrógeno centrales es magnesio, en lugar de hierro.

- b) El anillo D de todas las clorofilas está parcialmente reducido.
- c) El pirrol C tiene fusionado un anillo de ciclopentanona.
- d) El grupo vinilo de la posición 4 se encuentra reducido.
- e) No existen cadenas laterales ácidas, sino que están todas esterificadas. En particular, el resto propiónico ubicado en la posición 7 aparece siempre esterificado con alcoholes isoprenoides de cadena larga (farnesol o fitol), característica que le confiere liposolubilidad a la molécula.

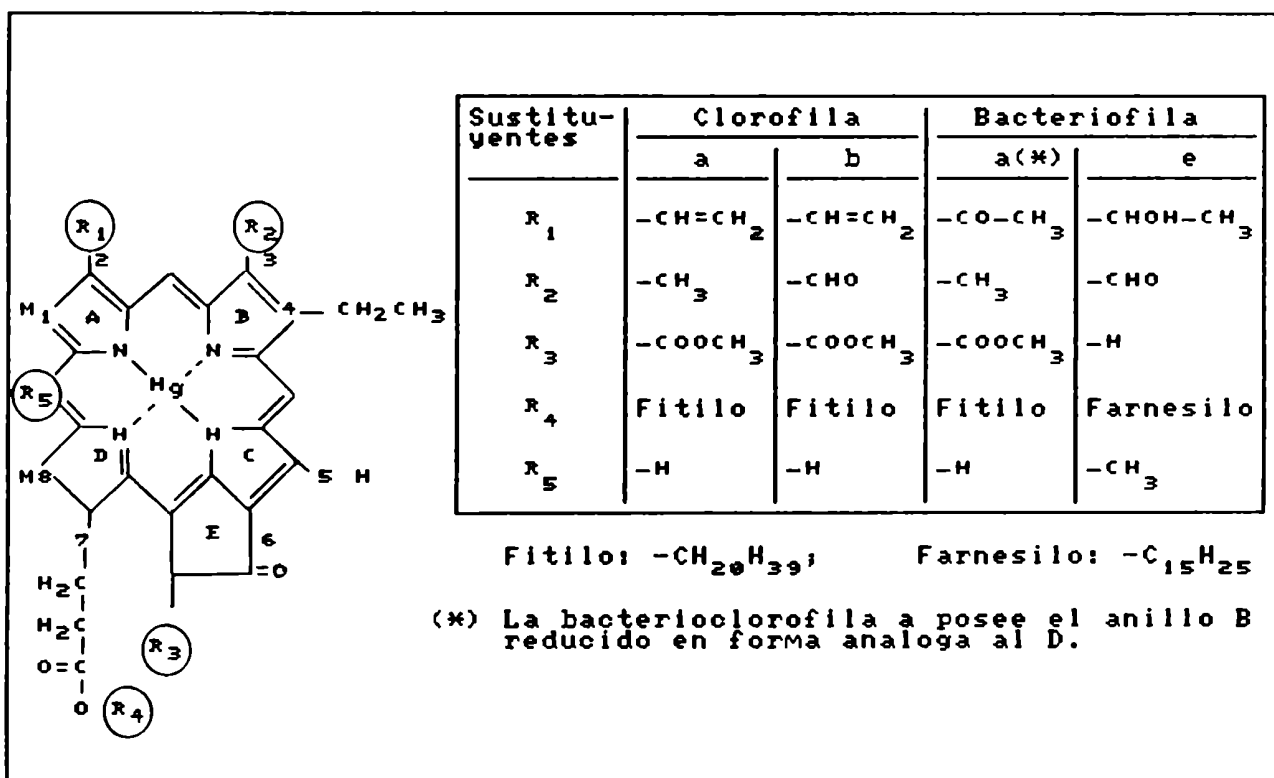


Figura 22: Estructura de las clorofilas.

Adaptado de Pfennig (144). Se describen las estructuras de las clorofilas a y b y bacterioclorofila a por ser las más abundantes y mejor conocidas; la bacterioclorofila e fue seleccionada con fines estrictamente comparativos.

El sistema conjugado de dobles enlaces de la unidad tetrapirrólica es el responsable del gran poder de absorción que presentan las clorofilas en la región visible del espectro. Debido a las

diferencias estructurales, anteriormente citadas, cada tipo de clorofila exhibe un espectro de absorción característico, que además varía según el solvente orgánico en el cual se halla extraído el pigmento. Todas las clorofilas in vivo están unidas a complejos lipoproteicos, de allí su notable solubilidad en solventes apolares.

3) Complejos con cobalto: la inserción de un átomo de cobalto (Co^{3+}) en el anillo corrínico (Figura 23 a) conduce a la formación de cobalaminas. Este grupo de compuestos comprende a la cianocobalamina o vitamina B_{12} y sus distintas coenzimas (5' desoxiadenosilcobalamina, metilcobalamina, hidroxicobalamina, etc).

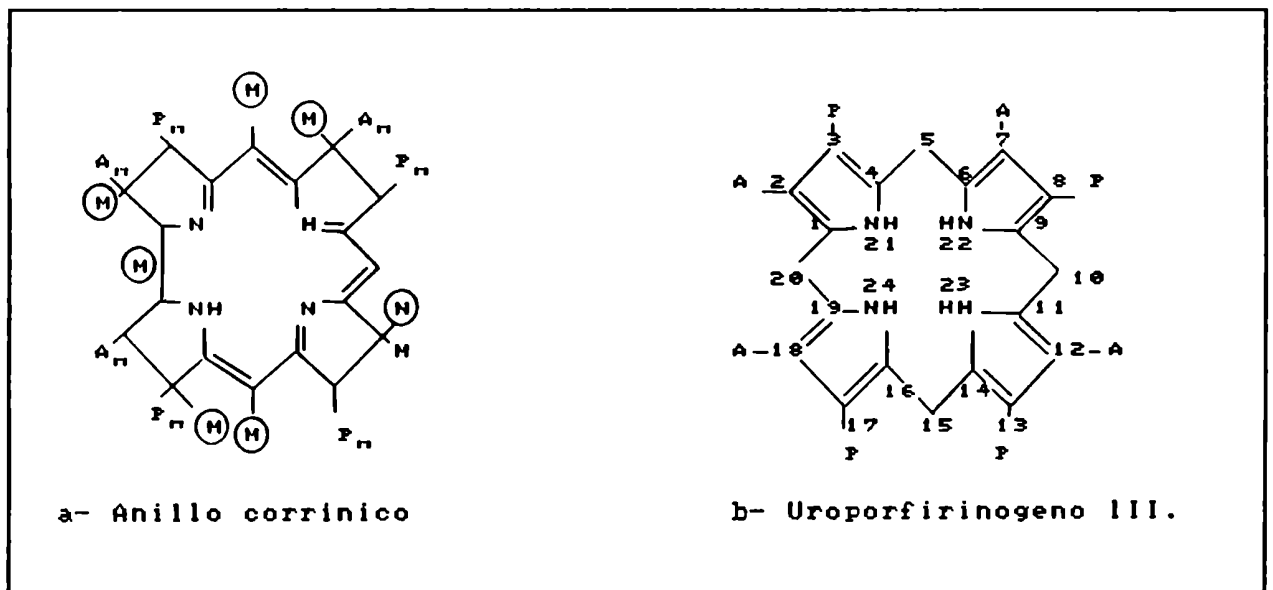


Figura 23: Estructura del anillo corrínico.

La nomenclatura utilizada para identificar los átomos del macrociclo corresponde a la aceptada por la IUPAC (3).

A: $-\text{CH}_2-\text{COOH}$; P: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$; A_n : $-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$
 P_n : $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$; M: $-\text{CH}_3$

El anillo corrínico, semejante al núcleo porfirínico, deriva del Urogen III (Figura 23 b) y para su conversión es necesario que ocurran las siguientes transformaciones (145):

- a) Introducción de 7 grupos metilo, provenientes de la S-adenosil-L-metionina, en los carbonos identificados con los núme

ros 1, 2, 5, 7, 12, 15 y 17.

- b) Decarboxilación de la cadena lateral acetato unida al carbono 12.
- c) Pérdida del átomo de carbono 20 y formación de un nuevo enlace entre el átomo de carbono 1 y 19.
- d) Reducciones en el macrociclo (equivalentes a cuatro electrones).
- e) Conversión de las cadenas laterales acetato y propionato en acetamida y propionamida, respectivamente.

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

Las diferentes cobalaminas surgen de los distintos grupos que ocupan la quinta y sexta posición de coordinación del cobalto. En la vitamina B_{12} y todos sus derivados (Figura 24), la estructura que se ubica por debajo del plano es siempre la misma, un ribonucleótido del 5,6-dimetilbencimidazol, mientras que el grupo que se ubica por encima del plano es variable y da origen al gran número de derivados de la vitamina B_{12} .

En cuanto a la función que desempeñan las cobalaminas la vitamina B_{12} es esencial para la normal maduración y desarrollo de los eritrocitos, la metilcobalamina actúa como transportador del grupo metilo; la 5-desoxiadenosilcobalamina funciona como cofactor de enzimas que catalizan reacciones de desplazamiento intramolecular (mutasas) e interviene como coenzima en la reducción de ribonucleótidos a desoxiribonucleótidos.

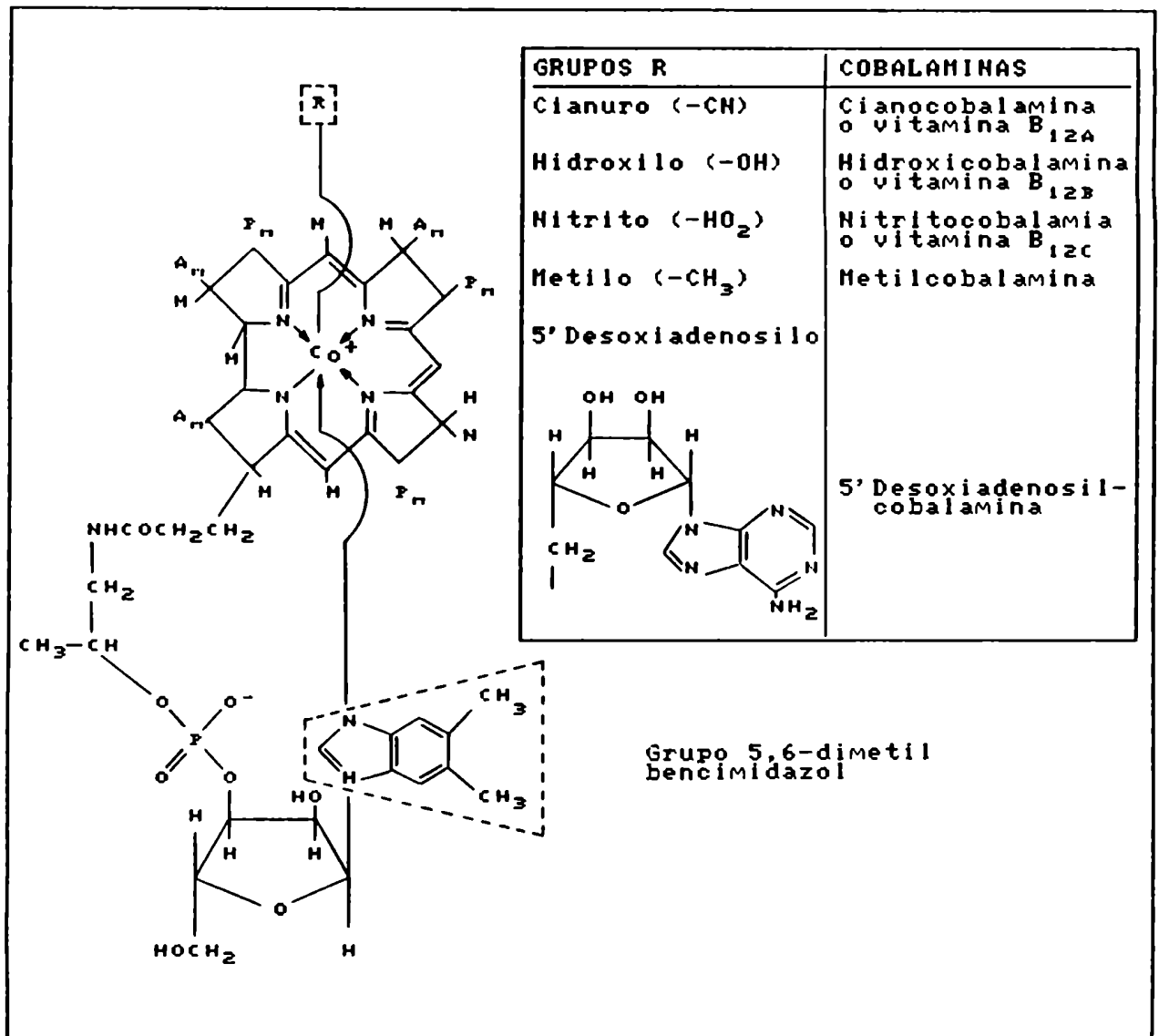


Figura 24: Vitamina B₁₂ y sus derivados.

4) Tetrapirroles de cadena abierta: Estos compuestos altamente coloreados se producen en la naturaleza por degradación del anillo porfirínico. Son ejemplos de tetrapirroles de cadena abierta los pigmentos biliares, biliverdina y bilirrubina (Figura 25 a y b), que provienen del catabolismo de la hemoglobina (146), y las ficobilinas, ficoeritrobilina y ficocianobilina (Figura 25 c y d), compuestos de color rojo y azul respectivamente, que actúan como

grupos prostéticos de la ficoeritrina y ficocianina, pigmentos accesorios de la fotosíntesis en la mayoría de las cianofíceas y rodofíceas (147).

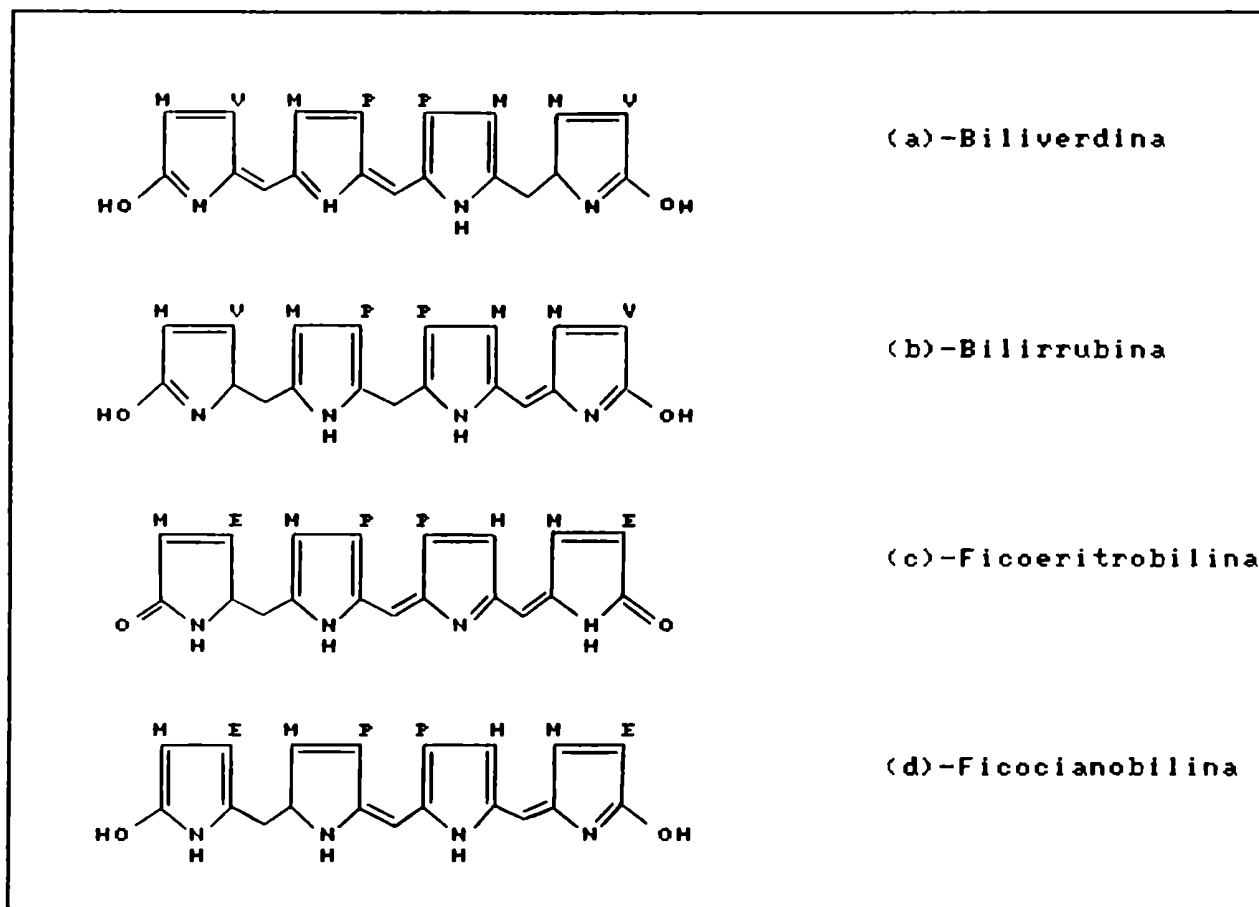


Figura 25: Estructuras de tetrapirroles de cadena abierta.
 Pigmentos biliares (a y b) y ficobilinas (c y d).
 M: $-\text{CH}_3$; U: $-\text{CH}=\text{CH}_2$; E: $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$; P: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$

CAPITULO IIREGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS

	Página
II.1 Mecanismos de control en la mayoría de los tejidos	47
A) Control por disponibilidad de sustrato (glicina).	47
B) Inhibición por producto (ALA).	47
C) Represión por producto final (hemo).	49
D) Inhibición por producto final (hemo).	49
E) Inducción por drogas porfirinogénicas.	49
F) Activación por trisulfocistina.	50
G) Control por constituyentes del medio ambiente o celular.	50
II.2 Aspectos regulatorios de la biosíntesis de hemoproteínas en <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .	52
II.2.1. El hemo como regulador de su propia síntesis.	52
II.2.2. El hemo como regulador de la síntesis de hemoproteínas.	53
A) Regulación a nivel transcripcional.	54
B) Control a nivel post-transcripcional.	54
C) Regulación a nivel de transporte y en samblamiento.	55

La naturaleza esencialmente dinámica de los seres vivos determina la existencia de mecanismos que aseguren un perfecto equilibrio entre las miles de reacciones metabólicas que tienen lugar en la célula. Este control se lleva a cabo a diferentes niveles y de variadas formas y de su coordinación depende el eficiente funcionamiento de una extraordinaria maquinaria regulatoria.

La biosíntesis de porfirinas se lleva a cabo con un alto grado de eficiencia, cuando fallan los mecanismos de control, la elevada concentración de precursores y/o intermediarios que puede alcanzarse, demuestran la capacidad potencial de funcionamiento de las enzimas del camino del hemo cuando actúan en forma descontrolada, y enfatizan además la existencia natural de una gran variedad de sistemas regulatorios que aseguran el equilibrio celular de acuerdo a las necesidades fisiológicas.

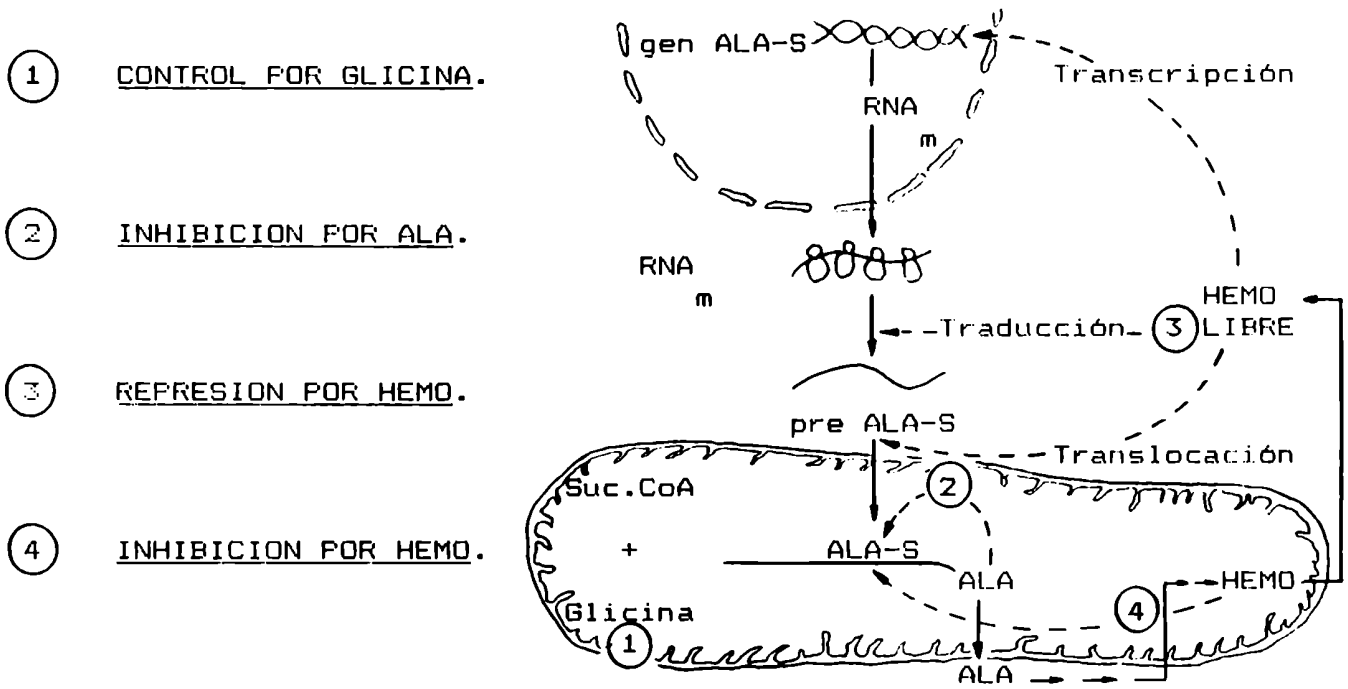
II.1 - Mecanismos de control en la mayoría de los tejidos.

En una gran variedad de fuentes el paso limitante de la biosíntesis de tetrapirroles, lo constituye la formación de ALA; por lo tanto, todo control que opere a nivel de síntesis de ALA servirá también para regular la cantidad de porfirinas formadas.

El ALA-S, enzima limitante en la mayoría de los tejidos, está sujeta a diferentes mecanismos de control (Figura 26), a saber:

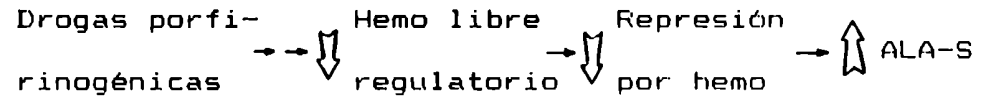
A) Control por disponibilidad de sustrato (glicina): Sabiendo que la concentración intracelular de glicina es del orden de 1 mM (148), y que el ALA-S presenta por este aminoácido una baja afinidad (K_m de 5 a 20 mM) se ha planteado la posibilidad de que la concentración de este sustrato constituya un factor limitante para la actividad de esta enzima. Esta hipótesis se ha confirmado observando que en ratas tratadas con ácido p-aminobenzoico o benzoato de sodio (compuestos que forman complejos conjugados con la glicina) se observa la reversión de la porfiria experimental inducida por DDC (149). En forma consistente con este resultado, la administración de glicina impide la reversión mencionada anteriormente.

B) Inhibición por producto (ALA): Se ha observado que tanto el ALA-S proveniente de Rhodopseudomonas spheroides (150) como de mitocondrias de médula ósea de conejo (26), se inhiben por ALA. Bottomley y Smithee (26) encontraron una inhibición del 20% para una concentración de ALA 0,025 mM, mientras que concentraciones mayores de 0,20 mM producen inhibición total.



5) INDUCCION POR DROGAS PORFIRINOGENICAS.

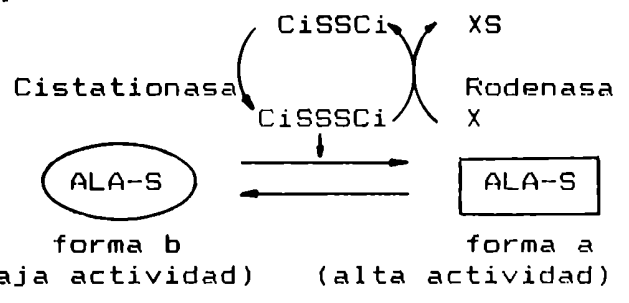
EN general:



6) ACTIVACION POR TRISULFOCISTINA.

Esquema postulado para el control del ALA-S en Rp. spheroides.

X: anión tiofílico
 CiSSCi: cistina
 CiSSSCi: trisulfocistina



7) CONTROL POR CONSTITUYENTES DEL MEDIO AMBIENTE CELULAR.

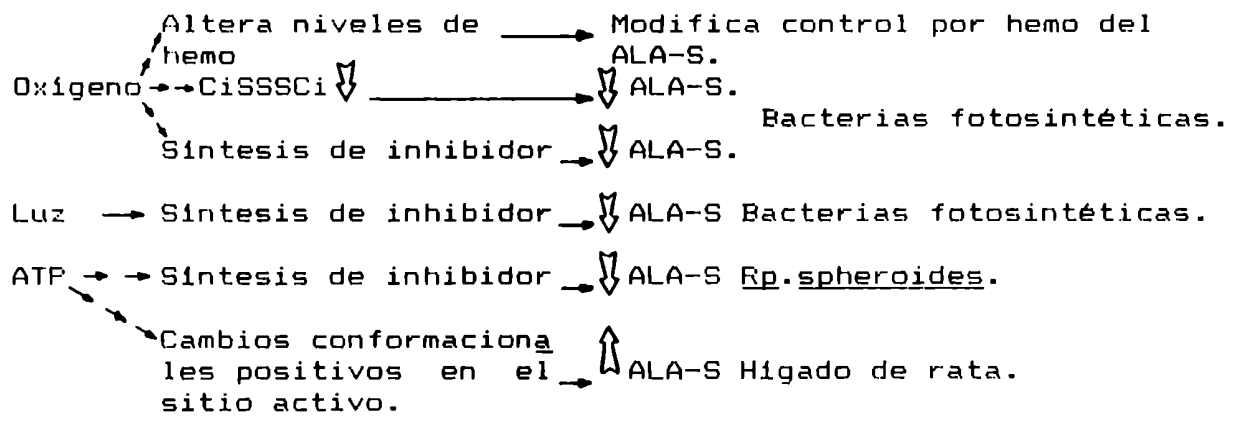


Figura 26 : Mecanismos de control que actúan sobre el ALA-S.

C) Represión por producto final (hemo): El hemo regula la expresión genética o síntesis de novo del ALA-S (23,24).

Como se indica en la Figura 26 el hemo como represor puede actuar a nivel de transcripción (37), traducción (151) y translocación de la enzima desde el citosol hacia la mitocondria (152, 153).

Este tipo de control se explica con mayor claridad asumiendo la existencia de un "pool" o reservorio de hemo libre, que tendría propiedades regulatorias y estaría localizado en el citosol. Dicho pool formado por el hemo recientemente sintetizado y por el hemo liberado de las hemoproteínas, debería ser pequeño y tener además una elevada velocidad de recambio (154).

D) Inhibición por producto final (hemo): Las concentraciones de hemo necesarias para reprimir la síntesis de ALA-S son del orden de $0,1\mu$ M, mientras que para actuar como inhibidor de la enzima ya formada se requieren concentraciones de alrededor de 10μ M (155). Estos datos sugieren que la inhibición por hemo es poco probable ya que la cantidad acumulada en la mitocondria no alcanza tales valores; sin embargo, la inhibición por producto final no puede descartarse totalmente dado que el ALA-S y el hemo se localizan en el mismo compartimento celular.

E) Inducción por drogas porfirinogénicas: Reciben el nombre de drogas porfirinogénicas todos aquellos compuestos capaces de inducir porfiria, es decir, de producir alteraciones a distintos niveles del camino biosintético de las porfirinas. Son ejemplos de tales compuestos el AIA, DDC, griseofulvina, fenobarbital, etc. Todas estas drogas tienen en común la propiedad de disminuir la concentra

ción del pool de hemo regulatorio ubicado en el citosol, ya sea por inhibición de la síntesis de hemo y/o aumento de su utilización o degradación (156,157). Independientemente del mecanismo por el cual actúen, al disminuir el contenido de hemo citosólico, disminuye el efecto del mismo como represor del ALA-S, produciéndose así una estimulación de la síntesis de esta enzima.

F) Activación por trisulfocistina: Empleando Rhodopseudomonas spheroides se demostró la regulación del ALA-S por trisulfocistina (158), un metabolito de bajo peso molecular capaz de interactuar directamente con la enzima, produciendo la conversión de una forma prácticamente inactiva (forma b) en otra de alta actividad (forma a). Considerando que el activador se sintetiza y se degrada in vivo por acción de la Cistationasa y Rodenasa respectivamente (Figura 26) se postula que las actividades relativas de estas dos enzimas serían las encargadas de limitar los niveles intracelulares de trisulfocistina, controlando así la actividad de ALA-S. Posteriormente se demostró que este mecanismo de regulación también opera en callos de soya (159) y en Rhodopseudomonas palustris (160), aunque en esta última fuente el mecanismo de acción propuesto difiere del esquematizado en la Figura 26. Apoyando la hipótesis anterior, Vázquez y col. (161) trabajando con eritrocitos humanos provenientes de pacientes porfíricos, encontraron una clara correlación entre una actividad disminuida de Rodenasa y aumentada de ALA-S.

G) Control por constituyentes del medio ambiente o celular:

- Oxígeno: La tensión de oxígeno y el estado de óxido-reducción de la célula influyen en forma diferencial sobre las distintas etapas del camino biosintético de las porfirinas. Así por

ejemplo, la transformación de coproporfirinógeno en protoporfirinógeno depende exclusivamente del oxígeno molecular, mientras que la inserción de hierro en la protoporfirina se ve favorecida por condiciones anaeróbicas. De este modo el oxígeno actuaría indirectamente sobre el ALA-S, por modificar la formación de producto final (hemo) y por ende la regulación que el mismo ejerce sobre esta enzima (162).

Estudios realizados en bacterias fotosintéticas demostraron que en estos organismos la acción inhibitoria del oxígeno sobre el ALA-S podía deberse tanto a una modificación en el metabolismo de sulfocompuestos que produce una disminución en el contenido celular de trisulfocistina como a la síntesis estimulada de un compuesto que posee propiedades inhibitorias (162).

- Illuminación: Trabajando con bacterias fotosintéticas se observó que una elevada intensidad luminosa, al igual que los aumentos de oxigenación, tenía un efecto inhibitorio sobre el ALA-S, de manera que se sugirió que en esta fuente los efectos de la luz y el oxígeno responderían a un mecanismo de control común, en el que probablemente también estaría involucrado el ATP (162).
- ATP: En cuanto al rol del ATP en la regulación del ALA-S existen evidencias que avalan dos comportamientos diferentes (162). En Rhodopseudomonas spheroides el ATP induciría la formación de un inhibidor de naturaleza proteica que actuaría inactivando la enzima mitocondrial, mientras que en hígado de rata, el ATP se uniría a un sitio alostérico del ALA-S citoplasmática provocando cambios conformacionales en los sitios de unión de los sustratos que lle

varían a una activación de la enzima.

Resumiendo, en bacterias fotosintéticas los resultados experimentales permiten postular que el efecto inhibitorio producido por altos niveles de oxígeno, iluminación y ATP se debería a la estimulación de la síntesis de un inhibidor (Figura 26).

II.2 - Aspectos regulatorios de la biosíntesis de hemoproteínas en Saccharomyces cerevisiae.

II.2.1. El hemo como regulador de su propia síntesis.

En levaduras, la regulación del camino biosintético del hemo parecería ser más compleja que la descrita anteriormente. Los resultados de Arrese y col (163) sugirieron que la producción de ALA no era limitante para la formación de hemo y citocromos; constituyéndose el ALA-D en la principal enzima regulatoria de la síntesis de tetrapirroles. Existen en la literatura evidencias experimentales que avalan esta última hipótesis sugiriendo que el ALA-D está sujeta a un control negativo por producto final (164) y a represión por glucosa (165,166).

Sin embargo, trabajos realizados con distintas mutantes hemo deficientes han indicado que si bien el ALA-S no era la enzima limitante, estaría aún sujeta a ciertos mecanismos de control, como ser inhibición por producto final (hemo) (167,168) y represión por glucosa (169). Keng y Guarente (170) demostraron que la expresión del gen que codifica para el ALA-S (HEM1) está regulado por el sistema HAP2-HAP3 (HAP = heme activator protein). El locus HAP2-HAP3 es inducido por hemo y de-reprimido cuando la célula de levadura se transfiere de un medio que contiene glucosa a otro que po-

see una fuente de carbono no fermentable. El sistema HAF2-HAF3 codifica una proteína que por unión al sitio UAS (upstream activator site) activa la transcripción de todos los genes involucrados en el metabolismo respiratorio (171,172).

Además de este sistema de activación se observó que el gen HEM1 está controlado por otras dos formas de regulación que actúan produciendo efectos opuestos (170). La primera de ellas es una activación a nivel de transcripción mediada por una proteína codificada por el gen HAF1 que se sintetiza cuando los niveles de hemo son bajos. El segundo tipo de control es negativo y contrarrestaría la represión que se produce en un medio de crecimiento con fuente de carbono no fermentable. Este complejo sistema de regulación debe existir con el fin de permitir que la expresión del gen HEM1 esté eficientemente coordinada con la de los apocitocromos cuando se produce el pasaje del metabolismo fermentativo al respiratorio y viceversa.

Para finalizar, resta mencionar a) el control negativo que ejercería el hemo y oxígeno a nivel de transcripción de la CPGasa (122) y b) la represión por glucosa sobre la expresión del gen HEM15 que codifica para la ferroquelatasa (138).

II.2.2. El hemo como regulador de la síntesis de hemoproteínas.

Como grupo prostético el hemo regula la biosíntesis, estructura y actividad de varias hemoproteínas ejerciendo su efecto a diferentes niveles. Existe en la literatura una amplia información acerca del rol que desempeña el hemo en la regulación de proteínas específicas en levaduras, fundamentalmente a nivel transcripcional, aunque también se han descrito ejemplos de control por hemo a nivel post-transcripcional y de transporte y ensamblamiento.

A) Regulación a nivel transcripcional

Como ya describimos, en levaduras, el hemo activa los genes nucleares HAP, los cuales codifican una proteína que a su vez, previa unión a los sitios UAS, activa la transcripción de genes estructurales. HAP1 a través del sitio UAS1 activa la transcripción de los genes: 1) CYC1 y CYC7 que codifican para el citocromo c iso-1 e iso-2 respectivamente (173, 174) y 2) CTT1 y CYT1 que codifican para la catalasa T y citocromo c₁ respectivamente (175).

La secuenciación del ADN que codifica para el HAP1 indica la presencia de tres dominios importantes, a uno de ellos se uniría directamente el hemo para activarlos (176).

