



*Estudio comparativo del metabolismo del carbono en  
autótrofos y heterótrofos. Caracterización de enzimas de  
diatomeas y sus relaciones evolutivas con otros  
organismos.*

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

**Autora:** Lic. María Belén Bosco

**Directora:** Dra. Mabel Aleanzi

Laboratorio de Enzimología Molecular  
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

2011

## **AGRADECIMIENTOS**

Han sido tantas las personas, caras, oídos, manos, brazos y ojos que me han acompañado y ayudado en este camino, que este agradecimiento probablemente no les sea fiel ni suficiente. Pero aquí va...

Quiero expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la Beca de Postgrado que me permitió desarrollar este trabajo de tesis.

También quiero agradecer a todos los organismos que financian el trabajo que se desarrolla en nuestro laboratorio: la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, el CONICET y la Universidad Nacional del Litoral.

Agradezco también a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por tener tanto que ver en mi formación, desde el título de grado hasta haberme permitido realizar este trabajo de tesis, y por contar con tanta gente dispuesta a ayudar.

Quiero agradecer a Alberto Iglesias, por darme un lugar en su grupo de trabajo, poner a mi disposición los recursos necesarios para hacer este trabajo de tesis y por compartir conmigo sus conocimientos.

Agradezco infinitamente a Mabel Aleanzi, por ser mi guía constante a lo largo de estos 8 años que la conozco y trabajo en el laboratorio. Por sus canciones, chistes, consejos, abrazos, modelos cinéticos, alfajores y poesías. Personalmente, por la palabra justa en el momento preciso. Laboralmente, por la pregunta justa en el momento preciso. Y por tanto más...

A todos mis compañeros, en realidad amigos, del LEM, por su apoyo incondicional, palabras de aliento, charlas e ideas compartidas, consejos laborales y no tanto. A Ana, por mucho más de lo que pueda escribir en estas páginas, por anécdotas de autos y familia compartidas, por enseñarme lo que significa ser maestra, por su calidez y compañía. A Ceci, por su ternura y paciencia, por dejar lo que estaba haciendo para darme un consejo, por lágrimas conjuntas. A Charly, por compartir la mesada, sus conocimientos con la máxima paciencia, reuniones y charlas de todo tipo. A Machunchus, por infinidad de anécdotas divertidas, por sus ocurrencias en el momento justo, por su pasión por defender sus ideales y su sed de un mundo mejor. Al Mati H.

por compartir tantos intereses, desde la música hasta las series televisivas, por la comprensión y el oído, por estar. A Mechi, por ser tan divertida, por prestarme siempre la oreja, por sus ataques cuando no le dan las curvas o se la molesta, por ser una persona tan especial. A Anita, uno de los personajes más personajes del LEM, por ser así de ocurrente y por tener una canción para cada momento del día. A Dieguito, por ser mi maestro en tantas cosas, por esa paciencia realmente infinita y disposición a ayudar y enseñar. A Silvia y Virginia, por compartir tantas risas, anécdotas y tardes de enseñanza. A Sergio, Vanesa, Matías A., Matías C., Érica, Jime y Cintia por consejos y momentos compartidos. A Vero, Gaby, Vani y Ale, por brindar siempre su ayuda generosa y por ser compañía constante a lo largo de todo este camino. A todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Laboratorio de Biología Celular y Molecular, por estar siempre dispuestos a participar y ayudar. A Vidu, Poli, Toto y Fede, tan importantes a lo largo de la carrera y aún después.

Agradezco a mis amigas, que me acompañaron durante todo este camino y mucho más: Anto, Clau, Guille, Jime, Lau, Lu, Meli, Petu, Sabri y Sil, por sus consejos, apoyo y compañía incondicional. A Melina, Fabri, Juli y Luchi, por enriquecer mi vida. A mis amigos de coro, Lucy, Pao, Mara, Jose y Andrés, por enseñarme que hay formas distintas de expresarse y llenar el alma. A Esteban, Jaque, Brune y Caro, mis amigos a distancia, porque su cariño se hace presente a través de los km.

Agradezco infinitamente a mis padres, Sissy y Rubén, porque sin ellos no sería quién soy ni estaría donde estoy. Por tantas cosas que no puedo poner en papel, por su cariño, estímulo y consejos constantes, por estar siempre, incondicionales, al lado mío. A mis hermanos, Gonza y Lisi, por crecer junto a mí y compartir tantas etapas hermosas, por su cariño. A mis cuatro abuelos, siempre presentes con una palabra de aliento o una mirada cariñosa. A mis tíos y primos, que siempre estuvieron y están a mi lado. A mi “nueva” familia: Inés, Cacho, Agnes, Gaby, Rafa y sobrinos, por ser nueva parte de mi vida y llenarla de cariño y contención.

A Daniel, por ser mi compañero de vida, por brindarme su amor y, especialmente, su paciencia. Por compartir conmigo fracasos y triunfos, y por la felicidad de crecer juntos.

A todos ellos les digo ¡GRACIAS!

*A mis padres, por estar siempre presentes.*

*A Daniel, por ser mi compañero de vida.*

Parte del trabajo realizado durante el transcurso de esta Tesis fue publicada en:

Bosco, M. B.; Machtey, M.; Iglesias, A. A.; Aleanzi, M. (2009) *UDPglucose pyrophosphorylase from Xanthomonas spp. Characterization of the enzyme kinetics, structure and inactivation related to oligomeric dissociation*. *Biochimie* 91: 204-13.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este Trabajo de Tesis fueron dados a conocer en las siguientes presentaciones en reuniones científicas:

Bosco, M. B.; Aleanzi, M.; Márquez, V.; Veccaría, A.; Iglesias, A. A. *Study of Carbon Metabolism in Phaeodactylum*. SAIB, 43<sup>th</sup> Annual Meeting. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 2007. *BIOCELL* 31 (supplement), p. 147.

Bosco, M. B.; Aleanzi, M.; Iglesias, A. A. *Heterologous Expression and Characterization of P. tricornutum's Phosphoglycerate Kinase-1*. SAIB, 44<sup>th</sup> Annual Meeting. Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 2008. *BIOCELL* 32 (supplement), p. 82.

Bosco, M. B.; Aleanzi, M.; Iglesias, A. A. *Redox Characterization of Phaeodactylum tricornutum's Chloroplastic Phosphoglycerate kinase*. SAIB, 45<sup>th</sup> Annual Meeting. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina, 2009. Publicado en *BIOCELL* 33 (supplement), p. 85.

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	vi
ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Las diatomeas y el ecosistema.....	1
1.2. Pared celular, ciclo celular y reproducción.....	1
1.3. Composición bioquímica de las diatomeas.....	4
1.3.1. Proteínas.....	5
1.3.2. Lípidos.....	5
1.3.3. Pigmentos.....	5
1.3.4. Ácidos nucleicos.....	6
1.3.5. Hidratos de carbono.....	6
1.4. Historia evolutiva de las diatomeas. Endosimbiosis secundaria.....	8
1.5. Cloroplastos de diatomeas.....	11
1.6. Metabolismo del carbono en diatomeas.....	13
1.6.1. Fotosíntesis y fijación de C.....	14
1.6.2. Fotorrespiración.....	19
1.6.3. Ciclos oxidativo y reductivo de las pentosas-P. Regulación.....	21
1.6.4. Glucólisis.....	23
1.6.5. Productos de almacenamiento de energía y carbono.....	26
1.7. Importancia económica de las diatomeas.....	27
1.8. <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	29
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1. Reactivos y enzimas.....	35
3.2. Plásmidos.....	35
3.3. Cepas.....	36
3.4. Medios y condiciones de cultivo.....	36
3.5. Antibióticos.....	37
3.6. Extracción de ARN.....	37
3.7. Retrotranscripción (RT-PCR).....	38
3.8. Oligonucleótidos.....	38

3.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	40
3.10. Mutagénesis sitio-dirigida. ....	41
3.11. PCR cuantitativa en tiempo real. ....	41
3.12. Electroforesis en gel de agarosa. ....	43
3.13. Purificación de ADN a partir de gel de agarosa. ....	43
3.14. Transformación de <i>E. coli</i> mediante la técnica de $\text{CaCl}_2$ . ....	43
3.14.1. Preparación de células competentes. ....	43
3.14.2. Transformación de células competentes.....	43
3.15. PCR de colonia. ....	44
3.16. Preparación de ADN plasmídico. ....	44
3.17. Digestión enzimática de ADN.....	44
3.18. Ligación de fragmentos de ADN.....	45
3.19. Secuenciación de ADN.....	45
3.20. Expresión de las proteínas recombinantes.....	45
3.21. Disrupción celular y obtención de extractos crudos.....	45
3.22. Purificación de las enzimas. ....	46
3.22.1. Purificación de la <i>PtrPGKasa-1</i> . ....	46
3.22.2. Purificación de las <i>PtrPGKasa-1-CHis</i> , <i>PtrPGKasa-1-NHis</i> , <i>TaeGapC</i> , <i>EcoTrx</i> y <i>PtrTrx-h2</i> .. ....	47
3.22.3. Purificación de la enzima UDP-Glc PPasa nativa a partir de células de <i>P. tricornutum</i> .....	48
3.23. Digestión proteolítica de la proteína de fusión.....	49
3.24. Cuantificación de proteínas totales.....	49
3.25. Concentración y lavado de soluciones proteicas. ....	49
3.26. Electroforesis en geles de poliacrilamida ..... 49	49
3.26.1. En condiciones desnaturalizantes y reductoras ..... 49	49
3.26.1. En condiciones desnaturalizantes y no reductoras ..... 50	50
3.26.2. En condiciones nativas ..... 50	50
3.27. Medida de actividad enzimática y determinación de parámetros cinéticos..... 50	50
3.27.1. Medida de la actividad de la crisolaminarón sintasa.. .... 51	51
3.27.1.1. Medida de actividad de la CSasa in vitro. .... 51	51
3.27.1.2. Medida de actividad de la CSasa in vivo..... 52	52
3.27.2. Medida de la actividad de la fructosa-1,6- bisfosfato aldolasa..... 53	53
3.27.3. Medida de la actividad de la enzima gliceraldehído-3-P deshidrogenasa. . 53	53

3.27.1. Medida de la actividad de la enzima 3-fosfoglicerato quinasa.....	54
3.27.2. Medida de la actividad de la enzima fosfoglucomutasa.....	55
3.27.1 .Medida de la actividad tiorredoxina.....	55
3.27.2. Medida de actividad de la enzima UDP-Glc pirofosforilasa.....	55
3.27.2.1 .Medida de actividad enzimática en sentido de síntesis de UDP-Glc...	56
3.27.2.2. Medida de actividad enzimática en sentido de pirofosforólisis.....	56
3.27.3. Medida de la actividad chaperona de la <i>Ptr</i> PGKasa-1 por protección de la Ga3PDHasa contra la desnaturalización térmica.....	57
3.28. Permeabilización de células de <i>P. tricornutum</i> .....	58
3.29. Cuantificación de pigmentos.....	58
3.30. Cuantificación de crisolaminarén.....	59
3.31. Cromatografía de tamiz molecular para la estimación de masas moleculares.....	59
3.32. Método de Ferguson.....	59
3.33. Entrecruzamiento.....	60
3.34. Modelado molecular por homología de la enzima <i>Ptr</i> PGKasa-1.....	61
3.35. Ensayos cinéticos de oxido-reducción sobre la enzima <i>Ptr</i> PGKasa-1.....	61
3.36. Titulación redox de la <i>Ptr</i> PGKasa-1.....	62
3.37. Titulación de sulfhidrilos.....	63
3.38. Cuantificación de ácidos sulfénicos.....	63
3.39. Alquilación de tioles libres.....	64
3.40. Inmunoprecipitación.....	64
3.41. ANOVA.....	65
3.42. Identificación de proteínas por mapeo peptídico.....	65
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
4.1. <u>Capítulo 1</u> : Caracterización de la enzima fosfoglicerato quinasa-1 de <i>P. tricornutum</i> .....	66
4.1.1. Clonado y expresión del gen que codifica para la fosfoglicerato quinasa-1 de <i>P. tricornutum</i> ( <i>Ptr</i> PGKasa-1) y purificación de la enzima.....	66
4.1.2. Caracterización estructural de la <i>Ptr</i> PGKasa-1.....	71
4.1.2.1. Determinación de estructura cuaternaria de la <i>Ptr</i> PGKasa-1 mediante el método de Ferguson.....	71
4.1.2.2. Determinación de la estructura cuaternaria de la <i>Ptr</i> PGKasa-1 mediante cromatografía de exclusión molecular.....	73



4.1.2.3. Determinación de la estructura cuaternaria de la <i>PtrPGKasa-1</i> mediante la técnica de entrecruzamiento.....	75
4.1.2.4. Modelado molecular de la <i>PtrPGKasa-1</i> .....	76
4.1.3. Caracterización funcional de la <i>PtrPGKasa-1</i> .....	78
4.1.3.1. Dependencia de la actividad con el pH.....	78
4.1.3.2. Dependencia de la actividad enzimática con la temperatura y cálculo de la Energía de activación (Ea).....	79
4.1.3.3. Obtención de los parámetros cinéticos.....	80
4.1.3.4. Estudio de sustratos alternativos.....	82
4.1.3.5. Estudio de efectos reguladores por metabolitos.....	84
4.1.3.6. Estudio del mecanismo de reacción de <i>PtrPGKasa-1</i> .....	86
4.1.3.7. Inhibición producida por ADP.....	88
4.1.3.8. Doble efecto de iones sobre la <i>PtrPGKasa-1</i> .....	89
4.1.4. Clonado, expresión y purificación de la <i>PtrPGKasa-1-CHis</i> y la <i>PtrPGKasa-1-NHis</i> .....	94
4.1.4.1. Clonado, expresión y purificación de la <i>PtrPGKasa-1-CHis</i> .....	94
4.1.4.2. Clonado, expresión y purificación de la <i>PtrPGKasa-1-NHis</i> .....	95
4.1.5. Caracterización redox de <i>PtrPGKasa-1</i> .....	101
4.1.5.1. Introducción a la inactivación irreversible.....	108
4.1.5.2. Estudio de la oxidación de la <i>PtrPGKasa-1</i> .....	109
4.1.5.3. Protección a la oxidación mediada por sustratos y cálculo de Kd.....	113
4.1.5.4. Estudio de la reducción de la <i>PtrPGKasa-1</i> .....	117
4.1.5.5. Titulación redox y cálculo del potencial de reducción de la <i>PtrPGKasa-1</i> .....	127
4.1.5.6. Geles no reductores de la <i>PtrPGKasa-1</i> oxidada y reducida.....	129
4.1.5.7. Titulación de formas oxidadas de la <i>PtrPGKasa-1</i> .....	131
4.1.5.8. Producción, purificación y caracterización de mutantes simples de la <i>PtrPGKasa-1</i> .....	136
4.1.6. Actividad enzimática chaperona de la <i>PtrPGKasa-1</i> .....	150
4.1.7. Discusión.....	159
4.2. <u>Capítulo 2:</u> Estudio del metabolismo de hidratos de carbono en <i>P. tricornutum</i> .....	167
4.2.1. Crecimiento auto-, hetero- y mixotrófico de <i>P. tricornutum</i> .....	167

4.2.2. Estudio de la especificidad por sustrato de la enzima crisolaminarón sintasa.....	170
4.2.3. Purificación parcial de la enzima UDP-Glc PPasa de fuente .....	173
4.2.4. Metabolismo de hidratos de carbono en <i>P. tricornutum</i> . Comparación en las condiciones de crecimiento auto- y mixotróficas.....	182
4.2.5. Metabolismo de hidratos de carbono en <i>P. tricornutum</i> . Comparación en las condiciones de crecimiento autotróficas y bajo condiciones oxidantes.....	195
4.2.6. Discusión. ....	199
5. CONCLUSIONES.....	201
6. RESUMEN .....	204
7. ABSTRACT.....	207
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	210

## ABREVIATURAS

1,3-bisPGA	glicerato-1,3- bisfosfato
2-ME	2-mercaptoetanol
3PGA	3-fosfoglicerato
aa	aminoácido
Abs	absorbancia
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADP	adenosina-5'-difosfato
ADP-Glc	adenosina-5'-difosfo-glucosa
ADP-Glc PPasa	adenosina-5'-difosfo-glucosa pirofosforilasa
AE	actividad enzimática
AEe	actividad enzimática específica
AMP	adenosina-5'-monofosfato
ATP	adenosina-5'-trifosfato
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BS	bis(sulfosuccinimidil)suberato
BSA	albúmina sérica bovina
CAT	ciclo de los ácidos tricarboxílicos
cél	célula
Chl	clorofila
COPP	ciclo oxidativo de las pentosas fosfato
cpm	cuentas por minuto
CS	crisolaminarén sintasa
esp	cantidad suficiente para
CTP	citocina-5'-trifosfato
DHAP	dihidroxiacetona-fosfato
dNTPs	mezcla equimolecular de desoxinucleótidos
DO	densidad óptica
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato)
DTT	ditiotreitól

<i>Eco</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
$E_h$	potencial redox
EROs	especies reactivas del oxígeno
ERNs	especies reactivas del nitrógeno
FBA	fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa
FBP	fructosa-1,6- bisfosfato
Fig.	figura
Ga3P	gliceraldehído-3-fosfato
Ga3PDHasa	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Glc	glucosa
Glc-1P	glucosa-1-fosfato
Glc-6P	glucosa-6-fosfato
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
GTP	guanosina-5'-trifosfato
HEDS	hidroxietildisulfuro
IAA	ácido iodoacético
IDA-Ni <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup> - ácido iminodiacético
IMAC	cromatografía de afinidad con metales inmovilizados
IPTG	isopropil β-D-tiogalactopiranosido
ITP	inosina-5'-trifosfato
LB	medio Luria Bertani
MM	masa molecular
MOPS	ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido, reducida
NADP <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, reducida
NBD	7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1, 3, diazole
NPS	nitroprusiato de sodio
-P	-fosfato (derivado de éster fosfórico)
p/v	peso en volumen
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida

pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PGKasa	3-fosfoglicerato quinasa
PGM	fosfoglucomutasa
Pi	pirofosfato inorgánico
P. ID.	<i>protein identification</i>
PPi	pirofosfato inorgánico
<i>Ptr</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
rpm	revoluciones por minuto
RuBisCO	ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa
-SH	sulfhidrilo
-SOH	ácido sulfénico
SDS	dodecil sulfato de sodio
t	tiempo
T	temperatura
<i>Tae</i>	<i>Triticum aestivum</i>
TAE	solución Tris-acético-EDTA
TBS	solución Tris salino
term	terminal
TPI	triosa-fosfato isomerasa
Tris	N-Tris-(hidroximetil) aminoetano
Trx	tiorredoxina
TTP	timidina-5'-trifosfato
UDP	uridina-5'-difosfato
UDP-Glc	uridina-5'-difosfo glucosa
UDP-Glc PPasa	uridina-5'-difosfo glucosa pirofosforilasa
U	unidades internacionales de actividad enzimática
UV	ultravioleta
v/v	volumen en volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-4indol- $\beta$ -D-galactósido

*La frase más excitante que se puede oír en ciencia,  
la que anuncia nuevos descubrimientos,  
no es "¡Eureka!" (¡Lo encontré!)  
sino "Es extraño ..."*

Isaac Asimov (1920-1996)

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 *Las diatomeas y el ecosistema.*

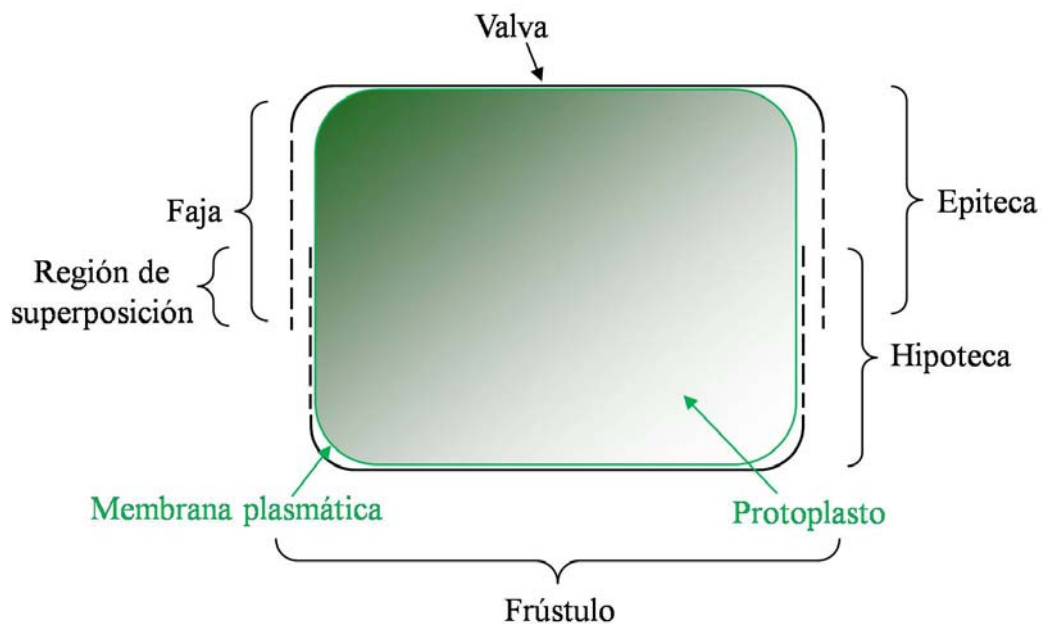
El origen de la vida y los cambios subsecuentes en la productividad oceánica que siguió a la evolución de la fotosíntesis han influenciado la geoquímica de la Tierra por los últimos 3 mil millones de años (Falkowski y col., 1998). Actualmente, los océanos son hogares de fitoplancton marinos formados por bacterias fotosintéticas, como proclorófitas y cianobacterias, y microalgas eucariotas (como algas pardas, algas rojas y algas verdes). Las algas marinas son las responsables de la mayor fijación de carbono en el mar: entre  $35\text{-}50 \cdot 10^9$  toneladas de carbono por año, alcanzando alrededor del 40% de la producción primaria total de la Tierra (Falkowski, 1994).

Las diatomeas son un grupo de algas cromófitas que colonizaron los océanos hasta profundidades a las que la radiación necesaria para la fotosíntesis lograba penetrar. Son capaces de crecer en agua salada y dulce, aún bajo condiciones extremas de temperatura y salinidad (Scala y col., 2002). Se cree que son el grupo eucariótico más importante del fitoplancton, contribuyendo en un 20-25% a la producción primaria global. Además, juegan un papel clave en el ciclo biogeoquímico del silicio (Treguer y col., 1995). Existen más de 250 géneros de diatomeas, con alrededor de 100.000 especies dispersas, dispersas en agua marina y dulce, así como en rocas y suelos (Round y col., 1990). Sus tamaños y formas son sorprendentemente variados, con diámetros que van entre 5 y 200  $\mu\text{m}$ .

### 1.2 *Pared celular, ciclo celular y reproducción.*

La característica más distintiva de las diatomeas es la habilidad de generar una pared externa porosa de sílice  $[(\text{SiO}_2)_n(\text{H}_2\text{O})]$ , conocida como frústulo. La solubilidad del mismo en agua se encuentra disminuida por la existencia de una capa de glicoproteínas que lo rodea, con altos niveles de rhamnosa y xilosa (Round y col., 1990). La misma está constituida por dos mitades, una de la cual es ligeramente más pequeña y encaja en la otra como una placa de Petri. La más grande de ambas es conocida como epiteca y la interna como hipoteca, y dentro de la estructura formada

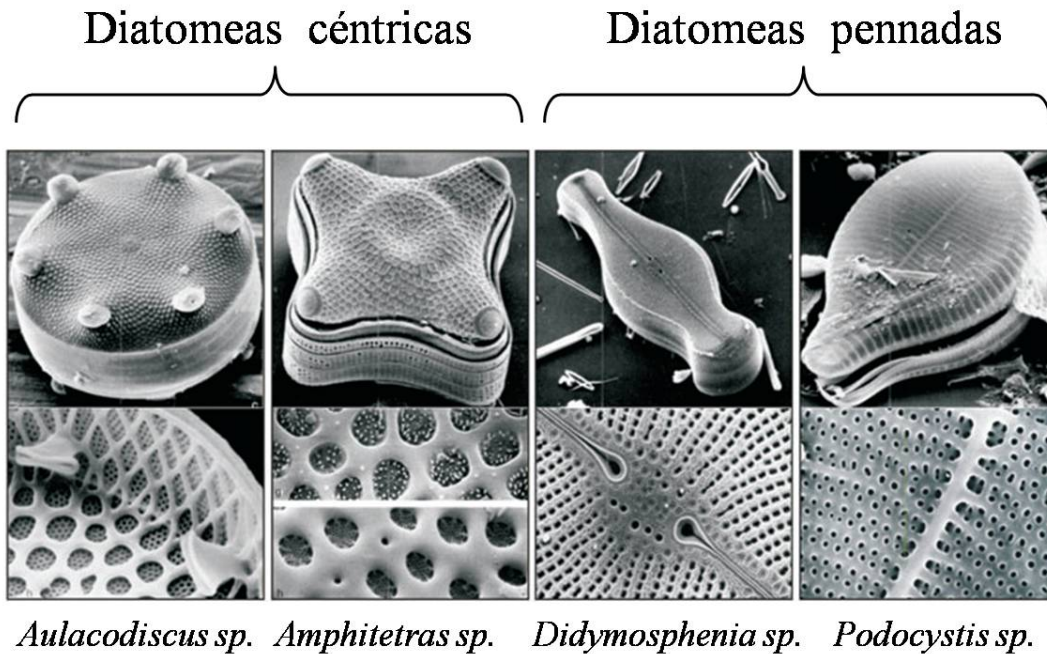
entre ambas se aloja el protoplasto (Fig. 1.1). Cada teca está compuesta por dos partes: la valva, que forma la superficie externa más grande y la faja, formada por bandas circulares de sílice unidas a los bordes de la valva. La banda terminal de cada teca se llama banda pleural y está localizada en la región de superposición de ambas tecas (Round y col., 1990; Van Den Hoek y col., 1995). El frústulo presenta ornamentaciones con los dibujos más variados, los cuales son exactamente reproducidos de generación en generación, lo que implica un control génico estricto del proceso, aún desconocido. Al ser la sílice inerte a los ataques enzimáticos, las diatomeas son menos vulnerables al ataque de microorganismos.



**Fig. 1.1:** Componentes del frústulo. La epiteca se superpone con la hipoteca, y cada teca consiste en una valva y una faja. Se señalan la membrana plasmática y el protoplasto.

Las diatomeas se clasifican en dos grandes grupos (órdenes), dependiendo de la simetría de sus frústulos. Las céntricas presentan simetría radial, circular o trímica, mientras que las pennadas son alargadas y simétricas bilateralmente (Van Den Hoek y col., 1995) (Fig. 1.2).

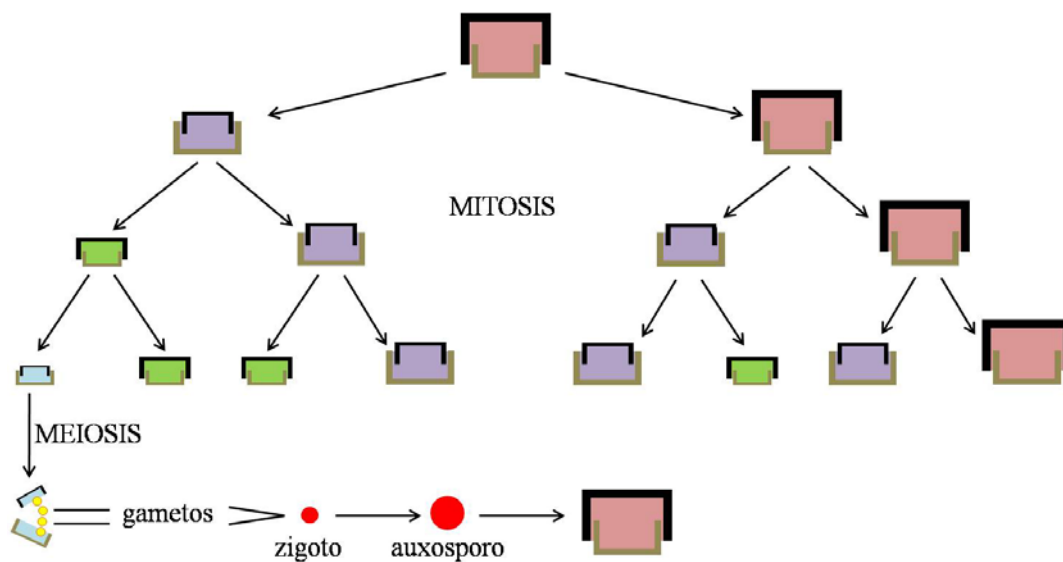




**Fig. 1.2:** Fotos de microscopía electrónica de barrido de las paredes celulares de dos diatomeas céntricas y dos pennadas, tomadas de (Round y col., 1990).

La rigidez de la pared celular de sílice impone ciertas limitaciones en la división y crecimiento celular. Las diatomeas alternan la multiplicación asexual (por mitosis) y la sexual (por meiosis). La forma de reproducción asexual consiste en la división de una célula en dos, con cada valva de la célula parental convirtiéndose en la epiteca de la célula hija (Fig. 1.3). En primer lugar, la célula se estira causando el alejamiento de la epiteca con respecto a la hipoteca. Luego, el núcleo se divide por mitosis y el protoplasto lo hace por invaginación de la membrana plasmática. En este momento la célula hija genera una nueva hipoteca dentro de una enorme vesícula (llamada vesícula de deposición de sílice), produciendo un enrejado de sílice que será luego recubierto por una matriz orgánica que evitará su disolución. Una vez formada, la estructura completa es expulsada por exocitosis y las dos células hijas se separan (Falciatore y Bowler, 2002). Por la forma del frústulo, este tipo de reproducción asexual lleva a que la progenie disminuya su tamaño a medida que pasan las generaciones (Fig. 1.3). Las diatomeas presentan también reproducción sexual, lo que les permite regenerar sus dimensiones originales y mantener la variabilidad genética. Durante este proceso ocurre

la división celular por meiosis y los gametos resultantes se liberan de las paredes celulares. Inmediatamente después de la fusión de los gametos, se forma un cigoto especializado conocido como auxosporo, que está cubierto de una pared celular orgánica y que aumenta mucho su tamaño en un tiempo corto. Durante la primera división de ese cigoto se forman las valvas de sílice, que exhiben la forma y ornamentación de la célula parental, para generar una célula del tamaño “original” (Fig. 1.3) (Chepurnov y col., 2004).



**Fig. 1.3:** Diagrama esquemático de la reproducción por mitosis (asexual) y meiosis (sexual). Figura adaptada de <http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio111/algae.htm>.

### 1.3 Composición bioquímica de las diatomeas.

A excepción del frústulo de sílice, la composición química de las diatomeas es similar a la de otras microalgas. Las células en crecimiento exponencial contienen 30-60% proteínas, 10-50% hidratos de carbono y 5-20% lípidos (Granum, 2002). Otros compuestos importantes son los ácidos nucleicos y nucleótidos, pigmentos, vitaminas, azúcares alcohol, aminoácidos libres y ácidos orgánicos. Sin embargo, la composición química de la célula varía según las condiciones de crecimiento e iluminación y el momento del ciclo celular en el que se encuentra.

### 1.3.1 Proteínas.

Las proteínas son esenciales en los procesos de transporte y almacenamiento de metabolitos, en el control del crecimiento y en las reacciones bioquímicas (enzimas). Al estudiar la composición de las proteínas, se encontró que las diatomeas presentan altas cantidades de aminoácidos esenciales, mayores a los de algas verde-azules, lo que las hace nutricionalmente excelentes (Hayashi y col., 1986).

### 1.3.2 Lípidos.

Los lípidos constituyen un grupo de biomoléculas hidrofóbicas que sirven de reservas de energía, moléculas de señalización y componentes de membranas. Los lípidos o gotas de aceite se almacenan en vacuolas o en el citoplasma. La composición y el contenido total de ácidos grasos varía a lo largo del crecimiento celular y con las condiciones de cultivo, aumentando su cantidad en la fase estacionaria y bajo condiciones de limitación de algunos nutrientes, como el fósforo (Siron y col., 1989). En el caso de los lípidos de membrana, los fosfolípidos son los mayoritarios, aunque las tilacoides contienen galactolípidos. La composición de ácidos grasos en las diatomeas está caracterizada por poseer altos niveles de ácidos C14, C16 y C20, especialmente el insaturado 16:1 (ácido palmitoleico) y el poliinsaturado 20:5 (ácido eicosapentaenoico, EPA), de la serie  $\omega$ -3 (Granum, 2002). Los lípidos juegan un papel importante en la flotabilidad de las diatomeas (Armbrust y col., 2004).

### 1.3.3 Pigmentos.

El pigmento central fotosintético es la clorofila (Chl) *a*, que constituye el 1-6% del carbono celular de las diatomeas. Los principales pigmentos accesorios son las Chl *c*<sub>1</sub> y *c*<sub>2</sub> y los carotenoides fucoxantina, diadinoxantina, diatoxantina y  $\beta$ -caroteno. Algunas diatomeas poseen Chl *c*<sub>3</sub> en lugar de Chl *c*<sub>1</sub>. Por los altos niveles de fucoxantina, los cloroplastos de las diatomeas presentan un color marrón dorado (Cavalier-Smith, 1981; Pennington y col., 1988; Stauber y Jeffrey, 1988).

En particular, las diatomeas tienen una gran capacidad de disipar el exceso de energía absorbida mediante un proceso no fotoquímico, conocido con la sigla NPQ (del

inglés *Non-Photochemical Quenching*). Mediante este proceso, los organismos fotosintéticos evitan que las altas intensidades luminosas causen fotoinhibición o fotodestrucción de las células. El nivel de NPQ observado en diatomeas puede ser hasta cinco veces superior al observado en plantas (Ruban y col., 2004). Este mecanismo protector tiene lugar sin alterarse la capacidad de captación de luz por parte de las diatomeas (Lavaud y col., 2003), lo que permite mantener altas velocidades de crecimiento en un amplio rango de iluminación (Falkowski y La Roche, 1991). NPQ involucra la acidificación del lumen de las membranas tilacoides, lo que causa la de-epoxidación de pigmentos, proceso conocido como ciclo de xantófilas (diadinoxantina en el caso de diatomeas). Así, la diadinoxantina, un carotenoide de baja eficiencia de transferencia de energía lumínica, es convertida en diatoxantina (Olaizola y col., 1994). Finalmente, la energía en exceso es disipada como radiación calórica.

#### 1.3.4 Ácidos nucleicos.

Cada célula contiene una cantidad constante de ADN, excepto durante la reproducción sexual, que contribuye en un 1-3% al carbono total de la diatomea. En contraste, la concentración de ARN aumenta con la velocidad de crecimiento, por lo que se alcanzan relaciones ARN/ADN entre 1 y 20 (Dortch y col., 1983).

#### 1.3.5 Hidratos de carbono.

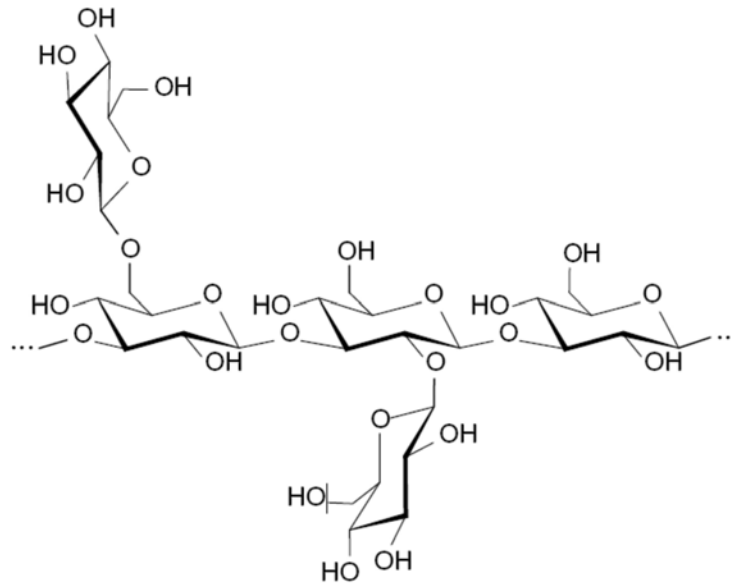
Los polisacáridos representan la parte mayoritaria de los hidratos de carbono de las diatomeas y pueden ser divididos en tres grupos: polisacáridos de la pared celular, polisacáridos extracelulares y glucano de reserva.

En cuanto a la pared celular, el frústulo de sílice está rodeado por una cubierta orgánica de polisacáridos estructurales, entre los que se destacan los glucuronomananos sulfatados (Ford y Percival, 1965b), y los heteropolisacáridos con proporciones muy variadas de galactosa, glucosa y manosa (y sus correspondientes ácidos urónicos), fucosa, rhamnosa, xilosa, entre otros (Hecky y col., 1973; Haug y Myklestad, 1976). Estos polisacáridos son los responsables de la adhesión de las células a superficies, y la protección contra la deshidratación celular (Hoagland y col., 1993). Por otro lado,

bandas de callosa, un glucano estructural con uniones  $\beta$ -1,3, forman las juntas de los componentes silíceos del frústulo (Waterkeyn y Bienfait, 1987).

Teniendo en cuenta los componentes extracelulares producidos por diatomeas, los polisacáridos constituyen su mayor parte. Los polisacáridos extracelulares son heteroglucanos complejos, con composición y estructura muy distinta a los intracelulares (Smestad y col., 1975; Percival y col., 1980). Suelen formar mucílagos gelatinosos de distinta viscosidad, los cuales son útiles en sistemas marinos para permitir la agregación, el intercambio iónico y la protección hacia depredadores (Decho, 1990).

El principal polisacárido de almacenamiento de carbono en diatomeas es un  $\beta$ -1,3-D-glucano llamado crisolaminarén. Éste presenta un esqueleto de glucosas (entre 20 y 60) unidas por enlaces  $\beta$ -1,3, con ramificaciones poco frecuentes, principalmente por uniones  $\beta$ -1,6 y  $\beta$ -1,2 (Fig. 1.4) (Beattie y col., 1961; Ford y Percival, 1965a; Ford y Percival, 1965b; Paulsen y Myklestad, 1978; McConville y col., 1986; Granum, 2002). Se ha demostrado que este polisacárido se encuentra en vacuolas mediante tinción con azul de anilina (Waterkeyn y Bienfait, 1987) y por inmuno-localización con anticuerpos monoclonales anti- $\beta$ -1,3-glucano (Chiovitti y col., 2004). Este glucano, soluble en agua, se acumula durante la fotosíntesis y se consume durante los períodos de oscuridad (Myklestad, 1974). La dinámica de producción y consumo del crisolaminarén parece estar íntimamente relacionada con el control fisiológico de la flotabilidad de la célula (Granum, 2002).