El hemo puede también actuar como represor, por ejemplo del gen CYC7 y ANB1 (177,178). Este efecto lo ejerce induciendo la expresión del gen ROX1, que codifica un factor, que actúa reprimiendo la transcripción de los genes citados anteriormente.

Asimismo, el hemo regula la transcripción de la subunidad V (Va y Vb) de la citocromo oxidasa, activando la expresión del gen COX Va e inhibiendo la expresión del gen COX Vb. De esta forma controla que isoforma de la subunidad V estará disponible para su ensamblamiento en la citocromo c oxidasa, dependiendo de la tensión de oxígeno (179,180). La transcripción de la subunidad IV de esta enzima, codificada por el gen COX IV también es regulada por el hemo pero además influye la fuente de carbono (180).

En Saccharomyces cerevisiae el hemo, oxígeno y glucosa regulan los niveles intracelulares de las apoproteínas de las catalasas tipo T y A (181-183).

B) Control a nivel post-transcripcional

La regulación de la expresión genética a nivel transcrip-

cional parecía ser la más importante, tanto en organismos eucaróti-
cos como procarióticos. Sin embargo, evidencias experimentales in-
dican que el control a nivel post-transcripcional también cumpli-
ría un rol significativo como un mecanismo adicional de regulación
del nivel de los productos génicos finales. En S.cerevisiae, se ha
demostrado que el hemo también controla a nivel post-transcripcio-
nal, la síntesis de catalasa tipo T y A (184,185).

C) Regulación a nivel de transporte y ensamblamiento.

Como un regulador positivo, el hemo está involucrado en el
procesamiento y maduración del citocromo c, en levaduras. En una
primera etapa, el producto primario de traslación sintetizado so-
bre los polisomas libres, con un peso molecular de 37 KD, es proce-
sado a la proteína madura de 31 KD. Luego, en una segunda etapa,
que es hemo-dependiente, esta proteína se ubica sobre la superfi-
cie externa de la membrana mitocondrial interna. Un procesamiento
similar ha sido descrito para el citocromo b₂ y la citocromo c pe-
roxidasa (186).

Independientemente, se ha reportado que el hemo a (Figura
21) o alguno de sus precursores, controla el ensamblamiento de las
siete subunidades que conforman la citocromo c oxidasa (187).

En todos estos casos, el hemo actuaría, o bien directamen-
te como un componente estructural que protege selectivamente a las
distintas apoproteínas de la acción degradativa de las proteasas,
o alternativamente podría inhibir directamente a proteasas, DNA y
RNA polimerasas y nucleasas (188).

**ALTERACIONES EN EL CAMINO METABOLICO DEL HEMO: PORFIRIAS HUMANAS Y
EXPERIMENTALES**

	Página
III.1 Porfirias humanas. Descripción, clasificación y naturaleza enzimopatológica.	57
III.2 Porfirias experimentales.	60
III.2.1. Introducción	60
III.2.2. Mecanismo de acción de los compuestos porfirinogénicos.	63

III.1 - Porfirias humanas. Descripción, clasificación y naturaleza enzimopatológica.

Las porfirias son un grupo heterogéneo de enfermedades, hereditarias o adquiridas, que resultan de la existencia de disturbios en el camino metabólico del hemo. Están asociadas a deficiencias enzimáticas específicas y se caracterizan por presentar sobreproducción o acumulación y excreción de porfirinas y/o precursores.

Dependiendo de que el error metabólico que las origina se exprese, fundamentalmente, en hígado o médula ósea, las porfirias pueden clasificarse en hepáticas y eritropoyéticas, aunque existen casos en los que se evidencia la participación de ambos órganos (Tabla 3). Considerando en cambio la sintomatología clínica asociada con esta patología, las porfirias se dividen en cutáneas, agudas y mixtas (Tabla 4). Según se observa, la sobreproducción de porfirinas es responsable, en las porfirias cutáneas, de la sensibilidad a la luz; mientras que la presencia de precursores, ALA y PBG, da origen a los típicos ataques de agudos dolores abdominales, cefaleas, vómitos, parálisis y manifestaciones psiquiátricas. Cuando tanto porfirinas como precursores se producen y excretan en exceso, estamos frente a síntomas agudos y cutáneos, y la porfiria resultante se denomina mixta.

Las posibles vías de excreción de las porfirinas y precursores acumulados son dos, orina y heces; la elección de una u otra vía depende de la solubilidad de estos compuestos. El ALA, PBG y las porfirinas más carboxiladas se eliminan por orina, mientras que las menos carboxiladas aparecen en materia fecal.

En los últimos 20 años el estudio de las porfirias ha en

trado en una etapa genético-enzimológica, y un mejor conocimiento del camino normal del hemo y las enzimas involucradas, ha provisto las bases para demostrar que la superproducción o acumulación de porfirinas y/o precursores, observada en cada clase de porfiria se debe en general a la suma de errores enzimáticos que se producen a dos niveles: primario y secundario (Figura 27). El defecto enzimático primario (genético o adquirido) se debe a un bloqueo o inhibición específico para cada tipo de porfiria, de alguna de las enzimas del camino metabólico del hemo. El defecto enzimático secundario es común a todas ellas y consiste en un aumento de actividad del ALA-S, a causa de una falla en el sistema regulador de su actividad, no funcionan los mecanismos de inhibición y/o represión por producto final (hemo) (Figura 26).

El conocimiento de estos defectos enzimáticos primarios y secundarios, permitieron explicar los distintos patrones y características bioquímicas asociadas a las diferentes porfirias.

Resumiendo, cada tipo de porfiria es el resultado de una deficiencia enzimática parcial primaria de algunas de las enzimas del camino del hemo, esto origina un patrón específico de acumulación y excreción de intermediarios que refleja justamente la sobreproducción del sustrato de la enzima deficiente.

La identificación y cuantificación de los diversos sustratos y/o intermediarios relacionados en sangre, orina y heces y la medición de la actividad de la enzima defectuosa constituye las bases para el diagnóstico médico y diferenciación de las porfirias en el laboratorio.

TABLA 3: Clasificación de las porfirias segun el organo en el cual se expresan.

Tipo de porfiria	Variedades
Eritropoyéticas.	Porfiria Congénita Eritropoyética (FCE). Protoporfiria Eritropoyética. (PFE). Coproporfiria Eritropoyética (CPE).
Hepáticas.	Porfiria Aguda Intermitente (FAI). Porfiria Variegata o Mixta (PV). Coproporfiria Hereditaria (CPH). Harderoporfiria (HP). Nueva Porfiria Aguda (NPA). Porfiria Cutánea Tarda Sintomática (PCT).
Hepatoeritropoyéticas.	Porfiria Hepatoeritropoyética o doble (PHE).

Tabla 4: Clasificación de las porfirias segun su sintomatología.

Tipo de porfirias	Sintomatología	Metabolitos detectados	Variedades detectadas
Cutáneas.	Fotosensibilidad.	Acumulación de porfirinas.	PCE PFE CPE PCT PHE
Agudas.	Síndrome neuro-abdominal.	Acumulación de ALA y PBG.	FAI NPA
Mixtas.	Síntomas de las porfirias agudas y cutáneas.	Acumulación de ALA, PBG y porfirinas.	PV CPH HP

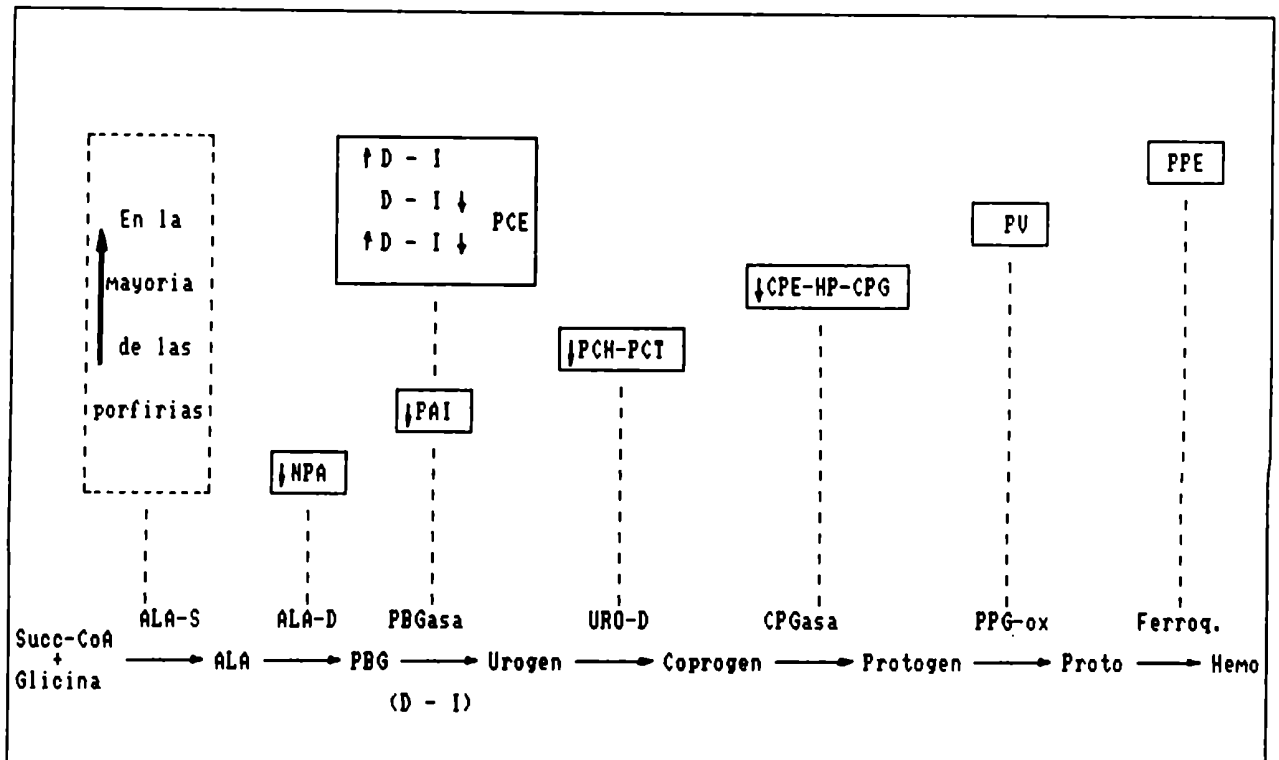


Figura 27: Alteraciones enzimáticas en las porfirias.

↑ aumento; ↓ disminución; D-I: Deaminasa-Isomerasa; (□): defectos enzimáticos primarios; (▤): defectos enzimáticos secundarios. Para el caso de la PCE se esquematizan los tres modelos postulados.

III.2 - Porfirias experimentales.

III.2.1. Introducción.

Se conoce hoy un gran número de compuestos, algunos de ellos presentes en el medio ambiente como contaminantes y otros empleados como drogas terapéuticas en el hombre, que son capaces de producir una variedad de interferencias en el camino metabólico del hemo. Estos agentes pueden estimular la formación de porfirinógenos y/o sus precursores ALA y PBG, que se acumulan y excretan dando lugar a un cuadro bioquímico que se asimila a una porfiria.

Mientras que pequeñas dosis de estas drogas, en caso de porfirias hepáticas, son capaces de inducir un ataque de porfiria en pacientes portadores de la falla hereditaria, se ha encontrado

que dosis mucho mayores de las mismas producen desórdenes en el metabolismo del hemo en individuos normales. Este fenómeno de inducción por drogas también puede observarse en animales de experimentación y aún en determinados tipos de cultivos de tejidos y de células. Cuando esta clase de desórdenes del metabolismo del hemo se producen en humanos se las denomina "porfirias adquiridas", o más genéricamente "porfirias experimentales", en particular cuando no se refiere a humanos.

El desarrollo de las porfirias experimentales ha provisto de importantes y convenientes modelos para el estudio de las porfirias humanas, contribuyendo al esclarecimiento de los mecanismos bioquímicos que las caracterizan.

Es de destacar que la evolución del estudio de las porfirias experimental y humana han sido paralelos en el tiempo, aunque en la mayoría de los casos fueron observaciones clínicas en humanos las que precedieron y estimularon las primeras investigaciones sobre la acción de drogas en animales de experimentación.

Con la introducción en la terapia humana a fines del siglo pasado, de hipnóticos y barbitúricos (sulfonal, sedormid) se hizo evidente que cantidades relativamente pequeñas de estas drogas podían precipitar ataques agudos, a veces fatales, en individuos con porfiria hereditaria clínicamente latente y asintomática. La incidencia de porfiria en pacientes tratados con este tipo de drogas resultó ser demasiado elevado, haciéndose evidente entonces que individuos sanos también eran afectados por estos compuestos. Este fue un aspecto muy importante en la investigación de las porfirias inducidas, por cuanto planteó la cuestión acerca de si era necesaria o no la existencia de un defecto genético para el desencadenamiento de la sintomatología de una porfiria.

La era moderna de la porfiria experimental, cobró gran impulso cuando se observó que la administración de sedormid duran

te varios días consecutivos a conejos normales, producía un gran incremento en la excreción urinaria de PBG y uroporfirina, además de su acumulación en el hígado, en tanto que sus concentraciones en sangre y médula ósea eran normales. El cuadro era claramente compatible con el de una porfiria hepática, similar al de la aguda intermitente. A este hallazgo, siguió un período de rica investigación en esta área que permitió establecer el importante rol que juega la actividad del ALA-S en la inducción de una porfiria hepática por ciertas drogas.

Hoy se conoce una extensa lista de drogas porfirinogénicas (Tabla 5), que son capaces de provocar una porfiria aún en ausencia de una falla genética, produciendo anormalidades metabólicas similares a las observadas durante el ataque agudo de las porfirias hereditarias humanas.

Tabla 5: Agentes porfirinogénicos y las porfirias humanas que producen.

Inductor	Signos bioquímicos	Mecanismo	Porfiria humana
AIA (conejos, ratas, ratones).	ALA ↑, PBG ↑	Aumento degradación de hemo.	FAI (a)
AIA + glicerina (ratones).	ALA ↑, PBG ↑, porfirinas ↑.	Inhibición Deaminasa de glóbulos rojos.	FAI
DDC (conejos).	Proto IX ↑(hígado heces).	Inhibición Ferroquelatasa.	Pv
DDC (ratones).	Proto IX ↑(hígado heces y sangre).	Inhibición Ferroquelatasa.	PPE (b)
Griseofulvina (ratones)	Proto IX ↑(hígado)	Inhibición Ferroquelatasa.	PV
HCB (conejos, ratones, aves).	Uro ↑	Inhibición Urogen decarboxilasa.	PCT
Fenilhidrazina+ Pb+U.V.(ratones)	Uro I ↑ (médula).		PCE (c)

(a), (b), (c): no se ha demostrado la inhibición de las enzimas PBG-Deaminasa, Protogen-oxidasa ni Isomerasa, respectivamente.

III.2.2. Mecanismos de acción de los compuestos porfirinogénicos.

Todos los compuestos porfirinogénicos tienen en común, para ejercer su efecto, la propiedad de disminuir el contenido de hemo del pool regulatorio, produciendo consecuentemente una estimulación de la actividad del ALA-S.

Hay dos condiciones experimentales bajo las cuales se puede afectar el balance de hemo celular (Figura 28):

a) Inhibición de la síntesis del hemo: Las drogas porfirinogénicas o bien sus metabolitos actúan directamente bloqueando la actividad de alguna de las enzimas que conducen a la biosíntesis del hemo. Compuestos como el 3,5-dicarbetoxi-1,4-dihidrocolidina (DDC) o la griseofulvina causan una rápida inhibición de la ferroquelatasa. Los animales tratados con DDC o griseofulvina acumulan en el hígado un pigmento verde, identificado como una N-metil protoporfirina IX que inhibe fuertemente a la ferroquelatasa por unión al sitio activo. Los hidrocarburos aromáticos polihalogenados como el hexaclorobenceno (HCB) inducen una porfiria hepática crónica con acumulación principalmente de uroporfirina, a consecuencia de la inhibición de la Uro-D.

b) Aumento en la degradación o utilización del hemo: Ciertos compuestos químicos como la alil-isopropil-acetamida (AIA) y varios compuestos insaturados relacionados (derivados acetilénicos) provocan la pérdida de citocromo P450 como consecuencia de la destrucción de su grupo prostético hemo, el cual puede convertirse en porfirinas N-alquiladas (pigmentos verdes diferentes a los producidos por el DDC o griseofulvina). Posteriormente se demostró que este tipo de inductores no saturados, mediante una reacción dependiente del citocromo P450, eran convertidos primeramente, en derivados monooxigenados, los cuales se encargaban luego de alquilar

uno de los nitrógenos del grupo prostético del citocromo, originando la porfirina N-alquilada. Por cuanto el citocromo P450 es tanto el iniciador como el blanco de la respuesta al tóxico, la conversión de su componente hemo se considera como una típica reacción de inactivación suicida o síntesis letal. Existe una clara correlación entre la caída del citocromo P450 y contenido hepático de hemo causado por el AIA, pero la apoproteína del citocromo P450 aparentemente no es dañada, ya que, los niveles disminuidos del citocromo P450 y su actividad de hidrolasa pueden recuperarse por la administración exógena de hemina.

Por otro lado, el fenobarbital y los compuestos relacionados, también reducen la concentración de hemo libre regulatorio, aunque por incremento de la síntesis de apocitocromo P450.

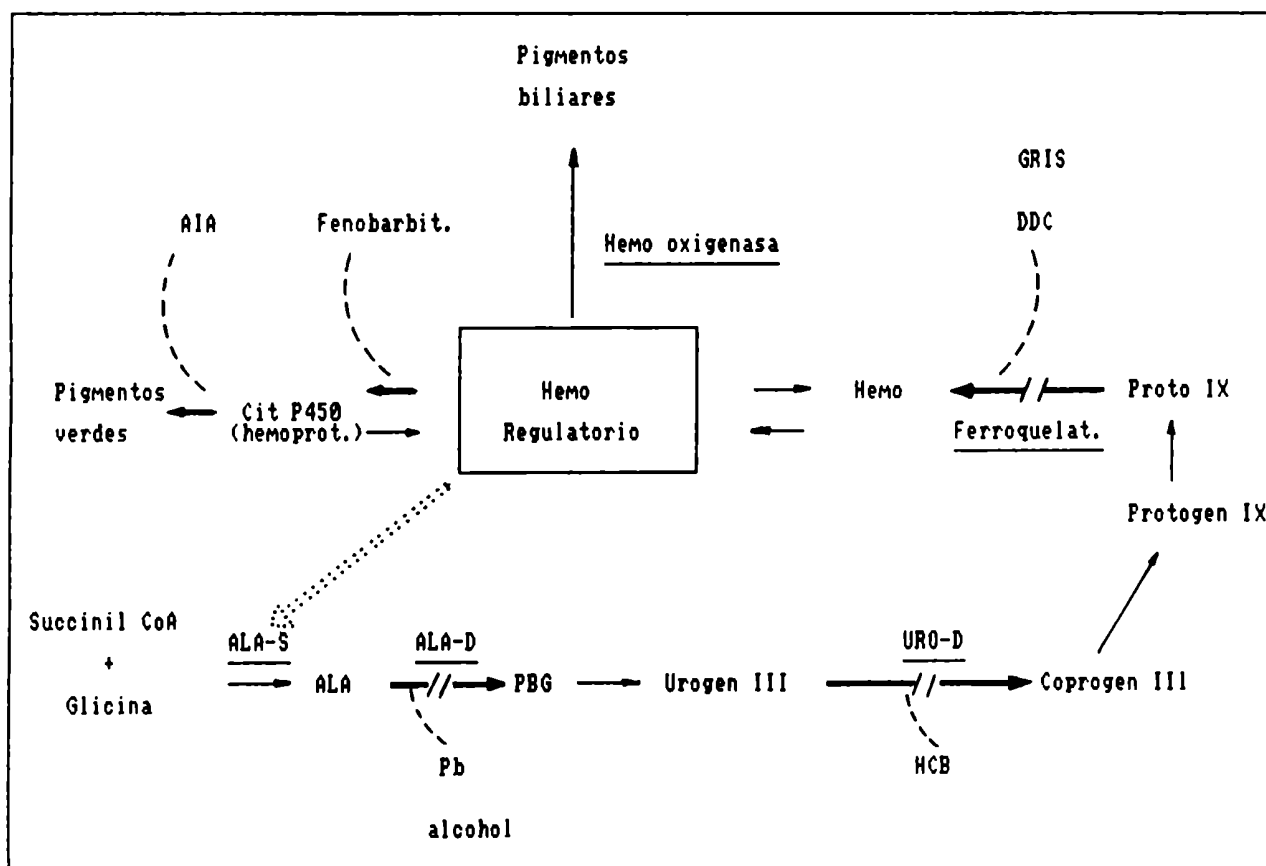


Figura 28: Esquema del camino metabólico del hemo.

Se indica el control negativo (---) por retroinhibición (RI) y/o represión (R) sobre el ALA-S por el hemo, su utilización para la síntesis de hemoproteínas como por ejemplo el cit P450 y su degradación a pigmentos biliares. Se señalan además los sitios de acción de algunos compuestos porfirinogénicos (-).

CAPITULO IVOBJETIVO Y FUENTE EXPERIMENTAL EMPLEADA

	Página
IV.1	Objetivos. 66
IV.2	Fuente experimental empleada: <u>S.cerevisiae</u> . 67
	IV.2.1. Características morfofisiológicas esenciales. 67
	IV.2.2. Mutantes deficientes en la biosíntesis de hemoproteínas. 72
	A) Mutantes deficientes en el metabolismo respiratorio. 72
	B) Mutantes deficientes en la síntesis de lípidos. 74
	C) Mutantes deficientes en catalasa. 76
	D) Mutantes deficientes en citocromo oxidasa. 77
	E) Mutantes resistentes a la represión por catabolito. 78
	F) Otras características útiles para el aislamiento de mutantes. 78

Dada la importancia de los modelos experimentales para el estudio de los distintos tipos de porfiria, el objetivo general de este trabajo ha sido evaluar si las características de una cepa hemodeficiente de S. cerevisiae coincidía con el patrón ya establecido de algún tipo de porfiria humana.

Trabajamos con dos cepas de esta levadura, una salvaje (D273-10B) y su mutante (B231). Esta última se caracteriza por acumular intracelularmente ALA y porfirinas, excretando al medio de crecimiento cantidades significativas de ALA.

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

IV.1 - Objetivos.

Empleando las cepas D273-10B y B231 de Saccharomyces cerevisiae, nuestros objetivos fueron:

- * Establecer en forma comparativa las diferencias más notorias entre ambas cepas respecto a la acumulación de metabolitos y actividades enzimáticas alteradas del camino biosintético de las porfirinas.
- * Orientar el trabajo hacia el estudio de una de las enzimas afectadas por la mutación, la Porfobilinogenasa, para cumplir este objetivo fue necesario:

Determinar las condiciones óptimas para medir la actividad de esta enzima.

Llevar a cabo la caracterización analizando la cinética de la reacción y el comportamiento de la PBGasa frente a determinados tratamientos, como ser, variaciones de pH, de fuerza iónica, de temperatura, acción de agentes precipitantes de proteínas (sulfato de protamina), estabilidad enzimática y cromatografía a través de una columna de tamices moleculares.

- * Correlacionar los niveles de metabolitos acumulados y actividades de ALA-S y ALA-D con el fin de postular posibles modos de regulación del camino biosintético del hemo en levaduras.
- * En base a la caracterización bioquímica de la cepa mutante, evaluar si existe similitud con el patrón característico de algún tipo de porfiria humana. De obtener un resultado positivo se propondría a la cepa B231 como modelo experimental de porfiria.

IV.2 - Fuente experimental empleada: Saccharomyces cerevisiae.

IV.2.1. Características morfofisiológicas esenciales.

A continuación daremos una breve reseña de las características más salientes de Saccharomyces cerevisiae (Figura 29). La bibliografía consultada corresponde a las referencias 189 a 192.

- Es un microorganismo eucariote unicelular, particularmente abundante en los sustratos que contienen azúcares tales como el néctar de las flores y la superficie de los frutos.

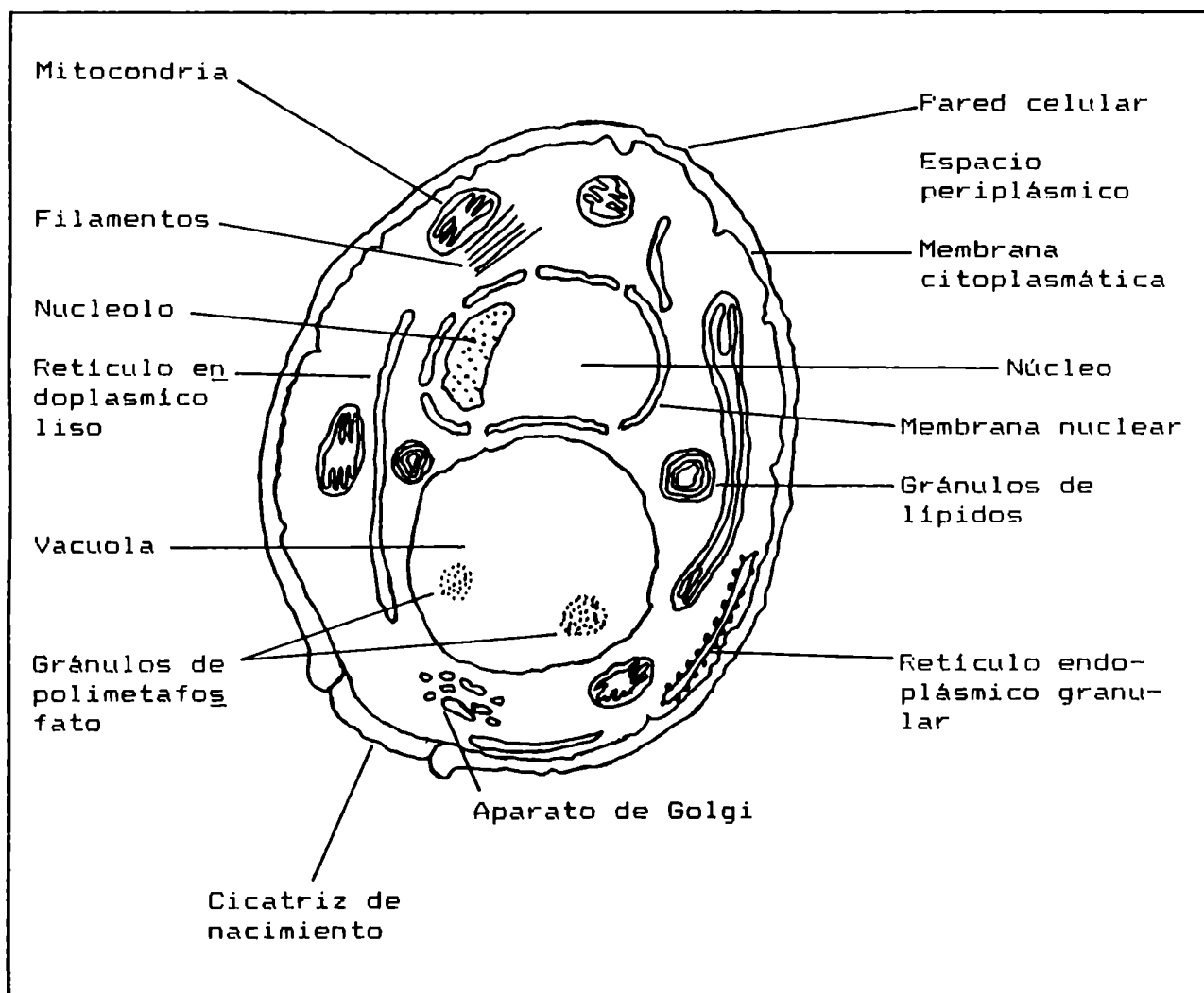


Figura 29: Esquema de una célula de Saccharomyces cerevisiae.

- Crecen en forma aeróbica facultativa. En condiciones anaeróbicas pueden fermentar glucosa y otros carbohidratos mientras que aeróbicamente utilizan varias fuentes de carbono, que metabolizan mediante el ciclo de Krebs.

Las células presentan forma esférica u oval con un diámetro aproximado de 3 a 5 μm .

- Observadas individualmente, las células de las levaduras parecen incoloras, pero cultivadas en medio sólido, producen colonias que pueden ser blancas o de color crema.

- En la superficie celular se distinguen tres cubiertas que de afuera hacia adentro se disponen en el siguiente orden: en primer lugar aparece una capa de mucus luego encontramos la pared celular y por último la membrana plasmática, que responde a la definición de unidad de membrana.

- La capa de mucus o cápsula le confiere a la célula un mayor tamaño y la hace más resistente a la fagocitosis por otras células animales.

- La pared celular está constituida por un complejo polímero heterogéneo que contiene: glucano ("celulosa" de la levadura), manano ("goma" de la levadura), quitina, proteínas, lípidos y grupos fosfatos. Los numerosos enlaces que se establecen entre estos constituyentes originan una estructura muy resistente, con poros muy pequeños.

- La función de la pared celular es conferir estabilidad mecánica y forma a las células, representando un filtro que sólo permite la difusión de micromoléculas. Distintas enzimas extracelulares como ser invertasa, melibiasa, glucamilasa y amilopeptidasa permiten la utilización de diferentes fuentes de carbono. La fosfatasa ácida posibilita la asimilación de varios ésteres de fosfato.

- El espacio comprendido entre la pared celular y la mem

brana citoplasmática se denomina espacio periplásmico; en el se localizan varias enzimas digestivas que actúan sobre sustratos que requieren hidrólisis previa antes de ser incorporados al citoplasma.

- La membrana plasmática está compuesta por lípidos (fosfolípidos), proteínas y polisacáridos; la hidrólisis del polisacárido rinde únicamente manosa. Las funciones de esta membrana son:

- a) participar en la captación de distintas nutrientes presentes en el medio, como iones, azúcares, aminoácidos y vitaminas.
- b) controlar la liberación de etanol y una variedad de otros compuestos que son excretados al medio durante la fermentación.
- c) permitir el pasaje de precursores y aún de macromoléculas (tales como exoenzimas) que se utilizan para la formación de la pared celular.

- En cuanto a su citología la levadura presenta la estructura de una célula eucariótica típica, similar a la de animales y plantas superiores. Poseen un núcleo visible pero pequeño con una membrana nuclear bien definida y una gran vacuola con gránulos de polimetafosfato, que ocupa gran parte del citoplasma. Todas las otras organelas presentan las características propias de la célula eucariótica.

- Las células de Saccharomyces cerevisiae presentan reproducción asexual, por gemación, y sexual por conjugación seguida por meiosis y formación de ascosporas.

- El ciclo de gemación de una levadura típica se muestra en la (Figura 30), contrariamente al desarrollo hifal en este caso la síntesis de ADN y la división nuclear se producen en

forma sincronizada. Por microscopía electrónica se hizo evidente sobre la pared de la célula hija, en uno de los polos, la cicatriz de nacimiento (cóncava), mientras que la célula madre posee la cicatriz de gemación (convexa).

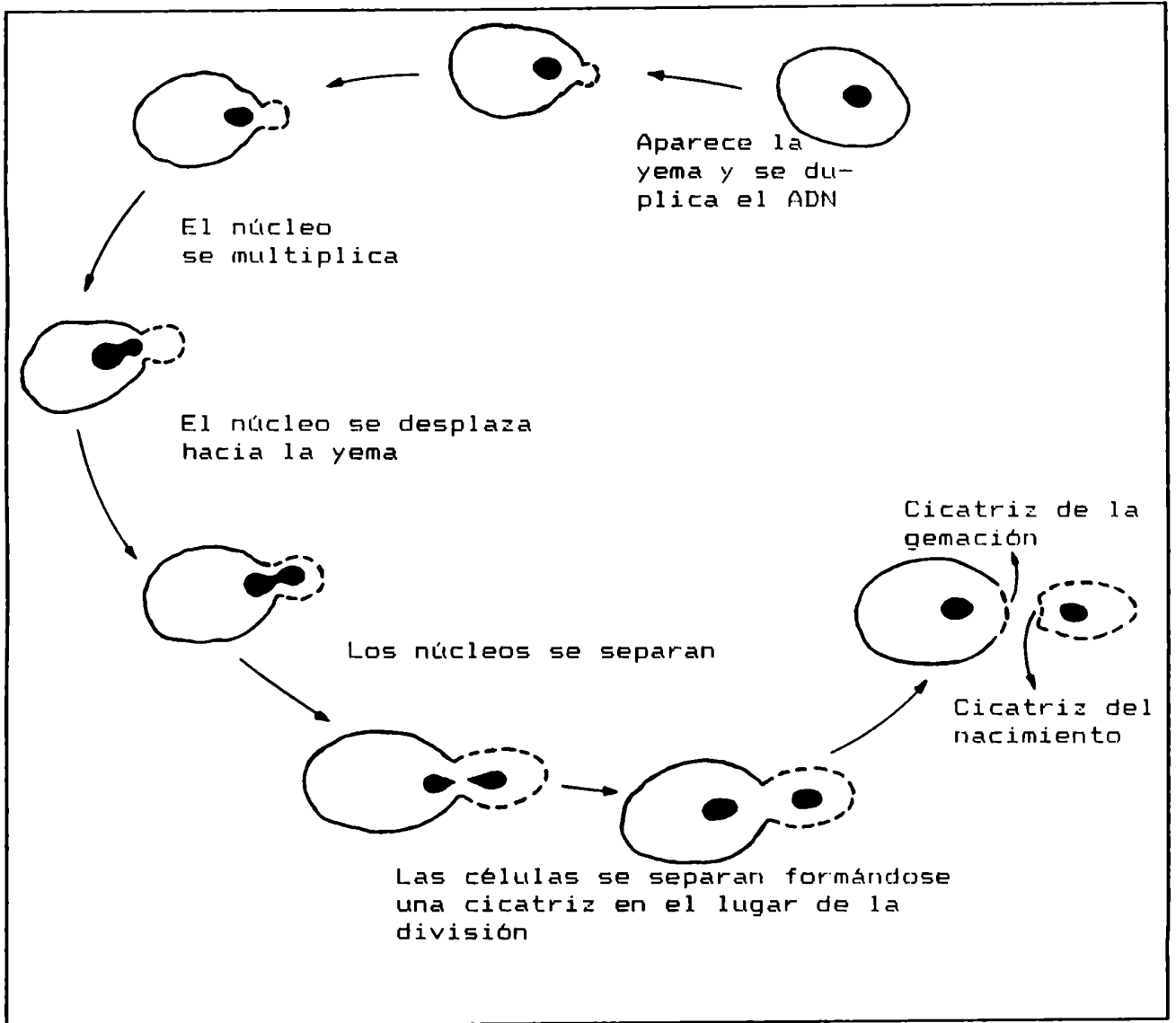


Figura 30: Ciclo de división celular de la levadura Saccharomyces cerevisiae.