**Fig. 1.4:** Estructura química de crisolaminarón. Figura tomada de (Granum, 2002).

#### 1.4 *Historia evolutiva de las diatomeas. Endosimbiosis secundaria.*

La fotosíntesis eucariota comenzó hace 1,2 miles de millones de años, cuando una célula eucariota heterotrófica capturó por endocitosis a una cianobacteria fotosintética, la cual finalmente fue reducida a un plástido fotosintético rodeado por dos membranas que presentaba una pequeña porción de genoma derivado de la cianobacteria (Fig. 1.5). De este proceso, conocido como endosimbiosis primaria, derivaron tres linajes fotosintéticos del reino **Plantae** (Fig. 1.6): **Viridaeplantae** (plantas terrestres y algas verdes), caracterizado por los pigmentos Chl *a* y *b*, **Rhodophyta** (algas rojas) y **Glaucophyta**, ambos caracterizados por poseer Chl *a* y ficobilinas. La diferencia entre **Glaucophyta** y el linaje rojo es que el primero retuvo la membrana plástica de peptidoglucano (Parker y col., 2008). Las plantas y algas verdes evolucionaron desde el linaje verde. Los eucariotas fotosintéticos se diversificaron aún más por procesos de endosimbiosis secundaria, en los que un eucariota no fotosintético endocitó a un eucariota fotosintético con un cloroplasto primario, originado por endosimbiosis primaria (Fig. 1.5). Durante este proceso, existió una gran transferencia de genes desde el núcleo del endosimbionte (N1, Fig. 1.5) hacia el de la célula huésped

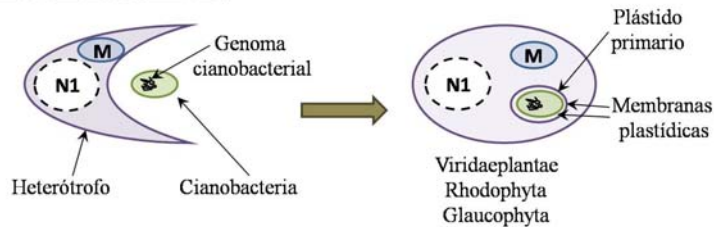
(N2), pasando por un estado intermedio con un núcleo relicto (nucleomorfo, Nm). Los organismos pertenecientes a **Cryptophyta** todavía contienen este nucleomorfo, mientras que el resto de los organismos lo perdieron luego de la transferencia de genes. La mitocondria de la célula fagocitada fue también perdida y los cloroplastos derivados de endosimbiosis secundaria tienen características distintivas, las cuales se detallarán en los apartados siguientes (Parker y col., 2008).

Las diatomeas pertenecen a la clase **Bacillariophyceae** dentro del filo **Stramenopiles** o **Heterokontophyta**, del reino **Chromista**. Este último es un supergrupo de Eukarya que puede considerarse tanto un reino independiente como integrado en Protista. El grupo incluye la gran mayoría de las algas cuyos cloroplastos contienen Chl *a* y *c*, así como varias especies sin colorear íntimamente relacionadas con ellas. Estos plástidos están rodeados por cuatro membranas que se supone que han sido adquiridos de una **Rhodophyta** hace mil millones de años (Bowler y col., 2008) (Fig. 1.6). El nombre **Chromista** fue introducido por Cavalier-Smith en 1981 (Cavalier-Smith, 1981) y las denominaciones anteriores **Chromophyta** y **Chromobionta** se refieren aproximadamente al mismo grupo. En la construcción de árboles filogenéticos basados en datos moleculares se han encontrados algunos problemas a la hora de establecer las relaciones entre los tres grupos de **Chromista** (**Heterokontophyta**, **Haptophyta** y **Cryptophyta**). Ahora parece que los tres comparten un ascendiente común con los “alveolata”, aunque también pudiera ser que **Chromista** sea polifilético. Algunos investigadores consideran que **Chromalveolata** (que incluye **Chromista** y **Alveolata**), **Rhizaria**, **Excavata** y **Primoplantae** forman parte del clado **Bikonta** (células eucariotas con dos flagelos, al menos ancestralmente) (Cavalier-Smith, 1981; Cavalier-Smith, 2004) (Fig. 1.6).

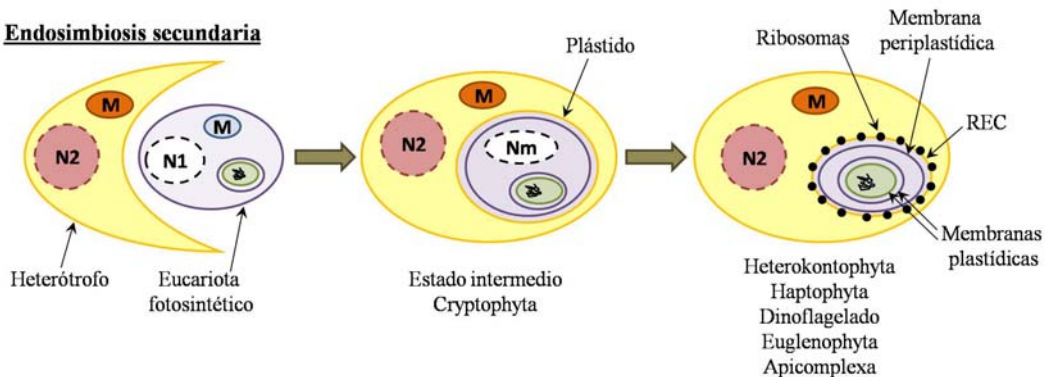
El fósil más antiguo de diatomeas céntricas tiene alrededor de 150 millones de años de antigüedad, mientras que las pennadas, 90 millones de años (Sims y col., 2006). Las diatomeas pennadas son las más diversificadas, aún siendo las más jóvenes, presentando características distintivas como su simetría bilateral, sus gametos son amoeboides, son más erosionantes del ambiente en el que se desarrollan, incluyen especies tóxicas, generalmente responden más fuertemente a la fertilización con hierro, y algunas pueden deslizarse activamente a través de las superficies (Bowler y col., 2008).

Los genes específicos de las diatomeas parecen estar evolucionando mucho más rápidamente que los demás eucariotas en general. Los mecanismos para esta rápida diversificación de genes incluyen la presencia de intrones, en el caso de las diatomeas céntricas; mientras que la expansión trascendental lograda por las pennadas puede deberse a los transposones, elementos génicos móviles que causaron la duplicación de genes y la subsecuente fragmentación del genoma (Bowler y col., 2008). Por lo expuesto, las diatomeas parecen haber perdido el contacto con el linaje de algas verdes, del cual evolucionaron las plantas superiores, y han seguido un camino evolutivo paralelo a ellas por los últimos 650 millones de años (Besendahl y col., 2000). Así, el análisis de gran cantidad de secuencias de ADNc confirmó que numerosos genes de las diatomeas están más relacionados filogenéticamente con los homólogos de animales que los de plantas (Scala y col., 2002). Aquí radica un punto relevante del estudio de las diatomeas, ya que ocupan un lugar clave en la evolución, constituyendo una interfase entre los organismos fotosintéticos y los heterótrofos.

**Endosimbiosis primaria**

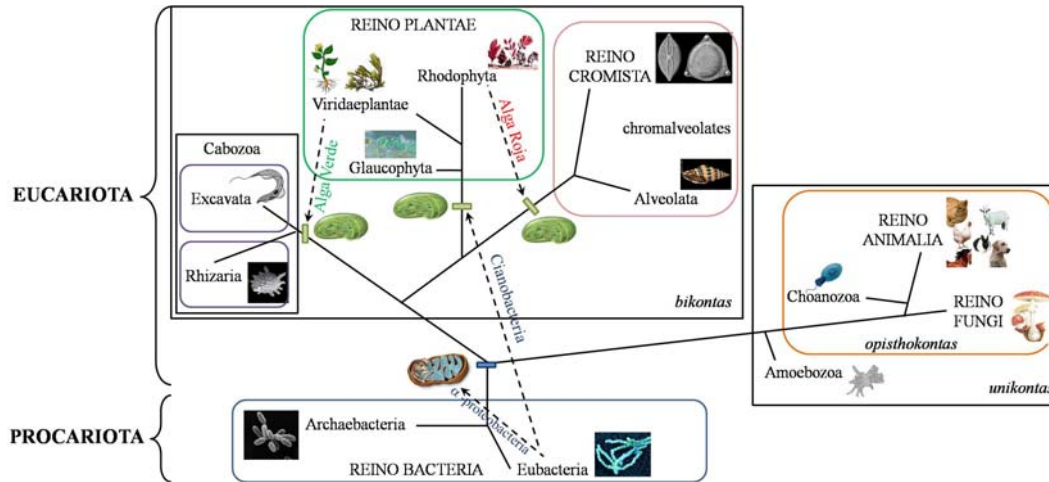


**Endosimbiosis secundaria**



**Fig. 1.5:** Origen de los cloroplastos por endosimbiosis primaria y secundaria. M, mitocondria; N, núcleo; Nm nucleomorfo; REC: retículo endoplasmático cloroplastídico. Figura adaptada de (Parker y col., 2008).





**Fig. 1.6:** Árbol de la vida simplificado. Con “ □ ” coloreados de celeste y verde se indican los momentos en lo que ocurrieron procesos de endosimbiosis que dieron origen a mitocondria y cloroplastos, respectivamente. Los organismos fagocitados durante estos procesos se señalan con líneas de puntos. Figura adaptada de (Cavalier-Smith, 2004).

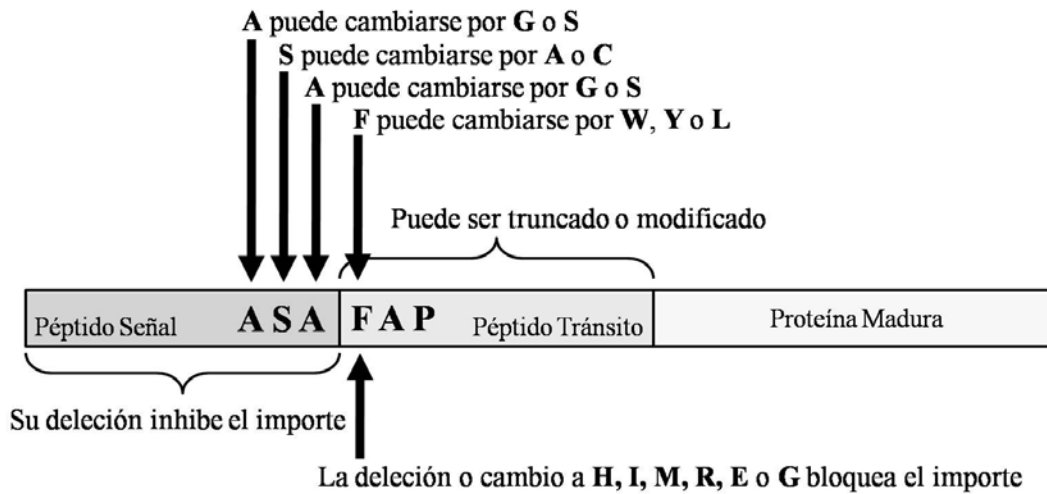
Las dos diatomeas más estudiadas hasta la actualidad son *Thalassiosira pseudonana* (céntrica) y *Phaeodactylum tricorutum* (pennada). Por sus genomas pequeños, son las únicas dos diatomeas cuyos genomas han sido totalmente secuenciados, lo que ha aportado gran cantidad de conocimientos a la biología y origen evolutivo de estos microorganismos. A pesar de que los linajes de diatomeas céntricas y pennadas han divergido hace sólo 90 millones de años, las estructuras de sus genomas son muy diferentes y alrededor del 30% de sus genes no son compartidos (Bowler y col., 2008).

### 1.5 Cloroplastos de diatomeas.

Debido a su historia evolutiva, los plástidos que han evolucionado por endosimbiosis secundaria están rodeados por más de dos membranas, cuatro en el reino **Chromista**. En el caso de las diatomeas y otros **Heterokontophyta**, la membrana más externa contiene ribosomas y parece ser continua con el retículo endoplasmático (RE) de la célula huésped. Por esto se lo llama RE cloroplastídico (REC) (Gibbs, 1978). De afuera hacia adentro, la membrana que le continúa a ésta, conocida como membrana periplastídica, es la membrana plasmática remanente del endosimbionte, mientras que

las dos internas corresponden al cloroplasto primario de la célula fotosintética fagocitada y es similar a los cloroplastos de plantas superiores (Fig. 1.5). Entre ambos pares de membranas se encuentra el espacio o compartimiento periplastídico (CPP).

Como se dijo, la endosimbiosis secundaria fue acompañada por una transferencia masiva de genes desde el núcleo de la célula fagocitada hacia el de la célula huésped. Por esto, existieron tres requerimientos críticos para el comienzo de la endosimbiosis: la evolución de la maquinaria de importe plastídico de proteínas, la transferencia de los genes del endosimbionte al núcleo de la célula huésped, y la adquisición genética de péptidos de señalización cloroplastídica (Kilian, 2004). Las proteínas del estroma codificadas en el núcleo están precedidas por una extensión bipartita N-terminal, que consiste en un péptido señal y un péptido tránsito, que permite el transporte a través de las cuatro membranas de estos cloroplastos. Mediante experimentos *in vitro* se ha demostrado que, individualmente, el péptido señal sería el que facilitaría el importe al RE, mientras que el péptido tránsito permitiría el ingreso al plástido primario y presenta, por tanto, dominios similares a los de plantas superiores (Bhaya y Grossman, 1991; Lang y col., 1998). Se ha identificado en diatomeas un dominio de función desconocida en el sitio de corte de la presecuencia N-terminal de las preproteínas plastídicas, particularmente importante para la reacción de importación al cloroplasto, conocido como motivo “ASAFAP”, por ser ésta la secuencia consenso del mismo (Gruber y col., 2007). En la Fig. 1.7 se muestra un esquema de la estructura de una preproteína plastídica, con indicaciones sobre posibles mutaciones que pueden realizarse sobre la misma sin alterar su funcionalidad. Por otra parte, existen enzimas que contienen la presecuencia bipartita pero sin el motivo “ASAFAP” requerido para el ingreso al estroma. Se ha demostrado, mediante fusión del péptido señal a la proteína verde fluorescente (GFP), que estas proteínas se localizan en el CPP (Gruber y col., 2009; Weber y col., 2009), indicando así que este compartimiento podría estar involucrado en procesos metabólicos.



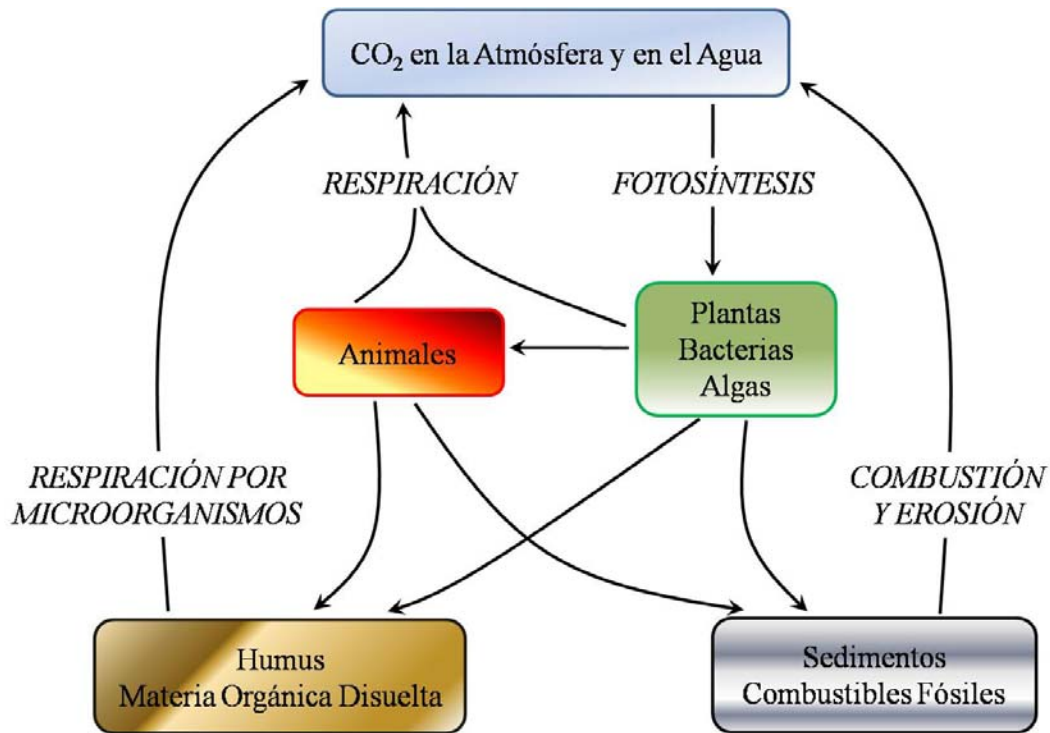
**Fig. 1.7:** Esquema de la estructura de una preproteína cloroplastídica de diatomea. Figura adaptada de (Gruber y col., 2007).

Las membranas tilacoides dentro del plástido presentan la típica estructura de **Heterokontophyta**, agrupadas en *grana* de a tres. Las diatomeas céntricas generalmente tienen varios cloroplastos con formas circulares, mientras que las pennadas presentan menor cantidad, generalmente sólo uno (Van Den Hoek y col., 1995).

### 1.6 *Metabolismo del carbono en diatomeas.*

Así como las diatomeas son muy importantes en el ciclo del silicio, también lo son para el del carbono (Kiene, 2008). El C está presente en la atmósfera en un 0,04% como gas CO<sub>2</sub>, de gran importancia para la vida de todos los organismos. Para permitir la supervivencia, el C tiene que ser reciclado e intercambiado entre las distintas formas vivientes, proceso que se conoce como el ciclo del C (Fig. 1.8). Así, el C atmosférico es fijado por los organismos autótrofos produciendo hidratos de carbono, a través de la fotosíntesis. El retorno del C a la atmósfera se da durante la respiración, en la que los seres vivos oxidan los alimentos y producen CO<sub>2</sub>, la descomposición de la materia orgánica por parte de hongos y bacterias, la combustión de restos fósiles y la erosión. Es decir, no sólo los seres vivos participan en este ciclo del C, sino también fenómenos

naturales como incendios y vientos. Los seres vivos acuáticos toman el  $\text{CO}_2$  del agua, ya que este gas es altamente soluble en ella (Alberts y col., 1996).



**Fig. 1.8:** Esquema global del ciclo del C. Figura adaptada de (Alberts y col., 1996).

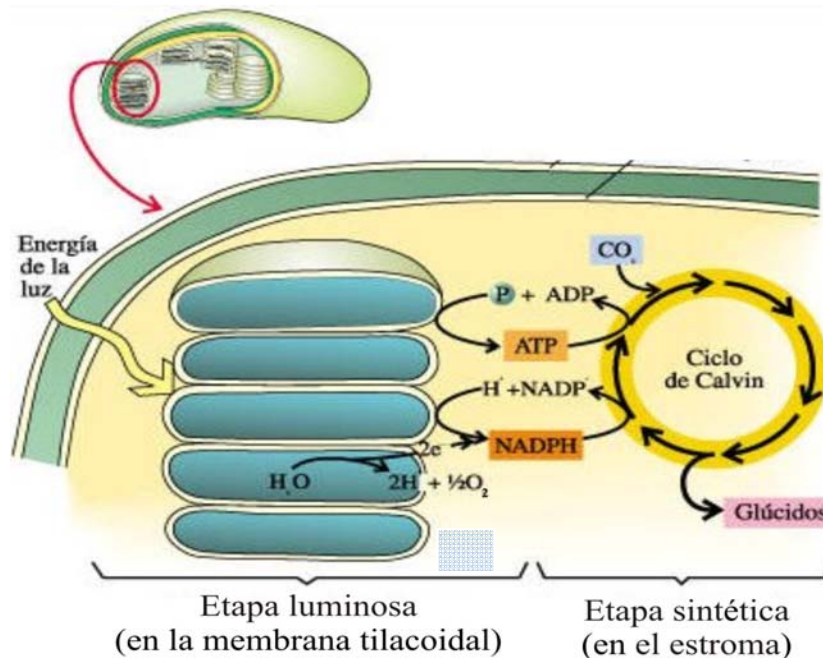
A pesar de la importancia de las diatomeas en los ecosistemas acuáticos y en el ciclo global del C, es relativamente poco lo que se sabe sobre la forma de fijación de C y las vías metabólicas de hidratos de carbono en estos microorganismos.

### 1.6.1 *Fotosíntesis y fijación de C.*

La fotosíntesis es el proceso que mantiene la vida en el planeta Tierra. Las plantas superiores, algas, diatomeas, cianobacterias y demás organismos fotosintéticos son los que realizan este proceso de transformación de la materia inorgánica en orgánica y, al mismo tiempo, convierten la energía solar en energía química. Todos los organismos heterótrofos dependen de esta conservación de energía y materia para

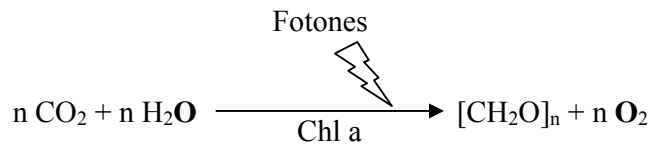
subsistir (Alberts y col., 1996). Además, la vida aeróbica depende de este tipo de fotosíntesis, ya que el proceso es intrínsecamente oxigénico. Existen dos tipos de procesos fotosintéticos: fotosíntesis oxigénica y fotosíntesis anoxigénica. La primera es la que realizan los organismos arriba detallados, donde el dador de electrones es el agua y, como consecuencia, se desprende oxígeno. En cambio, la segunda es llevada a cabo por bacterias púrpuras y verdes del azufre, en las que el dador de electrones es el sulfuro de hidrógeno, y consecuentemente, el elemento químico liberado no es oxígeno sino azufre, el cual puede ser acumulado en el interior de la bacteria o, en su defecto, expulsado al agua (Alberts y col., 1996).

El proceso fotosintético puede ser dividido en dos etapas: una denominada luminosa y la otra sintética. En la primera fase, la energía electromagnética de la luz es captada y convertida en energía química (ATP) y poder reductor (NADPH) por medio de un sistema de pigmentos y proteínas especializados. La etapa sintética involucra el uso del ATP y el NADPH para llevar a cabo la fijación del  $\text{CO}_2$  atmosférico con producción de fotoasimilados, primariamente hidratos de carbono, mediante el ciclo de Calvin, los cuales son derivados a la síntesis de los componentes moleculares celulares (Fig. 1.9).



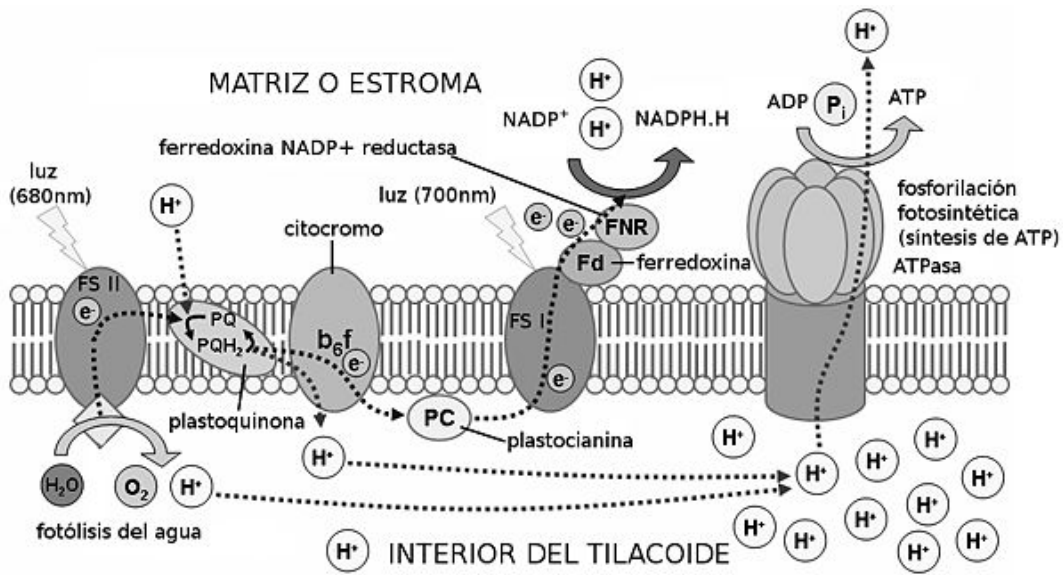
**Fig. 1.9:** Esquema global de la fotosíntesis. Figura adaptada de (Curtis y Barnes, 2004).

La reacción simplificada de la fotosíntesis oxigénica es:



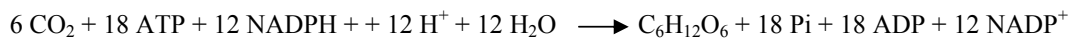
Donde  $[\text{CH}_2\text{O}]_n$  representa un hidrato de carbono general. La conversión de la energía electromagnética de la luz está asociada a la fotólisis del  $\text{H}_2\text{O}$ , con producción de  $\text{O}_2$  (indicado en **negritas**) y poder reductor; este último es entonces utilizado para reducir el  $\text{CO}_2$  a  $[\text{CH}_2\text{O}]_n$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en una etapa estrictamente separada en el tiempo de la captación de la luz. Así, las reacciones de ambas etapas están separadas tanto química como físicamente y están relacionadas por intermediarios en común.

Las reacciones lumínicas ocurren en las membranas tilacoides del cloroplasto, mediante la acción de dos fotosistemas seriados. En cada fotosistema los fotones son absorbidos por los pigmentos antena y la energía de excitación es transferida al centro de reacción Chl *a*. En diatomeas, las proteínas de membrana que cumplen esta función forman complejos con fucoxantina y Chl *a* y *c*, a diferencia de lo que ocurre en plantas y algas verdes, donde los pigmentos involucrados son Chl *a* y *b* (Falciatore y Bowler, 2002). Los electrones excitados por la luz se trasladan a través de la cadena de transporte de electrones, que es la responsable de dirigir protones a través de la membrana tilacoide, hacia el lumen del cloroplasto. Los electrones extraídos del agua en el fotosistema II son secuencialmente transferidos a través de quinonas, complejo citocromo *bf*, citocromo *c*<sub>6</sub> y el fotosistema I a ferredoxina (Fig. 1.10). Este transporte de electrones excitados a través de aceptores convierte energía electromagnética en energía química. Finalmente, se produce NADPH por la ferredoxina reductasa dependiente de  $\text{NADP}^+$ , usando ferredoxina reducida. El gradiente de pH formado a través de la membrana de las tilacoides por el bombeo de protones hacia el lumen lleva a la producción de ATP mediante fosforilación, por acción de la ATP sintasa (Fig. 1.10) (Alberts y col., 1996).



**Fig. 1.10:** Reacciones lumínicas de la fotosíntesis. Figura tomada de <http://es.wikipedia.org>.

En el estroma del cloroplasto se lleva a cabo la etapa sintética de la fotosíntesis, en la cual se da la fijación del  $\text{CO}_2$  en hidratos de carbono mediante el ciclo de Calvin, utilizando el NADPH y el ATP generados en las reacciones lumínicas. La reacción global neta de este proceso es:



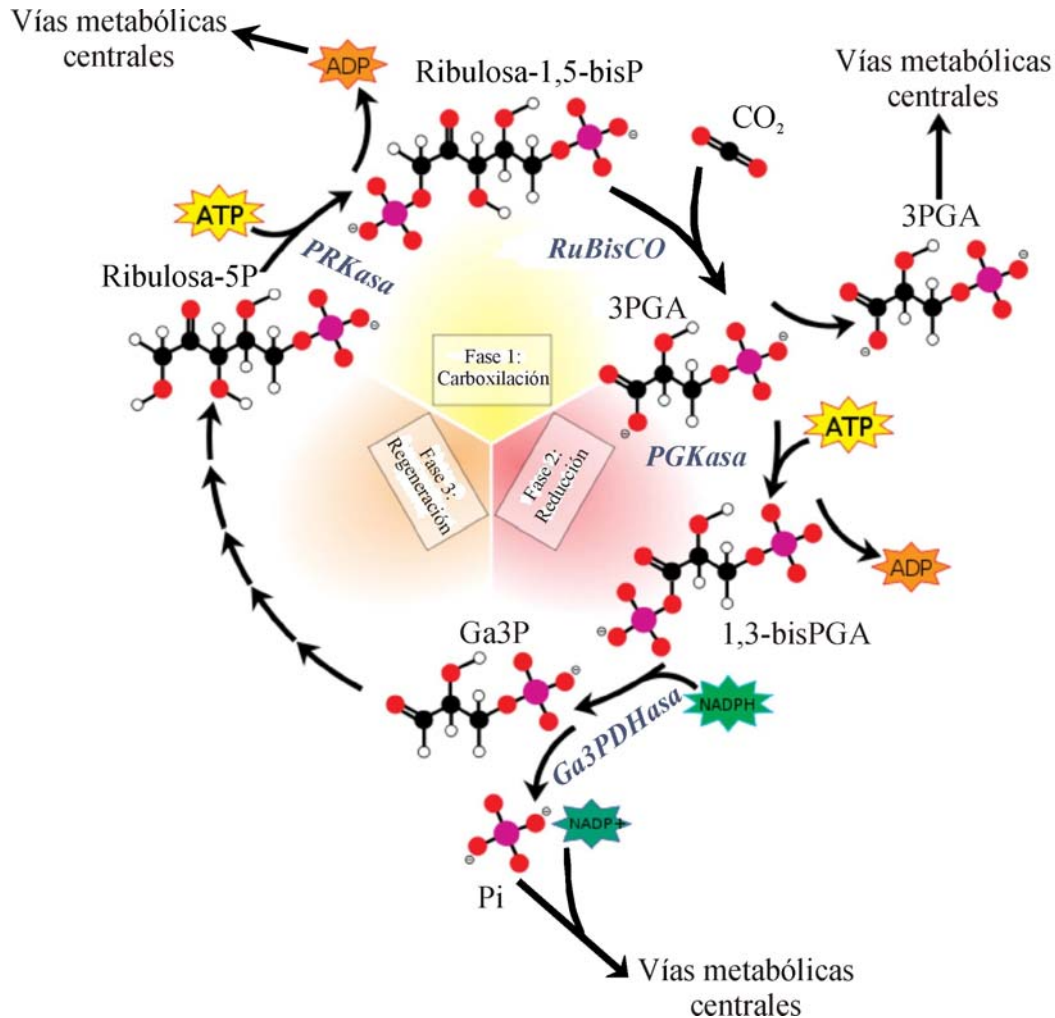
En consecuencia, para la formación de moléculas orgánicas a partir de  $\text{CO}_2$  y agua se requieren energía de enlace fosfato, en forma de ATP, y poder reductor, en forma de NADPH.

El ciclo de Calvin consta de tres etapas: carboxilación, reducción y regeneración (Fig. 1.11). En la primera se da la transformación de C inorgánico en C orgánico: el  $\text{CO}_2$  atmosférico se combina con el compuesto de 5 carbonos, la ribulosa-1,5-bisP para dar dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA), mediante la acción de la enzima ribulosa-1,5-bisP carboxilasa oxigenasa (RuBisCO). En los cloroplastos existen numerosas copias de esta enzima, lo que hace que sea la proteína más abundante de la Tierra (Alberts y col., 1996). La segunda etapa, o de reducción, incluye dos reacciones cuyos productos son las triosas-P, en las que se consumen el ATP y el NADPH generados en la fase lumínica de la fotosíntesis. La primera de ellas es catalizada por la enzima fosfoglicerato quinasa (PGKasa), que transfiere un grupo fosfato del ATP al

grupo carboxilo del 3PGA, para formar glicerato-1,3-bisP (1,3-bisPGA). Luego, la enzima gliceraldehído-3P deshidrogenasa (Ga3PDH<sub>asa</sub>) reduce el 1,3-bisPGA a gliceraldehído-3P (Ga3P) utilizando NADPH como cofactor, liberando Pi (Fig. 1.11). En la tercer etapa, una serie de diez reacciones llevan a la regeneración de la ribulosa-1,5-bisP, con el consumo de una molécula de ATP (Alberts y col., 1996).

Globalmente, cada 3 moléculas de CO<sub>2</sub> que ingresan al ciclo de Calvin se genera una triosa-P, que puede ser utilizada para regenerar intermediarios del ciclo o para sintetizar otros hidratos de carbono. El Ga3P producido en los cloroplastos a través de este ciclo es un intermediario en numerosas reacciones y vías metabólicas, siendo el metabolito exportado al citosol por un intercambiador de triosas-P/Pi de la envoltura del cloroplasto. De esta forma, las triosas-P son metabolitos centrales en el proceso de partición de fotoasimilados dentro de la célula fotosintética (Iglesias y Podestá, 2005).





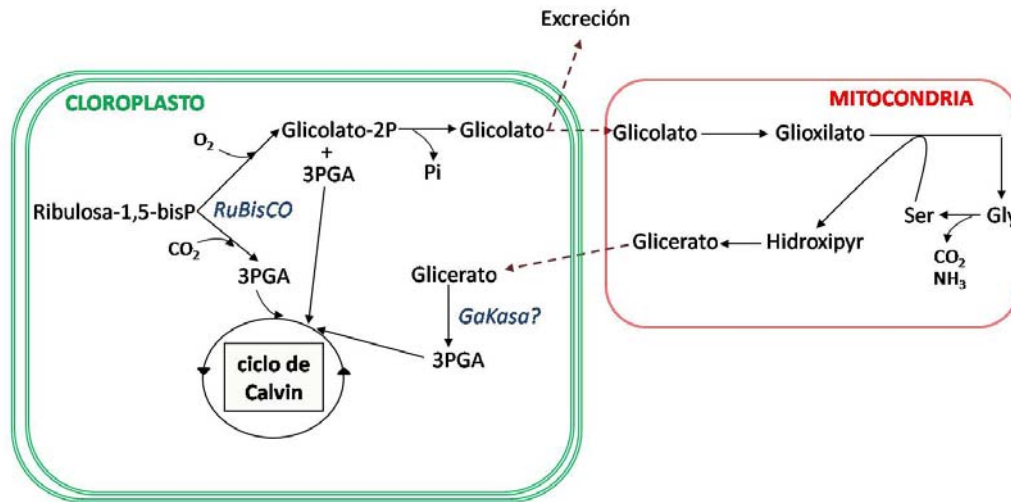
**Fig. 1.11:** Esquema simplificado del ciclo de Calvin. Cada esfera representa un átomo: C, negro; H, blanco; O, rojo; P, rosado. En letras azules se indican las enzimas y en letras negras los metabolitos. PRKasa, fosforribulocinasa. Figura adaptada de <http://es.wikipedia.org>.

### 1.6.2 Fotorrespiración.

Aunque la enzima RuBisCO tiene mayor especificidad hacia el  $\text{CO}_2$ , puede utilizar también  $\text{O}_2$  cuando la concentración del primer gas es baja. Este es el primer paso de la vía conocida como fotorrespiración, cuyo efecto es consumir  $\text{O}_2$  y liberar  $\text{CO}_2$  sin la producción de reservas de energía (Alberts y col., 1996). Sin embargo, en diatomeas el factor de especificidad ( $\tau$ ) de RuBisCO, que mide la habilidad de la misma de discriminar un gas de otro, es considerablemente mayor que en cianobacterias y algas

verdes, sugiriendo que la velocidad de fijación del  $O_2$  es menor (Paul y Volcani, 1976). Cuando el  $O_2$  compete con el  $CO_2$  se forma una molécula de glicolato-2P y una de 3PGA (Fig. 1.12). Este último ingresa en el ciclo de Calvin, mientras que el primero debe ser degradado por la vía fotorrespiratoria, ya que es un metabolito inhibidor de la triosa-P isomerasa del ciclo de Calvin. En plantas y algas verdes este proceso está bien caracterizado, pero no ocurre lo mismo en microalgas. En diatomeas una gran parte del glicolato-2P es excretado como un producto de desecho, por lo que la fotorrespiración resulta en una pérdida importante del C fijado. El resto es metabolizado por la vía C2, al igual que lo que ocurre en plantas superiores, en la que se da la hidrólisis del grupo fosfato y la exportación del glicolato del cloroplasto a la mitocondria, donde se oxida a glioxilato, con posterior transaminación para formar Gly. Finalmente se da la condensación de dos Gly a una Ser con liberación de amonio y  $CO_2$ , y la Ser se metaboliza para generar glicerato. No se ha encontrado en diatomeas una glicerato quinasa que fosforile el glicerato a 3PGA, última reacción de la vía C2, para que el mismo ingrese al ciclo de Calvin (Fig. 1.12) (Kroth y col., 2008).

Por otro lado, se ha encontrado que las diatomeas podrían ser capaces de realizar fotosíntesis C4, la cual permitiría la utilización más eficiente del  $CO_2$  disponible, con una disminución significativa de la fotorrespiración (Reinfelder y col., 2000; Kroth y col., 2008). Esto explicaría el éxito ecológico de las diatomeas en el ecosistema marino, ya que de esta forma serían capaces de crear reservas de carbono para su uso en condiciones menos favorables (Falciatore y Bowler, 2002).



**Fig. 1.12:** Modelo de la fotorrespiración en diatomeas. Los metabolitos se indican en letras negras y las enzimas en azules. GaKasa, glicerato quinasa. Con líneas de puntos marrones se indican los transportes a través de las organelas. Figura adaptada de (Kroth y col., 2008).

### 1.6.3 Ciclos oxidativo y reductivo de las pentosas-P. Regulación.

Los cloroplastos de las plantas y algas verdes contienen dos vías que son opuestas entre sí: el ciclo oxidativo de las pentosas-P (COPP) y el ciclo de Calvin, también llamado ciclo reductivo de las pentosas-P. El COPP es la ruta metabólica mediante la cual se utiliza la glucosa para generar pentosas-P, las cuales resultan necesarias para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Además, se obtiene poder reductor en forma de NADPH, utilizado para las síntesis reductivas, como la biosíntesis de los ácidos grasos y los esteroides (Fig. 1.13). Como el COPP y el ciclo de Calvin están interconectados, si ambos actuaran simultáneamente en el mismo compartimento el resultado sería un ciclo fútil, donde la producción y el consumo de poder reductor y energía ocurriría sin fijación neta de CO<sub>2</sub>. Es por esto que en los cloroplastos de las plantas y algas verdes ambas vías están estrictamente reguladas por sustratos e iones, y por óxido-reducción, ya sea a nivel transcripcional o enzimático, vía el sistema ferredoxina/tiorredoxina (Sun y col., 2003; Fey y col., 2005). Así, algunas enzimas del ciclo de Calvin como la fosforribuloquinasa (PRKasa), la Ga3PDHasa, la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) y la seduheptulosa-1,7-bisfosfatasa son activadas durante la exposición a la luz vía reducción por la tiorredoxina (Trx) y son inactivas en



(Michels y col., 2005). Medidas de actividades enzimáticas y búsquedas *in silico* en el genoma de diatomeas han llevado a pensar que esta vía metabólica sólo sería activa en citosol (Scala y col., 2002; Armbrust y col., 2004; Michels y col., 2005; Gruber y col., 2009). La ausencia del COPP completo en cloroplastos podría ser consecuencia de características metabólicas peculiares de las diatomeas con respecto a las plantas y algas verdes. Por un lado, una función importante del COPP en plantas es la de generar equivalentes de reducción en oscuridad, necesarios en el plástido. Como las diatomeas no acumulan almidón en los cloroplastos, sino que almacenan energía como lípidos o crisolaminarán fuera del mismo, si fueran necesarios equivalentes de reducción en el cloroplasto durante la noche, éstos no podrían ser generados por degradación del glucano e ingreso de las hexosas-P en el COPP en este compartimiento (Gruber y col., 2009). Por otro lado, otra importante función del COPP en plantas es la de generar ribosa-5P para la síntesis *de novo* de nucleótidos en los cloroplastos (Zrenner y col., 2006). Sin embargo, la formación de nucleótidos en las diatomeas ocurre exclusivamente en el citosol (Armbrust y col., 2004; Ast y col., 2009), por lo que no sería necesaria esta vía en los plástidos (Gruber y col., 2009).