El ciclo sexual (Figura 31) comienza con la fusión de dos células vegetativas de tipo opuestos de apareamiento, que originan una célula diploide. En condiciones adecuadas (por ejemplo en medio acetato relativamente deficiente en una fuente de nitrógeno), el núcleo de la célula diploide puede sufrir me

iosis conduciendo a la formación de ascosporas generalmente en número de cuatro, que son retenidas dentro de la pared de la célula diploide original ahora denominada asco. Cada una de las cuatro ascosporas de un sólo asco, pueden retirarse y hacerse germinar produciendo clones vegetativos haploides. La célula diploide es capaz por sí misma de desarrollarse vegetativamente durante muchas generaciones de modo que pueden tener existencias independientes tanto la fase haploide como la diploide.

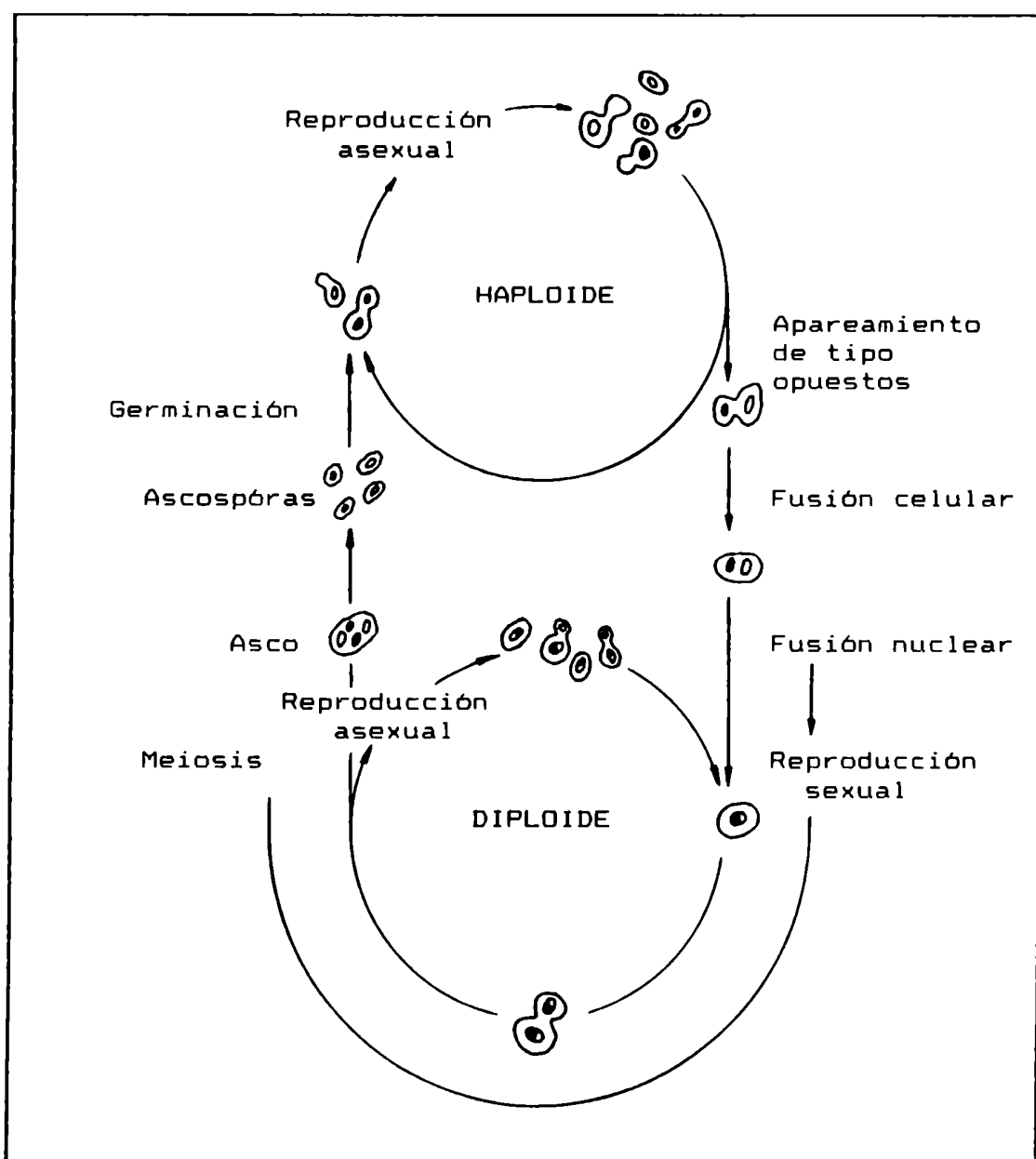


Figura 31: Ciclo de vida de una levadura típica, *Saccharomyces cerevisiae*.

- Los acontecimientos celulares de la fusión durante la conjugación sexual de las levaduras son marcadamente diferentes a las de las bacterias. En las levaduras ambas células participan activa e independientemente en el proceso, se fusionan y pierden su identidad, mientras que en las bacterias una célula es activa y otra pasiva, conservando cada una su identidad y continuando ambas sus funciones después.

- El número de cromosomas en Saccharomyces cerevisiae es de 16 en la célula haploide y 32 en la diploide.

IV.2.2. Mutantes deficientes en la biosíntesis de hemoproteínas.

Como ya describiéramos (Capítulo I) el hemo constituye el grupo prostético de una serie de hemoproteínas: citocromos respiratorios ($a + a_3$, b , c , c_1) ; citocromos microsomales (b_5 y P450), involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides); diversas enzimas como catalasa, citocromo oxidasa, etc.

En levaduras, el hemo cumple también un rol muy importante en la expresión de las enzimas de la cadena respiratoria.

A continuación daremos una somera descripción de las distintas mutantes bloqueadas en la biosíntesis de hemoproteínas, que han sido descritas en la literatura. Las agruparemos en base a la deficiencia primaria que llevó a su aislamiento y caracterización.

A) Mutantes deficientes en el metabolismo respiratorio.

Las levaduras obtienen la energía necesaria para vivir a partir de los procesos respiratorio o fermentativo. En determina

das condiciones, pueden perder la capacidad respiratoria pero continúa su desarrollo a expensas del metabolismo fermentativo. Dicha pérdida tiene un origen genético y se puede transmitir a través de ambos tipos de reproducción, sexual o vegetativa. Estas células deficientes en el metabolismo respiratorio (RD) integran una clase de mutantes que difieren de la levadura normal en sus características morfológicas, fisiológicas y enzimáticas.

Una mutante RD es menos eficiente, en la utilización de los azúcares, que la levadura normal y por lo tanto su crecimiento es más lento dando origen a colonias más pequeñas (petite).

Desde el punto de vista genético se han descrito dos tipos de mutantes RD: vegetativa y segregacional. Las primeras se caracterizan por la pérdida del factor citoplasmático (P) requerido para el desarrollo del sistema respiratorio. Este factor P (codificado por el ADN mitocondrial) es autónomo en su replicación pero dependiente del genoma nuclear para su función (193). Las mutantes vegetativas se obtienen principalmente por exposición a diferentes agentes químicos: colorantes (acriflavina), metales pesados, azida sódica, nitrofenoles, antibióticos, antifúngicos, etc.

Las mutantes segregacionales presentan una deficiencia a nivel de los genes acromosómicos y se pueden obtener, por ejemplo, por irradiación con rayos X. El tratamiento con luz ultravioleta (U.V.) puede originar mutantes de tipo vegetativo, segregacional o mutantes dobles.

A continuación se enumeran otras formas de expresión del genotipo RD:

- Pérdida de los citocromos a y b, conservando el c (194).

- Deficiencia sólo a nivel de citocromo c (193).

- Ausencia total de hemo, citocromos y catalasa (195).

Este fenotipo se revierte con el agregado de Proto

IX o glicina al medio de crecimiento.

- Acumulación de porfirinas y metaloporfirinas y ausencia total de citocromos (196).
- Acumulación de porfirinas y metaloporfirinas y cantidades normales de citocromos (197).
- Deficiencias en todos los citocromos (198). El fenotipo se revierte con el agregado de ALA, o una mezcla de Tween 80, ergosterol y metionina al medio de crecimiento. Esta cepa presenta dos mutaciones, una en un gen regulatorio y otra a nivel de un gen que parecería controlar la estructura del ALA-S (167, 198).
- Deficiencia parcial de citocromos respiratorios como consecuencia de alteraciones a nivel de transcripción o de translocación del ALA-S (172).
- Niveles reducidos de citocromos; esta cepa puede crecer en presencia de glucosa o galactosa sin otros agregados. La mutación aparece a nivel del ALA-D (200).

B) Mutantes deficientes en la síntesis de lípidos.

Las células de S.cerevisiae contienen de un 5-20 % de ácidos grasos y un 7-10 % de ergosterol, dependiendo de la composición del medio de crecimiento. En condiciones normales (aerobiosis y 30 °C) las cepas salvajes no requieren suplemento de lípidos pues los sintetizan en grandes cantidades, curiosamente tampoco se incorporan si se los provee exógenamente. Sin embargo, estos componentes si son requeridos en aerobiosis o a temperaturas elevadas en ausencia de esteroides, el crecimiento se detienen entre

la 5ta y 6ta generación y las células comienzan a morir 24 horas más tarde.

Resnick y Mortimer (201) obtuvieron por tratamiento con luz U.V. mutantes que requerían el agregado de un ácido graso no saturado (Tween 80) o ergosterol en el medio de crecimiento. De este grupo de mutantes denominado ole, las cepas ole 2, 3 y 4 eran además deficientes en citocromos y requerían metionina para su crecimiento. A continuación describiremos las características que presentan cada una de estas mutantes:

cepa ole 2: su deficiencia se revierte con el agregado de proto IX pero no de ALA, se presume bloqueo de algunas de las enzimas del camino biosintético del hemo posteriores al ALA-S.

cepa ole 3: bloqueo a nivel del ALA-S (198) ya que su deficiencia se revierte con el agregado de ALA al medio de crecimiento (202).

cepa ole 4: el fenotipo no se revierte ni con el agregado de ALA ni de Proto indicando que la falla se encontraba en una etapa aún posterior.

Gollub y col. (203-205) a partir de dos cepas de levaduras, erg+ y erg-, obtuvieron dos grupos de mutantes, que además de ser deficientes en la síntesis de lípidos, no poseían citocromos ni actividad de catalasa.

El grupo mutante proveniente de la cepa erg- presentaba la deficiencia parental (acumulación de lanosterol) sumada a un bloqueo en el camino biosintético del hemo (203,204).

Para el segundo grupo proveniente de erg+ y denominado hem, el análisis genético demostró que las propiedades de cada mutante eran consecuencia de una única deficiencia a nivel de alguno de los seis loci que codificaban para la biosíntesis de porfirinas

(205). El grupo hem estaba formado entonces por las cepas:

Mutante hem 1: requería el agregado de ALA para su crecimiento. La mutación afectaba el gen estructural del ALA-S (206).

Mutante hem 2: mostraba deficiencia en la actividad de ALA-D.

Mutante hem 3: bloqueo a nivel de la FBG-Deaminasa. Esta cepa al igual que las dos anteriores requerían metionina para su crecimiento, debido a una actividad deficiente de sulfito reductasa.

Mutantes hem 4, hem 5 y hem 6: estaban bloqueadas a nivel de Coprogen-oxidasa, ferroquelatasa y Urogen-decarboxilasa, respectivamente (205).

Todos estos estudios enfatizan la importancia del rol que desempeñan lípidos y citocromos en la biogénesis mitocondrial y la interdependencia entre la biosíntesis del hemo y el metabolismo lipídico. Al respecto, se ha postulado que el hemo y/o citocromos, cumplirían un papel fundamental en la regulación de la captación de esteroides en S. cerevisiae (207,208).

C) Mutantes deficientes en catalasa.

La deficiencia en catalasa se emplea como parámetro para aislar en forma simple y económica, mutantes deficientes en la síntesis de hemo.

Cepas mutantes deficientes en catalasa y citocromo fueron aisladas por Pachecka y col (209). Para alguna de ellas se corroboró que estas deficiencias se correlacionaban con bloqueos específicos en distintos pasos del camino biosintético del hemo (210).

En las mutantes designadas cat 7 y cat 11 estaba afectada la síntesis de ALA ya que, con su agregado al medio de crecimiento se revertía la falta de citocromo. Las deficiencias que presentaban estas cepas no se expresaban (cat 11) o lo hacían sólo parcialmente (cat 7) en el estado ρ^+ ; mientras que en el estado ρ^- se manifestaban totalmente.

Para otras cepas deficientes en catalasa se encontró que el bloqueo aparecía a nivel de UrogenI-sintetasa y Coprogen-oxidasa (210).

D) Mutantes deficientes en citocromo oxidasa.

La citocromo oxidasa es una enzima que posee al hemo a (Figura 21) como grupo prostético.

El análisis genético de cepas mutantes ρ^- demostró que mutaciones en tres loci del ADN mitocondrial: oxi I, oxi II y oxi III, producían una citocromo oxidasa anómala (211). Estos loci codificaban para las subunidades I, II y III de la enzima (212). Estudios posteriores (213) indicaron que las mutaciones oxi conducían a una alteración en la configuración de estas subunidades, ya sea por delección (subunidad I) o sustitución (subunidades II y III) de aminoácidos, que originaban una enzima inactiva. Estas mutaciones alteraban la inserción del Fe^{++} en el grupo prostético (hemo a), pero no tenían efecto sobre la incorporación del mismo a la apoproteína madura.

Otra mutante, también deficiente en citocromo oxidasa (pop 4), aislada originalmente por Sherman (214) y caracterizada por Arrese y col. (215), presentaba además acumulación de uroporfirinas y sus productos de decarboxilación, sugiriendo un bloqueo a nivel de la Urogen-decarboxilasa.

E) Mutantes resistentes a la represión por catabolito

Una propiedad de S. cerevisiae, ampliamente estudiada es su comportamiento diferencial según la fuente empleada para su crecimiento. La represión por catabolito constituye un importante mecanismo de control sobre la biosíntesis de hemo y hemoproteínas, cuando este microorganismo crece en un medio que contenga glucosa (Capítulo II).

Diferentes grupos de investigación han descrito mutantes en las cuales algunas de las enzimas que eran sensibles se transforman en resistentes al efecto glucosa (166, 216, 217). Así por ejemplo, la mutación hex 2-3 confiere resistencia al ALA-S, ALA-D, citocromos y algunas enzimas del ciclo de Krebs (166). Como ya fuera demostrado para el ALA-D (218), se observó que el control regulatorio que la glucosa ejerce sobre el ALA-S, no debe estar necesariamente correlacionado con la represión a nivel de los citocromos respiratorios.

F) Otras características útiles para el aislamiento de mutantes.

Las deficiencias primarias descritas anteriormente (a nivel del metabolismo respiratorio y lipídico, catalasa, citocromo oxidasa) constituyen parámetros útiles para el aislamiento de mutantes hemo deficientes. Otras características que posee la célula de levadura y que pueden ser utilizadas para este fin son las siguientes:

a) Ausencia de Zn-protoporfirina: La célula de levadura cultivada en aerobiosis acumula Zn-protoporfirina en la fracción mitocondrial (219). Empleando las propiedades fotodinámicas letales de

este compuesto, Grimal y Labbe-Bois (220) desarrollaron una técnica para obtener cultivos enriquecidos en aquellas mutantes hemo deficientes que no acumulaban Zn-protoporfirina. De esta forma aislaron diferentes cepas que definían siete grupos de complementación (221). El análisis demostró que cada cepa portaba una mutación nuclear recesiva. Los estudios bioquímicos indicaron que las mismas estaban bloqueadas en una de las siguientes actividades enzimáticas: ALA-S, ALA-D, PBG-Deaminasa, Urogen-decarboxilasa, ferroquelatasa (221) y protogen-oxidasa (222).

b) Fluorescencia bajo la luz U.V.: Otro método desarrollado para aislar mutantes parcialmente deficientes en las últimas etapas del camino biosintético del hemo, se basa en la identificación de los clones mutados por su fluorescencia a la luz U.V. (debido a la acumulación de porfirinas intracelularmente). De las mutantes obtenidas con esta metodología, siete estaban bloqueados diferencialmente a nivel de los cuatro pasos de decarboxilación catalizados por la Urogen-decarboxilasa (223, 224) y tres eran deficientes en ferroquelatasa (223).

Por otro lado, a partir de cultivos fluorescentes se pueden aislar mutantes bloqueados en las primeras enzimas de la biosíntesis de porfirinas, ya que formarán colonias no fluorescentes. Empleando esta metodología, Carvajal y col. (225) aislaron a partir de la cepa pop 4, distintas mutantes deficientes en la síntesis de ALA. Describieron además un nuevo gen RHM1, que segregaba independientemente del gen estructural y regulatorio del ALA-S, y que podría controlar ya sea la translocación de esta enzima a la mitocondria, o bien su actividad "in vivo" (225).

MATERIALES

Y METODOS

CAPITULO VMATERIALES Y METODOS

	Página
V.1. Materiales.	81
V.1.1. Fuente enzimática.	81
V.1.2. Reactivos.	81
V.1.3. Equipos.	82
V.2. Métodos.	82
V.2.1. <u>Saccharomyces cerevisiae</u> : cultivo y mantenimiento de las células.	82
V.2.2. Preparación del extracto enzimático.	83
V.2.3. Determinación de las actividades enzimáticas.	84
A) ALA-D.	84
B) PBGasa.	85
C) Deaminasa.	86
D) Uro-D.	87
V.2.4. Determinación del contenido proteico.	88
V.2.5. Determinación del contenido endógeno de ALA y porfirinas.	88
A) Cuantificación del ALA.	88
B) Cuantificación de porfirinas.	89
V.2.6. Eliminación del contenido endógeno de ALA y porfirinas.	89
V.2.7. Determinación de pesos moleculares.	90

V.1. Materiales.

V.1.1. Fuente enzimática

Se emplearon dos cepas, una salvaje, D273-10B, y su mutante hemo deficiente, B231. La muestra inicial de esta cepa fue cedida gentilmente al Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias en el año 1980 por el profesor Dr James Mattoon de la Universidad de Denver, Colorado, USA.

V.1.2. Reactivos.

El PBG se sintetizó enzimáticamente según la metodología descrita por Sancovich y col. (226), a partir de ALA-D de hígado bovino y ALA adquirido en Sigma Chemical Co., USA.

El uroporfirinógeno III empleado para medir actividad de Uro-D se obtuvo por reducción de la porfirina correspondiente siguiendo la metodología detallada en Métodos.

La Uroporfirina III y porfirinas usadas como standards cromatográficos pertenecían a la colección del desaparecido Dr Torben With quien las donara generosamente a la Dra Battle.

Las proteínas usadas como marcadores de pesos moleculares (anhidrasa carbónica, ovoalbúmina, albúmina sérica bovina) se obtuvieron de Sigma Chem. Co. U.K.

Los demás reactivos y solventes utilizados fueron todos de grado analítico P.A. provenientes de distintas fuentes comerciales, en su mayoría de Merck o Sigma Chem. Co., u otras específicas que se indicarán al describir los Métodos.

V.1.3. Equipos.

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

- Estufa de cultivo con agitación rotatoria Lab-Line (Orbit).
- Autoclave Ghilon.
- Flujo laminar Labconco.
- Sonicador Soniprep 150 MSE.
- Centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B.
- Centrifuga Rolco modelo CM-36.
- Baño de incubación Precisión Scientific C.O.
- Balanzas Mettler PC 2000 y AK 160.
- Espectrofotómetro Beckmann Model 35.
- Espectrofotómetro Shimadzu U.V. 210 A.
- pHmetro Altronix.
- Colector de fracciones Frac 100 de Pharmacia Fine Chemicals.
- Bomba peristáltica Perista Pump SJ-1215.

V.2. Métodos.

V.2.1. Saccharomyces cerevisiae: cultivo y mantenimiento de las células.

El medio de cultivo utilizado contiene por cada 100 ml: 2g de peptona (Difco); 1g de extracto de levadura (Difco); 2g de dextrosa (Merck) y agua destilada hasta completar el volumen.

Tanto el medio de cultivo como el material empleado en los

Tanto el medio de cultivo como el material empleado en los repiques se esterilizó con vapor, 20 minutos, a 1,2 atmósferas.

Para conservar las cepas se emplearon tubos que contenían medio de igual composición que el líquido al que se le adicionó agar (2g/100ml) y se hizo solidificar en forma inclinada. Las células repicadas a estos tubos se hicieron crecer en estufa a 28-30 °C durante 40-48 horas, conservándose luego a 4 °C hasta el momento de ser utilizadas.

Para obtener la masa de células necesarias para llevar a cabo cada experiencia, se repicaron inóculos del medio sólido a erlenmeyers que contenían de 10 a 15 ml de medio líquido y se hicieron crecer a 28-30 °C en oscuridad y con agitación constante durante 20-22 hs. Luego el contenido de cada erlenmeyer se transfirió a otros de mayor capacidad conteniendo 300 ml de medio cada uno y se continuó el crecimiento en las mismas condiciones durante 20-22 hs (hasta fase exponencial tardía). Las células se cosecharon por centrifugación a 12.000xg durante 10 minutos en centrifuga refrigerada y finalmente se lavaron una vez con agua destilada. Todas las operaciones de aquí en adelante se llevaron a cabo a 4 °C.

V.2.2. Preparación del extracto enzimático.

Las células cosechadas fueron resuspendidas en buffer fosfato de sodio 0,05M pH 8 en relación 1:2 (g de células/ml de buffer). Esta suspensión se sonicó a una amplitud de 10 μ durante 3 minutos, obteniéndose así la fracción enzimática denominada homogenato (H).

El sobrenadante que resultó de centrifugar esta fracción a 24.000xg durante 20 minutos fue identificado como sobrenadante (S) y se utilizó como extracto enzimático a menos que se especifique lo contrario.

V.2.3. Determinación de las actividades enzimáticas.

A) ALA-D

El sistema standard de incubación contenía 100 μ moles de buffer fosfato de sodio pH 6,8; 10 μ moles de ALA; 25 μ moles de cisteína; 1,0 ml de extracto enzimático (8-10 mg de proteína) y agua destilada hasta completar un volumen de 1 ml. Se incubó a 37 °C con agitación constante y en anaerobiosis durante 1 hora. La reacción se detuvo adicionando 0,1 ml de solución saturada de sulfato de cobre, la proteína precipitada se separó por centrifugación y en el sobrenadante se determinó la cantidad de PBG formado. En este caso al igual que para el resto de las enzimas que mencionamos a continuación, se realizaron todos los blancos y controles correspondientes.

La cuantificación de PBG se basa en su reacción con el reactivo de Ehrlich normal (2g de p-dimetil aminobenzaldehído, 25 ml de ácido clorhídrico concentrado y 75 ml de ácido acético glacial) (227), con el cual produce un compuesto de coloración rojiza. La técnica empleada consiste en mezclar un volumen de muestra con un volumen de reactivo a temperatura ambiente. Luego de la adición del reactivo, el máximo desarrollo del color se alcanza a los 8 minutos, manteniéndose constante hasta los 15 minutos, a partir de este momento comienza a decaer. El compuesto coloreado tiene un pico de absorción a 555 nm.

La cantidad de PBG formado se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\text{nmoles de PBG/h.ml} = \frac{A \times \text{dilución} \times 10^6}{555 \times f \times 226 \times V} \quad E$$

donde:

f = factor de conversión es igual a 113,6 (227)

226 = masa molar de PBG

V = volumen de enzima en el sistema de incubación.

E

Se define una unidad enzimática (U.E.) de ALA-D como la cantidad de enzima capaz de catalizar la formación de un nmol de PBG por hora, bajo las condiciones standard de incubación. La actividad específica corresponde al número de unidades enzimáticas por miligramo de proteína (U.E./mg).

B) PBGasa

El sistema standard de incubación contenía 60 μ g de PBG, 2,0 ml de extracto enzimático y buffer fosfato de sodio 0,05 molar pH 8 hasta completar un volumen final de 3 ml. Se incubó a 37 °C, en oscuridad, con agitación constante y aerobiosis durante 2 horas. La reacción se detuvo por el agregado de HCl concentrado, hasta alcanzar una concentración final en el incubado del 5%. La proteína precipitada se separó por centrifugación y en el sobrenadante, previa exposición a la luz blanca durante 20 minutos, se cuantificaron espectrofotométricamente las porfirinas formadas.

La cantidad total de porfirinas presentes en la solución ácida se calculó empleando la fórmula corregida de Rimington y Sveinsson (228). Este método se basa en las lecturas de las absorbancias a 380 nm, 430 nm y a la longitud de onda de máxima absorción de la banda de Soret (400-410 nm), determinándose la cantidad de producto formado mediante la siguiente expresión:

$$\text{nmoles porfirinas} = 2 A_{\text{máx.}} - (A_{380} + A_{430}) \times f \times V$$

donde: V = volumen de la solución desproteïnizada

A = absorbancias medidas a las longitudes de onda

indicadas en los subíndices

f = factor que tiene un valor de 1,008 para uroporfirina en solución ácida al 5% (229)

Para la determinación del tipo isomérico de las porfirinas presentes en el sobrenadante desproteínizado se procedió en primer lugar a la esterificación de las mismas, siguiendo el método descrito por Polo y col. (230). La solución se llevó a pH 3,0-3.5 con ácido acético glacial, se agregó talco tipo Venecia (Merck) y luego de agitar vigorosamente se centrifugó 10 minutos a 3.500 rpm. El talco con las porfirinas adsorbidas se secó en estufa a 100 °C durante 1 hora, luego se resuspendió en 5 ml de mezcla esterificante (ácido sulfúrico conc.: metanol; 1:9 v/v) y se mantuvo en estufa a 60 °C durante 20 minutos. Finalizada la reacción, se extrajeron las porfirinas esterificadas en cloroformo. El extracto clorofórmico se cromatografió en papel según el método de Falk y Benson (231).

Finalizada la cromatografía las porfirinas se identificaron bajo luz U.V. por comparación directa con standard corridos en las mismas condiciones.

Se define una unidad enzimática (U.E.) de PBGasa como la cantidad de enzima capaz de catalizar la formación de 1 nmol de porfirinas en 1 hora, bajo las condiciones standard de incubación. La actividad específica se expresa como el número de unidades enzimáticas por miligramo de proteína (U.E./mg).

C) Deaminasa

Para la determinación de la actividad de Deaminasa el procedimiento fue igual que para la PBGasa excepto que la temperatura de incubación fue de 45 °C.

D) Uro-D

Para la medición de la actividad de Uro-D se siguió el método descrito por Afonso y col. (232). El Urogen III se preparó por reducción de Uro III con Na/Hg 3% en relación 1g (Na/Hg)/ml solución de porfirinas. La mezcla se filtró sobre lana de vidrio en ambiente de nitrógeno y se llevó a pH 7,0 con ácido fosfórico al 40%.

La mezcla de incubación para Uro-D contenía en un volumen final de 3ml, 3 mmoles de glutatión; 0,3 mmoles de EDTA; 20 mmoles de buffer fosfato de Na pH 7,0; 36 nmoles de Urogen III y 1 ml de solución enzimática (8-10 mg de proteína). Se incubó a 37 °C, en oscuridad y atmósfera de nitrógeno. La reacción se detuvo por agregado de 0,33 ml de TCA 50%, se filtró sobre papel embebido en TCA 5% y el precipitado se lavó 2 veces con el mismo TCA. Se reunieron el filtrado y las soluciones provenientes de los lavados para la esterificación de las porfirinas según el método descrito anteriormente para PBGasa (230).

En este caso las porfirinas esterificadas en el extracto clorofórmico se cromatografiaron en HPTLC, el solvente de desarrollo contenía 7,5 ml de tolueno, 2,0 ml de acetato de etilo y 0,5 ml de metanol.

En un lector de placas se leyó el porcentaje de cada porfirina obtenida a partir de Urogen, y se calculó la cantidad de porfirinas totales decarboxiladas según la fórmula:

$$\frac{\text{n moles porfirinas}}{\text{ml enzima}} = \left(\sum_{i=4}^{i=7} \frac{\%i \times m}{100} \right) \frac{1}{\frac{V}{E}}$$

donde:

m = cantidad de urogen incubado.
 %i = porcentaje de cada porfirina (copro; penta; hexa o firia)
 V = volumen de enzima incubado.
 E

La unidad enzimática (U.E.) de Uro-D se define como la cantidad de enzima capaz de catalizar la formación de un nmol de producto (considerando la suma de todos los productos de decarboxilación sintetizados a partir de Urogen III), en una hora, en las condiciones standard de incubación. La actividad específica se expresa como el número de unidades enzimáticas por miligramo de proteína (U.E./mg).

V.2.4. Determinación del contenido proteico.

Se realizó según la técnica original descrita por Lowry y col. (233).

V.2.5. Determinación del contenido endógeno de ALA y porfirinas.

Alicuotas del extracto enzimático (S) se desproteinizaron con TCA, hasta alcanzar una concentración final del 5%. Luego se centrifugó a 8.000 rpm durante 20 minutos para separar la proteína desnaturalizada.

En este sobrenadante (S') se determinó la concentración de ALA y porfirinas de acuerdo al procedimiento descrito a continuación:

A) Cuantificación del ALA

El ALA se condensó con acetilacetona (2-4 pentanodiona) a pH 4,6 formando un pirrol, con una posición libre, que reacciona luego con el reactivo de Ehrlich para formar un compuesto coloreado que tiene un máximo de absorción a 553 nm (234). Para la formación del pirrol se empleó el método de Moore y Labbe (227). Se colocó en un tubo de ensayo 1 ml del sobrenadante, llevado a pH 4,6 con 0,1 ml de NaOH 3N; 1 ml de buffer acetato de sodio 1M pH 4,6 y 0,05 ml de acetilacetona. Se calentó 10 minutos a ebulli

ción en un baño de agua a 100 °C, se dejó enfriar y se le agregó igual volumen de reactivo de Ehrlich modificado (234). Este reactivo se prepara en el momento de usarlo y contiene 1g de P-dimetil aminobenzaldheído disuelto en 16 ml de ácido perclórico y 34 ml de ácido acético. El complejo coloreado se cuantificó espectrofotométricamente registrando la absorbancia a 553 nm entre los 10 y 30 minutos de agregado el reactivo. El coeficiente de extinción molar utilizado en los cálculos fue $7,2 \times 10^4 \text{ l. Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los nmoles de ALA por ml de extracto se calcularon mediante la siguiente expresión:

$$\frac{\text{nmoles ALA}}{\text{ml sobrenadante S'}} = \frac{A \times 1000 \times 4,15}{553 \times \frac{V}{E}}$$

donde:

4,15 = corresponde al volumen de reacción
 $\frac{V}{E}$ = volumen del sobrenadante S' empleado en el extracto.

B) Cuantificación de porfirinas.

La cantidad total de porfirinas presentes en el sobrenadante S' se determinó espectrofotométricamente empleando la fórmula corregida de Rimington y Sveinsson (228).

V.2.6. Eliminación del contenido endógeno de ALA y porfirinas.

Para la obtención del extracto enzimático libre de ALA y porfirinas se utilizaron las resinas de intercambio iónico Dowex 50 y Dowex 1-X8, respectivamente.

La adsorción se produjo en batch y la resina con los com

puestos adsorbidos se separó por centrifugación.

V.2.7. Determinación de pesos moleculares.

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

En nuestras experiencias utilizamos una columna de Sephadex G-100 (Pharmacia) de 50 cm de longitud y 2,4 cm de diámetro interno, que se equilibró y eluyó con buffer fosfato de sodio 50 mM pH 8,0 con un flujo de 22,2 ml por hora, recogándose fracciones de 1,85 ml. La calibración de la misma se realizó empleando proteínas de PM conocido, graficándose luego el volumen de elución relativo (V_e/V_o) en función del logaritmo del peso molecular (PM).

RESULTADOS

Y DISCUSION

CAPITULO VIASPECTOS MAS SALIENTES DE LAS CEPAS B273-10B Y B231 DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

	Página
VI.1. Variación de la densidad celular con el tiempo de crecimiento.	92
VI.2. Acumulación y síntesis de precursores y porfirinas.	93
VI.2.1. Contenido intracelular de porfirinas y precursores durante las tres fases de crecimiento.	93
VI.2.2. Formación de porfirinas a partir de precursores intracelulares.	96
VI.3. Actividad de Porfobilinogenasa y Decarboxilasa en ambas cepas de <u>S. cerevisiae</u> .	99
VI.4. Conclusiones parciales.	100

Teniendo en cuenta que la mutación que posee la cepa B231 se manifiesta por una acumulación intracelular de porfirinas, responsables de la fluorescencia roja que presentan las colonias al ser irradiadas con luz ultravioleta; nos pareció interesante investigar, en primer lugar, si la presencia de estos compuestos afectaba el crecimiento celular, cuál era el tipo de porfirinas presentes en la célula y si además de porfirinas se acumulaban precursores (ALA y PBG). Por último, identificar las enzimas del camino metabólico del hemo cuya alteración podría justificar el fenotipo de la cepa mutante.

Todas las determinaciones se llevaron a cabo empleando la cepa salvaje como control.

VI.1 Variación de la densidad celular con el tiempo de crecimiento

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

Un parámetro adecuado para cuantificar la turbidez de los cultivos de Saccharomyces cerevisiae fue la lectura de absorbancia a 570nm. En la Figura 32 se ilustran las curvas de crecimiento para la cepa D273-10B y B231 de S. cerevisiae, con sus tres fases características: lag, exponencial y estacionaria, sin observarse el crecimiento diáuxico típico de las levaduras facultativas que crecen en presencia de dextrosa como fuente de carbono. Se aprecia que la fase lag para la cepa mutada es algo más pronunciada que para la cepa salvaje.

Considerando que las células empleadas en los repiques se encontraban en fase exponencial es de esperar, tal como obtuvimos, una fase lag menor que la habitual, ya que utilizando las células en esta fase es prácticamente nulo el período de tiempo necesario para reactivar su metabolismo.

En la cepa D273-10B la fase exponencial comienza alrededor de las 4 horas y la estacionaria a las 25 horas de crecimiento; en tanto que para la mutante la fase lag se extiende hasta las 6 horas, iniciándose la estacionaria aproximadamente a las 30 horas.

Los datos de la Figura 32 también se utilizaron para calcular el tiempo generacional (G), siendo de 1,26 horas y 3,20 horas para las cepas salvaje y mutante respectivamente, el tiempo generacional mayor obtenido para la cepa B231 podría atribuirse a un efecto tóxico de las porfirinas acumuladas durante el crecimiento.