Algunos autores aseguran que, por la ausencia de COPP en los cloroplastos de las diatomeas, la regulación estricta de las enzimas del ciclo de Calvin no sería necesaria y por lo tanto no ocurriría (Michels y col., 2005; Kroth y col., 2008; Gruber y col., 2009). Hasta la actualidad sólo se han informado tres enzimas involucradas en esta última vía cuyas actividades enzimáticas fueran reguladas por óxido-reducción: la FBPassa, la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa y la PRKasa, aunque esta última presentó un potencial de reducción muy positivo, lo que hace que esta regulación no sea factible *in vivo* (Michels y col., 2005). Sin embargo son pocos los estudios realizados en este área.

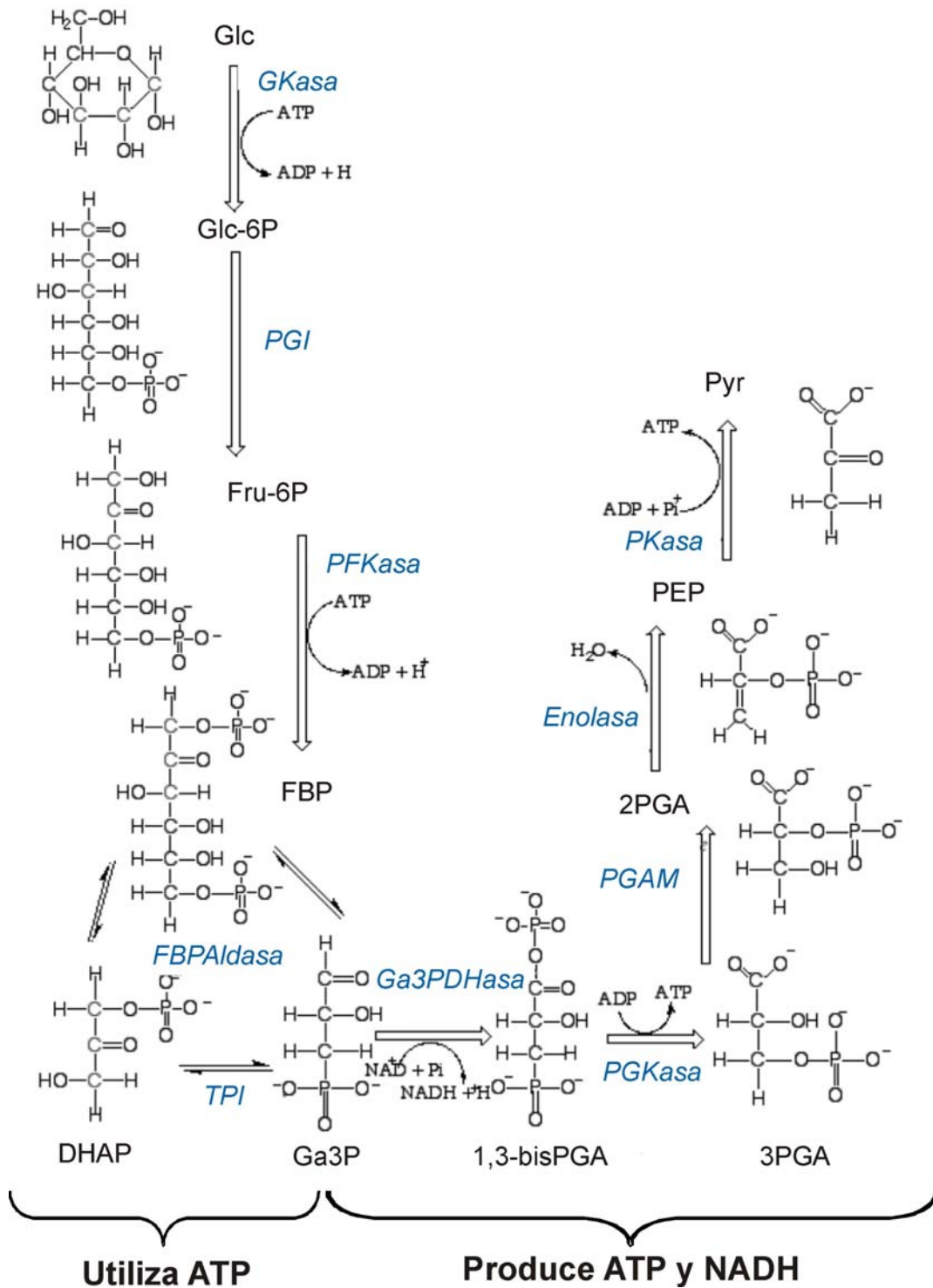
#### 1.6.4 Glucólisis.

La glucólisis o vía de Embden-Meyerhoff, es la vía de degradación de hexosas que tiene como producto al piruvato (Pyr). Las funciones de la glucólisis son la generación de moléculas de alta energía (ATP y NADH), la generación de Pyr, el cual puede ser importado por la mitocondria para su degradación aeróbica por el ciclo del ácido tricarbóxico (CAT) o ser utilizado en otros metabolismos, y la producción de

intermediarios de 3 y 6 C que están involucrados en diversos procesos celulares (Alberts y col., 1996). La reacción global de la glucólisis es:



La glucólisis consta de dos etapas: una de consumo y una de producción de energía. La primera consiste en transformar una molécula de glucosa en dos moléculas de Ga3P (una molécula de baja energía) mediante el uso de 2 moléculas de ATP. Esto permite duplicar los resultados de la segunda etapa de obtención energética. En la segunda fase, el Ga3P se transforma en un compuesto de alta energía, cuya hidrólisis genera una molécula de ATP y, como se generaron 2 moléculas de Ga3P, se obtienen en realidad dos moléculas de ATP. Esta obtención de energía se logra mediante el acoplamiento de una reacción fuertemente exergónica después de una levemente endergónica. Este acoplamiento ocurre una vez más en esta fase, generando dos moléculas de Pyr. De esta manera, en la segunda fase se obtienen 4 moléculas de ATP (Fig. 1.14) (Alberts y col., 1996).



**Fig. 1.14:** Reacciones de la glucólisis. Los metabolitos se indican en letras negras y las enzimas en azules. GKasa, glucoquinasa; PGI, fosfoglucoisomerasa; PFKasa, fosfofructoquinasa; FBPAldasa, fructosa-1,6-bisP aldolasa; TPI, triosa-P isomerasa; PGAM, fosfoglicerato mutasa; PKasa, Pir quinasa; DHAP, dihidroxiacetona-P. Figura adaptada de <http://pichonesdemedicina.blogspot.com/2009/11/blog-post.html>.

En los genomas de diatomeas se han identificado varias isoformas de las enzimas involucradas en glucólisis, con distintas localizaciones celulares. Así, en el cloroplasto esta vía podría ser activa, ya que en este compartimiento hay, al menos una isoforma de cada enzima (Kroth y col., 2008). Aún más sorprendente es el hecho de que en las mitocondrias se encuentran todas las enzimas de la segunda etapa de la glucólisis (de producción de ATP y NADH), por lo que se cree que existiría un flujo fotosintético de triosas-P desde el citosol o el cloroplasto hacia la mitocondria, mediante translocadores específicos, que llevaría a una conexión directa entre el ciclo de Calvin y el CAT. Entonces, las isoenzimas citosólicas podrían estar involucradas en distintas vías metabólicas, como por ejemplo la gluconeogénesis y el COPP (Liaud y col., 2000; Ginger y col., 2010).

#### 1.6.5 Productos de almacenamiento de energía y carbono.

Como se dijo en el apartado 1.3.5, el crisolaminarón (Fig. 1.4) es el principal polisacárido de reserva de energía de diatomeas. La contribución de este glucano a la materia particulada marina es relativamente alta, por lo que esta molécula resulta de importancia en el ciclo del carbono oceánico (Handa, 1969). El crisolaminarón representa entre un 10 y 20% del carbono celular total y su concentración varía durante el día, acumulándose durante períodos de luz y consumiéndose durante la respiración en oscuridad (Handa, 1969; Myklestad, 1974). Las vías de síntesis y degradación del crisolaminarón no han sido dilucidadas totalmente. Hasta la actualidad se ha demostrado la localización del glucano en vacuolas citosólicas en varias especies de diatomeas (Waterkeyn y Bienfait, 1987; Chiovitti y col., 2004). Por otro lado, se cree que el dador de glucosa sería la UDP-Glc, por medidas de actividades enzimáticas en extractos celulares (Roessler, 1987) y se han encontrado, mediante estudios *in silico*, secuencias correspondientes a exo-y endo-1,3- $\beta$ -glucanasas y  $\beta$ -glucosidasas, por lo que se cree son las enzimas primarias involucradas en la digestión del glucano (Kroth y col., 2008).

Es probable que una o más glicosil transferasas sinteticen el polímero de crisolaminarón, las cuales podrían ser ortólogas a las 1,3- $\beta$ -glucano sintasas de otros organismos o ser enzimas novedosas, dada la estructura y función distintiva de este polisacárido. Se ha identificado en diatomeas un gen que codificaría para una



1,3- $\beta$ -glucano sintasa, con varios dominios transmembrana y un péptido señal, similar a las callosa sintasas de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* (Kroth y col., 2008).

En cuanto al almacenamiento de energía y C a largo plazo, las diatomeas acumulan grandes cantidades de lípidos. La biosíntesis *de novo* de ácidos grasos ocurre dentro del cloroplasto, a través del complejo ácido graso sintasa tipo II, con posterior transporte al citosol (Armbrust y col., 2004). Se ha identificado una vía completa de biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados, incluyendo varias elongasas y desaturasas. Además, se ha encontrado una vía de biosíntesis de esteroides que produce colesterol, colestanol y epibrassicasterol (Armbrust y col., 2004), así como dos vías de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, una en la mitocondria y otra en los peroxisomas (Armbrust y col., 2004).

### **1.7 Importancia económica de las diatomeas.**

Por su alta eficiencia en producción de biomasa con un mínimo costo y el fácil escalado de su cultivo, las diatomeas han sido blanco de numerosos estudios para su implementación en procesos biotecnológicos e industriales, como por ejemplo en las industrias farmacéutica y cosmética (Olaizola, 2003). En el campo de la medicina humana y la veterinaria su potencial reside, por un lado, en la presencia de luteína en algunas especies de diatomeas, que puede reducir el riesgo de diversos tipos de cáncer, enfermedades cardíacas y oftalmológicas; así como de otros compuestos con acción anticarcinogénica, antimutagénica, estimuladora del sistema inmune, reductora de hipertensión y de niveles de colesterol, y desintoxicante (Domergue y col., 2002; Domergue y col., 2003; Olaizola, 2003). Además, su alto contenido en ácidos grasos  $\omega$ -3 hace que sean empleados en la prevención y tratamiento de enfermedades coronarias, agregación plaquetaria y niveles anómalos de colesterol (Yongmanitchai y Ward, 1991). Por otro lado, se ha demostrado que el EPA presenta actividad antimicrobiana, siendo activo (a concentraciones micromolares) contra un amplio rango de bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, incluyendo *Staphylococcus aureus* (Desbois y col., 2009).

Por otro lado, las diatomeas son altamente utilizadas en agricultura como biofertilizantes y acondicionadoras del suelo dado su alto contenido en proteínas

(Vrieling y col., 2005; Grachev y col., 2008) y como aditivos para forraje de ganadería y en acuicultura (Ahlgren y col., 1990). También presentan utilidad para la depuración de aguas residuales, ya que son capaces de crecer en condiciones extremas con mínima inversión y aportan oxígeno a las bacterias degradadoras (Lodi y col., 2003). Por su tolerancia a metales pesados como el cobre, el cadmio y el plomo, así como a los hidrocarburos clorados, han sido empleados como indicadores de contaminación (Akcha y col., 2008).

Dada su composición bioquímica, las diatomeas y los compuestos extraídos de ellas han sido utilizados en la alimentación humana y animal, ya que poseen concentraciones de vitaminas, minerales, ácidos grasos poliinsaturados y otros nutrientes mayores que las observadas en especies vegetales (Raja y col., 2007). También tienen otras aplicaciones como colorantes, en la industria alimenticia en margarinas, mayonesas, jugos, helados, quesos y productos de panificación (Banerjee y col., 2002).

Desde 1979 se está estudiando y poniendo a punto su uso para la producción de biodiesel, dado su gran contenido en ácidos grasos, para sortear los problemas de los altos costos del combustible mineral y su agotamiento, además del hecho de que la utilización de las microalgas para este proceso contribuirá también a disminuir los niveles de CO<sub>2</sub> atmosférico (McGinnis y col., 1997). Para que los lípidos de microalgas puedan competir con las fuentes de combustible existentes, el microorganismo utilizado debe ser capaz de lograr alta eficiencia fotosintética y gran rendimiento en producción de lípidos (Radakovits y col., 2010). Por esto se están realizando numerosos estudios para identificar y caracterizar las enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos, en su elongación e insaturación (Domergue y col., 2002; Domergue y col., 2003; Pereira y col., 2004). El conocimiento derivado de estos estudios permitiría obtener células genéticamente modificadas que cumplan con los requerimientos específicos (Lechl y col., 2007; Napier y col., 2009) y poner a punto las condiciones de crecimiento para optimizar la producción de los ácidos grasos de interés (iluminación, nutrientes, temperatura) (Siron y col., 1989; Yongmanitchai y Ward, 1991; McGinnis y col., 1997).

La nanotecnología busca el control de la estructura de la materia en una escala entre 1 y 100 nm (Poole y Owens, 2003). El éxito de este tipo de tecnología depende de

la posibilidad de aplicar métodos para la fabricación de materiales en esos tamaños a gran escala y a bajo costo. Dado que las diatomeas producen estructuras de sílice porosas con motivos altamente conservados que se ensamblan biológicamente, se ha sugerido que estos microorganismos podrían ser particularmente útiles para aplicaciones nanotecnológicas. Por ejemplo, los frústulos de las diatomeas vaciados pueden ser utilizados en métodos de filtración (por su porosidad constante) como membranas en la separación de biomoléculas, como resinas de filtración por geles, como biosensores selectivos de tamaño (Parkinson y Gordon, 1999), así como sistemas microelectromecánicos y como máscaras para microfabricación (Parkinson y Gordon, 1999). También se ha logrado expresar enzimas con actividades catalíticas de interés o proteínas receptoras y expresarlas *in vivo* unidas a la estructura de sílice, por lo que luego del aislamiento de la pared celular se obtiene la fracción con la proteína de interés expuesta, produciendo nanomateriales con funcionalidades específicas (Poulsen y col., 2007). Por su propiedad de contener materiales en su interior y por su resistencia mecánica, la estructura de sílice de las diatomeas resulta atractiva para su utilización como dispositivo de transporte microfluído (Losic y col., 2006). Por ejemplo, se están realizando estudios para utilizarla como vehículo de transporte de drogas, por ser su estructura porosa, inerte químicamente y biocompatible. Es más, si se incorporaran partículas ferromagnéticas al frústulo, sería posible dirigir la droga al órgano deseado utilizando magnetos (Bradbury, 2004).

### 1.8 *Phaeodactylum tricornutum*.

*Phaeodactylum tricornutum* es una diatomea pennada marina, única en el género *Phaeodactylum*:

Reino: Chromista

Filo: Heterokontophyta

Clase: Bacillariophyceae

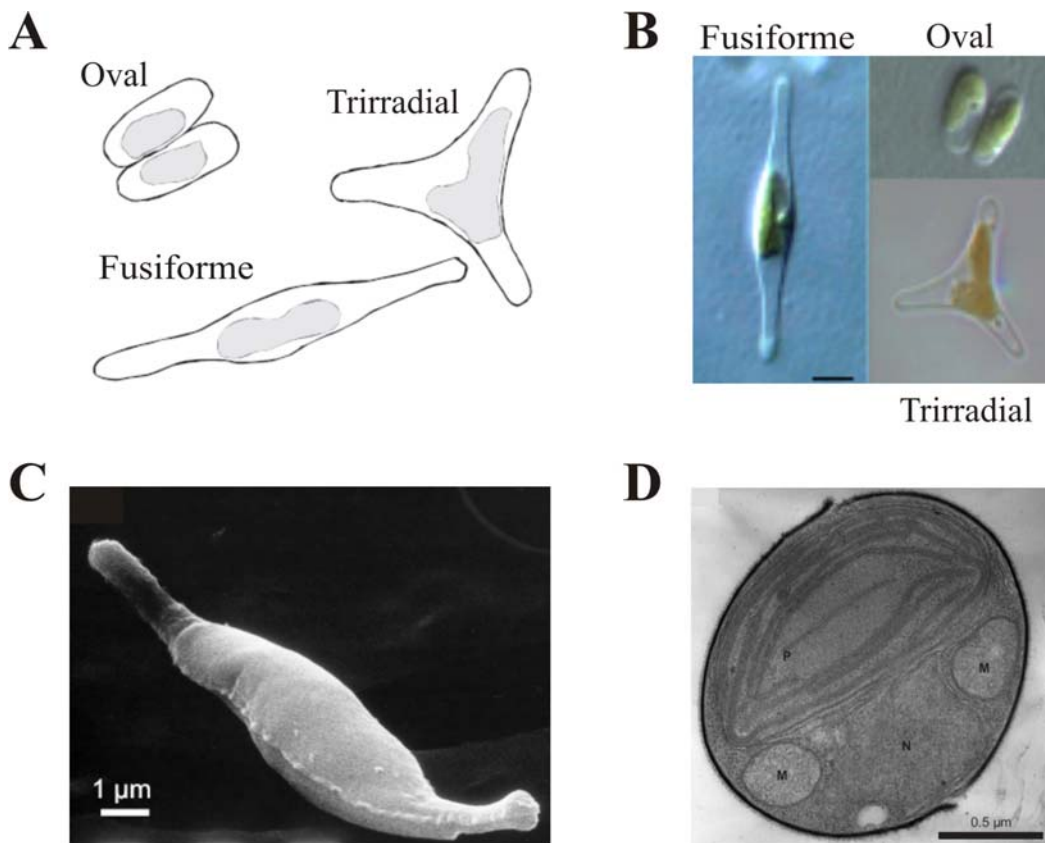
Orden: Naviculales

Familia: Phaeodactylaceae

Género: *Phaeodactylum*

Especie: *Phaeodactylum tricornutum*

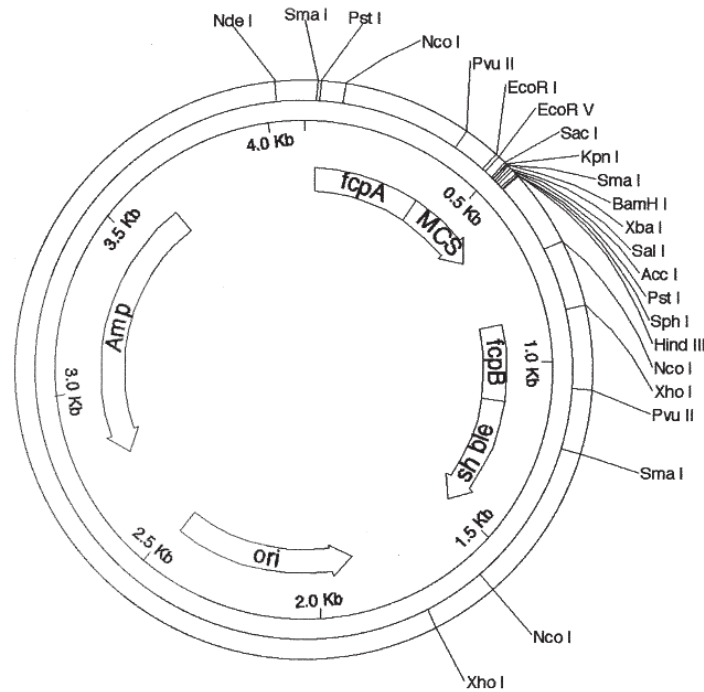
A diferencia de otras diatomeas, *P. tricorutum* puede existir en tres morfotipos distintos: oval, trirradial y fusiforme (Fig. 1.15), dependiendo de las condiciones ambientales (Borowitzka y Volcani, 1978). La producción de la pared de sílice en esta diatomea es facultativa y dependiente de la existencia de sílice en el medio de crecimiento. *P. tricorutum* es una fuente potencial de producción industrial del EPA (30%), el ácido palmitoleico (26%), el ácido palmítico (16:0, 17%), el ácido hexadecatrienoico (16:3, 5%) y el ácido mirisítico (14:0, 5%) (Domergue y col., 2003).



**Fig. 1.15:** Estructura celular de *P. tricorutum*. **A y B:** Pleomorfismo de las células de *P. tricorutum*: morfotipos oval, trirradial y fusiforme. Figura adaptada de (Gruber y col., 2007); **C:** foto de microscopía electrónica de la forma fusiforme de *P. tricorutum*; **D:** ultraestructura de la sección transversal de una célula de *P. tricorutum*, se indican plástido (P), mitocondria (M) y núcleo (N). Imágenes tomadas de (Gruber, 2008).

El genoma completo de *P. tricornutum* tiene aproximadamente 27,4 Mpb, conteniendo 10.402 genes de diversos orígenes, debido al fenómeno de endosimbiosis secundaria. Así, existen genes específicos de las diatomeas que han surgido por rearrreglos y recombinaciones del genoma gracias a la acción de los transposones, por la expansión o contracción específica de familias de genes y por la aparición o pérdida de intrones (Bowler y col., 2008). Además, ha sido demostrado que las diatomeas han retenido genes de ambos participantes de la endosimbiosis secundaria, por lo tanto incluyen metabolismos primarios como la fijación de carbono mediante fotosíntesis y el ciclo de la urea, en un mismo organismo (Allen y col., 2006). *P. tricornutum* presenta un alto contenido en GC, siendo el del ADN total de 48,5% (Scala y col., 2002).

Gracias a los avances hechos en la secuenciación de los genomas de *T. pseudonana* y de *P. tricornutum*, la biología de las diatomeas ha ingresado en la era pos-genómica, lo que requiere el desarrollo de técnicas moleculares que permitan analizar y modular la función de los genes y las proteínas de las diatomeas *in vivo* (Siaut y col., 2007). En cuanto a *P. tricornutum*, se ha logrado transformar células de este microorganismo mediante el empleo del plásmido pPha-T1 (Fig. 1.16), utilizando zeocina como antibiótico de selección, con efectividades mayores a las reportadas para otras diatomeas (Apt y col., 1997; Zaslavskaja y col., 2000). Mediante el uso de esta técnica se ha logrado identificar la localización celular de numerosas proteínas, fusionando el péptido señal estudiado a la GFP. Se han estudiado con éxito la expresión de varios genes reporteros y marcadores de selección (Apt y col., 1997; Zaslavskaja y col., 2000). Por otro lado, se han logrado identificar genes que pueden ser utilizados como estándares para estudios de PCR cuantitativa en tiempo real (Siaut y col., 2007). Recientemente se ha informado sobre el silenciamiento de genes de *P. tricornutum* mediante el uso de ARN de interferencia (De Riso y col., 2009). A su vez, se sigue trabajando para avanzar en el estudio de *Expressed Sequence Tags* (ESTs) (Maheswari y col., 2005; Maheswari y col., 2009) y lograr perfiles digitales de expresión de genes (Maheswari y col., 2010).



**Fig. 1.16:** Mapa del vector pPHA-T1, para transformar *Phaeodactylum*. Se indican los sitios de restricción. Amp, gen de resistencia a ampicilina; ori, origen de restricción de *E. coli*; MCS, sitio de múltiple clonado; fcpA y fcpB, promotores; sh ble, gen de resistencia a zeocina. Figura tomada de (Zaslavskaja y col., 2000).

Son varias las razones que hacen de *P. tricornutum* un modelo atractivo de estudio, como por ejemplo su pequeño genoma, el tiempo de generación corto (Scala y col., 2002; Bowler y col., 2008) y la capacidad de ser transformado genéticamente de forma estable (Apt y col., 1997; Falciatore y col., 1999; Zaslavskaja y col., 2000). Por otro lado, las numerosas herramientas moleculares desarrolladas en *P. tricornutum* hacen que esta microalga sea empleada como sistema predilecto para la realización de estudios biológicos y obtención de información sobre diatomeas. Es por esto que existe numerosa bibliografía con respecto a la morfología, fisiología y ecología de este organismo. Además, la dilucidación de su genoma completo ha sido un gran avance en el análisis metabólico (Bowler y col., 2008). Sin embargo, son pocos los estudios a nivel molecular realizados con *P. tricornutum*, lo que hace que todavía queden muchos interrogantes en lo que se refiere a su metabolismo y regulación del mismo.

Son marcadamente escasos los trabajos de caracterización de enzimas de diatomeas (en general) y de *P. tricornutum* (en particular), ya sea purificadas directamente de extractos del alga (Arias y col., 2010) o luego de la expresión recombinante de los genes respectivos (Michels y col., 2005), por lo que mayoritariamente las propiedades de las proteínas (y las rutas metabólicas en las que están involucradas) sólo han podido ser inferidas parcialmente a partir de comparaciones de secuencias por métodos informáticos. En el presente trabajo de tesis se presentan estudios realizados sobre la enzima PGKasa-1 de *P. tricornutum*, expresada en el sistema heterólogo de *E. coli*, que incluyen la caracterización funcional, estructural y regulatoria de la misma, presentando características distintivas con respecto a enzimas de otros organismos. Por otro lado, se midió actividad enzimática *in vivo* de la enzima responsable de la síntesis del crisolaminarón: la CSasa, identificando su sustrato glucosídico y aportando así información a esta vía metabólica tan escasamente caracterizada. También se intentó purificar la enzima UDP-Glc PPasa de *P. tricornutum* a partir de células de la diatomea y se logró identificar su secuencia e inferir sobre la localización de la síntesis del polisacárido de reserva. Finalmente, se realizó la medida de actividades enzimáticas de proteínas involucradas en el metabolismo de hidratos de carbono en extractos de diatomeas crecidas bajo distintas condiciones. Así, se logró establecer un escenario metabólico ocurrente e identificar las vías puestas en marcha en presencia de fuentes de C y N externas o de agentes oxidantes. En conjunto, los resultados del presente trabajo de tesis representan un aporte a la comprensión de las diatomeas a nivel metabólico y molecular, y a su comparación con otros organismos fotosintéticos y/o heterotróficos relacionados, dada su importante ubicación en el contexto evolutivo.

## 2 OBJETIVOS

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo principal aportar conocimientos a la caracterización de las vías metabólicas de hidratos de carbono operativas en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* y al escenario evolutivo operado a nivel enzimático y metabólico.

De este objetivo general se desprenden los siguientes objetivos particulares:

- ✓ Obtener de forma recombinante, purificar y caracterizar cinética, estructural y regulatoriamente las enzimas involucradas en el metabolismo de hidratos de carbono en *P. tricornutum*, en particular la enzima fosfoglicerato quinasa cloroplastídica (*Ptr*-PGKasa-1).

- ✓ Optimizar el crecimiento hetero- y mixotrófico de la cepa *P. tricornutum* LFF *Pt* 01.

- ✓ Realizar estudios sobre el metabolismo del polisacárido de reserva crisolaminarón y de las enzimas involucradas en el mismo.

- ✓ Caracterizar actividades enzimáticas en extractos de la diatomea bajo distintas condiciones de crecimiento para evaluar las vías metabólicas operativas en cada caso.



### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Reactivos y enzimas.**

Los componentes de los medios de cultivo para el crecimiento de los microorganismos y para la preparación de *buffers* fueron de la mejor calidad comercialmente disponible. Los reactivos y enzimas utilizados para Biología Molecular se obtuvieron de Promega, Fermentas y USB. Los reactivos químicos y efectores de las reacciones enzimáticas fueron adquiridos de Sigma-Aldrich o de la calidad más alta disponible en el mercado.

#### **3.2 Plásmidos.**

A. pGEM-T Easy (Promega): 3,0 kpb. Fue utilizado para realizar el clonado de los productos obtenidos de la PCR. La verificación de la presencia de inserto en el vector se realizó por diferenciación de colonias blancas por  $\alpha$ -complementación, en presencia de IPTG y X-Gal. Confiere resistencia a ampicilina.

B. pET-24a (Novagen): 5,3 kpb. Este vector de expresión, inducible por IPTG, no adiciona etiqueta de poli-His a la enzima expresada. Confiere resistencia a kanamicina.

C. pET-24b (Novagen): 5,3 kpb. Este vector de expresión, inducible por IPTG, adiciona etiqueta de His<sub>6</sub> en el extremo C-terminal de la enzima expresada. Confiere resistencia a kanamicina.

D. pET-19b (Novagen): 5,7 kpb. Este vector de expresión, inducible por IPTG, adiciona etiqueta de His<sub>10</sub> en el extremo N-terminal de la enzima expresada. Confiere resistencia a ampicilina.

E. pET-32a (Novagen): 5,9 kpb. Este vector de expresión, inducible por IPTG, fue utilizado para obtener sobre-expresión soluble y activa de la enzima *EcoTrx* con la adición de una etiqueta de His<sub>6</sub> en el extremo C-terminal. Confiere resistencia a ampicilina.

F. pRSET-A/*PtrTrx-h2* (gentilmente cedido por el Dr. Diego Arias): 3,4 kpb. Este vector de expresión, inducible por IPTG, fue utilizado para obtener expresión soluble y activa de la enzima *PtrTrx-h2* con la adición de una etiqueta de His<sub>6</sub> en el extremo N-terminal. Confiere resistencia a ampicilina.

G. pRSET-B/*TaeGapC* (gentilmente cedido por la Dra. Vanesa Piattoni): 4,0 kpb. Este vector de expresión, inducible por IPTG, fue utilizado para obtener expresión soluble y activa de la enzima *TaeGapC* con la adición de una etiqueta de His<sub>6</sub> en el extremo N-terminal. Confiere resistencia a ampicilina.

### 3.3 Cepas.

A. *Escherichia coli* TOP10 F' (Stratagene): [lacI<sup>q</sup>Tn10(Tet<sup>R</sup>)] mcr A  $\Lambda$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Lambda$ M15 $\Lambda$ lacX74 recA1 deoR araD139  $\Lambda$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG. Utilizada para mantenimiento y replicación de los plásmidos.

B. *Escherichia coli* Rosetta (DE3) (Novagen): F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) pRARE (argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL) (CamR). Utilizada para la expresión de las enzimas recombinantes *PtrPGKasa-1*, *PtrTrx-h2* y *TaeGapC*. Resistente a cloranfenicol.

C. *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Novagen): F<sup>-</sup> ompT hsdS (r<sup>-</sup> m<sup>-</sup>) gal dcm (DE3). Utilizada para la expresión de la enzima *EcoTrx*.

D. *Phaeodactylum tricornutum*: Cepa LFF Pt 01, cedida por el Dr. Alejandro Beccaría del Laboratorio de Fermentaciones, FBCB, UNL.

### 3.4 Medios y condiciones de cultivo.

Las cepas bacterianas fueron crecidas a 37 °C y con agitación a 180 rpm, en los siguientes medios de cultivo, según el experimento a realizar:

✓ Luria-Bertani (LB): 10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl y agua desionizada (csp 1 l).

✓ LB-agar: medio LB y agar-agar 1,5% (p/v).

✓ Terrific Broth (TB): 12 g triptona, 24 g extracto de levadura, 4 ml glicerol, 2,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 12,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y agua desionizada (csp 1 l).

Para conservación de las cepas bacterianas durante períodos largos de tiempo, las mismas se almacenaron en medio LB líquido suplementado con 25% de glicerol a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . Para la expresión de las proteínas recombinantes las células fueron crecidas en medio TB.

La diatomea *P. tricornutum* fue cultivada a  $(22 \pm 3)\text{ }^\circ\text{C}$ , bajo régimen de luz continua o de ciclos de luz:oscuridad 16:8 (intensidad luminosa de  $15\text{-}90\ \mu\text{E m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ), según el experimento a realizar, sin agitación, en el medio:

✓ Agua de mar artificial: 27 g NaCl, 3,2 g  $\text{MgSO}_4$ , 5,6 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\ \text{H}_2\text{O}$ , 1,45 g  $\text{KNO}_3$ , 1,5 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\ \text{H}_2\text{O}$ , 90 mg  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 40 mg  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\ \text{H}_2\text{O}$ , 78 mg  $\text{Na}_4\text{EDTA} \cdot 2\ \text{H}_2\text{O}$ , 10  $\mu\text{g}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\ \text{H}_2\text{O}$ , 12  $\mu\text{g}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0,00001 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\ \text{H}_2\text{O}$ , 18  $\mu\text{g}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\ \text{H}_2\text{O}$ , 6  $\mu\text{g}$   $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\ \text{H}_2\text{O}$  y agua desionizada (csp 1 l). Se ajustó el pH a 7,6 unidades con NaOH.

Para el crecimiento mixotrófico de las células se adicionó hidrolizado ácido de caseína 1,5 g/l y glicerina 0,5 M.

La cosecha de las células se realizó por centrifugación a 5.000 g durante 10 min a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , luego de lo cual se lavó el paquete celular 4 veces con NaCl 27 g/l y se lo almacenó a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### **3.5 Antibióticos.**

- Ampicilina: concentración final 100  $\mu\text{g/ml}$ .
- Kanamicina: concentración final 50  $\mu\text{g/ml}$ .
- Cloranfenicol: concentración final 20  $\mu\text{g/ml}$ .

### **3.6 Extracción de ARN.**

Para la extracción de ARN de *P. tricornutum* se empleó la técnica del Trizol que se describe a continuación. A  $\sim 100$  mg de células, crecidas como se explicó en el apartado 3.4, se adicionó 1 ml del reactivo Trizol (Invitrogen), se mezcló por inversión

y se dejó actuar durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se agregaron 0,2 ml de cloroformo y la muestra resultante se centrifugó a 12.000 g por 15 min, a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml y se adicionó igual volumen de alcohol isopropílico para precipitar el ARN. Luego de 15 min a 4 °C se centrifugó y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol 75% (v/v). Se centrifugó por última vez y, luego de descartar el sobrenadante, se disolvió el precipitado en 40 µl de agua libre de RNAsas.

### **3.7 Retrotranscripción (RT-PCR).**

Para obtener el ADN copia (ADNc) a partir del ARN extraído, en primer lugar se adicionó al mismo oligonucleótido desoxitimidina (oligo-dT) 0,2 mM y se incubó a 70 °C durante 5 min y a 4 °C por 5 min. Luego se adicionó el *buffer* específico de la enzima, dNTPs 2 mM, inhibidor de RNAsas (*RNAsin*, Promega) y 200 U de la enzima retrotranscriptasa (M-MLV, Promega). La reacción se llevó a cabo en termociclador Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup> gradient a 42 °C durante 1 h y se detuvo por calentamiento a 75 °C por 10 min.

### **3.8 Oligonucleótidos.**

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron diseñados en nuestro laboratorio mediante estudios de secuencias y sintetizados por Sigma-Aldrich. Los mismos se detallan en la Tabla 3.1, junto con los sitios de restricción (que se adicionaron con la finalidad de subclonar los genes amplificados en el correspondiente vector de expresión) o sin los mismos (en los casos en que se construyeron mutantes sitio-dirigidas).

Nombre	Secuencia	Sitio de restricción
<i>Ptr</i> FBAC1Fw	<u>CATATG</u> CCCCGCGTCGGTCAAG	<i>Nde</i> I
<i>Ptr</i> FBAC1Rv	<u>GAGCTC</u> TTAGTTGAGCACGCCGTTG	<i>Sac</i> I
<i>Ptr</i> FBA3Fw	<u>CATATG</u> GCAACCATTACTGATCTC	<i>Nde</i> I
<i>Ptr</i> FBA3Rv	<u>AAGCTT</u> CTACTTGCCCAAGGTC	<i>Hind</i> III
<i>Ptr</i> GapC1Fw	<u>CATATG</u> GCTACCGGTATGGGAGTC	<i>Nde</i> I
<i>Ptr</i> GapC1Rv	<u>GAGCTC</u> TTAGGCCTTGATCTTGGC	<i>Sac</i> I
<i>Ptr</i> GapC2Fw	<u>CATATG</u> CCAGTCTCTCTCGGAATC	<i>Nde</i> I
<i>Ptr</i> GapC2Rv	GCCCCAGCCAATTTCTTCAGGGTTGCGC	no
<i>Ptr</i> PGK1Fw	<u>CATATG</u> AAGGCCTCCATTGAAGACCTC	<i>Nde</i> I
<i>Ptr</i> PGK1Rv	<u>GAGCTC</u> TTATTTGTCGTTGAGCGCG	<i>Sac</i> I
<i>Ptr</i> PGK1RvCHis	<u>GCGGCCG</u> CTTTGTCGTTGAGC	<i>Not</i> I
<i>Ptr</i> PGK1NHis1	GAATTCGTCGAAAA <u>A</u> CTTGCCGCTCC	no
<i>Ptr</i> PGK1NHis2	GGAGCGGCAAG <u>T</u> TTTTTCGACGAATTC	no
<i>Ptr</i> PGK2Fw	CGAAGCCAATACAATTGTTTGGAACGGTCCGATG	no
<i>Ptr</i> PGK2Rv	<u>GAGCTC</u> TTACACTTCTGTCAAAGCCGCAAC	<i>Sac</i> I
Q-rps-Fw	CGAAGTCAACCAGGAAACCAA	no
Q-rps-Rv	GTGCAAGAGACCGGACATACC	no
<i>Ptr</i> TPI-GapC3Fw	GGATCCGCCAGTGCCAAGAC	no
<i>Ptr</i> TPI-GapC3Rv	<u>AAGCTT</u> TCATTTGGATTTCTCCATGTGC	<i>Hind</i> III
C12S-1	GAAGGTTCTCGTCCGTT <u>C</u> CGACGTCAACGTCCC	no
C21S-2	GGGACGTTGACGTCG <u>G</u> AACGGACGAGAACCTTC	no
C58S-1	GCCATCGTCAGTGTCT <u>C</u> CTCACATTTGGGACGC	no
C58S-2	GCGTCCCAAATGTGAG <u>G</u> AGACACTGACGATGGC	no

C77S-1	GTTCTCCCTCGGACCTT <b>C</b> CGCCGAGCGCATGGG	no
C77S-2	CCCATGCGCTCGGCG <b>G</b> AAGGTCCGAGGGAGAAC	no
C95S-1	CCCTCGCACCCGACT <b>C</b> CATCGGTGAAGAAGTCG	no
C95S-2	CGACTTCTTCACCGATG <b>G</b> AGTCGGGTGCGAGGG	no
C214S-1	GCCCTGCTCGATAAAT <b>C</b> CGACAAGGTCATCATCG	no
C214S-2	CGATGATGACCTTGTCG <b>G</b> ATTTATCGAGCAGGGC	no
C312S-1	GGAAGCACTTTCCGACT <b>C</b> CAAGACTATCATCATG	no
C312S-2	CATGATGATAGTCTTG <b>G</b> AGTCGGAAAGTGCTTCC	no

**Tabla 3.1:** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Las secuencias subrayadas corresponden a los sitios de restricción. Los nucleótidos en **azul** corresponden a las mutaciones insertadas en el gen blanco.