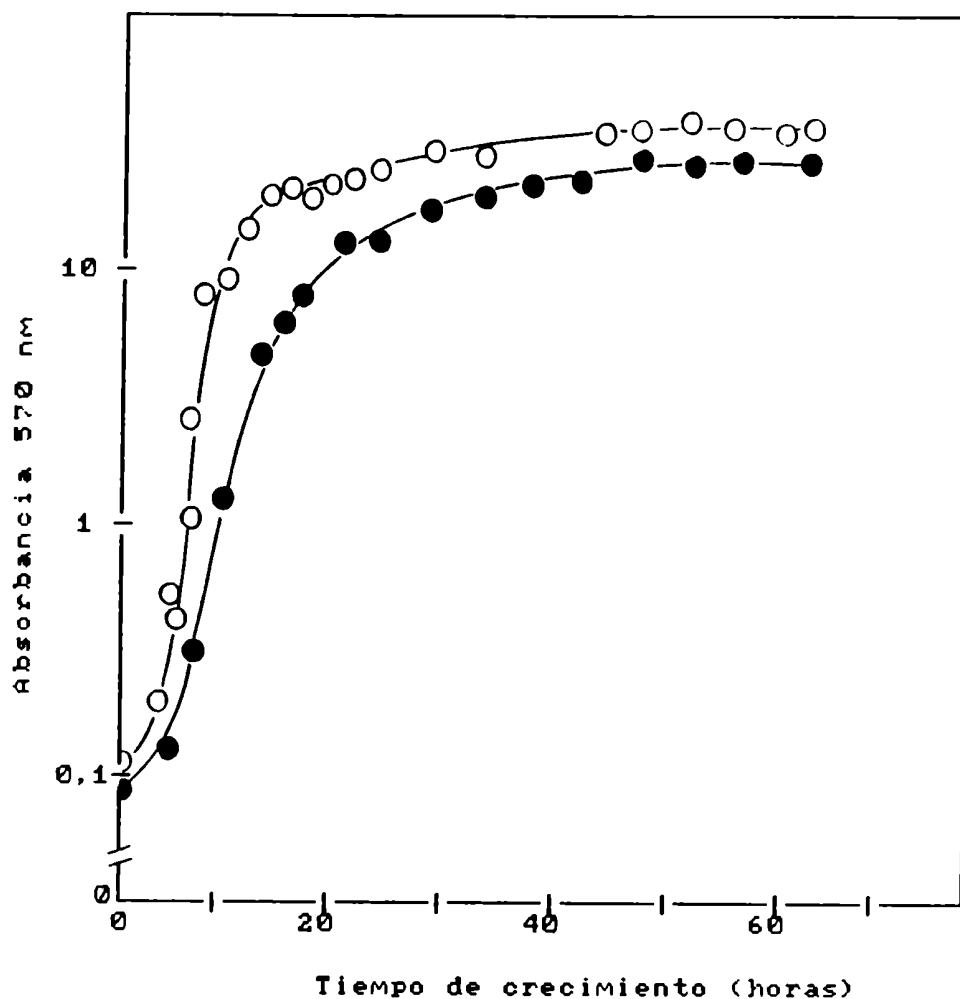


Figura 32: Curvas de crescimento.

Se tomaron entre 0 y 70 horas distintas alícuotas de una suspensión celular en crecimiento y previa dilución se estimó la turbidez a 570 nm.
(o) Cepa D273-10B, (●) Cepa B231.

VI.2. Acumulación y síntesis de precursores y porfirinas.

VI.2.1. Contenido intracelular de porfirinas y precursores durante las tres fases de crecimiento.

Para llevar a cabo este estudio empleamos el sobrenadante S' (obtenido después de desproteinizar el sobrenadante S). El contenido de porfirinas se evaluó directamente por medición espectrofotométrica. La cantidad de PBG se determinó también espectrofotométricamente previa reacción con el reactivo de Ehrlich. Para la cuantificación del ALA, se comparó la eficiencia de los siguientes métodos:

a) Método directo: el ALA contenido en S' se condensó directamente con acetilacetona (2,4-pentanodiona) a pH 4,6 para formar un pirrol que luego reacciona con el reactivo de Ehrlich.

b) Método indirecto: el ALA se separó del resto de los componentes presentes en S', por fijación a una columna Dowex-50, de la que se eluyó con acetato de sodio 0,5M y luego se cuantificó de igual forma que en el método directo.

En la Tabla 5 se observan las cantidades de ALA presentes en una muestra de sobrenadante S' obtenido a partir de células de la cepa B231 cosechadas en fase exponencial. Puede verse que los valores obtenidos por ambos métodos son similares, razón por la cual seleccionamos al método directo como el más conveniente para las determinaciones posteriores.

Tabla 5: Cuantificación del ALA intracelular.

Método	ALA (nmoles/ml)
Directo	105,36 + 2,40
Indirecto	93,44 + 12,08

La determinación se efectúa en el sobrenadante S' y los valores se expresan por ml de sobrenadante S

En la Figura 33 se observa la variación del contenido intracelular de ALA, PBG y porfirinas presentes en la cepa B231, durante las distintas fases de crecimiento. La cantidad de ALA y porfirinas acumuladas varían en función del tiempo mostrando un valor máximo a las 20 horas de crecimiento; mientras que el contenido de PBG fue despreciable durante todo el intervalo (menos que

1 nmol/ml).

El estudio cromatográfico de las porfirinas acumuladas reveló la presencia de un 90% de uroporfirina tipo isomérico III, 5% de porfirinas heptacarboxílicas y trazas de penta y coproporfirinas.

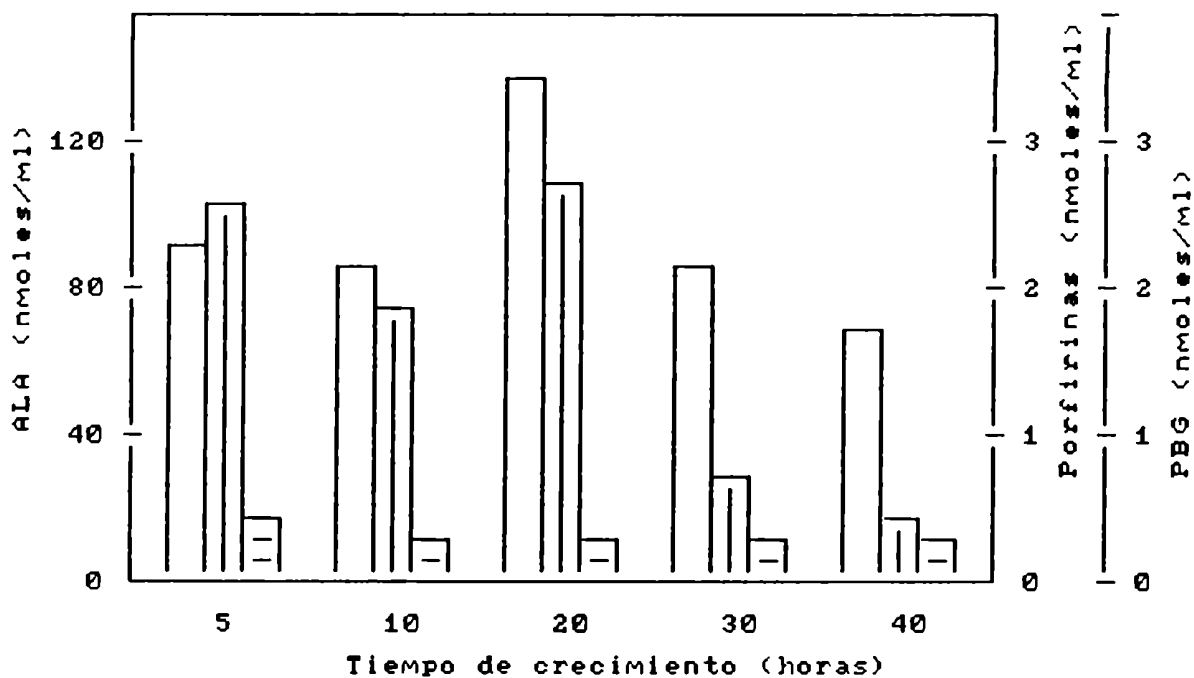


Figura 33: Acumulación de ALA (□), porfirinas (▨) y PBG (■) en la Cepa B231.

Las células cultivadas de la manera habitual se cosecharon a distintos tiempos, según se indica en la figura. La metodología empleada para la determinación de porfirinas y precursores corresponde a la descrita en Materiales y Métodos.

Aclaremos que aunque los resultados se expresan por ml de sobrenadante S y correspondan a extractos distintos para cada tiempo, igualmente son comparables debido a que siempre se resuspenden las células en la misma relación (2g de células/ml buffer).

Por último, de un análisis del contenido de estos metabolitos en la cepa salvaje y en su mutante (Tabla 6) observamos, como era de esperar, claras diferencias. La cepa B231 es capaz de acumular intracelularmente grandes cantidades de ALA y porfirinas,

mientras que los valores hallados para la cepa salvaje se encuentran apenas dentro del límite de detección.

Además se aprecia que un aumento de ALA intracelular está asociado con un aumento de ALA al medio, mientras que no sucede lo mismo con las porfirinas, dado que, aunque se acumulan intracelularmente no atraviesan la membrana celular y en consecuencia no las detectamos en el medio de crecimiento.

Tabla 6: Contenido de porfirinas y precursores en la cepa salvaje (D273-10B) y mutante (B231) de Saccharomyces cerevisiae.

Cepas	ALA (nmoles/ml)		Porfirinas (nmoles/ml)	
	Intracelular	Extracelular	Intracelular	Extracelular
D273-10B	14	ND	0,5	ND
B231	137	80	3,5	ND

Las determinaciones se efectúan en el sobrenadante S' y los resultados se expresan por ml de sobrenadante S. ND: no detectable. Las mediciones se llevaron a cabo en células cultivadas durante 20-22 horas.

VI.2.2. Formación de porfirinas a partir de precursores intracelulares.

Habiéndose observado que la incubación de una alícuota del sobrenadante S, traía aparejado un aumento en el contenido de porfirinas, nos pareció interesante investigar qué ocurría con los niveles de ALA durante la formación de las mismas.

Con este propósito se incubó durante 4 horas el sobrenadante proveniente de células cosechadas en fase exponencial, retirándose cada 30 minutos alícuotas en las que se determinó el contenido de ALA remanente y porfirinas formadas (Figura 34).

Como se observa en la figura, a medida que aumenta la cantidad de porfirinas sintetizadas disminuye el contenido de ALA. No habiéndose observado en ningún caso niveles detectables de PBG,

se espera una relación estequiométrica de 1 a 8 entre la cantidad de porfirinas formadas y el ALA consumido.

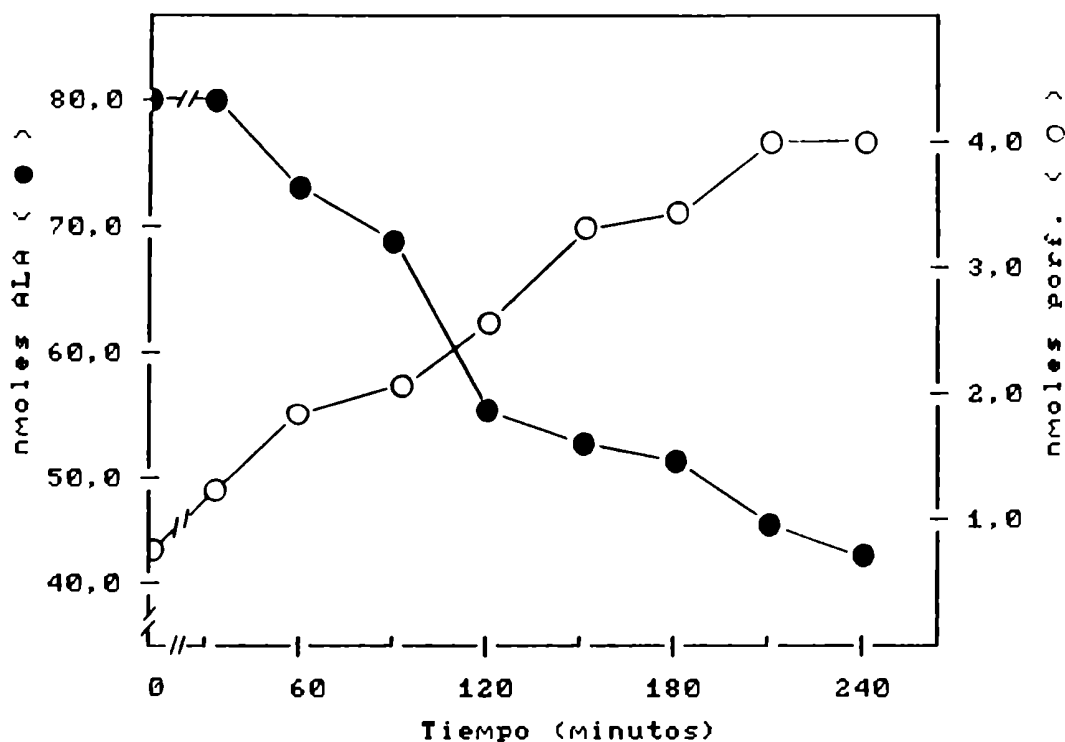


Figura 34: Variación del contenido de ALA y porfirinas durante el tiempo de incubación.

El sobrenadante (S) proveniente de células cosechadas en fase exponencial se incubó diferentes tiempos y en distintas alícuotas se determinó desaparición de ALA y formación de porfirinas, según se detalla en Métodos.

En la Tabla 7 se comparan los datos correspondientes a la cantidad de porfirinas detectadas experimentalmente con las que se esperaría obtener en función de la cantidad de ALA consumido.

Tabla 7: Correlación entre los niveles de ALA y porfirinas.

Tiempo (minutos)	ALA (nmoles)		Porfirinas (nmoles)	
	remanente	consumido	teóricas	experimentales
0	81,06	0	0	0
30	80,76	0,29	0,04	0,51
60	74,21	6,83	0,85	1,02
90	69,31	11,74	1,47	1,31
120	56,50	24,55	3,07	1,90
150	52,65	28,40	3,55	2,53
180	51,50	29,55	3,69	2,69
210	47,02	34,03	4,25	3,40
240	44,47	36,58	4,57	3,40

Las condiciones experimentales corresponden a las descritas en la leyenda de la Figura 34. La cantidad de porfirinas teóricas corresponden a las calculadas en función del ALA consumido, considerando que a partir de ocho moléculas de ALA se biosintetiza una de porfirina.

Según los valores de la tabla, a tiempos cortos (hasta 60 minutos) la cantidad de porfirinas sintetizadas es mayor que la calculada a partir de ALA consumido, este comportamiento podría deberse a que el sobrenadante posee inicialmente una cierta cantidad de intermediarios polipirrólicos, que en este tiempo completan la ciclación. A tiempos más altos (entre 120 y 240 minutos), la situación se invierte y sería la presencia de estos mismos complejos enzima-PBG, que ahora se forman durante la incubación a expensas del ALA consumido y que no llegan a porfirinas, lo que justificaría los resultados obtenidos.

A continuación se evaluó la eficiencia de la diálisis y el empleo de resinas de intercambio iónico como métodos de separación del ALA y porfirinas presentes en el extracto enzimático.

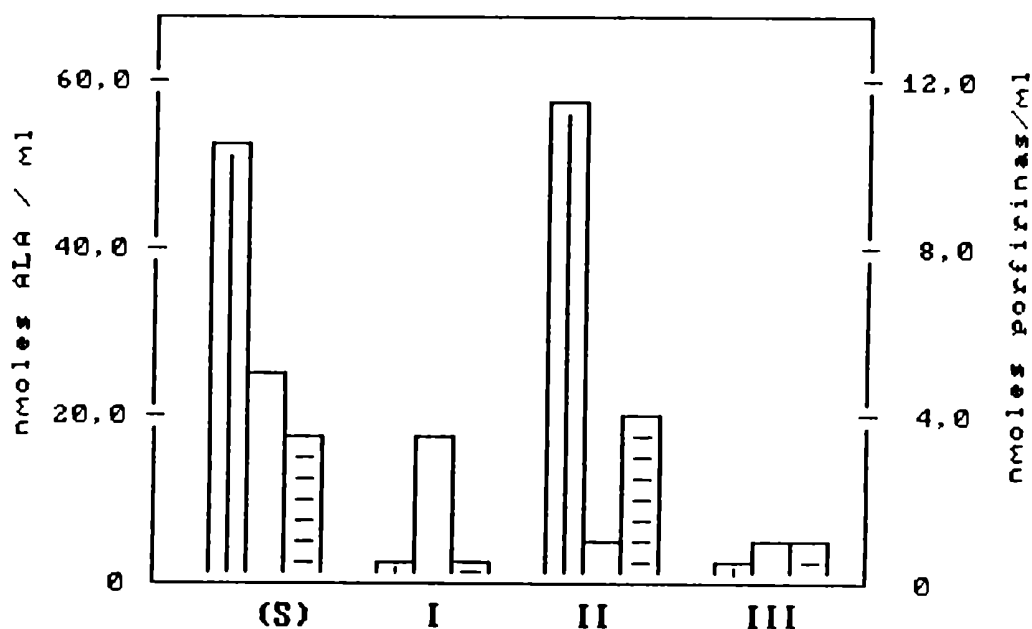


Figura 35: Biosíntesis de porfirinas en presencia y/o ausencia de precursores intracelulares.

Se midió contenido de ALA (□) y porfirinas (□) intracelulares, junto con las porfirinas sintetizadas (▨) luego de 2 horas de incubación, a partir de los siguientes extractos: (S)= sobrenadante S; I= sobrenadante S dializado, II= sobrenadante S adsorbido en resina Dowex 1-X8, III= sobrenadante S dializado y luego adsorbido en resina Dowex 1-X8.

Como vemos en la Figura 35 la diálisis durante 24 horas a 4 °C contra buffer Tris-HCl 5mM pH 7,4-7,6 resultó ser el procedimiento adecuado para eliminar el ALA presente en el sobrenadante S, mientras que la separación de porfirinas sólo se logró con el empleo de la resina Dowex 1-XB (en batch). La aplicación consecutiva de ambas técnicas permitió obtener un sobrenadante libre de ALA y porfirinas.

Empleando las fracciones enzimáticas provenientes de los distintos tratamientos descritos arriba, confirmamos que las porfirinas originadas durante la incubación de los mismos, se sintetizan principalmente a partir del ALA presente inicialmente en el extracto.

VI.3. Actividad de Porfobilinogenasa y Decarboxilasa en ambas cepas de *S.cerevisiae*.

Teniendo en cuenta que el 90% de las porfirinas acumuladas por la cepa B231 corresponde a uroporfirina III, nos pareció interesante determinar las actividades de las enzimas encargadas de sintetizar y metabolizar este compuesto, PBGasa y Decarboxilasa respectivamente.

Para la medición de estas actividades se empleó como extracto enzimático el sobrenadante S proveniente de células cosechadas en fase exponencial tardía. Para la cepa B231 el mismo fue previamente tratado con resina Dowex 1-XB, lo que nos permitió disponer de un extracto proteico libre de porfirinas.

Los resultados obtenidos (Tabla 8), muestran para la cepa mutante, tomando como control la salvaje, una actividad de PBGasa casi dos veces mayor y de Decarboxilasa 4 veces menor.

Tabla 8: Actividad de PBGasa y Decarboxilasa en S.cerevisiae.

Cepas	Actividad específica (U.E./mg)	
	PBGasa	Decarboxilasa
D273-10B	0,40	0,32
B231	0,75	0,08

La metodología empleada para la medición de actividades corresponde a la descripta en Métodos.

En base a estas actividades evaluadas "in vitro", concluimos que tanto la PBGasa como la Decarboxilasa participan en la acumulación de Uro III, la primera estimulando su síntesis y la segunda disminuyendo su metabolización.

VI.4. Conclusiones parciales.

Trabajando con Saccharomyces cerevisiae cepas D273-10B y B231, observamos que:

- Para ambas cepas las curvas de crecimiento presentan perfiles similares, en los que se aprecian las tres fases características: lag, exponencial y estacionaria.
- En el medio de cultivo empleado el desarrollo de la cepa mutante es levemente menor al de la cepa salvaje.
- La cepa B231 acumula cantidades significativas de ALA y porfirinas, 10 y 7 veces mayor respectivamente, a los que presenta la cepa salvaje.

Las porfirinas formadas durante la incubación se sintetizan principalmente a expensas del ALA intracelular presente en el sobrenadante.

- El nivel de intermediarios polipirrólicos que contiene el extracto enzimático, sólo contribuiría a la formación de no más del 20% de las porfirinas totales detectadas luego de dos horas de incubación (actualmente se continúan estudios sobre el tema).

La cepa mutante presenta "in vitro" una actividad de PBGasa dos veces aumentada y de Deacrboxilasa cuatro veces disminuída respecto a los valores de estas actividades obtenidos para la cepa salvaje. Estos resultados justificarían la acumulación de uroporfirina III que presenta "in vivo" la cepa mutante.

CAPITULO VIIPORFOBILINOGENASA: PROPIEDADES DE LA ENZIMA DE AMBAS CEPAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

	Página
VII.1. Determinación de las condiciones óptimas para la medición de actividad.	103
VII.1.1. Extracción de la enzima.	103
A) Ruptura celular.	103
B) Selección de la fracción enzimática más activa.	104
VII.1.2. Atmósfera de incubación.	105
VII.1.3. Variación de la cantidad de proteína y del tiempo de incubación.	106
VII.1.4. Efecto de la concentración de sustrato.	107
VII.1.5. pH óptimo.	108
VII.1.6. Efecto de la concentración de sales de sodio y magnesio.	109
VII.1.7. Variación de la actividad enzimática con el tiempo de crecimiento.	110
VII.2. Caracterización de la Porfobilinogenasa.	112
VII.2.1. Cinética de la reacción.	112
A) Estudio de velocidades iniciales.	112
B) Comportamiento cinético en presencia de ALA y porfirinas intracelulares.	116
VII.2.2. Efecto del pH sobre la reacción catalizada por la PBGasa.	120
A) Efecto del pH sobre la ionización de la enzima.	120
B) Estabilidad del sustrato frente al pH.	124
C) Precipitación isoeléctrica.	124
VII.2.3. Fraccionamiento salino.	127
VII.2.4. Tratamiento con sulfato de protamina.	128
VII.2.5. Estabilidad de la PBGasa.	132
A) Tratamiento térmico.	132
B) Estacionamiento a bajas temperaturas.	136
VII.2.6. Determinación del peso molecular.	138
VII.3. Conclusiones parciales.	140

VII.1 Determinación de las condiciones óptimas para la medición de actividad.

VII.1.1. Extracción de la enzima.

A) Ruptura celular: Debido a que las levaduras poseen una pared celular compleja y muy resistente fueron ensayados distintos métodos de ruptura: perlas de vidrio y mortero, arena y mortero, arena y sonicación o sonicación solamente. Este último método resultó ser el más eficiente.

Con el objeto de establecer las condiciones óptimas de sonicación, las células cosechadas en fase exponencial tardía se re-suspendieron en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 8,0 y diferentes alícuotas se sonicaron variando la amplitud y tiempo de sonicación.

Para todas las amplitudes ensayadas (8, 10, 12 y 14 μ), se observó un incremento en la liberación de proteínas y unidades enzimáticas al aumentar el tiempo de sonicación de 1 a 3 minutos.

Establecida la amplitud óptima de sonicación, 10 μ , se amplió el intervalo de tiempo hasta alcanzar 7 minutos. En la Tabla 9 se muestran los resultados que corresponden a la cepa salvaje, ya que la cepa mutante presentó el mismo comportamiento frente a este tratamiento.

Tabla 9: Variación de la actividad de PBGasa con el tiempo de sonicación.

Tiempo de sonicación (min)	Actividad (UE)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (UE/mg prot.)
1	0,74	2,64	0,14
2	1,22	3,45	0,18
3	3,17	5,90	0,27
5	4,09	12,61	0,16
7	4,62	17,27	0,13

La suspensión celular sonicada a una amplitud de 10 μ durante los tiempos indicados, se centrifugó y en los distintos sobrenadantes se mide actividad de PBGasa de la manera habitual.

Con estos datos fijamos como condiciones óptimas de ruptura celular la sonicación del homogenato a una amplitud de 10 μ durante 3 minutos.

B) Selección de la fracción enzimática más activa: A continuación se determinó cuál era la distribución de la actividad presente en el homogenato luego de centrifugarlo a 24.000 xg durante 20 minutos. Los resultados (Tabla 10) indican para ambas cepas, que la actividad se concentra en la fracción sobrenadante (S) y que el contenido de proteínas presente inicialmente en el homogenato (H) se distribuye entre las fracciones (S) y (P). En cuanto a la suma de unidades enzimáticas el comportamiento difiere según la cepa. En la mutante se mantiene dentro del valor correspondiente al homogenato; mientras que para la cepa salvaje es notablemente superior. En este último caso el sobrenadante (S) incrementa en un 50% el contenido de unidades enzimáticas; este resultado sugiere que por centrifugación se habría separado algún componente o factor presente en el homogenato que actuaría reprimiendo la actividad de la enzima.

Tabla 10: Distribución de la actividad enzimática por efecto de la centrifugación.

Fracción	D273-10B			B231		
	Proteína (mg/ml)	Actividad (U.E.)	Actividad especif.	Proteína (mg/ml)	Actividad (U.E.)	Actividad especif.
H	42,12	7,79	0,09	27,72	12,34	0,22
S	20,42	11,47	0,28	10,52	11,26	0,53
P	24,20	0,64	0,01	14,14	3,56	0,12

Se incubaron las distintas fracciones enzimáticas H, S y P en aerobiosis, empleando las condiciones standard para medir actividad de PBGasa.

Finalmente de los resultados obtenidos surge que la actividad específica de sobrenadante (S) respecto a la del homogenato

(H) es de 2 a 3 veces mayor; por lo tanto en base a estos datos elegimos como fracción más conveniente para realizar los estudios de caracterización la fracción sobrenadante (S).

VII.1.2. Atmósfera de incubación.

Si bien en la mayoría de los tejidos la PBGasa es activa tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, en callos de soya y Euglena gracilis el producto sólo se forma en estricta anaerobiosis (235 y referencias allí indicadas).

Tabla 11: Efecto de la atmosfera de incubacion con la actividad de PBGasa

Atmósfera de incubación	Actividad específica	
	Cepa D273-10B	Cepa B231
		(a) (b)
Aerobiosis	0,28	0,25 0,53
Anaerobiosis	0,27	0,24 0,51

Se determinó actividad de PBGasa en condiciones aeróbicas y anaeróbicas siguiendo la metodología descrita en Métodos (a) Actividad específica correspondiente a las porfirinas formadas a partir de precursores endógenos (b) Actividad específica obtenida considerando las porfirinas totales sintetizadas durante la incubación.

Empleando la fracción sobrenadante proveniente de células cosechadas en fase exponencial tardía, se determinó para ambas cepas la actividad de PBGasa en presencia y ausencia de oxígeno. Los resultados obtenidos (Tabla 11) indican que no se observa variación de la actividad cuando se modifica la atmósfera de incubación. En el caso de la cepa B231 se obtienen los mismos resultados

evaluando tanto la cantidad de porfirinas totales como las originadas a partir de precursores endógenos.

VII.1.3. Variación de la cantidad de proteína y del tiempo de incubación.

A continuación analizamos el efecto de la concentración de proteína y el tiempo de incubación sobre la actividad de PBGasa en el sobrenadante S.

En la Figura 36 A observamos para ambas cepas un incremento lineal de la formación de porfirinas al aumentar la cantidad de proteína. La actividad específica se mantiene constante y numéricamente igual a la pendiente de la recta. Este dato es importante porque nos permite comparar valores de actividad de extractos enzimáticos que difieren en su contenido proteico.

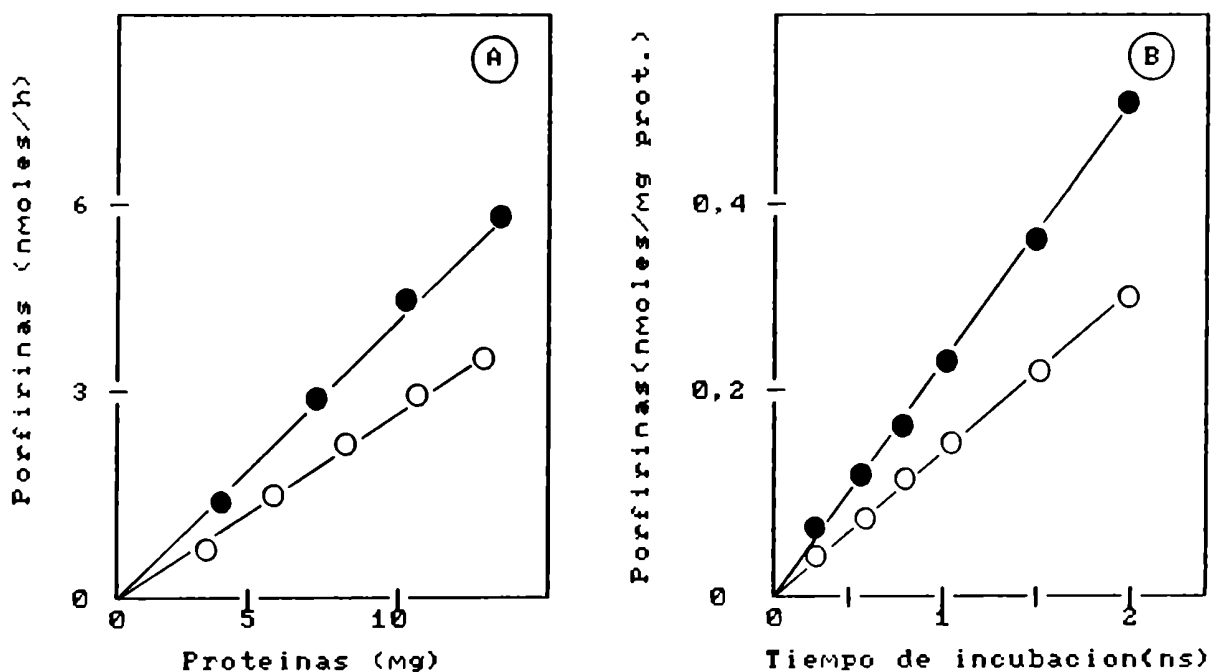


Figura 36: Variación de la formación de porfirinas con la concentración de proteínas y con el tiempo de incubación.

(A) Se mide la actividad de la enzima utilizando el sistema standard de incubación y cantidades de proteínas variables entre 0 y 15 mg. (B) Se mide actividad de PBGasa variando el tiempo de incubación entre 0 y 120 minutos, el resto de las condiciones experimentales fueron las utilizadas habitualmente. (○) Cepa D273-10B, (●) Cepa B231.

En cuanto al tiempo de incubación (Figura 36 B), hasta las 2 horas la formación de producto fue lineal. En base a este resultado elegimos como tiempo standard de incubación 60 minutos, con lo cual aún para concentraciones de PBG menores que la empleada ($88 \mu M$) nos aseguramos estar dentro del intervalo de tiempo en que la velocidad de formación de producto sea constante.

VII.1.4. Efecto de la concentración de sustrato.

Empleando células de levadura cosechadas en fase exponencial tardía se estudió la variación de la actividad de PBGasa en función de la concentración de sustrato (Figura 37).

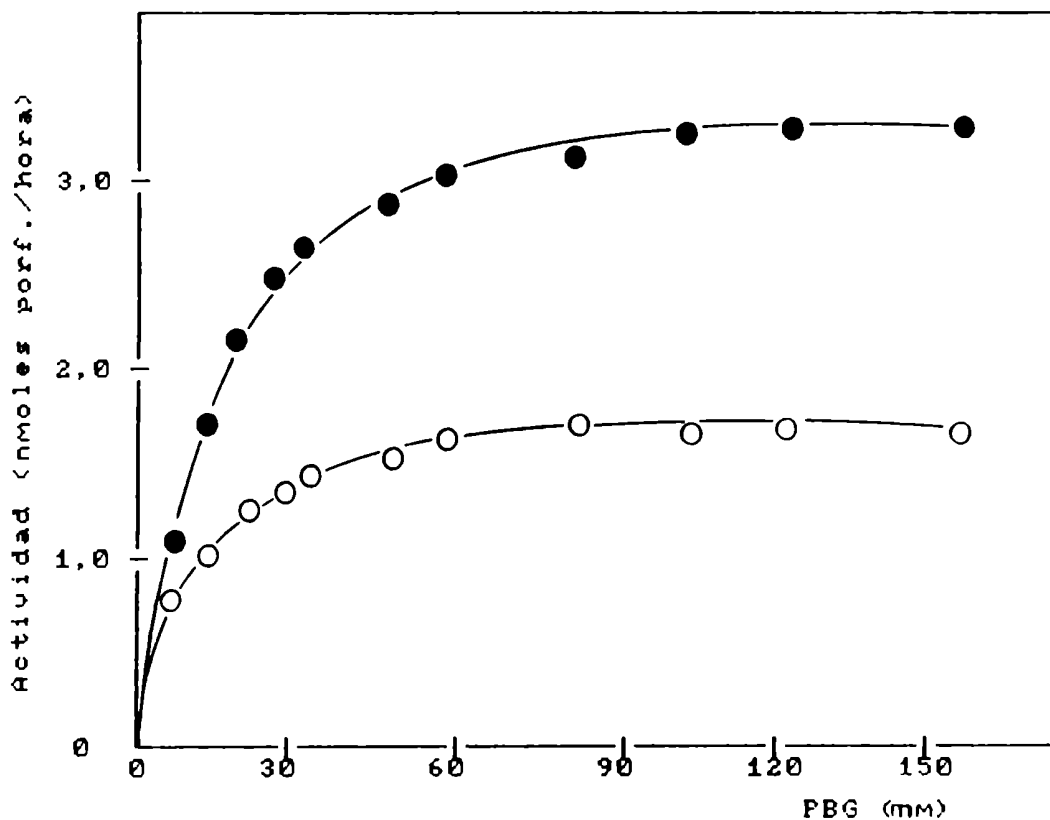


Figura 37: Actividad de PBGasa al variar la concentración de sustrato.

Se mide actividad de PBGasa para ambas cepas, salvaje (○) y mutante (●), siguiendo la metodología habitual, empleando el sobrenadante S como extracto enzimático y variando la concentración de PBG.

Comparando la cepa salvaje con la mutante vemos que se saturan a concentraciones de PBG similares ($70-90 \mu M$); pero con ag

tividades máximas diferentes, para la cepa B231 el valor es de aproximadamente el doble del correspondiente a la cepa D273-10B.

En consecuencia, trabajamos con concentraciones de PBG de alrededor de $90 \mu\text{M}$ para asegurarnos de estar en condiciones óptimas para la medición de actividad en ambas cepas.

Teniendo en cuenta la linealidad existente entre la formación de producto y el tiempo de incubación Figura 36, los valores de actividad se pueden convertir en velocidades iniciales y a partir de los mismos elaborar conclusiones con respecto al comportamiento cinético de la enzima (ver ítem VII.2.1.)

VII.1.5. pH óptimo.

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

Para la PBGasa de Saccharomyces cerevisiae, cepas D273-10B y B231, la curva de actividad en función del pH Figura 38 tiene forma de campana con un rango de pH óptimo estrecho que oscila entre 7,0 y 7,4, valores que se obtienen empleando en el sistema de incubación buffer fosfato de sodio pH 8; el uso de Tris-HCl para cubrir el mismo rango de pH produce una disminución de aproximadamente el 20% en los valores de actividad. La variación de pH en el sistema de incubación se logró utilizando las soluciones reguladoras que se detallan en la leyenda de la Figura 38.

Teniendo en cuenta que el agregado del extracto enzimático y la metabolización de sustancias a lo largo del tiempo de incuba

ción pueden contribuir a modificar el pH del sistema de ensayo, se consideró como pH experimental al promedio de los valores medidos antes y después de la incubación.

Considerando que la variación de la actividad enzimática con el pH depende fundamentalmente del comportamiento ácido-base de la enzima y del sustrato, se realizó un estudio exhaustivo al respecto que se discute más adelante (item VII.2.2.)