### 3.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Con la finalidad de amplificar los genes de interés, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos (detallados en el apartado 3.8) que poseían diferentes sitios de restricción en sus extremos 5'. Se emplearon los siguientes reactivos: *Taq* ADN polimerasa 2,5 U (Fermentas), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *buffer* PCR 1X, dNTPs 0,2 mM cada uno, oligonucleótidos en una concentración final de 1 µM cada uno, ADNc genómico o ADN plasmídico como templado, según el experimento, y agua estéril para completar el volumen de 20-50 µl. El ensayo de PCR se realizó en termociclador Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup> gradient, utilizando el siguiente programa:

1 ciclo de	Desnaturalización	95 °C	5 min
30 ciclos de	Desnaturalización	95 °C	1 min
	Hibridación	62 °C	40 s
	Elongación	72 °C	1 min/kpb
1 ciclo de	Elongación	72 °C	10 min

Los fragmentos obtenidos luego de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y la banda correspondiente a la longitud buscada se cortó y purificó, como se explica más adelante. Posteriormente se ligó al vector de clonado pGEM-T Easy y se transformaron células *E. coli* TOP10.

### **3.10 Mutagénesis sitio-dirigida.**

Para introducir las mutaciones en el gen que codifica para la *Ptr*PGKasa-1 se utilizó la técnica de *QuickChange* (Stratagene). Ésta consiste en utilizar un par de oligonucleótidos complementarios a una misma secuencia de ADN, los cuales tienen en el medio de sus secuencias el nucleótido a mutar. Se extienden ambas cadenas de ADN del plásmido que contiene el gen a mutar, que funciona como molde de la técnica de PCR. Para esto se adicionan al templado 125 ng de cada oligonucleótido específico, dNTPs 0,2 mM y 2,5 U de *Pfu* polimerasa (Fermentas), en el medio de reacción específico para la enzima. Luego se remueve el templado por digestión con 10 U de la enzima de restricción *DpnI* durante 3 h a 37 °C, y el ADN resultante se utiliza para transformar células de *E. coli* TOP10. Finalmente se corrobora la presencia de la mutación deseada mediante secuenciación.

### **3.11 PCR cuantitativa en tiempo real.**

En primer lugar, se realizó la extracción de ARN total como se explicó en el apartado 3.6, a partir de 0,1 g de células de *P. tricornutum* en fase de crecimiento exponencial. Se removió el ADN genómico que pudiera contaminar el ARN extraído mediante digestión con 1 U/μl de ADNasa I libre de ARNasas (Promega) durante 30 min a 37 °C, según las indicaciones del comerciante. Se llevó a cabo la RT-PCR según el apartado 3.7 y el ADNc así obtenido fue utilizado para la PCR cuantitativa en tiempo real. La mezcla de reacción para tal fin (20 μl finales) contenía *buffer* 1X, MgCl<sub>2</sub> 3,75 mM, dNTPs 0,1 mM cada uno, oligonucleótidos específicos (Tabla 3.2) 200-400 nM, *SyBr Green* 0,4X (Cambrex), ADNc 13 ng y 0,05 μl de *Taq Platinum* (Invitrogen).

ARNm a cuantificar	Oligonucleótidos utilizados	Tamaño del fragmento amplificado (nts)
FBAC1	<i>PtrFBAC1Fw – PtrFBAC1Rv</i>	1090
FBA3	<i>PtrFBA3Fw – PtrFBA3Rv</i>	1490
GapC1	<i>PtrGapC1Fw – PtrGapC1Rv</i>	1030
GapC2	<i>PtrGapC2Fw – PtrGapC2Rv</i>	244
PGKasa-1	C312S-1 – <i>PtrPGK1Rv</i>	294
PGKasa-2	<i>PtrPGK2Fw – PtrPGK2Rv</i>	254
TPI-GapC3	<i>PtrTPI-GapC3Fw – PtrTPI-GapC3Rv</i>	1140

**Tabla 3.2:** Par de oligonucleótidos empleado para amplificar cada transcripto indicado y tamaño del mismo, en nucleótidos (nts).

El ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real se realizó en lector de fluorescencia Chromo4 (MJ Research) sobre un termociclador PTC-200 (MJ Research), utilizando el siguiente programa:

1 ciclo de	Desnaturalización	94 °C	5 min
41 ciclos de	Desnaturalización	94 °C	30 s
	Hibridación	62 °C	30 s
	Elongación	72 °C	1,5 min
1 ciclo de	Elongación	72 °C	10 min

Se utilizó como normalizador un fragmento del gen que codifica para la subunidad 30S pequeña de la proteína ribosomal (ID 10847) de 166 pb empleando los oligonucleótidos Q-rps-Fw y Q-rps-Rv (Siaut y col., 2007), cuyas secuencias se detallan en la Tabla 3.1.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y tres replicados biológicos fueron utilizados para cada experimento. Los fragmentos obtenidos luego de la PCR se sometieron a curvas de temperatura de desnaturalización, verificándose así la identidad del producto amplificado.



### **3.12 *Electroforesis en gel de agarosa.***

Las muestras de ADN y ARN fueron, en primer lugar, acondicionadas con glicerol 3% (v/v) y azul de bromofenol 0,05% (p/v). Luego se separaron en geles de agarosa al 1% (p/v) utilizando como medio de corrida *buffer* TAE (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM) adicionado con bromuro de etidio 0,3 µg/ml) mediante la aplicación de 100 V durante 20-30 min, con el sistema Mini-Sub<sup>®</sup>Cell GT (Bio-Rad). Las bandas fueron visualizadas con un transiluminador UV a 302 nm (DyNA Light, LabNet International Inc).

### **3.13 *Purificación de ADN a partir de gel de agarosa.***

La purificación de ADN a partir de los geles de agarosa se realizó utilizando el equipo Wizard<sup>®</sup> Plus SV minipreps DNA Purification System (Promega), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

### **3.14 *Transformación de E. coli mediante la técnica de CaCl<sub>2</sub>.***

#### ***3.14.1 Preparación de células competentes.***

Las bacterias fueron crecidas toda la noche en agitación, a 37 °C, en medio LB. El cultivo fue luego diluido 1/30 en medio LB fresco y se cultivó por 2 h en las mismas condiciones. Las células fueron separadas en alícuotas de a 1 ml, centrifugadas a temperatura ambiente durante 5 min a 4500 rpm y resuspendidas en 500 µl de ST1 (MOPS-NaOH 10 mM, KCl 10 mM, pH 7,0). Luego de una nueva centrifugación en idénticas condiciones que la anterior, se agregaron 500 µl de ST2 (MOPS-NaOH 100 mM, KCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 6,5) y se incubó por 15 min en hielo. Se repitió la precipitación de las células por centrifugación para finalmente resuspenderlas en 100 µl de ST2.

#### ***3.14.2 Transformación de células competentes.***

A 100 µl de una suspensión de bacterias competentes se le adicionaron 2 µl de ADN plasmídico. La mezcla se incubó 1 h en hielo, luego de lo cual se realizó el

tratamiento térmico: 45 s a 42 °C. Las células fueron puestas en hielo durante 2 min, diluidas en 1 ml de medio LB e incubadas por 1 h a 37 °C. Finalmente, se centrifugaron las bacterias 5 min a 4500 rpm, se resuspendieron en 100 µl de medio y se sembraron en placas de Petri conteniendo medio LB-Agar con la adición del antibiótico correspondiente, según la construcción plasmídica con la que se transformó. Se incubaron las placas durante toda la noche a 37 °C.

### **3.15 *PCR de colonia.***

Se realizó PCR de colonia con la finalidad de corroborar la presencia del gen de interés en el plásmido correspondiente para cada colonia bacteriana. Para esto se realizan las reacciones de PCR de idéntica manera que en el apartado 3.9, pero disminuyendo el volumen de reacción a 20 µl y utilizando como molde una pequeña cantidad de la colonia a estudiar. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y los clones que contenían el inserto de interés fueron repicados a medio LB líquido para posterior extracción de ADN plasmídico y conservación a -80 °C.

### **3.16 *Preparación de ADN plasmídico.***

Para extraer ADN plasmídico se utilizó el equipo comercial Wizard<sup>®</sup> Plus SV minipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. La calidad y cantidad del ADN recuperado se verificó por electroforesis en gel de agarosa. El material plasmídico obtenido se conservó a -20 °C.

### **3.17 *Digestión enzimática de ADN.***

Las digestiones enzimáticas de ADN se realizaron utilizando enzimas de restricción comerciales según las indicaciones del fabricante.

### **3.18 *Ligación de fragmentos de ADN.***

La ligación de los fragmentos de ADN se realizó con T4 ADN ligasa (Promega). La reacción se llevó a cabo calentando 5 min a 65 °C una mezcla inserto-vector en una relación molar 5:1. Luego se adicionaron 2 U de la enzima y *buffer* provisto por el fabricante, alcanzando un volumen final de 15  $\mu$ l. Se incubó a 16 °C durante toda la noche.

### **3.19 *Secuenciación de ADN.***

La secuenciación nucleotídica del ADN plasmídico fue llevada a cabo por Macrogen (Corea del Sur).

### **3.20 *Expresión de las proteínas recombinantes.***

Para la expresión de las enzimas recombinantes se utilizaron las células de *E. coli* Rosetta (DE3) transformadas con el vector de expresión correspondiente; el crecimiento se llevó a cabo en medio TB líquido con la adición del antibiótico que correspondiera y cloranfenicol, durante toda la noche, con agitación 180 rpm, a 37 °C. Luego se diluyó 1/100 con medio TB fresco, también suplementado con antibiótico, y se incubó en iguales condiciones hasta que el cultivo alcanzara una  $DO_{600\text{ nm}} = 0,5 - 0,6$ . Se procedió entonces a la inducción de las células mediante el agregado de IPTG en concentración final de 0,2 mM y se incubaron a 25-28 °C durante 4 ó 16 h, según se indique. Finalizada la inducción, se recolectaron las células mediante centrifugación a 5.000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

### **3.21 *Disrupción celular y obtención de extractos crudos.***

Los paquetes celulares se resuspendieron en el *buffer* adecuado para la purificación o el experimento a efectuar posteriormente. Se procedió con la ruptura celular mediante sonificado en un procesador ultrasónico de alta intensidad Vibra-cell™ VCX-600 (Sonics & Materials Inc.), con sucesivos pulsos de 30 s, en baño de hielo.

Finalmente, los lisados celulares así obtenidos se centrifugaron a 12.000 rpm, a 4 °C durante 15 min. La fracción soluble (extracto crudo) se utilizó para la purificación de la enzima de interés o se conservó a -20 °C, según correspondiera.

### **3.22 Purificación de las enzimas.**

#### **3.22.1 Purificación de la PtrPGKasa-1.**

La lisis de las células *E. coli* Rosetta [pET-24a/PtrPGKasa-1] inducidas se llevó a cabo en *buffer* A (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 1 mM, 2-ME 1 mM). El extracto crudo fue parcialmente purificado mediante precipitación salina con sulfato de amonio con un intervalo de corte entre el 35 y 80% de saturación. La fracción insoluble obtenida, previa centrifugación, fue resuspendida en el *buffer* A y la concentración salina fue ajustada al 30% (de saturación) de sulfato de amonio, y se sembró en una columna de interacción hidrofóbica de *Phenyl Sepharose* equilibrada con la misma solución. Luego de lavar la columna con 10 vol del mismo *buffer*, la elución se llevó a cabo aplicando un gradiente lineal descendiente de sulfato de amonio: 30-0%. Las fracciones que presentaron AE de fosfoglicerato quinasa fueron desaladas mediante pasaje por columnas de tamiz molecular BioGel Fast Desalting (BioRad), equilibradas con *buffer* A. El extracto resultante fue sometido a cromatografía de pseudo-afinidad con colorantes: se sembró en una columna empacada con resina *Blue A Sepharose* (Amicon), con posterior lavado y elución por gradiente lineal creciente de concentración salina: 0-300 mM NaCl, en *buffer* A. Las fracciones con la AE buscada fueron recolectadas, desaladas y purificadas mediante cromatografía de afinidad, utilizando la resina *2',5'-ADP Sepharose* (GE). La elución en este caso se realizó con gradiente lineal salino de NaCl 0-1 M en *buffer* A. Las fracciones con AE de PGKasa se reunieron, se acondicionaron con la adición de glicerol 10% (v/v) y, convenientemente fraccionadas, fueron mantenidas a -80 °C hasta su uso. De esta forma la enzima conservó el total de su actividad durante, al menos, 6 meses.

3.22.2 Purificación de las *PtrPGKasa-1-CHis*, *PtrPGKasa-1-NHis*, *TaeGapC*, *EcoTrx* y *PtrTrx-h2*.

Luego de la inducción, la lisis de las células que se detallan a continuación se llevó a cabo en el *buffer* C (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, EDTA 0,1 mM):

- ✓ *E. coli* Rosetta [pET-24b/*PtrPGKasa-1*] (para expresión de la *PtrPGKasa-1-CHis*);
- ✓ *E. coli* Rosetta [pET-19b/*PtrPGKasa-1*] y sus mutantes (para expresión de la *PtrPGKasa-1-NHis* y sus mutantes);
- ✓ *E. coli* Rosetta [pRSET-A/*TaeGapC1*] (para expresión de la *TaeGapC1* con la adición de 6 His en el extremo N-terminal);
- ✓ *E. coli* BL21 [pET-32a] (para expresión de la *EcoTrx* con la adición de 6 His en el extremo C-terminal);
- ✓ *E. coli* Rosetta [pRSET-A/*PtrTrx-h2*] (para expresión de la *PtrTrx-h2* con la adición de 6 His en el extremo N-terminal).

Todas estas enzimas, producidas con adición de una etiqueta de His en alguno de sus extremos, fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). Cada extracto crudo obtenido fue sembrado en una columna de Ni<sup>2+</sup>-IDA-Agarosa (GE) equilibrada con *buffer* C, luego de lo cual se lavó la resina con 10 vol de la misma solución. La elusión se llevó a cabo aplicando un gradiente lineal creciente de imidazol en *buffer* C: 0-300 mM. Las fracciones con la AE buscada se reunieron. Las *TaeGapC*, *EcoTrx* y *PtrTrx-h2* fueron acondicionadas mediante la adición de glicerol 10% (v/v), y almacenadas en alícuotas a -80 °C hasta su uso. Las enzimas *PtrPGKasa-1-CHis*, *PtrPGKasa-1-NHis* y sus mutantes fueron incubadas con 2-ME 10 mM durante 30 min a 0 °C, luego de lo cual se quitó el reductor mediante el uso de resinas de tamiz molecular BioGel Fast Desalting (BioRad), equilibradas con *buffer* B [Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM; NaCl 0,3 M; glicerol 10% (v/v)]. Finalmente estas enzimas fueron concentradas mediante ultrafiltración por centrifugación y guardadas en alícuotas a -80 °C hasta su uso. De esta forma las enzimas se mantuvieron completamente activas durante, al menos, 6 meses.

3.22.3 Purificación de la enzima UDP-Glc PPasa nativa a partir de células de *P. tricornutum*.

Para realizar la purificación de la UDP-Glc PPasa nativa de la diatomea se partió de una masa de 52,6 g de células *P. tricornutum* crecidas en condiciones mixotróficas y cosechadas en crecimiento exponencial. El paquete celular se resuspendió en *buffer* D [MOPS-NaOH 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, sacarosa 5% (p/v)] y se realizó la ruptura por sonicado. El extracto crudo obtenido luego de centrifugar fue sometido a una precipitación con sulfato de amonio con un intervalo de corte entre 30 y 80% de saturación, el precipitado final fue resuspendido en *buffer* D y desalado en resinas de tamiz molecular equilibradas con el mismo *buffer*. El extracto libre de sales fue sembrado en una columna de intercambio iónico: *DEAE-Sepharose* (GE Healthcare Life Sciences), previamente equilibrada con *buffer* D. Luego de realizar el lavado con 10 vol del mismo *buffer*, se procedió a la elusión de la fracción adsorbida a la matriz, mediante el uso de un gradiente lineal de NaCl, en un rango que abarcó desde 0 hasta 0,4 M. Las fracciones que presentaron AE de pirofosforilasa fueron reunidas, tamizadas nuevamente y sometidas a purificación por pseudo-afinidad con colorantes mediante el uso de la resina *Red A Sepharose* (Amicon). Se realizaron lavados con 10 vol de *buffer* D para su posterior elusión aplicando un gradiente lineal creciente de concentración salina: NaCl 0-1,5 M. Las fracciones que presentaron la AE buscada se reunieron y concentraron por ultrafiltración por centrifugación. Finalmente se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular en resina *Superdex 200 Prep Grade* (GE Healthcare Life Sciences). La columna presentaba una altura de 32 cm y diámetro interno de 1 cm, con un volumen de resina de 25 ml; como *buffer* de equilibrado se utilizó Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,1 M, EDTA 0,1 mM. Los picos proteicos eluidos fueron concentrados y analizados para detectar la presencia de actividad de pirofosforilasa. Los tubos que presentaron la AE buscada fueron cambiados a *buffer* D, acondicionados con la adición de 10% (v/v) de glicerol y almacenados a -80 °C. De esta forma la enzima se conservó sin pérdida de actividad durante, al menos, 6 meses.

### **3.23 *Digestión proteolítica de la proteína de fusión.***

La reacción de proteólisis para la escisión de la etiqueta de His se llevó a cabo en un medio que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, Tween 0,1% (v/v) y concentraciones de enteroquinasa entre 0,001 y 4 U. Se ensayaron tiempos de reacción entre 4 y 16 h y temperaturas de 0 y 4 °C. La enzima de fusión *PtrPGKasa-1-NHis* (120 µg) fue examinada alternativamente en solución o adsorbida a la resina Ni<sup>2+</sup>-IDA-Agarosa.

### **3.24 *Cuantificación de proteínas totales.***

La cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo según el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando BSA (Sigma) como estándar. Las lecturas de Abs se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro UV-Vis METROLAB 325 BD.

### **3.25 *Concentración y lavado de soluciones proteicas.***

La concentración de soluciones proteicas y lavado de proteínas mediante ciclos de dilución-concentración fueron llevados a cabo utilizando dispositivos de ultrafiltración por centrifugación Amicon (Millipore), de límite de corte de MM apropiado para cada proteína, en centrífuga a 4 °C y 6.000-7.000 g, según indicaciones del fabricante.

### **3.26 *Electroforesis en geles de poliacrilamida***

#### **3.26.1 *En condiciones desnaturizantes y reductoras***

La electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) fue realizada en geles de poliacrilamida discontinuos, siendo la concentración del gel de resolución de 10-15% y la de del gel de apilamiento de 4%, según Laemmli (Laemmli, 1970), se utilizó un equipo Mini Protean II (Bio-Rad). Previo a la corrida electroforética, las muestras fueron desnaturizadas por el agregado de SDS 1% (p/v) y 2-ME 100 mM en Tris-HCl 50 mM pH 6,8 y su posterior calentamiento a 100 °C durante 5 min. Al

finalizar la corrida las bandas proteicas fueron visualizadas por tinción con *Coomasie Brilliant Blue R-250*.