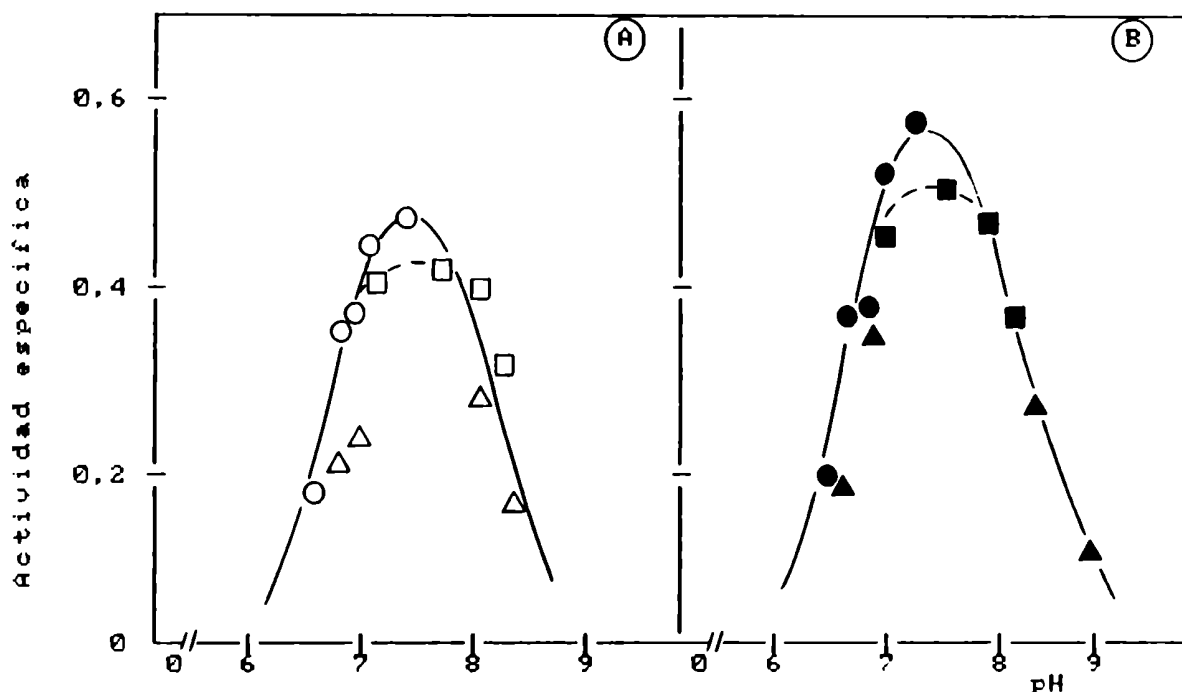


Figura 38: Actividad de PBGasa en función del pH de incubación.

Los diferentes pH se obtuvieron con distintas soluciones reguladoras: (○,●) Fosfato de sodio; (□,■) Tris-HCl; (△,▲) Glicina-NaOH. El sistema de incubación y la medición de actividades se realizaron de la manera descrita en Métodos. (A) Cepa D273-10B, (B) Cepa B231.

De los resultados obtenidos, concluimos que el pH de máxima actividad, comprendido entre 7,0 y 7,4 se obtiene al emplear buffer fosfato de sodio pH 8,0 a una concentración final de 50 mM.

VII.1.6. Efecto de la concentración de sales de sodio y magnesio

Llambias y Batlle (236), Sancovich y col.(237) y más tarde Clemente y col.(105), describieron un efecto activante de los io

nes sodio y magnesio sobre la actividad de Deaminasa (236, 237) e Isomerasa (105). Asimismo, Cornford (238) ya había observado antes que cambios en la composición salina afectan la síntesis de porfirinas a partir de PBG.

Al investigar el efecto de una mezcla de cloruro de sodio y cloruro de magnesio sobre la PBGasa de ambas cepas de levadura (Tabla 12), empleando la misma concentración que producía activación en otras fuentes, no se observó estimulación de actividad, sino que por el contrario se hizo evidente una marcada inhibición (aproximadamente del 50%). Independientemente de este resultado, la relación de isómeros I y III no se vio modificada.

Tabla 12: Efecto de las sales de sodio y magnesio sobre la actividad de PBGasa.

NaCl : MgCl ₂ (ml)	Actividad específica	
	D273-10B	B231
	0,42	0,83
0,075	0,37	0,66
0,15	0,30	0,51
0,30	0,21	0,39

Empleando como extracto enzimático el sobrenadante S, se midió actividad de PBGasa adicionando al sistema de incubación una mezcla de NaCl 0,3M : MgCl₂ 0,06M (1:1). El resto de las condiciones experimentales fueron las habituales ya descriptas en Métodos.

En conclusión se resolvió no adicionar sales de sodio y magnesio al sistema standard de incubación.

VII.1.7. Variación de la actividad enzimática con el tiempo de crecimiento.

Es conocido que en ciertos organismos la actividad de alguna

de las enzimas del camino de los tetrapirroles varía con el tiempo de crecimiento (18, 239), se decidió por lo tanto, una vez optimizadas las condiciones para la medición de la actividad enzimática, estudiar su variación en función de las horas de crecimiento.

En la Figura 39 se ilustran los datos obtenidos, es de destacar la notable diferencia que existe entre las dos cepas. En la salvaje no se observan cambios significativos entre 10 y 30 horas de crecimiento; en cambio la cepa mutante presenta un máximo bien definido entre las 20 y 25 horas, que es aproximadamente 2 veces el valor de la actividad encontrado para la PBGasa de la cepa salvaje. A partir de las 40 horas se produce, para ambas cepas, una disminución apreciable de la actividad.

En conclusión, las células deben ser cosechadas entre 20-22 horas, intervalo de tiempo correspondiente a la fase exponencial tardía de la curva de crecimiento (Figura 32).

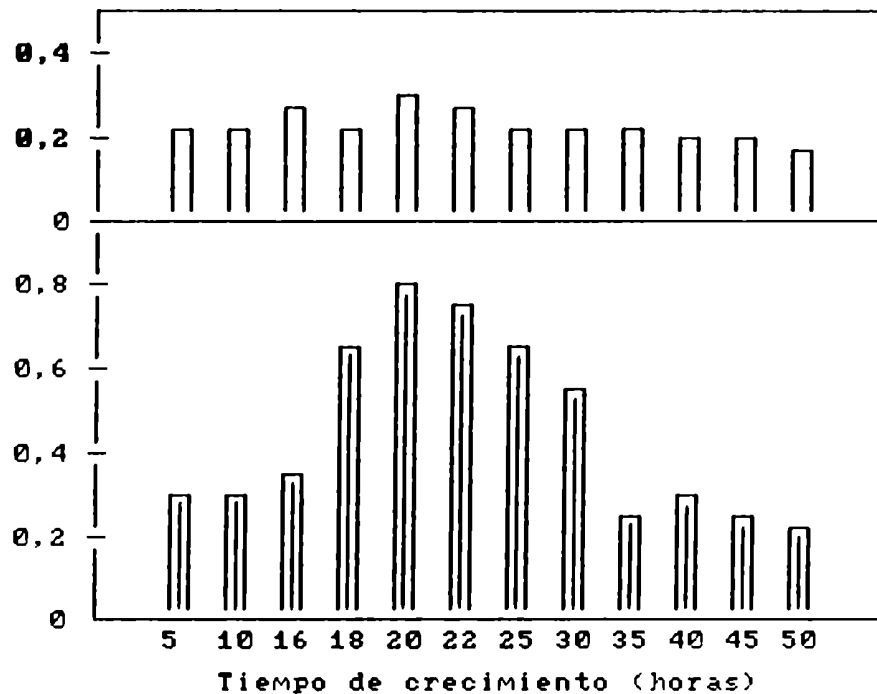


Figura 39: Efecto del tiempo de crecimiento sobre la actividad de PBGasa.

Como extracto enzimático se empleó el sobrenadante S obtenido para ambas cepas utilizando células cosechadas en los tiempos indicados. La determinación de actividad se realizó según se describe en Métodos. (□) Ceba D273-10B; (▣) Ceba B231.

VII.2 Caracterización de la porfobilinogenasa

VII.2.1. Cinética de la reacción.

El objetivo de llevar a cabo estos estudios fue establecer características del mecanismo de acción y determinar parámetros cinéticos (mediante estudio de velocidades iniciales) y analizar de qué forma distintos compuestos (en este caso ALA y porfirinas) pueden actuar sobre la cinética de la reacción. A continuación se describen los resultados obtenidos para la PBGasa de Saccharomyces cerevisiae.

A) Estudio de velocidades iniciales: Estamos en presencia de una reacción catalizada por un complejo enzimático. (Deaminasa-Isomerasa) en la que participan cuatro moléculas del mismo sustrato (PBG) y se generan dos productos (uroporfirinógenos y amoníaco).

El estudio de velocidades iniciales implica llevar a cabo mediciones de actividad (nmoles de productos formados por hora de incubación) variando la concentración de PBG (Figura 40 y 41).

Los gráficos de dobles recíprocas o sea $1/v$ vs $1/PBG$ indican para la enzima de ambas cepas un comportamiento cinético michaeliano. Al calcular los parámetros cinéticos, constante de afinidad por el sustrato (K_m) y velocidad máxima (V) observamos que:

- La cepa salvaje presenta el mismo valor de K_m ($15,4 \mu M$) independientemente de que las células se cosechen en fase exponencial o estacionaria. Resultados análogos se obtuvieron para la cepa mutante para la cual el valor de K_m fue de $20,4 \mu M$.

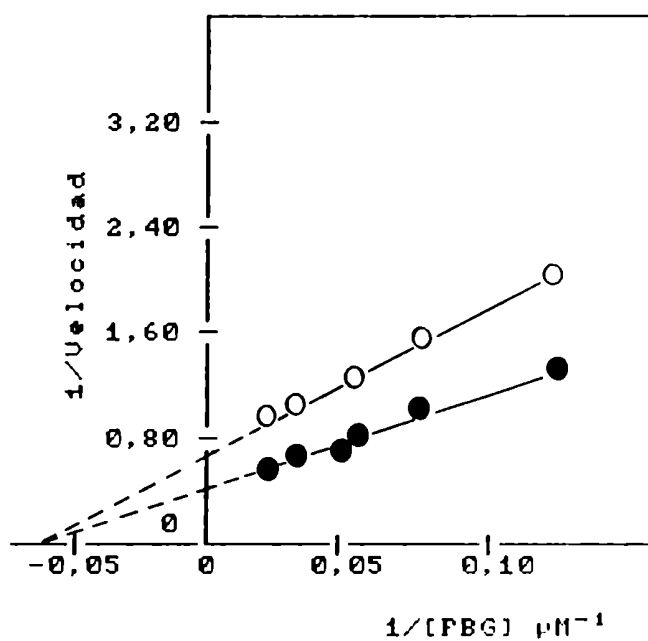
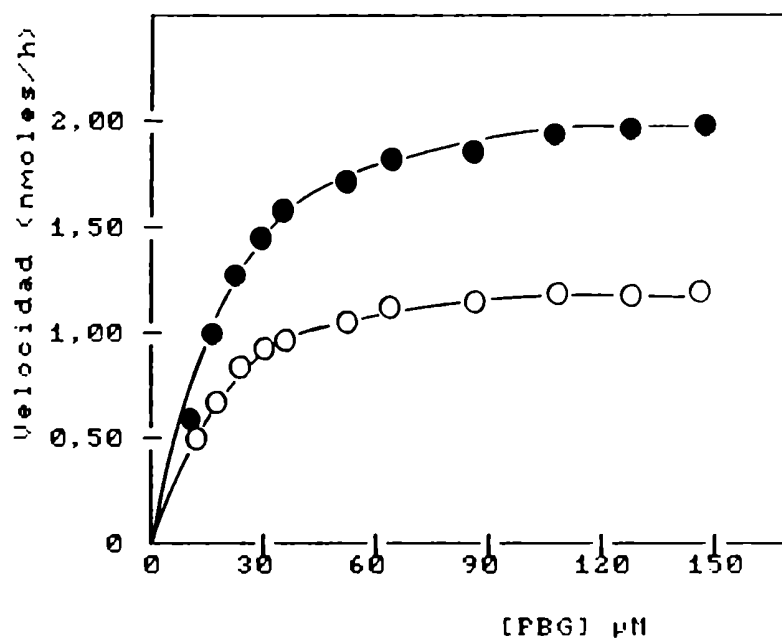
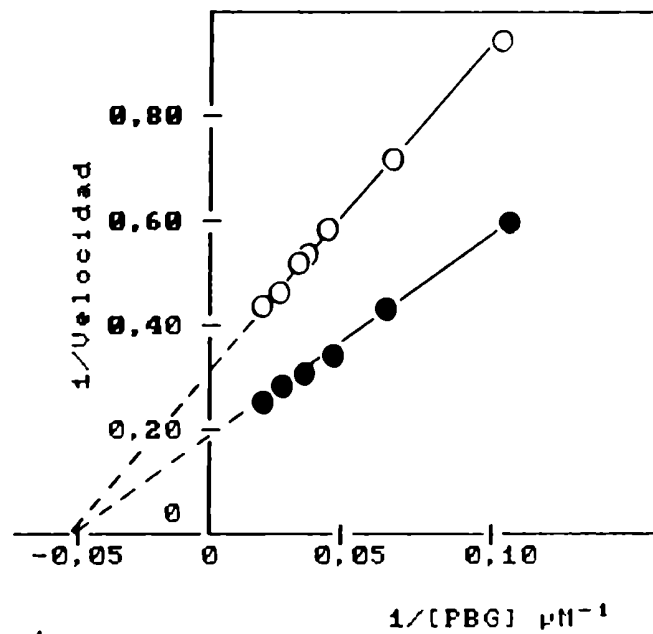
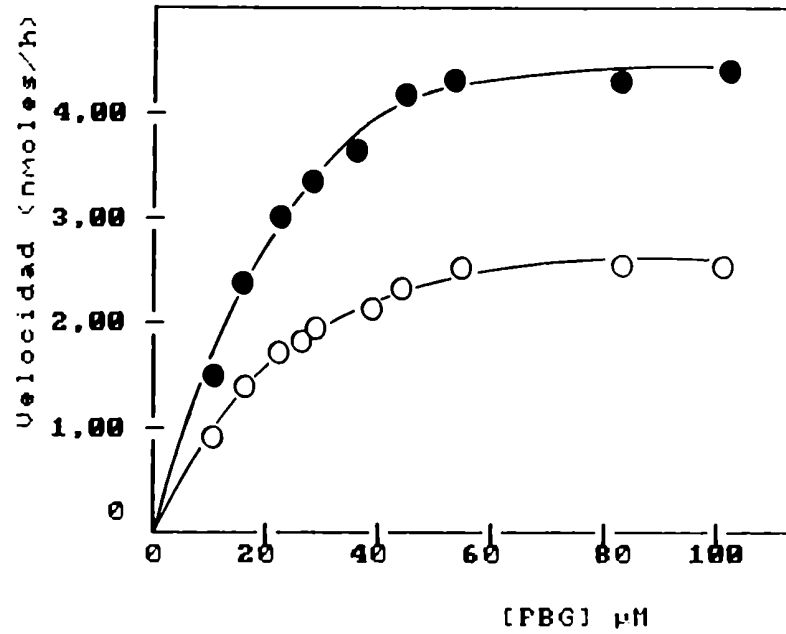


Figura 40: Actividad de PBGasa de la cepa salvaje al variar la concentración de PBG.

Se mide actividad de la manera habitual empleando el sobrenadante S proveniente de células cosechadas en fase exponencial (●) y estacionaria (○).



1

Figura 41: Actividad de PBGasa de la cepa mutante al variar la concentración de PBG.

Se mide actividad de la manera habitual empleando el sobrenadante S proveniente de células cosechadas en fase exponencial (●) y estacionaria (○).

- Ambas cepas presentaron en la fase estacionaria valores de velocidad máxima aproximadamente un 50% menores que los correspondientes a la fase exponencial. Entre las 20 y 40 horas de crecimiento la cantidad de enzima activa disminuye un 50%, probablemente debido a que las condiciones en el medio de cultivo dejaron de ser óptimas para el crecimiento (falta de nutrientes, acumulación de metabolitos tóxicos, etc).
- Los valores de K_m fueron del mismo orden para la cepa salvaje y mutante, mientras que los valores de velocidades iniciales y velocidad máxima resultaron ser en la cepa salvaje, aproximadamente la mitad de los encontrados en la cepa mutante. Esto último está de acuerdo con que la actividad de PBGasa detectada en la cepa B231, sea dos veces mayor.

Los gráficos de dobles recíprocas lineales además de permitirnos determinar los parámetros cinéticos están indicando para el complejo enzimático de la PBGasa que la misma, en las condiciones de trabajo ensayadas, no presenta interacciones entre Deaminasa e Isomerasa que pudiesen dar lugar a efectos cooperativos. El obtener un único valor de K_m para una enzima que emplea cuatro moléculas de un mismo sustrato, pone de manifiesto la existencia de un sólo tipo (o población) de sitios de unión para el mismo. Los gráficos de Hill (Figura 42) corroboran estos resultados y el comportamiento cinético michaeliano de la PBGasa de ambas cepas.

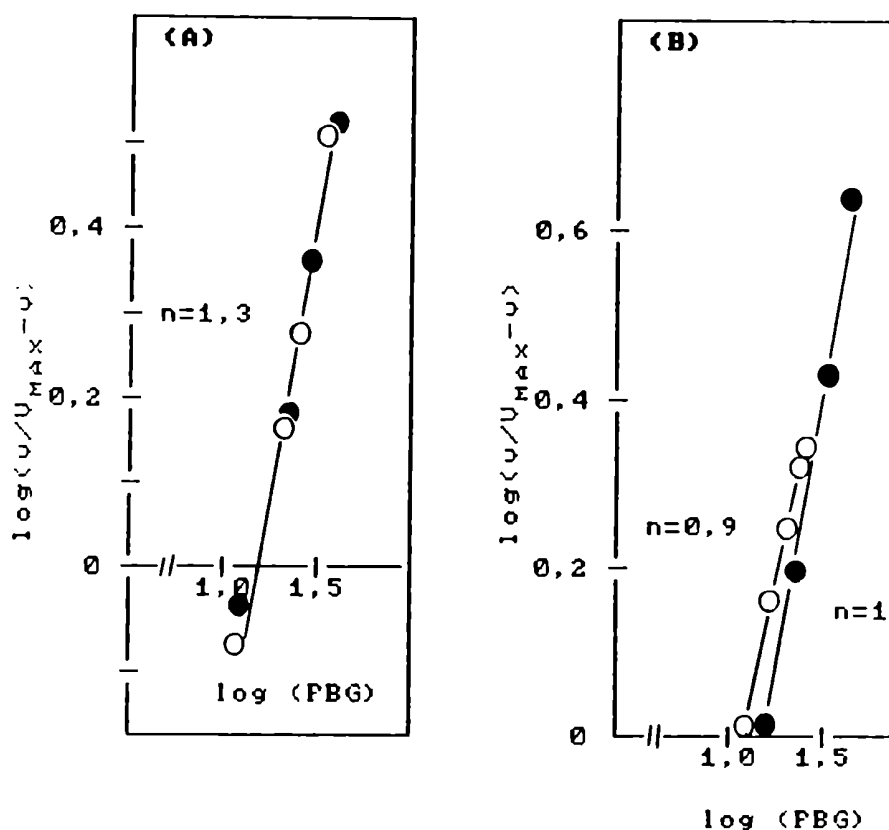


Figura 42: Grafico de Hill para las cepas salvaje

(A) y mutante (B).

Los valores representados corresponden a las velocidades iniciales y V obtenidos de las Figuras 40 y 41. En ambos casos se analizó el comportamiento de la enzima en fase exponencial (●) y estacionaria (○).

B) Comportamiento cinético en presencia de ALA y porfirinas intracelulares: Considerando que la cepa B231 cosechada en fase exponencial contiene ALA y porfirinas acumuladas intracelularmente, se evaluó la posibilidad de una variación en la cinética de la reacción al eliminar estos compuestos endógenos. Las curvas obtenidas con el sobrenadante libre de ALA y/o porfirinas fueron similares (Tabla 13), por tal razón en la Figura 43 sólo se muestra la que corresponde al extracto enzimático libre de ambos compuestos y se la compara con la correspondiente al sobrenadante S que no fue sometido a ningún tipo de tratamiento.

Tabla 13: Comparacion de los parametros cineticos para ambas cepas de Saccharomyces cerevisiae.

Cepa	Km μM	V (nmoles porf./hora)
D273-10B		
a) Fase exponencial	15,4	2,27
b) Fase estacionaria	15,4	1,43

B231		
a) Fase exponencial	20,4	5,26
b) Fase estacionaria	20,0	3,23
c) Fase exponencial sin ALA	11,0	5,13
d) Fase exponencial sin porfirinas	13,7	4,76
e) Fase exponencial sin ALA y sin porfirinas.	11,4	5,13

Los valores tabulados fueron obtenidos a partir de los gráficos de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk)

Vemos que la presencia de precursores y porfirinas acumuladas no modifica el valor de velocidad máxima, pero sí la afinidad de la enzima por el sustrato. Estos resultados están indicando que tanto el ALA como las porfirinas actuarían como inhibidores competitivos de la PBGasa.

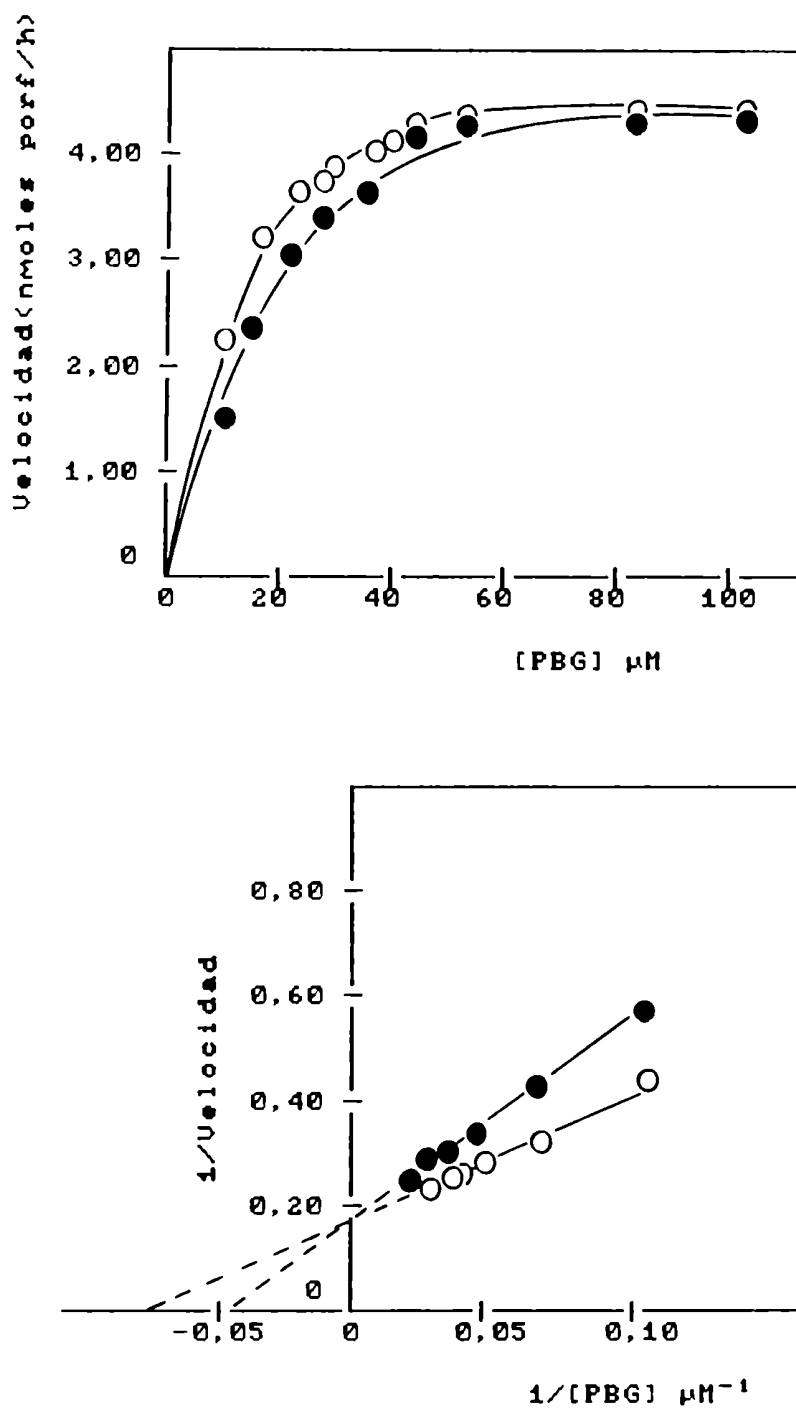


Figura 43: Efecto del ALA y porfirinas intracelulares sobre la actividad de PBGasa de la cepa B231.

Empleando células cosechadas en fase exponencial se midió actividad de PBGasa en presencia (●) y ausencia (○) de ALA y porfirinas endógenas.

La inhibición producida por las porfirinas sobre la enzima podría atribuirse (Figura 44), según la clasificación de Cleland (240) a una:

- a) Inhibición por producto: que resulta de actuar las porfirinas como sustrato de la reacción que progresa en sentido opuesto al estudiado habitualmente.
- b) Inhibición dead-end: en este caso las porfirinas compiten con el PBG por el sitio activo de la enzima, pero no pueden ser transformadas químicamente. La formación del complejo enzima-porfirinas conduce a un "camino sin salida".

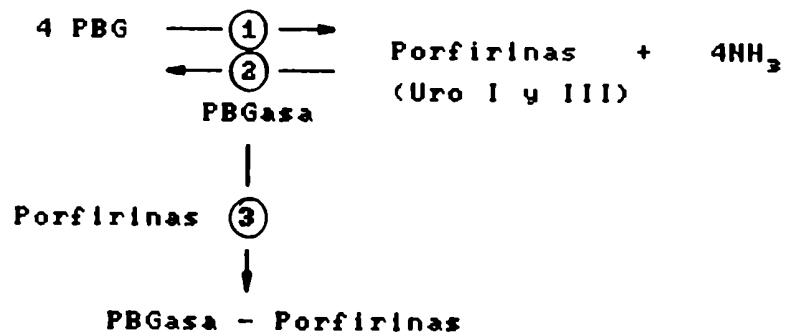


Figura 44: Inhibición de las porfirinas sobre la actividad de PBGasa.

① Indica la formación de porfirinas a partir de PBG. ② inhibición por producto y ③ inhibición por formación de complejo dead-end

Ambos tipos de inhibición tienen en común que el sustrato (PBG) y el inhibidor (porfirinas) compiten por la misma forma enzimática; por lo tanto, en principio, cualquiera de ellos serviría para justificar los resultados obtenidos.

Sin embargo, si tenemos en cuenta que no existen trabajos que avalen la reversibilidad de la reacción catalizada por la

PBGasa, la inhibición por producto debería considerarse improbable, con lo cual restaría como única alternativa que las porfirinas inhiban por formación de complejos dead-end. (Son necesarias experiencias adicionales para corroborar estas conclusiones).

Afonso y col. (241) han propuesto para la inhibición por porfirinas de Deaminasa y PBGasa de glóbulos rojos, que el inhibidor se uniría al sitio activo de la enzima produciendo un cambio conformacional que no se revertía al eliminar las porfirinas. Nuestros resultados no se pueden justificar con este modelo ya que para la PBGasa de levadura observamos que la cantidad de enzima activa no se modifica por la presencia de porfirinas (la velocidad máxima no varía)

El efecto inhibitorio del ALA no sería directo sino que se manifestaría previa conversión a porfirinas (estudios posteriores corroboran este resultado).

VII.2.2. Efecto del pH sobre la reacción catalizada por la PBGasa

La variación de la actividad enzimática con el pH (Figura 38) depende fundamentalmente del comportamiento ácido-base de la enzima y del sustrato; ambos parámetros fueron evaluados y en base a los resultados obtenidos se ensayó el comportamiento de la PBGasa de ambas cepas durante la precipitación isoeléctrica.

A) Efecto del pH sobre el estado de ionización de la enzima

La mayoría de las enzimas se desnaturalizan en forma irreversible a valores extremos de pH. No obstante, en algunos casos el efecto de variaciones en el pH puede involucrar cambios reversibles en el estado de ionización de la proteína.

Un método simple para estudiar la estabilidad de la enzima

consistió en preincubar muestras de la misma a distintos pH's tratando que las condiciones de preincubación se asemejen lo más posible a las utilizadas durante la incubación misma. Luego el pH del extracto se reajustó al óptimo y se midió actividad enzimática.

Paralelamente se realizaron los controles correspondientes para evaluar la cantidad de enzima activa presente al final de la preincubación. Una vez reajustado el pH se centrifugó a 20.000xg durante 15 minutos, descartándose el precipitado y conservando el sobrenadante como extracto enzimático. En este último se midió actividad y concentración de proteína.

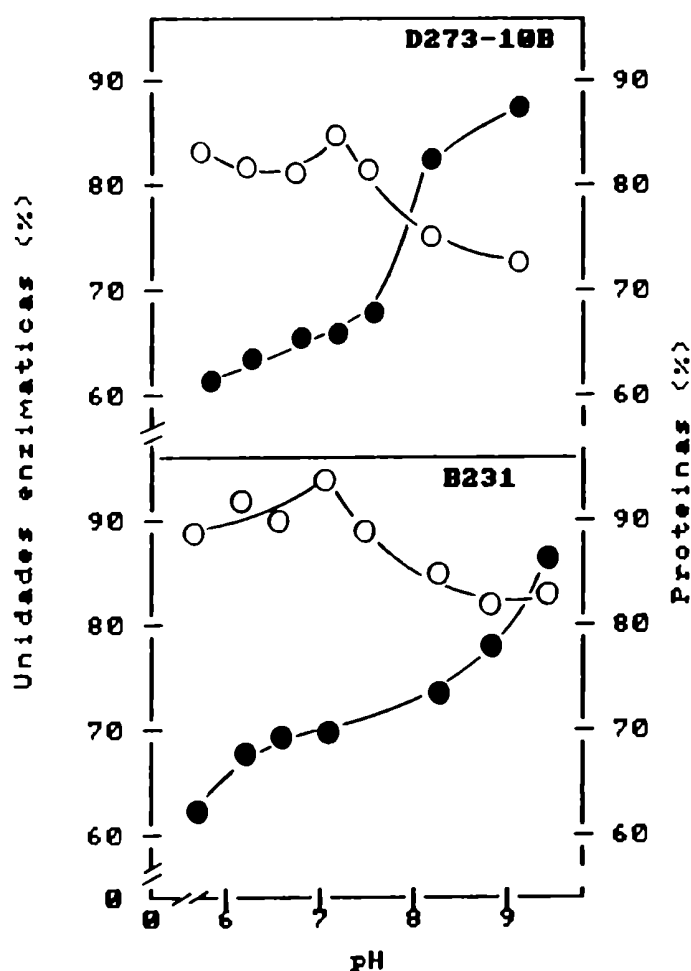


Figura 45: Estabilidad de la enzima frente al pH.

Luego de preincubar durante 30 minutos a los pH's indicados, se centrifugó y en el sobrenadante se midió actividad enzimática (○) y cantidad de proteínas (●) de la manera descrita en Métodos.

Los resultados obtenidos considerando como 100% los valores correspondientes al sobrenadante S se muestran en la Figura 45.

Manteniendo el extracto enzimático a pH óptimo (7,2) la pérdida de unidades enzimáticas debidas a la preincubación fue aproximadamente del 10% para ambas cepas. A pH's entre 6 y 7,2 la enzima mostró mayor estabilidad que a pH's mayores que el óptimo.

La cantidad total de proteína disminuye progresivamente al variar el pH entre 9 y 6. A pH 6 precipita irreversiblemente el 40% de las proteínas totales sin alterar los niveles de proteína activa (PBGasa).

Cuando en un mismo gráfico (Figura 46) superponemos estos últimos resultados con los obtenidos al incubar a los distintos pH's (Figura 38), concluimos que para ambas cepas:

- La enzima es estable en un amplio rango de pH.
- La pérdida de actividad que se observa incubando a pH's alejados del óptimo, se revierte casi en su totalidad al restaurar el pH al valor óptimo. En consecuencia, las variaciones producidas en el estado de ionización de la enzima deben atribuirse a cambios totalmente reversibles.
- En base a este estudio se deduce que la precipitación isoelectrónica podría ser utilizada como etapa de purificación para la PBGasa de levaduras.

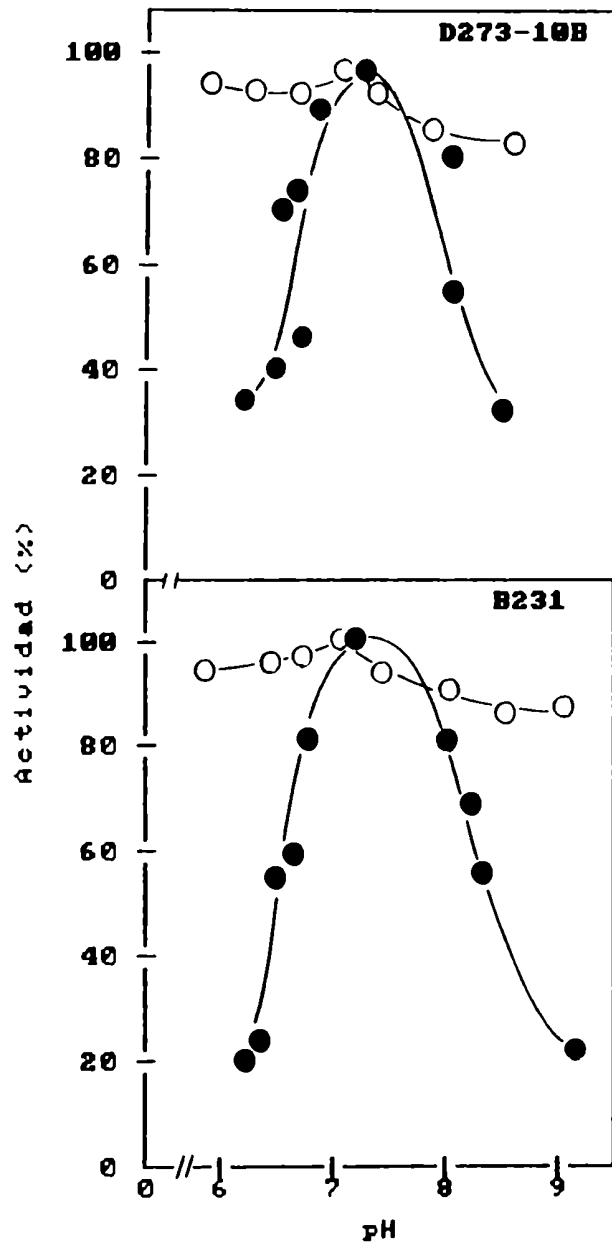


Figura 46: Estabilidad de la PBGasa frente al pH.

Se representa el porcentaje de actividad en función del pH de incubación (●) y preincubación (o). En este último caso la actividad se midió a pH óptimo.

B) Estabilidad del sustrato frente al pH.

El efecto del pH sobre la concentración de PBG se evaluó directamente a partir de los blancos de reactivo utilizados como controles al construir la curva de la Figura 38 (estos tubos contenían, a excepción de la enzima, todos los otros componentes del sistema de incubación). Partiendo de aproximadamente 0,27 μ moles de PBG observamos (Figura 47) que esta cantidad se mantiene constante (dentro del error del método de cuantificación) a lo largo de todo el rango de pH empleado independientemente del pH empleado.

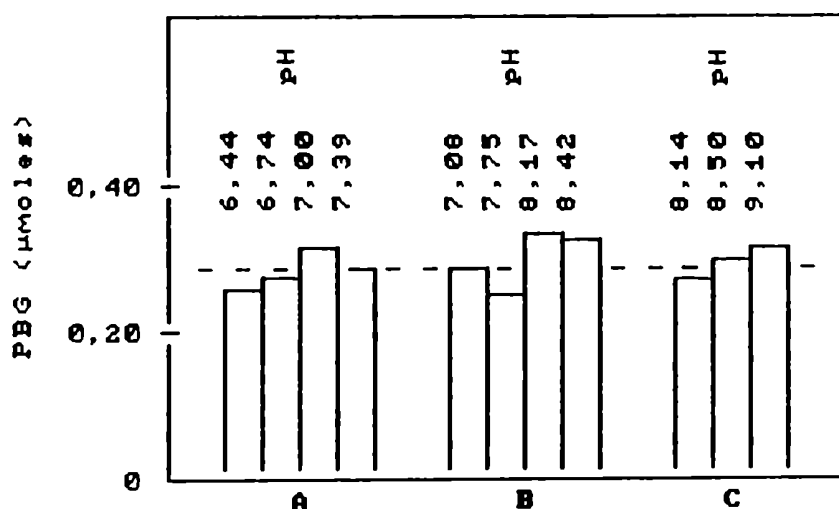


Figura 47: Estabilidad del sustrato (PBG).

En los blancos de reactivos que corresponden a cada buffer empleado en la obtención de la curva de pH (A: Tris-HCl, B: Fosfato de sodio, C: Glicina-NaOH), se determinó la cantidad de PBG remanente.

C) Precipitación isoeléctrica.

El pH en el cual la proteína no tiene carga neta se designa como su punto isoeléctrico y debido a la falta de repulsión entre las moléculas corresponde al de mínima solubilidad. Esta propiedad se utiliza como principio de purificación en la técnica que se conoce con el nombre de precipitación isoeléctrica.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores (Figura 45 y 46), los rangos de pH ensayados para el fraccionamiento estuvieron comprendidos en la zona de pH's ácidos y en cada intervalo probado se determinó cantidad de proteínas y actividad enzimática en sobrenadante y pellet (Figuras 48 y 49).

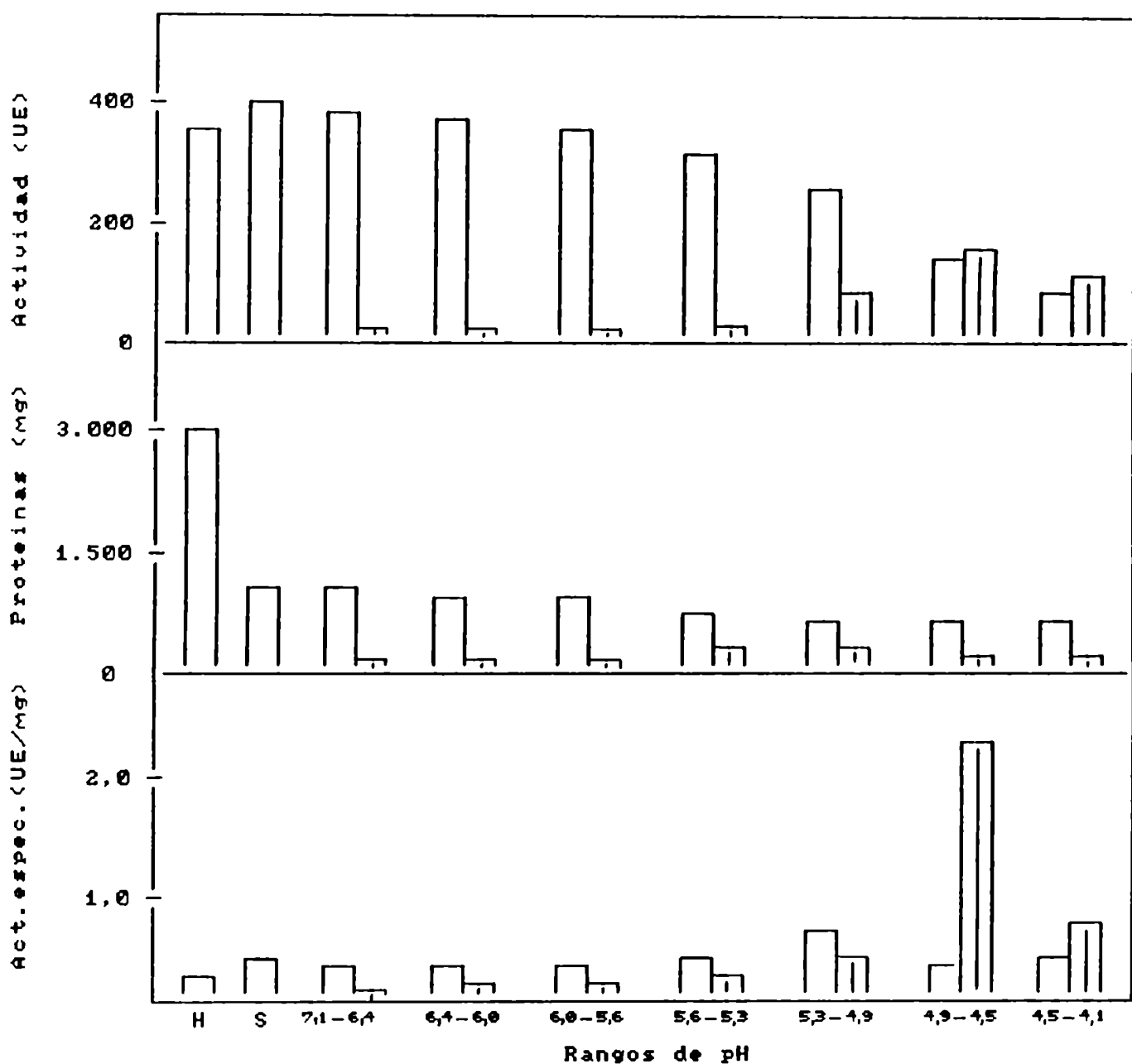


Figura 48: Precipitación isoelectrica (Ceba D273-10B).

En cada rango de pH ensayado se midió en el sobrenadante (□) y en el pellet (▨) número de unidades enzimáticas y cantidad de proteína según la metodología descrita en Métodos.

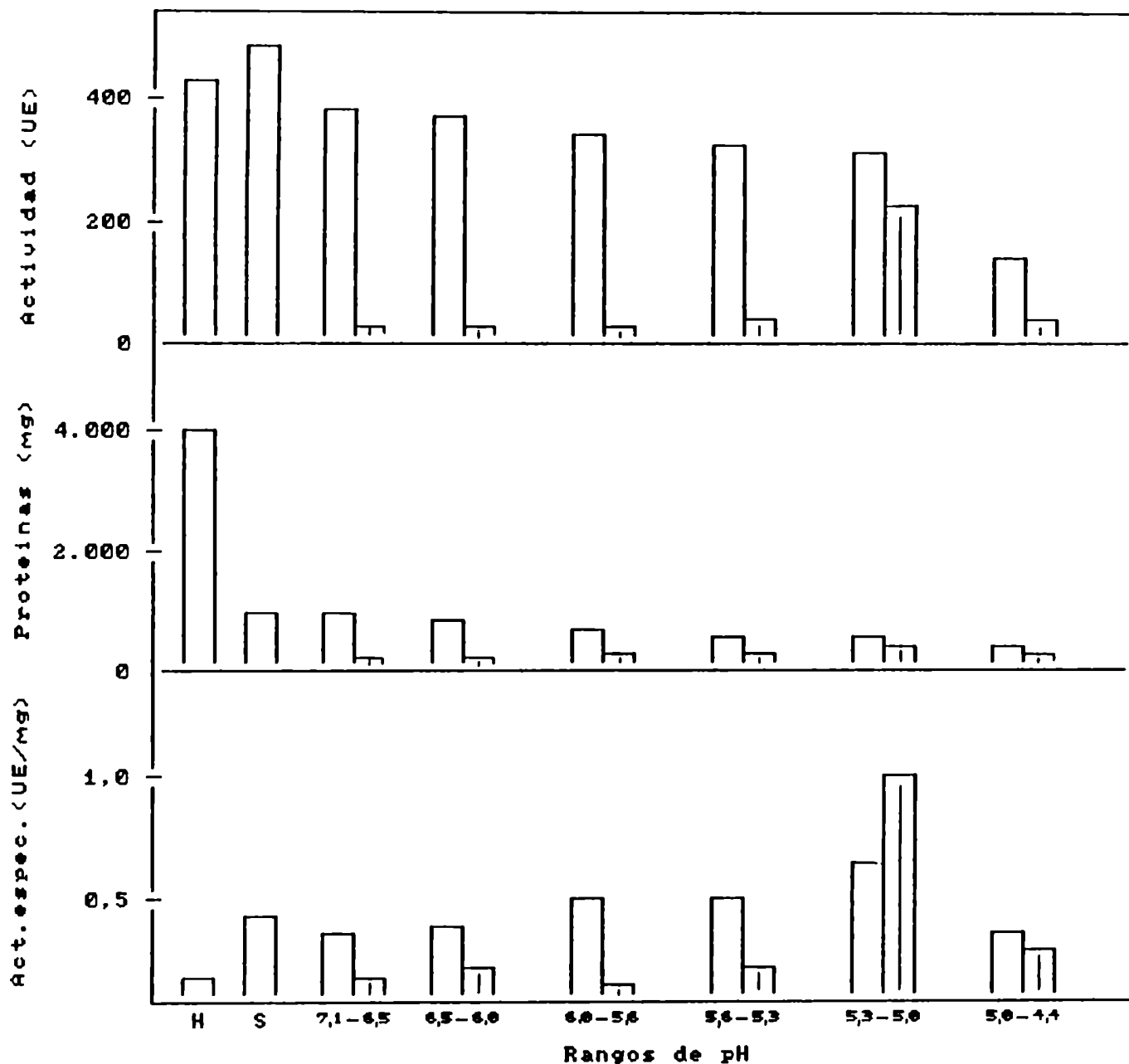


Figura 49: Precipitación isoelectrónica (Cepa B231).

En cada rango de pH ensayado se midió en el sobrenadante (□) y en el pellet (▣) número de unidades enzimáticas y cantidad de proteína según la metodología descrita en Métodos.

Vemos que para ambas cepas existe un rango estrecho de pH, comprendido entre 5,5-4,2 aproximadamente en el cual se concentran las unidades enzimáticas y se observa una disminución significativa en la concentración de proteínas.

Considerando el rendimiento y grado de purificación alcanzado (Tabla 14), la precipitación isoeléctrica podría ser empleada como etapa de purificación.

Tabla 14: Precipitación isoeléctrica como etapa de purificación

Fracción	Proteínas (mg)	Actividad (U.E.)	Act.especif. (U.E./mg)	Rend. (%)	Purif.
Cepa D273-10B					
Homogenato	2969	351	0,12	100	1,0
Sobrenadante S	1099	426	0,39	121	3,2
Rango de pH 5,3 - 4,2	258	271	1,05	77	8,8

Cepa B231					
Homogenato	2164	458	0,21	100	1,0
Sobrenadante S	653	511	0,78	112	3,7
Rango de pH 5,6 - 4,4	161	286	1,78	62	8,5

Los distintos pH's se alcanzaron agregando ácido acético. Los valores para el rango de pH's indicado corresponden a la proteína que precipita en dicho intervalo.

VII.2.3. Fraccionamiento salino.

Empleando el sobrenadante S como extracto enzimático se investigó el efecto del tratamiento con sulfato de amonio sobre la actividad de PBGasa (Tabla 15). Fraccionando en los rangos de 0-40, 40-65 y 65-90% observamos que alrededor del 85% de las unidades enzimáticas presentes en el homogenato se concentran en la fracción 40-65%, alcanzándose un grado de purificación de entre 6 y 7 veces, respecto a la etapa inicial y no más de dos veces respecto al sobrenadante S.

En conclusión, además de la precipitación isoelectrónica, el fraccionamiento con sulfato de amonio sería otra técnica que nos permite concentrar la proteína sin pérdida apreciable de actividad, pero con la desventaja que para medir actividad de PBGasa en esta fracción debe ser previamente desalada ya que el ión amonio es un poderoso inhibidor de esta enzima.

Tabla 15: Precipitación con sulfato de amonio

Fracción	Proteínas (mg)	Actividad (U.E.)	Act.especif. (U.E./mg)	Rend. (%)	Purif.
Cepa D273-10B					
Homogenato	1233	148	0,12	100	1,0
Sobrenadante S	424	170	0,40	115	3,3
(NH ₄) ₂ SO ₄					
0 - 40%	95	34	0,36	23	3,0
40 - 65%	170	130	0,76	88	6,4
65 - 90%	42	4	0,10	3	0,8

Cepa B231					
Homogenato	2086	420	0,20	100	1,0
Sobrenadante S	596	462	0,77	110	3,9
(NH ₄) ₂ SO ₄					
0 - 40%	114	79	0,69	19	3,5
40 - 65%	234	357	1,53	85	7,7
65 - 90%	61	7	0,11	2	0,6

La proteína precipitada en los distintos rangos se resuspendió en buffer fosfato de sodio 0,05M pH 8,0; se desaló a través de una columna de Sephadex G-25 (dimensiones: longitud 25cm; diámetro interno 10mm; volumen de gel 20 ml) y se midió actividad de la manera descrita en Métodos.

VII.2.4. Tratamiento con sulfato de protamina.

La protamina es un compuesto que actúa precipitando ácidos y proteínas asociadas a los mismos. Se emplea como etapa de purifi

cación para aquellas proteínas que permanecen en solución independientemente de la concentración de protamina que se utilice en el tratamiento. Si la proteína en estudio, por ejemplo una enzima, interactúa asociándose a la protamina, este método no se emplearía como etapa de purificación ya que no es posible separarla sin pérdida de actividad.

Para evaluar el efecto del tratamiento con sulfato de protamina sobre la PBGasa de Sacchromyces cerevisiae se llevó a cabo el siguiente estudio. A distintas alícuotas del sobrenadante S, obtenido de la manera habitual, se le agregaron volúmenes variables de una solución al 2% en agua de sulfato de protamina y se dejó agitando en frío durante 20 minutos. Las relaciones empleadas oscilaron entre 10^{-2} y 10^{-3} ml de sulfato de protamina/ml de proteína.

Transcurridos los 20 minutos el sulfato de protamina con la proteína asociada se separó ya sea centrifugando a $24.000 \times g$ 20 minutos o bien ultracentrifugando 30 minutos a $140.000 \times g$.

En la Figura 50 A, perteneciente a la cepa salvaje podemos ver que para relaciones de sulfato de protamina mayores de 5×10^{-3} hay una pérdida importante de las unidades enzimáticas contenidas en el sobrenadante, independientemente del método de separación empleado.

En cuanto a la cantidad de proteína (Figura 50 B) sólo observamos el efecto del sulfato de protamina si la separación de la proteína precipitada se realiza por centrifugación.

Como era de esperar (Figura 50 C) con relaciones de sulfato de protamina menores a 5×10^{-3} no conseguimos mejorar el valor de actividad específica obtenido simplemente por ultracentrifugación del sobrenadante. Para relaciones mayores a 5×10^{-3} la actividad específica disminuye significativamente debido a la pérdida de unidades enzimáticas.

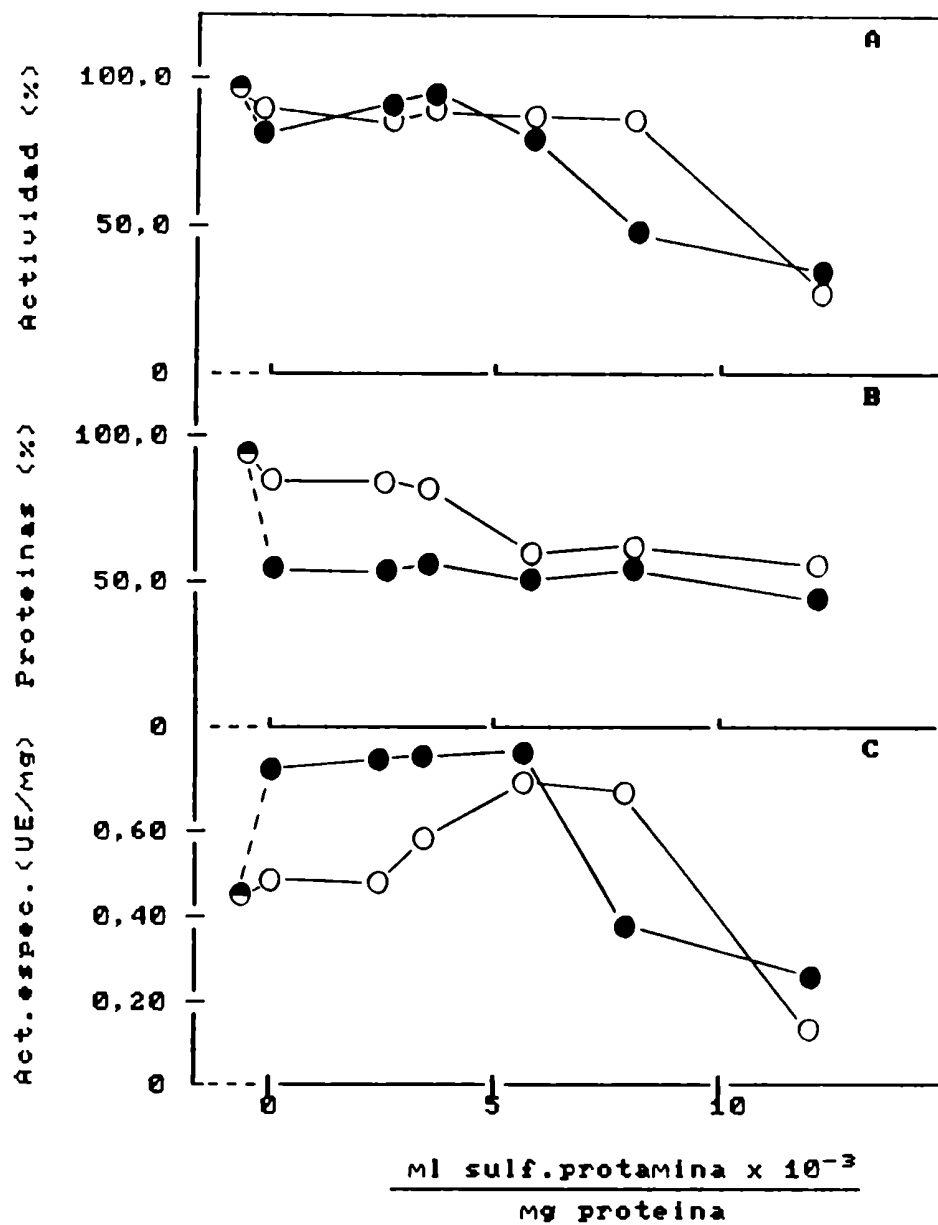


Figura 50: Tratamiento con sulfato de protamina (Cepa D273-10B)

Se determinó contenido de proteínas y unidades enzimáticas a las fracciones centrifugadas (o) y ultracentrifugadas (●) provenientes del tratamiento con distintas concentraciones de sulfato de protamina. El primer punto de cada gráfico sobre la abscisa punteada corresponde a los valores determinados en el sobrenadante S.

Según la Figura 51 A, B y C los resultados que se obtuvieron empleando la cepa mutante fueron similares a los analizados para la cepa salvaje.

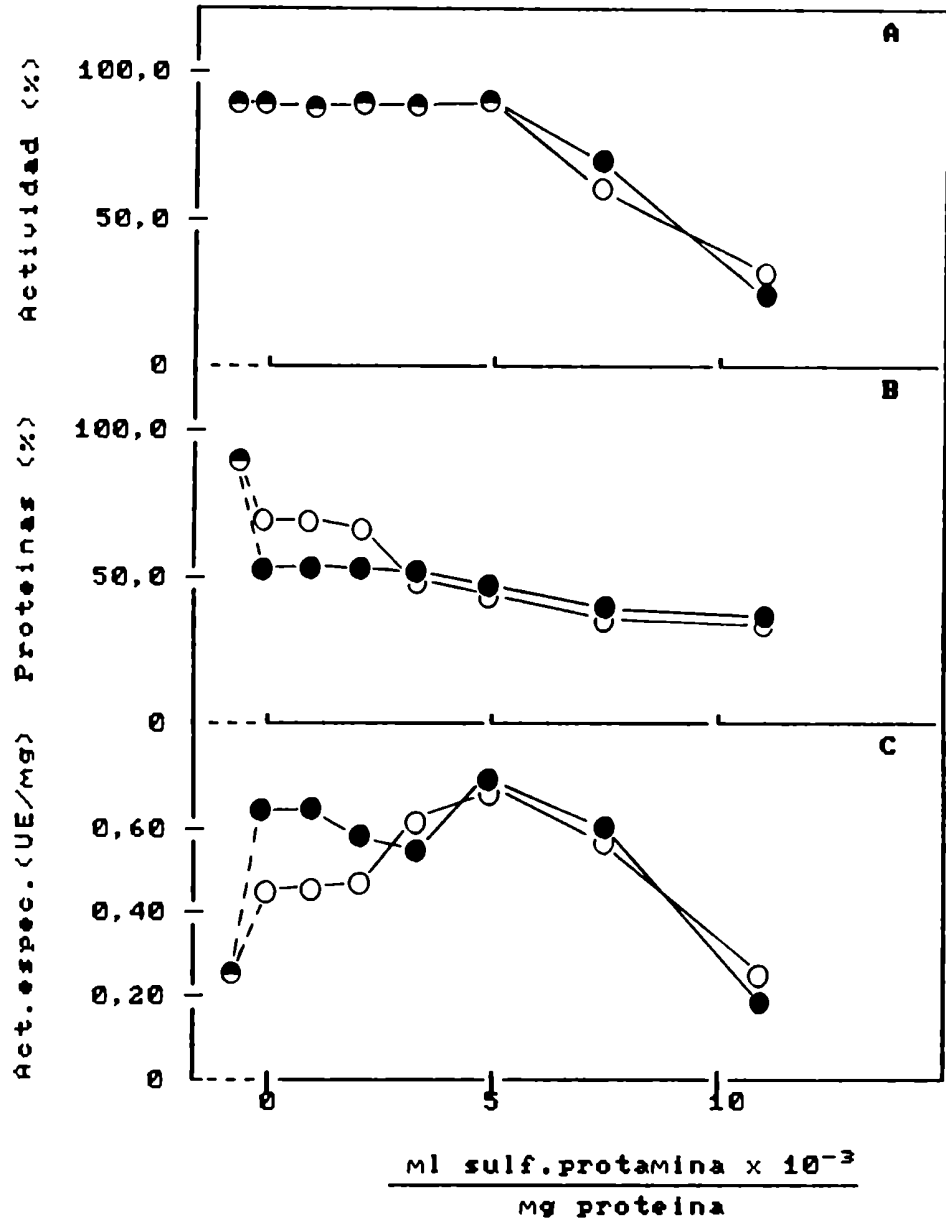


Figura 51: Tratamiento con sulfato de protamina

(Cepa B231).

Se determinó contenido de proteínas y unidades enzimáticas a las fracciones centrifugadas (○) y ultracentrifugadas (●) provenientes del tratamiento con distintas concentraciones de sulfato de protamina. El primer punto de cada gráfico sobre la abscisa punteada corresponde a los valores determinados en el sobrenadante S.

Finalmente, considerando que la cantidad de proteína que se consigue separar del sobrenadante simplemente por ultracentrifugación permanece constante independientemente del agregado de sul-

fato de protamina, concluimos que para ambas cepas en estudio la disminución en un 50% de la cantidad de proteína debe atribuirse en su mayor parte al efecto de la ultracentrifugación. Se descarta entonces el tratamiento con sulfato de protamina como posible etapa en un esquema de purificación.

VII.2.4. Estabilidad de la PBGasa.

A) Tratamiento térmico: Debido a la naturaleza termolábil (Deaminasa) y termolábil (Isomerasa) de las dos proteínas que constituyen la PBGasa, nos pareció interesante investigar el comportamiento de este complejo cuando se lo somete a diferentes temperaturas durante distintos intervalos de tiempo.

En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos para el sobrenadante S proveniente de la cepa D273-10B luego de tratamiento térmico a distintas temperaturas durante 5 minutos.

Para la fracción calentada a 40 °C observamos un aumento de alrededor del 30% en la cantidad de unidades enzimáticas, que junto con la disminución que se produce en la cantidad de proteínas, da como resultado un aumento de aproximadamente el 50% en la actividad específica.

A temperaturas más altas es evidente una disminución significativa en la actividad enzimática (a 55 °C se pierde alrededor del 45% de unidades enzimáticas) sin embargo, los valores de actividad específica aumentan debido a la acentuada disminución (60%) en la cantidad de proteína.

El aumento de unidades enzimáticas que se obtiene como consecuencia del tratamiento a 40 °C podría atribuirse a la conocida activación que sufre el complejo de la PBGasa cuando la Isomerasa

se separa de la Deaminasa. Este comportamiento podría justificarse si consideramos que la Isomerasa actúa en el complejo como unidad regulatoria modulando la actividad del mismo.

Otra posibilidad que debería investigarse es la presencia de algún factor regulador de naturaleza proteica o no que por efecto del calentamiento se liberara o adoptara una estructura particular que le permitiera actuar sobre uno o ambos componentes de la PBGasa, modificando así su actividad.

Tabla 16: Tratamiento termico (Cepa salvaje).

Fracción	Actividad (U.E.)	Proteínas (mg)	Actividad específica (U.E./mg)
Control 1	3,12	7,10	0,44
Calentamiento			
40 °C	4,13	6,38	0,65
45 °C	3,68	6,68	0,55
50 °C	3,34	4,25	0,78
55 °C	2,25	2,88	0,78
Control 2	8,23	7,10	1,16

El sobrenadante (S) fue sometido a las temperaturas que se indican 5 minutos y luego de separar la proteína desnaturalizada se incubó en condiciones standard. Los controles 1 y 2 corresponden al sobrenadante S sin tratamiento térmico, incubado a 37° y 45 °C, respectivamente.

La PBGasa de esta fuente se diferencia de la caracterizada en otros tejidos por presentar menor estabilidad térmica y una activación menos notoria al disociarse el complejo de la PBGasa por acción del calor.

Según los datos cromatográficos, independientemente del tiempo y la temperatura de calentamiento, las porfirinas obtenidas en estos ensayos fueron siempre del tipo isomérico 1, corroborando así la termolabilidad de la Isomerasa.

Comparando los controles 1 y 2 observamos que la actividad medida incubando el sobrenadante S a 45 °C durante 1 hora se incrementa por lo menos tres veces respecto al incubado a 37 °C.

Este aumento, evaluado considerando que la concentración de proteínas no se modifica, en realidad sería mucho mayor dado que el contenido final de las mismas al cabo de una hora de incubación a 45 °C es del 60% del valor inicial.

Los resultados obtenidos para la cepa mutante no se muestran por ser totalmente análogos a los obtenidos para la cepa salvaje.

Finalmente, se presentan los gráficos provenientes del sobrenadante S a 45 °C durante 5, 10 y 15 minutos (Figura 52).

Analizando los datos obtenidos para ambas cepas vemos que luego del incremento inicial, que se visualiza entre el control y tiempo cero, las unidades enzimáticas permanecen aproximadamente constantes para los diferentes tiempos empleados. El aumento de actividad específica se debe únicamente a una disminución en la cantidad de proteína no activa.

Cuando el calentamiento se lleva a cabo más allá de 15 minutos se observa una disminución apreciable en el número de unidades enzimáticas, debido a desnaturalización de la proteína. Este comportamiento distinto al obtenido para la enzima incubada a 45 °C durante 1 hora (Tabla 16, control 2) podría atribuirse a que en este último caso la proteína se encuentra en presencia de su sustrato el cual ejercería una acción protectora.

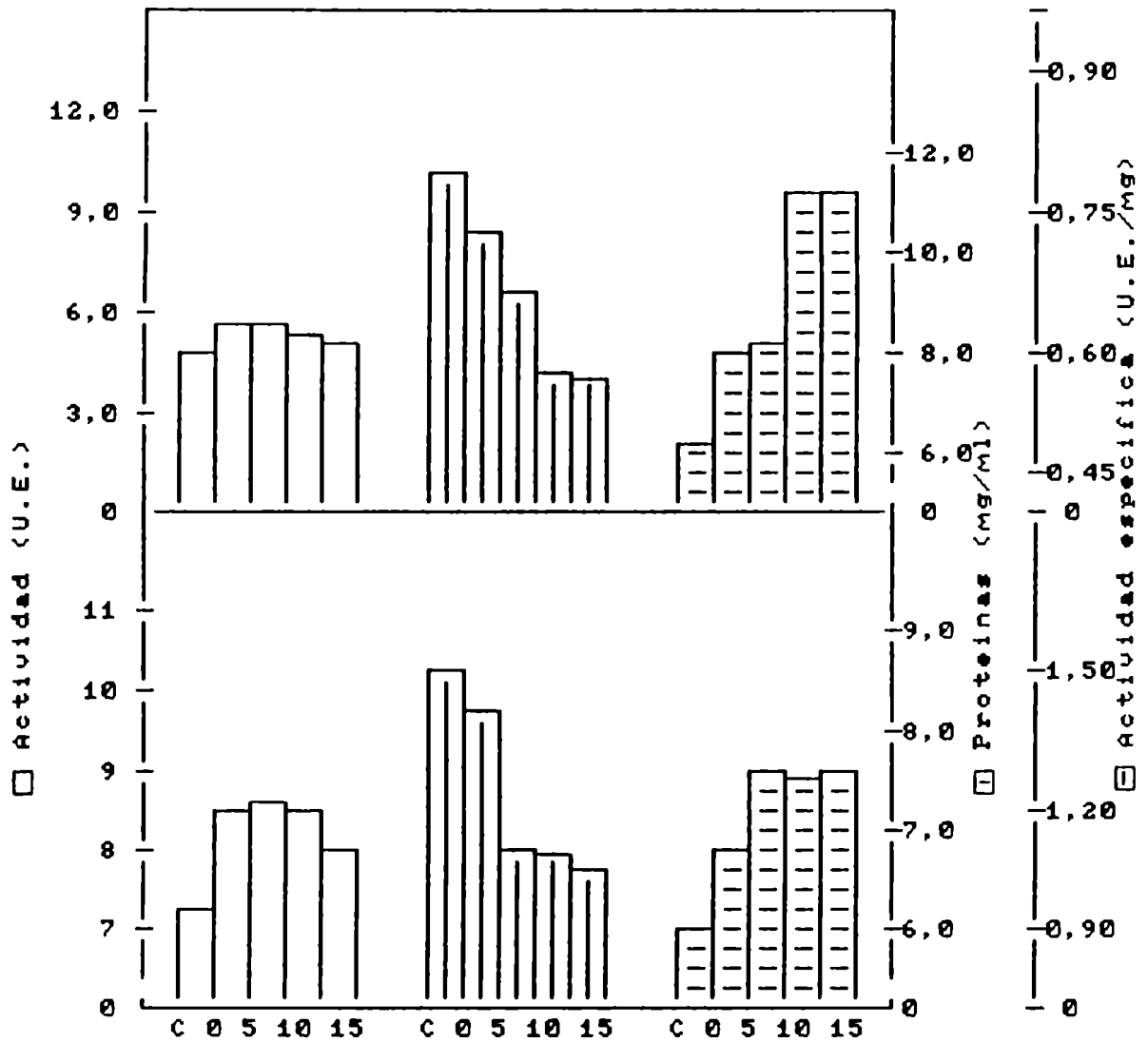


Figura 52: Efecto de la temperatura sobre la actividad de la PBGasa en ambas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se mide la concentración de proteínas y producto formado, luego de calentar el sobrenadante S a 45 °C durante los tiempos que se especifican. La actividad a tiempo cero corresponde a la fracción calentada sólo hasta alcanzar los 45 °C y C al sobrenadante S sin tratamiento previo.

En conclusión, la PBGasa de ambas cepas se comporta frente al tratamiento térmico de forma similar. Es de destacar que la estabilidad al calor de la Deaminasa de levadura es menor que la encontrada en otros tejidos.

En forma análoga a lo reportado para la enzima de otras fuentes (94, 97, 236, 237, 242) nosotros encontramos la típica activación por calentamiento de la Deaminasa.

B) Estacionamiento a bajas temperaturas: La determinación de la curva de estacionamiento es útil desde el punto de vista práctico ya que tiene por objeto establecer la estabilidad de la enzima en el tiempo; dicho estudio se realizó con células cosechadas y lavadas guardadas a -20°C y en el sobrenadante conservado a 4°C .

El objetivo era establecer cuánto tiempo podían mantenerse las células de ambas cepas (D273-10B y B231) a -20°C una vez cosechadas, para lo cual se midió la actividad del sobrenadante obtenido con las células recién cosechadas y con las células estacionadas una, dos y tres semanas; se observó que la actividad no se modifica durante este tiempo, de modo que es posible cosechar y conservar un stock de células durante aproximadamente un mes a -20°C .

A una fracción del sobrenadante obtenido con células recién cosechadas se le determinó actividad y el resto fue conservado a 4°C durante aproximadamente 10-15 días realizándose controles periódicos de la actividad.

En la Figura 53 vemos que para la cepa salvaje la actividad de la enzima no se modifica hasta aproximadamente el cuarto día de estacionamiento, luego comienza a disminuir llegando a una actividad enzimática del 10% de la inicial entre el séptimo y el on

ceavo día de estacionamiento.

La cepa B231 en cambio, mantiene su actividad de PBGasa en un valor que no difiere significativamente del inicial durante alrededor de 20 días. Cabe aclarar, sin embargo, con respecto a esta última cepa que si bien a partir del cuarto día se produce un pequeño aumento de la actividad, la fracción enzimática en estudio aumentó su turbidez con los días de estacionamiento y que por otro lado el máximo de Soret correspondiente a la medición de porfirinas formadas que siempre se encuentra a 405 nm (uroporfirina) se detectó aproximadamente a 402 nm, lo que hace suponer una posible degradación o formación de productos que absorben a esa longitud de onda. Por esta razón, no podemos asegurar un comportamiento normal de la PBGasa en la cepa B231 durante ese tiempo.

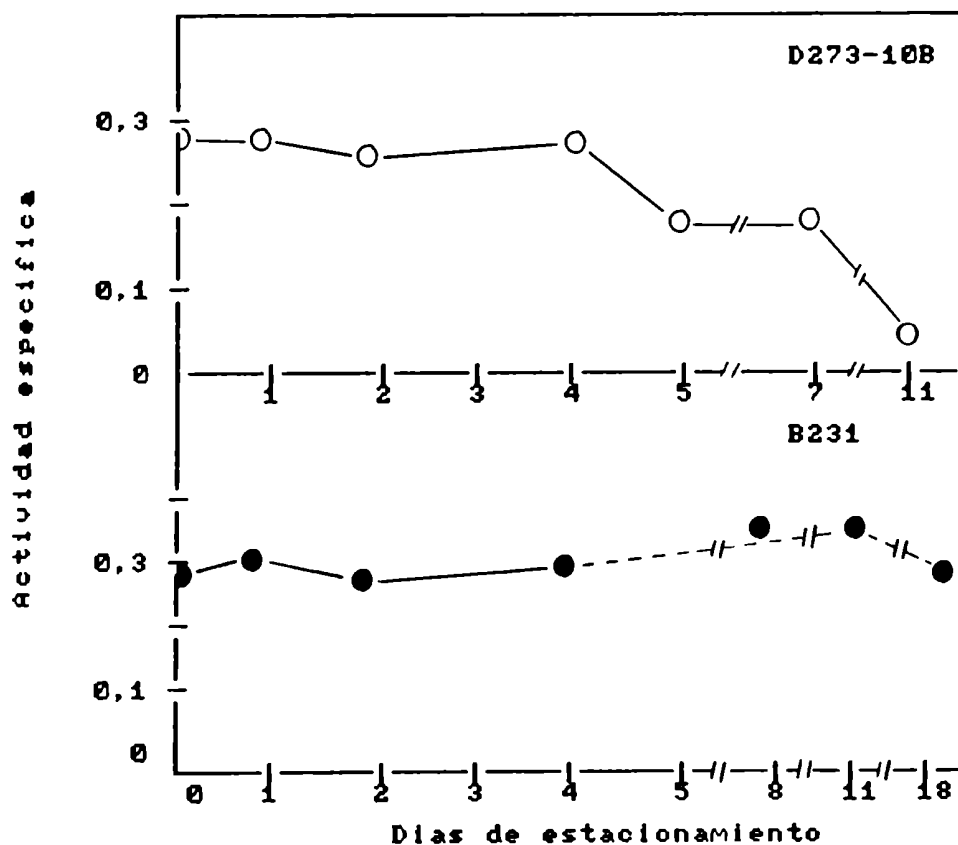


Figura 53: Variación de la actividad de PBGasa con los días de estacionamiento.

Se empleó como fracción enzimática el sobrenadante S obtenido a partir de células cosechadas en fase exponencial tardía y mantenido a 4 °C durante el tiempo que duró la experiencia.

Concluimos entonces que las células cosechadas pueden estacionarse durante aproximadamente un mes mientras que la fracción sobrenadante S debe utilizarse dentro de los tres primeros días, durante los cuales mantiene su actividad original, sin sufrir ningún tipo de alteraciones.

VII.2.6. Determinación del peso molecular.

Se determinaron los pesos moleculares de la PBGasa de ambas cepas de levadura, empleando cromatografía a través de tamices moleculares (Sephadex G-100).

La preparación enzimática utilizada presentaba un grado de purificación de treinta veces y provenía del sobrenadante S sometido a ultracentrifugación (140.000 xg 20 minutos) y precipitación isoeléctrica (rango de pH: 5,5-4,2).

En la Figura 54 se muestra el perfil de elución correspondiente a la cepa salvaje. La enzima eluye en un pico único, al cual en base al volumen de elución se le adjudica un PM de 50.000 \pm 5.000. No se detectó la presencia de agregados ni especies de menor peso molecular. El mismo perfil de elución con resultados análogos se obtuvo también para la cepa mutante.

En la Tabla 17 se presenta una recopilación de datos provenientes de diversas publicaciones en las que se reporta el peso molecular de esta enzima. Los valores hallados abarcan un rango que va desde 25.000 hasta aproximadamente 100.000, si bien predomina el de 50.000. Ya en 1980 Rossetti y col. (94) llamaron la atención acerca de la diversidad de esos valores de pesos moleculares hallados para la PBGasa, señalando que la enzima podría existir en tres

especies moleculares diferentes, tetrámero, dímero y monómero, de acuerdo a la fuente. Estos autores sugirieron además, que en algunos organismos el monómero sería la especie activa, como ocurre en callos de soya, mientras que en otros, sería necesaria la adición de dos a cuatro unidades protoméricas para que la actividad se manifieste.

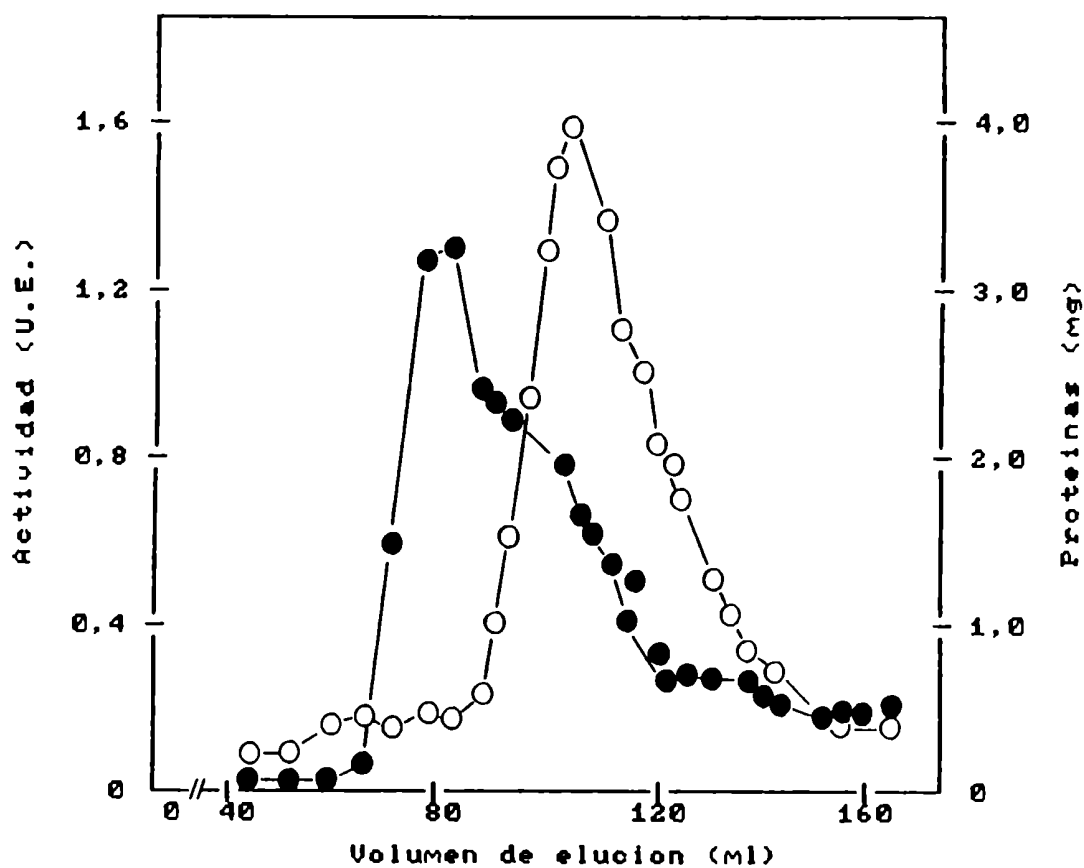


Figura 54: Perfil de elución de la PBGasa a través de Sephadex G-100 (Cepa D273-10B).

La proteína se eluyó empleando buffer fosfato de sodio 50mM pH 8,0. En los eluidos de la columna se determinó contenido proteico (●) y actividad (○). El sistema de incubación y la metodología empleada fueron los descritos en Métodos.

Tabla 17: Pesos moleculares para la PBGasa de distintas fuentes.

Fuente	Peso molecular	Referencias
Hígado vacuno	50.000	(243)
Hígado porcino	50.000	(244)
Eritrocitos de ave	100.000	(245)
Callos de soya	25.000	(236)
<u>Euglena gracilis</u> (soluble)	50.000 (25.000)	(246)
<u>Euglena gracilis</u> (particulada)	50.000 (25.000)	(247)
<u>Rp. palustris</u>	115.000 50.000	(248)
<u>S.cerevisiae</u> (cepa D273-10B)	50.000	este trabajo
<u>S.cerevisiae</u> (cepa B231)	50.000	este trabajo

Los datos de peso molecular entre paréntesis corresponden especies proteicas presentes en menor cantidad pero con actividad de PBGasa.

VII.3. Conclusiones parciales.

Para la Porfobilinogenasa de ambas cepas (D273-10B y B231) de Saccharomyces cerevisiae:

- Establecimos las características óptimas para la medición de actividad "in vitro":

a) La técnica más adecuada para extraer la proteína a partir de una suspensión celular, resultó ser la sonicación a una amplitud de 10 μ durante 3 minutos y posterior centrifugación a 24.000 xg 20 minutos.

b) En el rango ensayado la formación de porfirinas fue lineal tanto con el tiempo de incubación (0-2 horas) como con la concentración de proteínas (0-15 mg).

c) La actividad enzimática no se vio modificada por la presencia o ausencia de oxígeno durante la incubación.

d) Para ambas cepas, la saturación con sustrato se alcanza con concentraciones de PBG del orden de 70-90 μM .

e) El pH óptimo oscilaba entre 7,0-7,4 y se obtuvo empleando buffer fosfato de sodio pH 8,0 a una concentración final de 50 μM .

f) El agregado de una mezcla de sales de sodio y magnesio no estimuló la actividad de la PBGasa sino que por el contrario producía una inhibición del 50% o más, dependiendo de la concentración empleada.

- A través de estudios de velocidades iniciales, observamos:

a) Cinéticas michaelianas con lo cual descartamos todo tipo de interacción que pudiese dar lugar a efectos cooperativos entre Deaminasa e Isomerasa, y postulamos la existencia de un sólo tipo o población de sitios de unión para el sustrato.

b) Los valores de K_m fueron del mismo orden para la cepa salvaje y mutante (entre 15 y 20 μM).

c) Los valores de velocidad máxima varían con la fase de crecimiento en que fueron cosechadas las células, mientras que la constante de Michaelis-Menten no se modifica.

d) Tanto el ALA como las porfirinas producen sobre la PBGasa una inhibición competitiva. El efecto inhibitorio del ALA se produ

ce previa conversión a porfirinas y estas últimas manifiestan su acción mediante la formación de complejos dead-end con la enzima.

De un estudio exhaustivo de efecto del pH sobre la PBGasa surge que:

a) La enzima es estable en un amplio rango de pH (entre 6-9).

b) La pérdida de actividad que se pone de manifiesto a pH's mayores o menores que el óptimo se debe a modificaciones totalmente reversibles en el estado de ionización de la proteína.

c) La precipitación isoeléctrica en el rango 5,5-4,2 nos permite concentrar alrededor del 70% de las unidades enzimáticas con un grado de purificación de 8 veces respecto a la fracción homogenato.

- Observamos que alrededor del 85% de la enzima precipita con un aumento en el grado de purificación de casi dos veces, en el intervalo 40-65% de saturación de sulfato de amonio.

- El tratamiento con sulfato de protamina tiene el mismo efecto que ultracentrifugar a 140.000 xg 30 minutos, por lo tanto se descarta como posible etapa en un esquema de purificación.

- La estabilidad de la enzima con respecto al:

a) Tratamiento térmico: Resultó ser menos estable que la encontrada en otros tejidos. En cuanto a la habitual activación que posee la Deaminasa al separarse de la Isomerasa, si bien se detectó, fue menos notable que lo habitual.

b) Estacionamiento a bajas temperaturas: Las células cosechadas pueden ser almacenadas durante aproximadamente un mes y el sobre

nadante (S) tres días sin pérdida apreciable de actividad.

- Por cromatografía a través de Sephadex G-100 obtuvimos para la PBGasa un peso molecular de 50.000. No se detectó la presencia de agregados ni especies de menor peso molecular.

CAPITULO VIII**CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA CEPA B231. PROBABLE MODELO DE PORFIRIA EXPERIMENTAL.**

	Página
VIII.1. Actividad del ALA-Sintetasa.	145
VIII.2. Actividad del ALA-Dehidrasa.	146
VIII.3. Caracterización bioquímica.	149
VIII.4. Algunos aspectos acerca de la regulación del camino metabólico del hemo en levaduras.	152
VIII.5. Cepa B231 como modelo de porfiria experimental.	154
VIII.6. Conclusiones parciales.	155

Teniendo en cuenta que la cepa mutante además de porfirinas acumula y excreta ALA, comenzamos investigando las actividades de las enzimas encargadas de sintetizar y consumir este compuesto. En principio, esperaríamos una actividad aumentada del ALA-S y/o disminuida del ALA-D. Luego, en base a todos los resultados obtenidos, culminaríamos con la caracterización bioquímica de la cepa mutante, para finalmente investigar si existe o no correlación con algún tipo de porfiria humana.

VIII.1. Actividad del ALA-Sintetasa.

Debido a la corta vida media e inestabilidad que caracterizan al ALA-S, la determinación de actividad de esta enzima debe hacerse rápidamente y en presencia de todos los cofactores requeridos.

Asimismo, debe eliminarse el contenido de ALA intracelular presente en el extracto proveniente de la cepa mutante, ya que el mismo disminuye la sensibilidad en la cuantificación del ALA producido por la reacción enzimática y además puede originar inhibición por producto.

La técnica empleada para separar el ALA endógeno fue distinta dependiendo de que se partiera del extracto enzimático (sobrenadante S) o las células enteras. En el primer caso se utilizaron resinas de intercambio iónico (ver Métodos), mientras que en el segundo se permeabilizaron las membranas celulares.

El trabajar con células permeabilizadas posee la ventaja, no sólo de eliminar el ALA endógeno en forma más rápida que cualquier otro método, sino que también permite separar conjuntamente todo tipo de compuestos intracelulares que podrían llegar a interferir en la cuantificación del ALA, producto de la reacción enzimática. Este método (163) consiste en someter las células enteras a siete ciclos de congelamiento y descongelamiento sucesivos. El congelamiento se logra colocando los tubos con el pellet de células durante 30 segundos en nitrógeno líquido y el descongelamiento, por inmersión en un baño a 45 °C también durante 30 segundos. Las células permeabilizadas se lavan tres veces con el buffer de trabajo y están listas para medir actividad de ALA-S, en un periodo no mayor de una hora.

Independientemente de la técnica empleada para separar el ALA y de suministrar todos los cofactores necesarios para medir actividad en ningún caso se detectaron niveles significativos de actividad de ALA-S.

VIII.2. Actividad del ALA-Dehidrasa.

La actividad de ALA-D se estimó en función de la cantidad de porfirinas sintetizadas por el extracto enzimático durante una hora utilizando ALA como sustrato, debido a que en ningún caso la reacción pudo detenerse en la formación de PBG.

Comparando la actividad de ALA-D entre la cepa salvaje y mutante (1,09 y 2,72 U.E./mg respectivamente), vemos que la cepa B231 presenta una actividad 2,5 veces mayor que la correspondiente a la cepa D273-10B.

Cuando la actividad se midió en función de los días de crecimiento celular obtuvimos para ambas cepas un perfil similar al observado para la PBGasa. El ALA-D de la cepa B231 (Figura 55) mostraba una actividad máxima a las 20 horas de crecimiento, que además se correlacionaba perfectamente con el tiempo en el cual el contenido de ALA intracelular alcanzaba su máximo valor.

Sabiendo que en algunas fuentes como por ejemplo Rhodospseudomonas spheroides (249), se ha reportado para el ALA-D un comportamiento alostérico y teniendo en cuenta el rol regulatorio que se postula para esta enzima en levaduras, nos pareció conveniente medir actividad variando la concentración de sustrato. Los resultados obtenidos para ambas cepas (Figura 56) muestran una cinética michaeliana con valores de Km casi idénticos, de aproximadamente 2,5 μM .

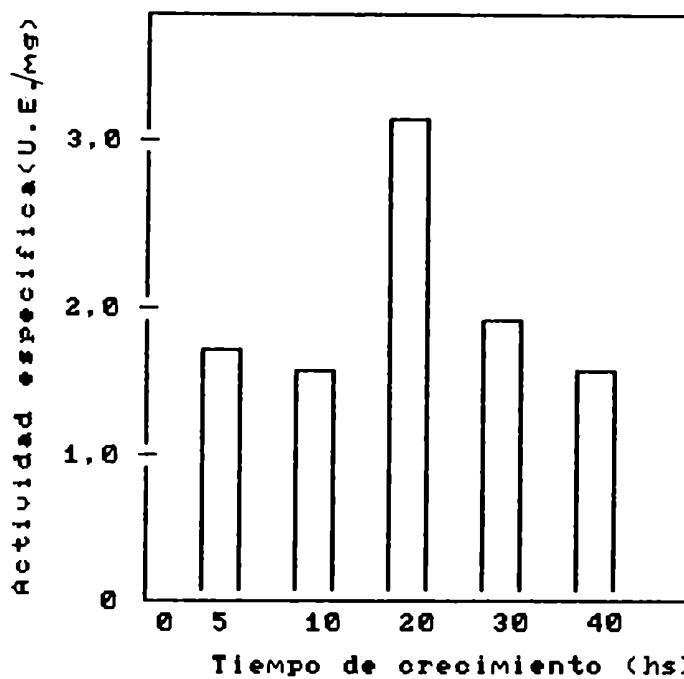


Figura 55: Actividad del ALA-D en función del tiempo de incubación.

La medición de actividad se realizó de la manera descrita en Métodos, empleando el sobrenadante S como extracto enzimático.

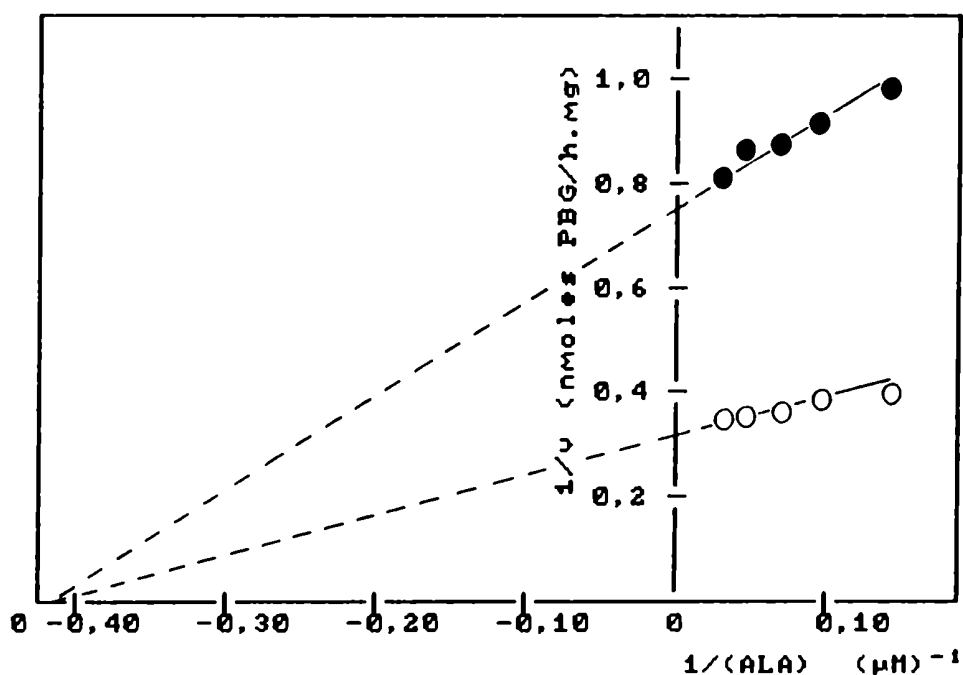


Figura 56: Grafico de Lineweaver-Burk para el ALA-D.

Se midió actividad de ALA-D de la manera descrita en Métodos, empleando como extracto enzimático el sobrenadante S. (o) Cepa B231, (●) Cepa D273-10B.

El hecho de obtener gráficos de dobles recíprocas lineales pone de manifiesto que la medición indirecta de la actividad de esta enzima, a través de las porfirinas formadas, es un método adecuado ya que la PBGasa no limita la velocidad de la reacción o lo que es lo mismo todo el PBG formado a expensas del ALA pasa a porfirinas.

El ALA-D de levaduras también exhibe la característica inhibición debida al ácido levulínico. Dada la similitud estructural entre el ALA y este compuesto (Figura 57), la inhibición se debe a que ambos compiten en su unión al sitio activo resultando la inhibición de tipo competitivo. Según la Tabla 18 una concentración de ácido levulínico 1 mM produce una inhibición del 50%, mientras que la pérdida de actividad es casi total, con concentraciones mayores de 5 mM.

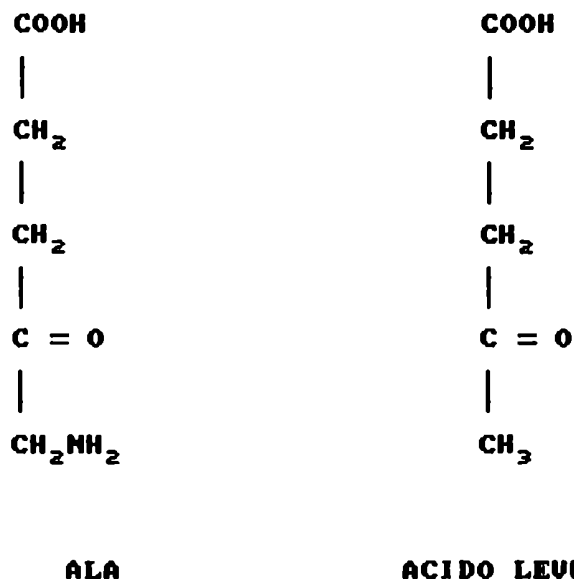


Figura 57: Estructuras del ALA y ácido levulínico.

Tabla 18: Efecto del ácido levulínico sobre la actividad del ALA-D.

Acido levulínico (mM)	Act.especifica (%)
0	100
0,1	92
0,5	64
1,0	48
2,5	22
5,0	8
10,0	1

Se midió actividad de ALA-D de la manera descrita en Métodos, adicionando distintas cantidades de ácido levulínico.

VIII.3. Caracterización bioquímica.

En base a todos los estudios realizados sobre las actividades enzimáticas e intermediarios involucrados en el camino biosintético del hemo, resumimos ahora en forma comparativa para ambas cepas, los parámetros más significativos que nos permitirán, desde el punto de vista bioquímico, caracterizar la mutación.

La cepa B231 es capaz de acumular intracelularmente grandes cantidades de ALA (100-140 nmoles/ml) y porfirinas (3-4 nmoles/ml), mientras que los valores hallados para la cepa salvaje se encuentran apenas dentro del límite de detección y no tienen significado biológico. La cantidad de ALA y porfirinas acumuladas por la cepa mutante varían en función del tiempo de crecimiento celular, con un máximo alrededor de las 20 horas, mientras que el contenido de PBG fue despreciable durante todo el intervalo (Figura 58).

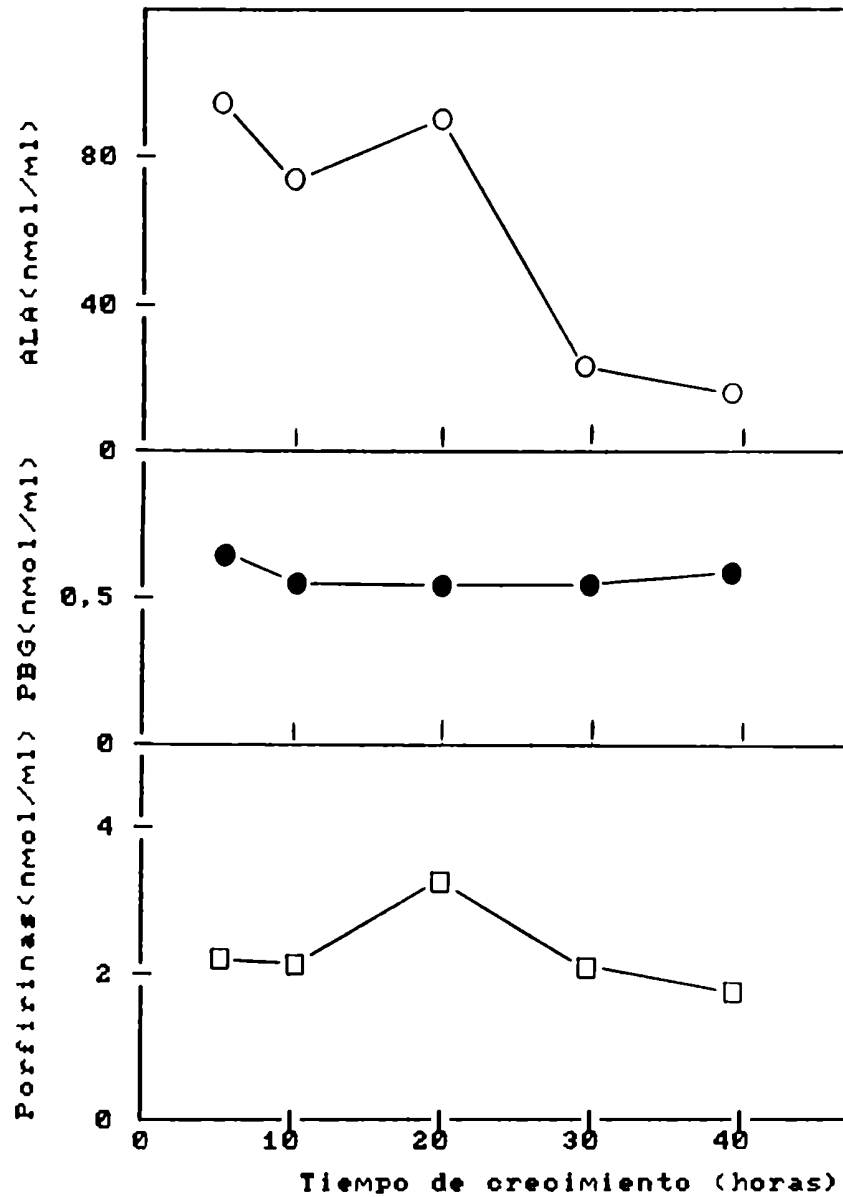


Figura 58: Acumulación de ALA (○), PBG (●) y porfirinas (□) en función del tiempo de crecimiento (Cepa B231).

La metodología empleada corresponde a la descrita en Métodos.

El tipo de porfirinas acumuladas "in vivo", 90% de UroIII y 5% de porfirinas heptacarboxílicas con trazas de penta y coproporfirina, se correlaciona con las actividades aumentada de PBGasa y disminuida de Uro-D detectadas "in vitro" para la cepa mutante (Figura 59). El máximo de actividad de PBGasa y ALA-D detectados

"in vitro" entre las 20 y 25 horas de crecimiento, coincide con el valor máximo de acumulación de ALA y porfirinas presentes "in vivo".

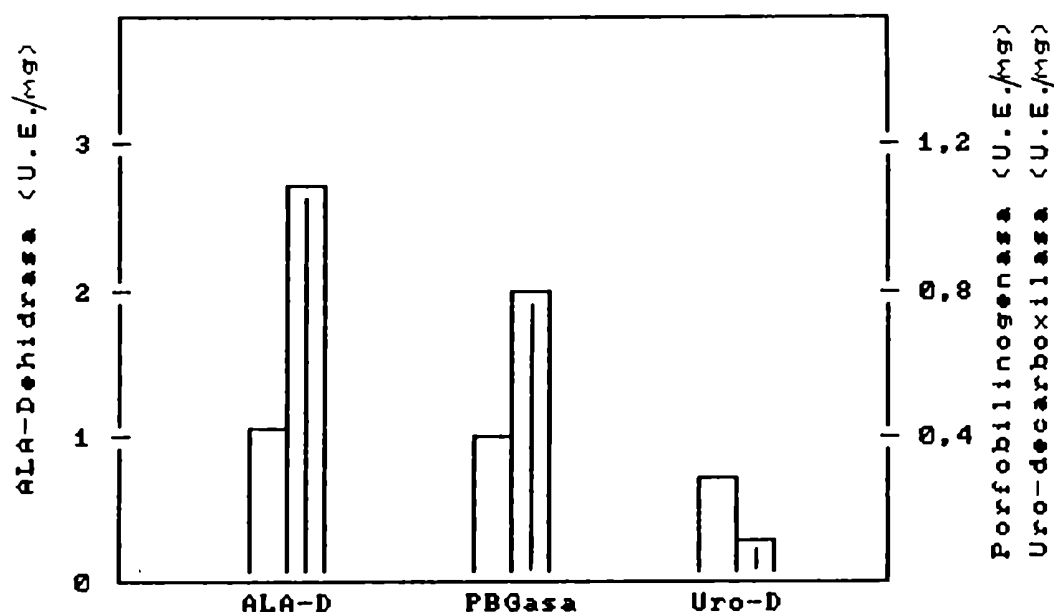


Figura 59: Actividades enzimáticas de ALA-D, PBGasa y Uro-D en ambas cepas de *S. cerevisiae*. Las mediciones se realizaron según se indica en Métodos, empleando como extracto enzimático el sobrenadante S proveniente de células cosechadas en fase exponencial tardía. (□), (■) : Cepas D273-10B y B231 respectivamente.

Habiéndose demostrado anteriormente que las porfirinas detectadas intracelularmente se sintetizan a partir del ALA acumulado (Figura 34), es de esperar que la cepa mutante presente una actividad incrementada del ALA-D ya que debe suministrar el sustrato necesario para que la PBGasa sintetice el uroporfirinógeno. El no detectar niveles significativos de PBG y la acumulación de ALA pondrían de manifiesto una relación de actividades ALA-D/ALA-S baja.

VIII.4. Algunos aspectos acerca de la regulación del camino metabólico del hemo en levaduras.

En general las enzimas que limitan la velocidad de una secuencia metabólica específica deben tener un turn-over alto para adaptarse rápidamente a las necesidades celulares.

En la mayoría de los tejidos es el ALA-S la enzima que controla la velocidad de formación del hemo, por tener una vida media corta y estar presente en muy bajas concentraciones. Estos requisitos no los cumple el ALA-D ya que es una enzima que generalmente se encuentra en exceso y su actividad es normalmente alta comparada con cualquiera de las otras enzimas de este camino biosintético.

Si el ALA-S es la enzima regulatoria y el ALA-D la enzima mayoritaria, la relación ALA-D/ALA-S es normalmente alta. En S.cerevisiae (164-166, 206) y Neurospora crassa (250) esta relación está invertida y se observa la menor actividad de ALA-D comparada con la de otros organismos (Tabla 19), postulándose entonces que la enzima podría desempeñar un rol fundamental en la regulación de la biosíntesis de tetrapirroles.

En Propionibacterium shermanii (251) y E.gracilis (239, 251) también se ha propuesto que el ALA-D posee un rol regulatorio; en este último microorganismo se observa que tanto la hemina como CoproIII, ProtoIX y sus correspondientes porfirinógenos actúan como inhibidores.

En Rp.spheroides, Nandi y col.(249) propusieron al ALA-D como segundo punto de regulación en la síntesis de porfirinas, ya que la enzima poseía características alostéricas y presentaba inhibición feed-back por Proto y hemina.

En base a estos reportes la mayor actividad de ALA-D que presenta la cepa mutante respecto a la salvaje (Figura 59) podría

atribuirse a que la enzima está desregulada.

El ALA-D en levaduras está sujeta a inhibición feed-back por hemo (164) y represión por glucosa (165,166). Por lo tanto, el bloqueo que presenta la cepa B231 a nivel de Uro-D impide la síntesis de todo el hemo requerido por la célula, justificando así la falta de regulación por producto final. Por otro lado, según mediciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio, en cultivos de levadura en fase exponencial tardía los niveles de glucosa son despreciables, por lo cual la represión por este metabolito tampoco es posible. Resumiendo, la desregulación del ALA-D en la cepa mutante se debería a la falta de inhibición por producto final y la ausencia de represión por glucosa. Cabe aclarar que si bien la enzima está aumentada, aparentemente este incremento responde a las necesidades celulares ya que no hay acumulación de PBG y todo el que se sintetiza es convertido en porfirinas.

Tabla 19: Actividad de ALA-D en distintas fuentes.

Fuente enzimática	Act. espec. (U.E./mg)	Referencias
Hígado bovino	37	(252)
Hígado porcino	27	(252)
Eritrocitos humanos	84	(253)
Hígado de ratón	23	(254)
<u>Euglena gracilis</u>	33	(239)
<u>Mucor rouxii</u> (micelio)	16,5	(89)
<u>Mucor rouxii</u> (levadura)	2,6	(89)
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>		
- Cepa S288-C	4,8	(255)
- Cepa GS1-36	4,5	(255)
- Cepa D27	1,7	Correa García y col. (en prep.)
- Cepa D27/C6	1,5	Correa García y col. (en prep.)
- Cepa D273-10B	1,09	este trabajo.
- Cepa B231	2,72	este trabajo.

Los valores tabulados corresponden a extractos enzimáticos crudos.

VIII.5. Cepa B231 como modelo de porfiria experimental.

Luego de la caracterización bioquímica efectuada a lo largo de todo este trabajo sobre la cepa B231, elaboramos un esquema en el cual se resumen las alteraciones que la misma presenta en el camino biosintético del hemo.

En la Figura 60 se esquematizan dichas modificaciones conjuntamente con las deficiencias correspondientes a una porfiria cutánea tarda (PCT), por ser esta porfiria humana la que presenta mayor similitud con las alteraciones encontradas en la cepa mutante.

En conclusión, la semejanza existente entre ambos patrones nos permite proponer a la cepa mutante como un posible modelo experimental de PCT, que podría ser empleado para el estudio de esta patología.

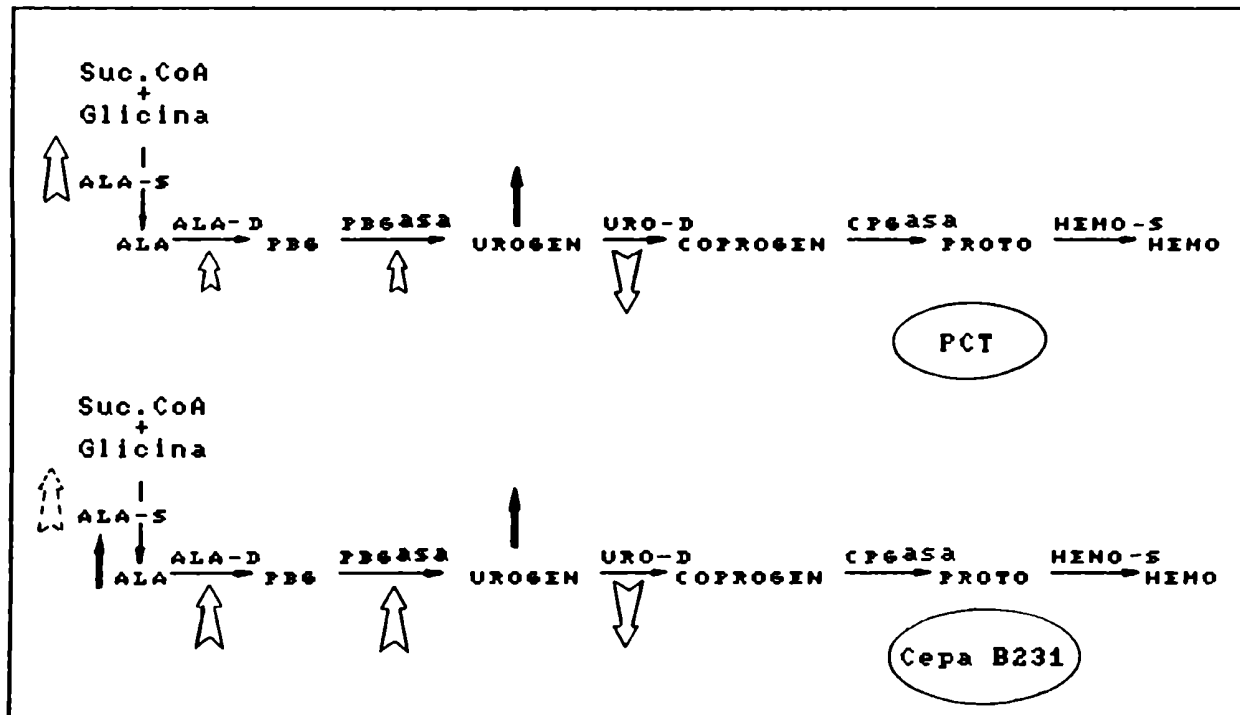


Figura 59: Relación entre las deficiencias enzimáticas presentes en una porfiria cutánea tardía y en la cepa mutante B231 de *S. cerevisiae*.

Las flechas en trazo continuo y discontinuo corresponden a actividades medidas y propuestas, respectivamente.

VIII.6. Conclusiones parciales.

Culminada la caracterización bioquímica de la cepa B231, concluimos que:

- Si bien no logramos detectar niveles de actividad de ALA-S, independientemente del método empleado par eliminar el ALA endógeno, proponemos que la enzima probablemente posea una actividad significativa ya que sería la responsable de la acumulación de ALA en la cepa mutante.

- La cepa B231 presenta una actividad de ALA-D 2,5 veces mayor a la de la cepa salvaje. La enzima muestra un máximo de actividad a las 20 horas de crecimiento, cinética michaeliana y la típica inhibición por ácido levulínico.

- Los resultados obtenidos avalarían el rol regulatorio postulado para el ALA-D en levaduras. Indirectamente se manifestó el control negativo por producto final y la represión por glucosa, propuestos como modos de regulación para esta enzima.

- Las características bioquímicas de la cepa mutante nos permiten ubicarla, dentro de la clasificación de las porfirias, como un posible modelo experimental de porfiria cutánea tarda.

CAPITULO IX**CONCLUSIONES FINALES**

Página

156

En base a los estudios bioquímicos efectuados comparativamente entre ambas cepas, D273-10B y B231, de Saccharomyces cerevisiae, surgen las siguientes diferencias:

Parámetros analizados	Cepa D273-10B	Cepa B231
Tiempo generacional	1,26 hs	3,20 hs
Acumulación intracelular de metabolitos: ALA PBG Porfirinas	14 nmoles/ml no significativo 0,5 nmoles/ml	137 nmoles/ml no significativo 3,5 nmoles/ml (90% UroIII, 5% hepta y trazas de penta y coproporfirinas).
Actividades enzimáticas: PBGasa Uro-D ALA-D	0,40 U.E./mg 0,32 U.E./mg 1,09 U.E./mg	0,75 U.E./mg 0,08 U.E./mg 2,72 U.E./mg
Irradiación con luz ultravioleta.	no fluorescen	fluorescencia rosa

Es evidente la perfecta correlación existente entre la acumulación de los diferentes metabolitos evaluados "in vivo" y los valores de actividades enzimáticas determinados "in vitro".

Establecidas las diferencias entre ambas cepas, de todas las enzimas afectadas seleccionamos a la PBGasa para su caracterización. Los aspectos que se tuvieron en cuenta para esta elección fueron: a) se trataba de una enzima cuya actividad se veía incrementada por la mutación; b) el método empleado para determinar su actividad era exacto y reproducible y c) eran escasos los reportes de propiedades de la enzima en esta fuente.

Si bien el ALA-D también poseía una actividad incrementada en la cepa mutante respecto a la salvaje, su medición sólo podía efectuarse en forma indirecta y se reservó para posteriores estudios relacionados fundamentalmente con aspectos regulatorios. Cabe destacar que a pesar que los niveles de actividad del ALA-D en la cepa B231 son 2,5 veces mayores que el de la D273-10B, siguen siendo bajos comparados con los de otras fuentes, razón por la cual no sería muy conveniente seleccionar a esta enzima para realizar estudios de propiedades y caracterización.

Respecto a trabajar con Uro-D, esta posibilidad se descartó por tratarse de una enzima de compleja determinación de actividad, medición que en este caso sería aún más dificultosa por ser la enzima deficiente en la cepa mutante.

Volviendo a la PBGasa, de todos los parámetros analizados para su caracterización, resultó un comportamiento muy similar para la enzima de ambas cepas, observando:

- Saturación con iguales concentraciones de sustrato.
- Valores de Km casi idénticos.
- El pH óptimo fue el mismo.

- Precipita en el mismo rango de fraccionamiento con sulfato de amonio.
- En la precipitación isoeléctrica, se aísla y concentra en el mismo intervalo de pH.
- El tratamiento con calor produjo el mismo efecto en la enzima de ambas cepas.
- Demostró igual estabilidad cuando se la almacenó a bajas temperaturas.
- El peso molecular fue el mismo y coincidía con el reportado en la mayoría de las fuentes.

Las diferencias halladas entre la PBGasa de ambas cepas, podrían resumirse de la siguiente manera:

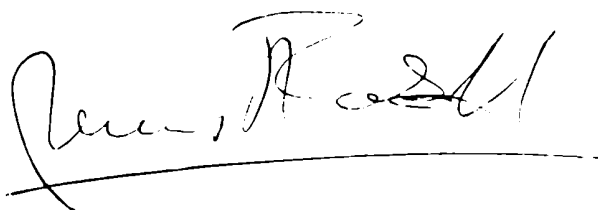
- La cepa salvaje no presenta actividad cuando se la incubaba en presencia de sustrato, mientras que la mutante manifiesta en estas condiciones del 40 al 50% de la actividad óptima, medida a concentraciones saturantes de sustrato (debido a la posibilidad de sintetizar PBG a partir del ALA presente en el extracto enzimático).

- La cepa salvaje posee menor variación en los niveles de actividad con las horas de crecimiento, a diferencia de lo que ocurre en la cepa mutante que presenta un máximo bien definido entre las 20-22 horas.

- Otra diferencia notoria fueron los valores de la velocidad máxima medidos en fase exponencial tardía, que fueron para la cepa mutante del doble de los que presentaba la salvaje.

En base a la recopilación de todos los datos que obtuvimos a lo largo de este trabajo, surge que la cepa B231 posee características bioquímicas muy similares a las que presenta la porfiria

cutánea tarda. De aquí en más podría ser utilizada como modelo experimental para el estudio de esta patología, con el fin fundamental, de establecer la eficacia y el mecanismo de acción de distintas drogas que eventualmente serían empleadas en el tratamiento de esta patología.



J. ROSSETTI

CAPITULO X**REFERENCIAS**

Página

160

1. Brock, T.D. (1978) en *Biología de los Microorganismos*, Cap. 5, p. 122. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
2. Brock, T.D. (1978) en *Biología de los Microorganismos*, Cap. 15, p. 532. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
3. Kappas, A.; Sassa, S. & Anderson, K. E. (1983) en *The etabolic Basis of Inherited Disease* (Eds. J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarten; D.S. Fredicson; J.L. Goldstein & M.S. Brown). Parte 9, Cap. 60, p. 1301, Mc Grow-Hill Book Company, Publications Minneapolis, M.N., USA.
4. Kikuchi, G.; Kumar, A.; Talmage, P. & Shemin, D. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 1214.
5. Gibson, K.D.; Larver, W.G. & Neuberger, A. (1958) *Biochem. J.* 70, 71.
6. Granick, S. & Urata, G. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 821.
7. Marver, H.S.; Tschudy, D.P.; Perlroth, M.G. & Collins, A. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2803.
8. Takaku, F.; Wada, O.; Sassa, S. & Nakao, K. (1968) *Cancer Res.* 28, 1250.
9. Margolis, F.L. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 145, 373.
10. Sardesai, V.M.; Lenaghan, R. & Rosenberg, J.C. (1972) *Biochem. Med.* 6, 366.
11. Paterniti, J.R.; Simone, J.J. & Beattie, D.S. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 189, 86.
12. Porra, R.J.; Barnes, R. & Jones, O.T.G. (1972) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 1365.

13. Volland, C. & Felix, F. (1984) *Eur. J. Biochem.* 142, 551.
14. Brattsten, L.B. & Wilkinson, C.F. (1975) *Biochem. J.* 150, 97.
15. Klein, O. & Senger, H. (1978) *Photochem. Photobiol.* 27, 203.
16. Beale, S.I.; Foley, T. & Dzelzkalns, V. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1666.
17. Lombardo, M.E.; Araujo, L.S.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1988) *Comp. Biochem. Physiol.* 91B, 279.
18. Wider de Xifra, E.A.; Batlle, A. & Tigier, H.A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 235, 511.
19. Ramaswamy, N.K. & Nair, P.N. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 293, 269.
20. Lascelles, J. (1964) en *Tetrapyrroles Biosynthesis and its Regulation*, p. 84. Benjamin, New York.
21. Marks, G.S. (1966) *Bot. Rev.* 32, 56.
22. De Matteis, F. (1967) *Pharmac. Rev.* 19, 523.
23. Sassa, S. & Granick, S. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 517.
24. Marver, H.S. (1969) en *Microsomes and Drug Oxidation*, p. 495. Academic Press, New York.
25. Burnham, B. & Lascelles, J. (1963) *Biochem. J.* 87, 462.
26. Bottomley, S.S. & Smithee, G.A. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 159, 27.
27. Igarashi, J.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1976) *J. Biol. Chem.* 80, 1091.
28. Barnes, R.; Jones, M.S.; Jones, O.T.G. & Porra, R.J. (1971) *Biochem. J.* 124, 633.
29. Nakakuki, M.; Yamauchi, K., Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1980) *J. Biol. Chem.* 225, 1738.
30. Yamauchi, K.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1980) *J. Biol. Chem.* 225, 1746.
31. Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Brooker, J.D.; May, B.K. & Elliott, W.H. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110, 23.
32. Ohashi, A. & Kikuchi, G. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 607.
33. Urban-Grimal, D.; Reves, U. & Labbe-Bois, R. (1984) *Curr. Genet.* 8, 327.
34. Leong, S.A.; Williams, O.H. & Duta, G.S. (1985) *Nucleic Acid Research* 13, 5965.

35. Yamamoto, M.; Yew, N.S.; Federspiel, M., Dogson, J.B.; Hayashi, N. & Engel, J. D. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3702.
36. Schoenhaut, D.S. & Curtis, P.J. (1986) Gene (Amst.) 48, 55.
37. Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Maguirre, D.J.; Elferink, C.J.; Bawden, M.J.; Mercer, J.F.B. & May, B.K. (1988) J. Biol. Chem. 263, 5202.
38. Borthwick, I.A.; Srivastava, G.; Day, A.R.; Pirola, B.A.; Snoswell, M.A.; May, B.K. & Elliott, W.H. (1985) Eur. J. Biochem. 150, 481.
39. Woods, J.S. (1974) Mol. Pharmacol. 10, 389.
40. Hayashi, N.; Yoda, B. & Kikuchi, G. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 131, 83.
41. Batlle, A.M. del C. & Magnin, P.H. (1988) en Porfirias Humanas y Experimentales. Aspectos clínicos y bioquímicos. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. Sup. Nro. 2, Cap. I, p. 3.
42. Zaman, Z.; Jordan, P.M. & Akhtar, M. (1973) Biochem. J. 135, 257.
43. Akhtar, M.; Abboud, M.M.; Barnard, G.; Jordan, P. & Zaman, Z. (1976) Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.) B. 273, 117.
44. Nandi, D.L. (1978) J. Biol. Chem. 253, 8872.
45. Beale, S.I. & Castelfranco, P.A. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 143.
46. Beale, S.I. & Castelfranco, P.A. (1974) Plant Physiol. 53, 297.
47. Beale, S.I.; Gough, S.P. & Granick, S. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2719.
48. Meller, E.; Belkin, S. & Harel, E. (1975) Phytochemistry 14, 2399.
49. Gough, S.P. & Kannangara, C.G. (1976) Carlsberg Res. Commun. 41, 183.
50. Meller, E. & Gassman, M.L. (1982) Plant Sci. Lett. 26, 23.
51. Harel, E. & Ne'eman, E. (1983) Plant Physiol. 72, 1062.
52. Jurgenson, J.E.; Beale, S.I. & Troxler, R.F. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 149.
53. Troxler, R.F. & Offner, G.D. (1979) Arch. Biochem. Biophys. 195, 53.
54. Kipe-Nolt, J.A. & Stevens Jr., S.E. (1980) Plant Physiol. 65, 126.
55. Weinstein, J.D. & Beale, S.I. (1984) Plant Physiol. 74, 146.
56. Gomez-Silva, B.; Timko, M.P. & Schiff, J.A. (1985) Planta 165, 12.

57. Gilles, H.; Jaenchen, R. & Thauer, R.K. (1983) Arch. Microbiol. 135, 237.
58. Avissar, Y.J.; Ormerod, J.G. & Beale, S.I. (1989) Arch. Microbiol. 151, 513.
59. Neuberger, A. & Turner, J.M. (1963) Biochim. Biophys. Acta 67, 342.
60. Chen, J.; Miller, G.W. & Takemoto, J.Y. (1981) J. Bacteriol. 208, 221.
61. Bajkowski, A. & Friedmann, H.C. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2207.
62. Gassman, M.; Pluscec, J. & Bogorad, L. (1968) Plant Physiol. 43, 1411.
63. Foley, T. & Beale, S.I. (1982) Plant Physiol. 70, 1495.
64. Meisch, H.U.; Hoffmann, H. & Reinle, W. (1983) Biochim. Biophys. Acta 743, 281.
65. Shioi, Y.; Nagamine, M. & Sasa, T. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 234, 117.
66. Varticovski, L.; Kushner, J.P. & Burnham, B.F. (1980) J. Biol. Chem. 255, 3742.
67. Singh, N.K. & Datta, K. (1985) Biochim. Biophys. Acta 827, 305.
68. Shanker, J. & Datta, K. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 248, 652.
69. Ades, I.Z. (1989) Int. J. Biochem. 21, 679.
70. Lohr, J.B. & Friedmann, H.C. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 908.
71. Hayashi, S. & Noguchi, T. (1983) J. Biol. Chem. 258, 13693.
72. Harel, E.; Ne'eman, E. & Meller, E. (1983) Plant Physiol. 72, 1056.
73. Hoare, K. & Datta, K. (1990) Arch. Biochem. Biophys. 277, 122.
74. Shanker, J. & Datta, K. (1985) FEBS Lett. 189, 129.
75. Shanker, J. & Datta, K. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 248, 652.
76. Mamet, R.; Mevasser, R.; Bomstein, Y., Atsmon, A. & Schoenfeld, N. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1034, 148.
77. Lombardo, M.E.; Araujo, L.S.; Juknat, A.A. & Batlle, A. M. del C. (1989) Eur. J. Biochem. 182, 657.
78. Dresel, E.I.B. & Falk, J.E. (1953) Nature 172, 1185.
79. Shemin, D. & Russell, C.S. (1953) J. Am. Chem. Soc. 75, 4873.
80. Granick, S. (1954) Science 120, 1105.

81. Maralihalili, G.B.; Rao, S.R. & Bhagwat, A.S. (1985) *Phytochemistry* 24, 2533.
82. Finelli, V.N.; Klauder, D.S.; Karaffa, M.A. & Petering, H. G. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 303.
83. Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 570, 167.
84. Fukuda, H.; Paredes, S. & Batlle, A. M. del C. (1988) *Comp. Biochem. Physiol.* 91B, 285.
85. Bevan, D.R; Bodlaender, P. & Shemin, D. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2030.
86. Shemin, D. (1976) *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B273, 109.
87. Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M.; Ferramola, A.M.; Sopena, Y.; Wider de Xifra, E.A. & Sancovich, H.A. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 401.
88. Nandi, D. & Shemin, D. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 1236.
89. Paveto, C.; Passeron, S.; Stella, A.M. & Batlle, A.M. del C. (1989) *Comp. Biochem. Physiol.* 94B, 635.
90. Burton, G.; Fagerness, P.E.; Hosazawa, S.; Jordan, P.M. & Scott, A.I. (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 202.
91. Evans, J.N.S.; Burton, G.; Fagerness, P.E.; Mackenzie, N.E. & Scott, A.I. (1986) *Biochemistry* 25, 896.
92. Frydman, R.B. & Feinstein, G. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 350, 358.
93. Higuchi, M. & Bogorad, L. (1975) *Ann. NY Acad. Sci.* 244, 401.
94. Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnik, A.A.; Kotler, M.; Fumagalli, S. & Batlle, A.M. del C. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 761.
95. Shioi, Y.; Nagamine, M.; Kuroki, M. & Sasa, T. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 616, 300.
96. Anderson, P.M. & Desnick, R.J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1993.
97. Williams, D.C.; Morgan, G.S.; McDonald, E. & Battersby, A.R. (1981) *Biochem. J.* 193, 301.
98. Williams, D.C. (1984) *Biochem. J.* 217, 675.
99. Fumagalli, S.A.; Kotler, M.L.; Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1985) *Int. J. Biochem.* 17, 485.
100. Hart, G.J.; Abell, C. & Battersby, A.R. (1986) *Biochem. J.* 240, 273.
101. Jordan, P. M.; Thomas, S.D. & Warren, M.J. (1988) *Biochem. J.* 254, 427.

102. Miller, A.D.; Hart, G.J.; Packman, L.C. & Battersby, A.R. (1988) *Biochem. J.* 254, 915.
103. Scott, A.I.; Clemens, K.R.; Stolowich, N.J.; Santander, P.J.; Gonzalez, M.D. & Roessner, C.A. (1989) *FEBS Lett.* 242, 319.
104. Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A. M. del C. (1987) *Int. J. Biochem.* 19, 981.
105. Clement, R.P.; Kohashi, M. & Piper, W.N. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 214, 657.
106. Hart, G.J. & Battersby, A.R. (1985) *Biochem. J.* 232, 151.
107. Tsai, S.F.; Bishop, D.F. & Desnick, R.J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 1268.
108. Alwan, A.F. & Jordan, P.M. (1988) *Biochem. Soc. Trans.* 16, 965.
109. Kohashi, M.; Clement, R.P.; Tse, J. & Piper, W.N. (1984) *Biochem. J.* 220, 755.
110. Juknat, A.A.; Drnemann, D. & Senger, H. (1988) *Z. Naturforsch.* 43c, 357.
111. Koopmann, G.E.; Juknat de Geralnik, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1986) *Int. J. Biochem.* 18, 935.
112. Elder, G.H.; Tovey, J.A. & Sheppard, D.M. (1983) *Biochem. J.* 215, 45.
113. Straka, J.G. & Kushner, J.P. (1983) *Biochemistry* 22, 4664.
114. De Verneuil, H.; Grandchamp, B. & Nordmann, Y. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 611, 174.
115. Romeó, P.H.; Raich, N.; Dubart, A.; Beaupain, D.; Pryor, M.; Kushner, J.; Cohen-Solal, M. & Goossens, M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9825.
116. Batlle, A.M. del C.; Benson, A. & Rimington, C. (1965) *Biochem. J.* 97, 731.
117. Yoshinaga, T. & Sano, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4722.
118. Camadro, J.M.; Chambow, H.; Jolles, J. & Labbe, P. (1986) *Eur. J. Biochem.* 156, 579.
119. Tait, G.H. (1972) *Biochem. J.* 128, 1159.
120. Al-Hazimi, H.M.G.; Jackson, A.H.; Ryder, D.; Elder, G.H. & Smith, S.G. (1976) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 88.
121. Yoshinaga, T. & Sano, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4727.
122. Zagorec, M. & Labbe-Bois, R. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 2506.
123. Poulson, R. & Poglase, W.J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 1269.
124. Polglase, W.J.; Whitlow, K.J. & Poulson, R. (1975) *Fed. Proc.* 34, 692.

125. Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 435.
126. Poulson, R. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 3730.
127. Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 211, 305.
128. Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1976) *Biochem. Biophys. Acta* 449, 1.
129. Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1978) *Biochem. Biophys. Acta* 544, 540.
130. Jackson, A.H. & Games, D.E. (1975) *Ann. NY Acad. Sci.* 244, 591.
131. Taketani, S. & Tokynaga, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12748.
132. Taketani, S. & Tokynaga, R. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 443.
133. Jones, O.T.G. (1983) en *Metals and Micronutrients. Uptake and Utilization by Plants. Ann. Proceed. Phyt. Soc. Europe* (Eds. D.A. Robb y W.S. Pierpoint) Vol. 21, Cap. 8, p. 125. Academic Press.
134. Hanson, J.W. & Dailey, H.A. (1984) *Biochem. J.* 222, 695.
135. Dailey, H.; Fleming, J.E. & Harbin, B.M. (1986) *J. Bacteriol.* 165, 1.
136. Salzman, T. & Batlle A.M. del C. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.* 85B, 537.
137. Camadro, J.M. & Labbe, P. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11675.
138. Labbe-Bois, R. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 7278.
139. Dailey, H.A. & Fleming, J.E. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11453.
140. Ferreira, G.C.; Andrew, T.L.; Karr, S.W. & Dailey, H.A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 3835.
141. Dailey, H.A.; Jones, C.S. Y Karr, S.W. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 999, 7.
142. Brock, T.D. (1978) en *Biología de los Microorganismos*, Cap. 16, p. 562. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
143. Pelczar, M.J. & Reid, R.D. (1979) en *Microbiología*, Cap. 18, p. 273. Ed. Mc Grow-Hill.
144. Pfennig, N. (1967) *Ann. Rev. Microbiol.* 21, 285.
145. Scott, A.J. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* 11, 29.
146. Maines, M.D. (1988) *FASEB J.* 2, 2557.
147. Brock, T.D. (1978) en *Biología de los Microorganismos*, Cap. 6, p. 182. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
148. Neuberger, A. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 787.

149. Piper, W.N.; Condie, L.W. & Tephly, T.R. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 159, 671.
150. Lascelles, J. (1960) J. Gen. Microbiol. 23, 487.
151. Yamamoto, M.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 225.
152. Hayashi, N.; Watanabe, N. & Kikuchi, G. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 700.
153. Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Brooker, J.D.; Wallace, J.C.; May, B.K. & Elliott, W.H. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 117, 344.
154. Moore, M.R. & Disler, P.B. (1985) en Porphyria. Clinics in Dermatology. (Eds. P.B. Disler y M. R. Moore), Vol. 3, Nro. 2, Cap. III, p. 7.
155. Wolfson, S.J.; Bartcsak, A. & Bloomer, J.R. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3543.
156. Batlle, A.M. del C.; Magnin, H.P. & Wider, E.A. (1981) en Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, Clínica y Tratamiento, Cap. V, p. 71. Ed. Universitaria de Buenos Aires.
157. Marks, G.S.; McCluskey, S.A.; Mackie, J.E.; Riddick, D.S. & James, C.A. (1988) FASEB J. 2, 2774.
158. Wider de Xifra, E.; Sandy, J.; Davies, R. & Neuberger, A. (1976) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B273, 79.
159. Vázquez, E.; Wider de Xifra, E. & Batlle, A. (1980) Int. J. Biochem. 12, 721.
160. Viale, A.; Wider de Xifra, E. & Batlle, A. (1980) Int. J. Biochem. 12, 729.
161. Vázquez, E.; Buzaleh, A.; Wider, E. & Batlle, A. (1987) Int. J. Biochem. 19, 217.
162. Batlle, A.M. del C.; Magnin, P.H. & Wider, E.A. (1981) en Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, Clínica y Tratamiento, Cap. IV, p. 59. Ed. Universitaria de Buenos Aires.
163. Arrese, M.R.; Carvajal, E.; Robison, S.; Sambunaris, A.; Panek, A. & Mattoon, J.R. (1983) Curr. Genet. 7, 175.
164. Jayaraman, J.; Padmanaban, G.; Malathi, K. & Sarma, P.S. (1971) Biochem. J. 121, 531.
165. Labbe-Bois, R. & Labbe, P. (1978) en Biochemistry and Genetics of Yeast (Eds. Bacila, M.; Horecker, B.L. y Stoppani, A.O.M.) p. 97, Academic Press, N. Y.
166. Borralho, L.; Malamud, D.; Panek, A.; Tenan, M.; Oliveira, D. & Mattoon, J.R. (1989) J. Gen. Microbiol. 135, 1217.
167. Malamud, D.R.; Padrao, G.R.B.; Borralho, L.M.; Arrese, M.R.; Panek, A.D. & Mattoon, J.R. (1983) Braz. J. of Med. and Biol. Res. 16, 203.

168. Rytka, J.; Bilinski, T. & Labbe-Bois, R. (1984) *Biochem. J.* 218, 405.
169. Mattoon, J.R.; Lancashire, W.E.; Sanders, H.K.; Carvajal, D.R.; Malamud, D.R.; Braz, G.R.C. & Panek, A.D. (1979) in *Biochemical and Clinical Aspects of Oxygen*, p. 145. (Ed. W. Canghey) Academic Press, New York.
170. Keng, T. & Guarente, L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9113.
171. Pinkham, J.L. & Guarente, L.P. (1985) *Mol. Cell Biol.* 5, 3410.
172. Mattoon, J.R.; Carvajal, E. & Guthrie, D. (1990) *Curr. Genet.* 17, 179.
173. Prezant, T.; Pfeifer, K. & Guarente, L.P. (1987) *Mol. Cell Biol.* 7, 3252.
174. Zitomer, R.S.; Sellers, J.W.; McCarter, D.W.; Hastings, G.A.; Wick, P. & Lowry, C. (1987) *Mol. Cell Biol.* 7, 2212.
175. Winkler, H.; Adam, G.; Mattes, E.; Schanz, M.; Hartig, A. & Ruis, H. (1988) *EMBO J.* 7, 1799.
176. Pfeifer, K.; Kin, K-S; Kogan, S. & Guarente, L. (1989) *Cell* 56, 291.
177. Lowry, C.V, & Zitomer, R. S. (1988) *Mol. Cell Biol.* 8, 4651.
178. Mehta, K.D. & Smith, M. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 8670.
179. Trueblood, C.E.; Wright, R.M. & Poytoon, R.O. (1988) *Mol. Cell Biol.* 8, 4537.
180. Hodge, M.R.; Kim, G.; Singh, K. & Cumsy, M.G. (1989) *Mol. Cell Biol.* 9, 1958.
181. Woloszczuk, W.; Sprinson, D.B. & Ruis, H. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2624.
182. H.rtner, H.; Ammerer, G.; Hartter, E.; Hamilton, B.; Rytka, J.; Bilinski, T. & Ruis, H. (1982) *Eur. J. Biochem.* 128, 179.
183. Spevak, W.; Hartig, A.; Meindl, P. & Ruis, H. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 203, 73.
184. Sledziewski, A.; Rytka, J.; Bilinski, T.; H.rtner, H. & Ruis, H. (1981) *Curr. Genet.* 4, 19.
185. Hamilton, B.; Hofbauer, R. & Ruis, H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7609.
186. Ohashi, A.; Gibson, J.; Gregor, I. & Schatz, G. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13042.
187. Saltzgaber-M.ller, J. & Schatz, G. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 305.
188. Padmanaban, G.; Venkateswar, V. & Rangarajan, P.N. (1989) *Trends in Biochemical Sciences (TIBS)*.

189. Rose, A.H. & Harrison, J.S. (1978) en *Biology of Yests* (Ed. A.H. Rose y J.S. Harrison), Vol. 1. Academic Press.
190. Arnold, W.N. (1981) en *Yeast Cell Envelopes: Biochemistry, Biophysics and Ultrastructure*. Vol. I, CRC Press, Inc.
191. Brock, T.D. (1978) en *Biología de los Microorganismos*, Cap. 17, p. 685. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
192. Brock, T.D. (1978) en *Biología de los Microorganismos*, Cap. 11, p. 385. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
193. Sherman, F. (1963) *Genetics* 48, 375.
194. Raut, E. (1953) *Exp. Cell Res.* 4, 295.
195. Yeas, M. & Starr, T.J. (1953) *J. Bacteriol.* 65, 83.
196. Miyake, S. & Sugimura, T. (1968) *J. Bacteriol.* 96, 1977.
197. Pretlow, T.P. & Sherman, F. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 148, 629.
198. Woods, R.A.; Hildagarde, K.; Sanders, M.B.; Foury, F.; Drysdale, B.E. & Mattoon, J.R. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 9090.
199. Lancashire, W.E. & Mattoon, J.R. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 801.
200. Myers, A.M.; Crivellone, M.D.; Koerner, T.J. & Tzagoloff, A. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 16822.
201. Resnick, M.A. & Mortimer, R.K. (1966) *J. Bacteriol.* 92, 597.
202. Astin, A.M.; Haslam, J.M. & Woods, R.A. (1977) *Biochem. J.* 166, 275.
203. Gollub, E.G.; Troch, P.; Liu, P.K. & Sprinson, D.B. (1974) *Fed. Proc.* 33, 1568.
204. Gollub, E.G.; Troch, P.; Liu, P.K. & Sprinson, D.B. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 471.
205. Gollub, E.G.; Liu, P.K.; Dayan, J.; Aldersbeg, M. & Sprinson, D.B. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2846.
206. Mattoon, J.R.; Malamud, D.R.; Brunner, A.; Braz, G.; Carvajal, E.; Lancashire, W.E. & Panek, A.D. (1978) en *Biochemistry and Genetics of Yeast. Pure and Applied Aspects*, p. 317 (Ed. M. Bacila; B. Horecker y A.O.M. Stoppani) Academic Press, New York.
207. Lewis, T.A.; Taylor, F.R. & Parks, L.W. (1985) *J. Bacteriol.* 163, 199.
208. Lorenz, R.T. & Parks, L.W. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 3707.
209. Pachecka, J.; Litwinska, J. & Bilinski, T. (1974) *Mol. Gen. Genet.* 134, 299.

210. Labbe-Bois, R.; Rytka, J.; Litwinska, J. & Bilinski, T. (1977) *Mol. Gen. Genet.* 156, 177.
211. Slominski, P.P. & Tzagoloff, A. (1976) *Eur. J. Biochem.* 61, 27.
212. Thalenfeld, B.E. & Tzagoloff, A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 6173.
213. Keyhani, E. & Keyhani, J. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 717, 355.
214. Sherman, F. (1964) en *International Symposium of Mechanisms of Regulation of Cellular Activities in Microorganisms (Marseille, 1963)*, p. 465. Gordon and Breach, New York.
215. Arrese, M.R.; Vojensky, D. & Mattoon, J.R. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 848.
216. Michels, C.A. & Romanowski, A. (1980) *J. Bacteriol.* 143, 673.
217. B. ker-Schitt, E.; Francisci, S. & Schweyen, R.J. (1982) *J. Bacteriol.* 151, 303.
218. Malher, H.R. & Lin, C.C. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 1039.
219. Labbe-Bois, R. & Volland, C. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 565.
220. Urban-Grimal, D. & Labbe-Bois, R. (1980) *Mol. Gen. Genet.* 178, 713.
221. Urban-Grimal, D. & Labbe-Bois, R. (1981) *Mol. Gen. Genet.* 183, 85.
222. Camadro, J.M. & Labbe, P. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11675.
223. Kurlandzka, A. & Rytka, J. (1985) *J. Gen Microbiol.* 131, 2909.
224. Kurlandzka, A.; Zoladek, T.; Rytka, J.; Labbe-Bois, R. & Urban-Grimal, D. (1988) *Biochem. J.* 253, 109.
225. Carvajal, E.; Panek, A. & Mattoon, J.R. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 2855.
226. Sancovich, H.; Ferramola, A.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1970) en *Methods in Enzymology* (Ed. Tabor y Tabor), Vol. 17, p. 220. Academic Press, New York.
227. Moore, D.L. & Labbe, R.F. (1964) *Clin. Chem.* 10, 105.
228. Rimington, C. & Sveinsson, S. (1950) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2, 209.
229. Rimington, C. (1960) *Biochem J.* 75, 620.
230. Polo, C.F.; Afonso, S.G. & Batlle, A.M. del C. (1988) *Acta Bioq. Clin. Latinoamer.* Vol. XXII, 439.
231. Falk, J.E. & Benson, A. (1953) *Biochem. J.* 55, 101.

232. Afonso, S.G.; Chinarro, S.; Stella, A.M.; Batlle, A.M. del C.; Lenczner, M.J. & Magnin, P.H. (1985) *Rev. Arg. Dermatol.* 66, 12.
233. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.A. & Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
234. Mauzerall, D. & Granick, S. (1956) *J. Biol. Chem.* 219, 435.
235. Batlle, A.M. del C. & Rossetti, M.V. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 251.
236. Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971) *Biochem. J.* 121, 327.
237. Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Batlle, A.M. del C.; Kivilevich, A. & Grinstein, M. (1976) *Acta Physiol. Latinoam.* 26, 376.
238. Cornford, P. (1964) *Biochem. J.* 91, 64.
239. Stella, A.M. (1977) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
240. Cleland, W.W. (1970) en *The Enzymes* (Ed. P.D. Boyer) Vol. II, p. 1.
241. Afonso, S.G.; Chinarro, S.; Muñoz, J.J.; Enriquez de Salamanca, R. & Batlle, A. (1987) *Boll. Ist. S. Gallicano* Vol. XIII, 35.
242. Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.; Juknat A.A. & Batlle, A.M. del C. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* 87B, 601.
243. Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 196, 130.
244. Fumagalli, S.A. (1988) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
245. Llambías, E.B. & Batlle A.M. del C. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 227, 180.
246. Rossetti, M.V.; Lombardo, M.E.; Juknat de Geralnik, A.A.; Araujo, L.S. & Batlle, A.M. del C. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.* 85B, 451.
247. Rossetti, M.V. (1978) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
248. Juknat, A.A.; Kotler, M.; Koopmann, G. & Batlle, A. (1989) *Comp. Biochem. Physiol.* 92B, 291.
249. Nandi, D.L.; Baker-Cohen, K.F. & Shemin, D. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 1224.
250. Muthukrishnan, S.; Malthi, K. & Padmanaban, C. (1972) *Biochem. J.* 129, 21.
251. Menon, I.A. & Shemin, D. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 304,
252. Fukuda, H. (1988) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.

253. Bustos, N.; Stella, A.M.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 745.
254. Buzaleh, A.M., Vázquez, E.S. & Batlle, A.M. del C. (1990) *Gen. Pharmac.* 21, 27.
255. Borralho, L.; Panek, A.; Malamud, D.; Sanders, S. & Mattoon, J. (1983) *J. Bacteriol.* 156, 141.