### 3.26.1 En condiciones desnaturalizantes y no reductoras

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes no reductoras fue realizada en geles de poliacrilamida discontinuos, siendo la concentración del gel de resolución de 8,5% y la de del gel de apilamiento de 4%, con SDS, pero omitiendo el 2-ME y el posterior calentamiento a 100 °C durante 5 min. Al finalizar la corrida, los geles fueron teñidos con *Coomasie Brilliant Blue R-250*.

### 3.26.2 En condiciones nativas

Se llevó a cabo la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas utilizando como soportes geles discontinuos de poliacrilamida al 7,5-10,5%, según Laemmli (Laemmli, 1970), sin la adición de SDS ni 2-ME a las muestras o al *buffer* de corrida. Al finalizar la electroforesis, los geles fueron teñidos con *Coomasie Brilliant Blue R-250*.

Los marcadores de MM utilizados para SDS-PAGE fueron: fosforilasa b (94,0 kDa), BSA (67,0 kDa), ovoalbúmina (43,0 kDa), anhidrasa carbónica (30,0 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14,4 kDa). Para el caso de PAGE en condiciones nativas, los marcadores de MM fueron: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440,0 kDa), catalasa (232,0 kDa), lactato deshidrogenasa (140,0 kDa), fosforilasa b (94,0 kDa), BSA (67,0 kDa), ovoalbúmina (43,0 kDa) y anhidrasa carbónica (30,0 kDa). En todos los casos los marcadores de MM utilizados fueron de GE Healthcare Life Science (código 17-0446-01), New England BioLabs (código P7708), Promega (código V8491) y Pierce (código 26681). La pureza de las muestras fue estimada por densitometría utilizando el programa *LabImage 2.7.0* (Kapelan).

## **3.27 Medida de actividad enzimática y determinación de parámetros cinéticos.**

Se define una unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima necesaria para producir/consumir 1  $\mu$ mol de producto/sustrato en 1 min, bajo condiciones óptimas de medida, especificadas para cada enzima. En todos los casos se



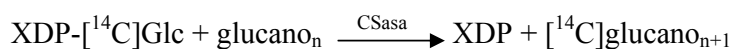
midieron velocidades iniciales, llegándose a conversiones no mayores del 10 % de sustrato, para asegurar una dependencia lineal de la velocidad con el tiempo. Se utilizaron métodos espectrofotométricos continuos o de punto final.

Todas las medidas de Abs fueron realizadas en un equipo Multiskan Ascent one-channel vertical light pathfilter photometer (Thermo Electron Co.). En los ensayos en los que se midieron cambios en la concentración de NAD(P)H a 340 nm, se utilizó el coeficiente de extinción molar de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Las curvas de saturación fueron realizadas midiendo AE a concentración variable del sustrato o efector a evaluar y concentración fija y saturante del resto de los componentes (sustratos y cofactores esenciales). Los datos cinéticos fueron graficados como velocidad inicial, en U/mg, en función de la concentración del sustrato o efector variable. El cálculo de los parámetros cinéticos fue realizado mediante el ajuste no lineal de los datos experimentales a la ecuación de Hill utilizando el programa *Origin 7.0* (OriginLab). Se define como  $S_{0,5}$  a la concentración de sustrato que produce un 50% de la velocidad máxima ( $V_M$ ). Se obtuvo el valor de coeficiente de Hill ( $n_H$ ) para cada caso. Los valores de los parámetros cinéticos son el resultado de al menos dos determinaciones con una variación menor al 10%.

### 3.27.1 Medida de la actividad de la crisolaminarón sintasa (CSasa, EC 2.4.1.34).

La actividad enzimática de la CSasa fue medida empleando la técnica descrita por Yep y Bejar (Yep y col., 2004), de dos maneras: *in vitro* e *in vivo*, como se describe a continuación. Ambas técnicas se basan en la medición de la marca radioactiva incorporada al polisacárido de reserva según:



siendo XDP equivalente a ADP o UDP, según corresponda.

#### 3.27.1.1 Medida de actividad de la CSasa in vitro.

La mezcla de reacción (70  $\mu\text{l}$  finales) contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,0,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, BSA 0,2 mg/ml, XDP- $^{14}\text{C]Glc}$  2 mM (800-1.000 cpm/nmol), citrato de sodio 0,12

M, Glc-6P 10 mM, glucógeno de hígado de conejo o almidón 0,5 mg y el extracto enzimático. Se ensayaron tres opciones como extracto:

- extracto soluble de *P. tricornutum*, luego de sonicado y centrifugado,
- extracto sonicado de la diatomea, sin separación de las fracciones soluble e insoluble del mismo,
- extracto insoluble, *pellet* celular luego de la disrupción y centrifugación.

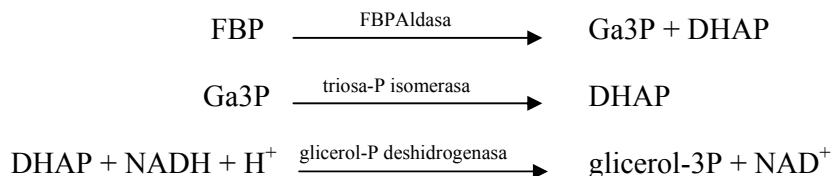
La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 15-60 min, luego de lo cual se detuvo por calentamiento en un baño de agua hirviente durante 45 s. El [<sup>14</sup>C]glucano formado se precipitó mediante el agregado de 0,1 ml de una solución de glucógeno 10 mg/ml como agente coprecipitante, seguido de 2 ml de una mezcla metanol 75% (v/v) y KCl 1% (p/v). La mezcla se incubó a 0 °C durante 10 min y se centrifugó a 2.000 rpm durante 3 min. Luego de descartar el sobrenadante, el glucano precipitado se redisolvió en 0,2 ml de agua y se repitió la precipitación. El último precipitado fue lavado con la mezcla metanol 75% (v/v) y KCl 1% (p/v), redisolto con 0,3-1 ml de agua y se midió la radioactividad de una alícuota convenientemente acondicionada con cóctel de centelleo. A partir de conocer la radioactividad específica de la solución de [<sup>14</sup>C]XDP-Glc utilizada como sustrato se calcularon los nmoles de marca incorporados al glucano en la reacción.

#### 3.27.1.2 Medida de actividad de la CSasa in vivo.

La mezcla de reacción (70 µl finales) contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, BSA 0,2 mg/ml, XDP-[<sup>14</sup>C]Glc 2 mM (800-1.000 cpm/nmol), citrato de sodio 0,12 M, Glc-6P 10 mM, y 10<sup>9</sup> células permeabilizadas (ver el apartado 3.28). La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 15-60 min, luego de lo cual las células fueron centrifugadas y lavadas dos veces con una solución de NaCl 0,9% (p/v) para quitar el exceso de marca no incorporada, e incubadas con KOH 67,5% (p/v) y calentadas en un baño de agua hirviente durante 3 h para detener la reacción y lisar las células (Lou y col., 1997). Al polisacárido liberado se le adicionó glucógeno 10 mg/ml como agente coprecipitante y fue precipitado y lavado utilizando el mismo método descrito en el apartado anterior. El último precipitado fue redisolto con 0,25-0,5 ml de agua y se midió la radioactividad de una alícuota convenientemente acondicionada con cóctel de centelleo.

3.27.2 Medida de la actividad de la fructosa-1,6- bisfosfato (FBP) aldolasa (FBPAldasa, EC 4.1.2.13).

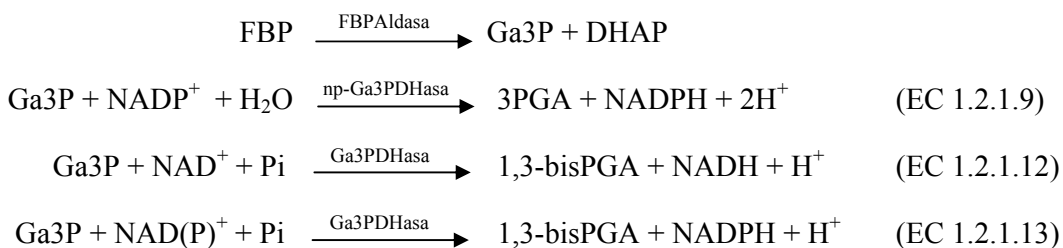
La actividad de la enzima FBPAldasa fue medida por un método continuo, acoplado a la oxidación de NADH según la secuencia de reacciones detallada más abajo; la evolución de la reacción fue seguida midiendo disminución de Abs a 340 nm, a 30 °C, según (Blostein y Rutter, 1963):



El medio de reacción (50 µl finales) contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5 mM, NADH 0,15 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, triosa-P isomerasa de músculo de conejo 10 U/ml (Sigma), glicerol-P deshidrogenasa de músculo de conejo 1 U/ml (Sigma), FBP 1 mM y el extracto enzimático a medir en dilución adecuada.

3.27.3 Medida de la actividad de la enzima gliceraldehído-3-P deshidrogenasa (Ga3PDHasa, EC 1.2.1.9, EC 1.2.1.12 y EC 1.2.1.13).

Las actividades enzimáticas de las enzimas fosforilante (Ga3PDHasa) y no fosforilante (np-Ga3PDHasa) se midieron según (Gomez Casati y col., 2000):

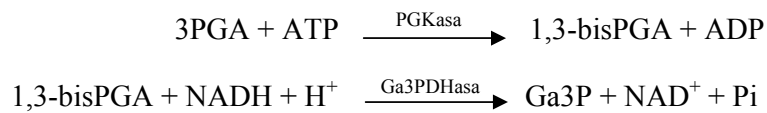


El medio de reacción (50 µl finales) contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> 0,2 mM, 2-ME 1 mM. La reacción se inició mediante la adición del sustrato 1,3-bisPGA, el cual fue generado *in situ* mediante la reacción acoplada de la enzima FBP aldolasa (FBPAldasa). Para esto se incubó FBP 2,4 mM y FBPAldasa de músculo de conejo 1 U/ml (Sigma) durante 10 min a 37 °C, en un medio que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y, en el caso de la medida de las enzimas fosforilantes, AsO<sub>4</sub>Na<sub>3</sub> 5 mM. La evolución de la reacción de la Ga3PDHasa fue seguida midiendo aumento de Abs a

340 nm, debido a la reducción de  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  a  $\text{NADH}$  o  $\text{NADPH}$ , respectivamente.

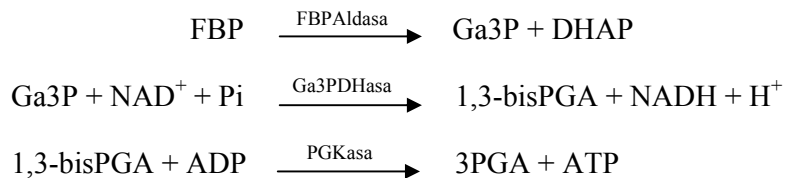
3.27.1 Medida de la actividad de la enzima 3-fosfoglicerato quinasa (PGKasa, EC 2.7.2.3).

Excepto que se aclare lo contrario, la actividad enzimática de la PGKasa fue medida en el sentido de reacción de fosforilación de 3PGA a 1,3-bisPGA, usando el método descrito por Bücher (Bücher, 1955):



El medio de reacción (50  $\mu\text{l}$  finales) contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,0, ATP 5 mM, 3PGA 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, NADH 0,2 mM, Ga3PDHasa de músculo de conejo 1 U/ml (Sigma) y 10  $\mu\text{l}$  de una dilución adecuada del extracto enzimático. La actividad fue ensayada midiendo el consumo de NADH a 340 nm.

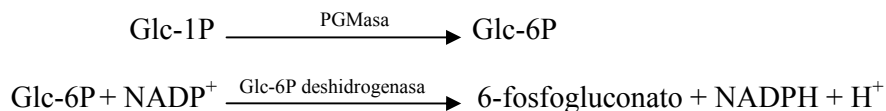
La actividad enzimática en el sentido de reacción de fosforilación de ADP fue utilizado con el sólo propósito de comparar las actividades de la *Ptr*PGKasa-1-NHis en sus formas reducida y oxidada. Como 1,3-bisPGA es inestable, debe ser generado *in situ* utilizando el método acoplado de la Ga3PDHasa (Bücher, 1955; Hurth y col., 2007):



La mezcla de reacción contenía *buffer* fosfato 50 mM pH 8,0, FBP 1 mM, 0,5 U/ml de FBPAldasa de músculo de conejo (Sigma), ADP 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{NAD}^+$  0,5 mM, Ga3PDHasa de músculo de conejo 100 U/ml (Sigma) y PGKasa.

3.27.2 Medida de la actividad de la enzima fosfoglucomutasa (PGMasa, EC 5.4.2.2).

La medida de actividad de la PGMasa fue llevada a cabo utilizando el método descrito por Qian y col. (Qian y col., 1994):



La mezcla de reacción (50  $\mu\text{l}$  finales) contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  7 mM, Glc-6P deshidrogenasa 1 U/ml (Sigma),  $\text{NADP}^+$  0,2 mM y el extracto a evaluar. La reacción fue iniciada por la adición de Glc-1P 1 mM y seguida por aumento en la Abs a 340 nm, por aparición de NADPH, a 30 °C.

3.27.1 Medida de la actividad tiorredoxina (Trx, EC 1.8.4.8).

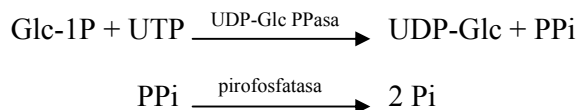
La actividad enzimática de la Trx se midió empleando el método de reducción de insulina, descrito por Holmgren (Holmgren, 1979). Este método se basa en la capacidad de las Trxs, previamente reducidas con DTT, de reducir los puentes disulfuro de la insulina bovina, resultando en la precipitación de la cadena B de ésta y en el consecuente aumento en la turbidez del medio. La mezcla de reacción (100  $\mu\text{l}$  finales) contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 2 mM, DTT 0,5 mM, Trx en cantidad adecuada e insulina de páncreas bovino 0,13 mM (Sigma), sustrato con el que se inició la reacción. La evolución de la actividad fue seguida midiendo aumento de Abs a 630 nm (turbidez), cada 5 min a 30 °C. En los blancos se omitió la Trx.

3.27.2 Medida de actividad de la enzima UDP-Glc pirofosforilasa (UDP-Glc PPasa, EC 2.7.2.9).

La medida de actividad enzimática de la UDP-Glc PPasa fue realizada en ambos sentidos de reacción: síntesis y pirofosforólisis de UDP-Glc, empleando métodos discontinuos, de punto final colorimétrico y radioquímico, respectivamente. Para el caso de medida de actividad enzimática de la ADP-Glc PPasa, los medios de reacción fueron los mismos, pero con el reemplazo del sustrato UTP (UDP-Glc) por ATP (ADP-Glc).

### 3.27.2.1 Medida de actividad enzimática en sentido de síntesis de UDP-Glc.

Este método se basa en la cuantificación de Pi, por medio de una reacción de color con el complejo Verde de Malaquita/molibdato de amonio, generado en la hidrólisis enzimática del PPI, producto de la reacción de síntesis de UDP-Glc (Fusari y col., 2006). Las reacciones acopladas del método son:

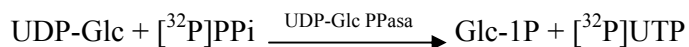


La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ , que incluía MOPS-NaOH 50 mM pH 8,0;  $\text{MgCl}_2$  7 mM; UTP 1 mM; BSA 0,2 mg/ml; pirofosfatasa inorgánica de levadura 0,5 mU/ $\mu\text{l}$  y el extracto a evaluar, en dilución adecuada. El ensayo se llevó a cabo a 37  $^\circ\text{C}$ , con el agregado de Glc-1P, de manera de alcanzar una concentración final de 1 mM, y se dejó reaccionar el tiempo necesario para obtener una señal medible (5-10 min) sin alcanzar una conversión de sustratos superior al 10%. La reacción se detuvo con el agregado de 375  $\mu\text{l}$  del reactivo de color, e inmediatamente después, se le adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de citrato de sodio 34% (p/v). Se dispensaron 250  $\mu\text{l}$  de mezcla en policubetas de ELISA y su Abs fue determinada a 630 nm. Mediante la construcción de una curva de calibrado con testigos de Pi, se obtuvo el factor de conversión de medidas de DO a nmoles de Pi.

El reactivo de color se preparó mezclando 3 volúmenes de Verde de Malaquita al 0,045% (p/v) en agua y 1 volumen de molibdato de amonio 4,2% (p/v) en HCl 5 N. Luego de homogeneizar durante 30 min y filtrar, a 5 ml de la solución obtenida se le adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de Tween 20 al 2% (v/v).

### 3.27.2.2 Medida de actividad enzimática en sentido de pirofosforólisis.

Este método está basado en la cuantificación de [ $^{32}\text{P}$ ]UTP formado por acción enzimática (Ghosh y Preiss, 1966), según la siguiente reacción:



La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 150  $\mu\text{l}$ , que incluía MOPS-NaOH 100 mM pH 8,0;  $\text{MgCl}_2$  5 mM; UDP-Glc 1 mM; BSA 0,2 mg/ml y la muestra a estudiar, en dilución adecuada. El ensayo se llevó a cabo a 37  $^\circ\text{C}$ , con el

agregado de 1 mM [<sup>32</sup>P]PPi (1.000-3.000 cpm/nmol) y se dejó reaccionar 10 min. La reacción se detuvo con el agregado de 1 ml de ácido tricloroacético al 5% (p/v) previamente enfriado a 0 °C. Se adicionaron luego 100 µl de una suspensión de carbón activado al 15% (p/v) en 1 M NaCl, de manera de adsorber el [<sup>32</sup>P]UTP para separarlo del sustrato marcado que no reaccionó. Las muestras se centrifugaron durante 2 min a 2.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado dos veces con 2 ml de agua destilada fría. El precipitado obtenido fue resuspendido en 250 µl de HCl 1 M y llevado a baño de agua hirviendo durante 10 min, luego de lo cual se lo enfrió en hielo. Finalmente, se centrifugó nuevamente y se cuantificó el Pi radioactivo liberado por la hidrólisis en 200 µl del sobrenadante que fueron adicionados a 800 µl de cóctel de centelleo líquido (60 g naftaleno; 8 g omnifluor; 30 ml etilenglicol; 200 ml metanol; dioxano hasta completar el volumen final de 1 l). Mediante la lectura de distintos testigos de [<sup>32</sup>P]PPi, se obtuvo el factor de conversión de cpm a nmoles de PPi.

### 3.27.3 Medida de la actividad chaperona de la PtrPGKasa-1 por protección de la Ga3PDHasa contra la desnaturalización térmica.

La Ga3PDHasa es una enzima que precipita a 43 °C. Por esta propiedad se la utiliza como sustrato para la medición de actividad biológica de chaperona de otras proteínas que pueden protegerla de tal agregación térmica (Lee y col., 1995). Para ensayar tal actividad de chaperona de la PtrPGKasa-1 se utilizó la Ga3PDHasa de *Triticum aestivum* (TaeGapC), la que fue incubada (a concentración 3,2 µM en monómero) con concentraciones variables de la PtrPGKasa-1, en *buffer* B a 43 °C, en un volumen total de 100 µl. La desnaturalización térmica fue seguida mediante aumento en la Abs a 630 nm (turbidez) o por actividad enzimática de la Ga3PDHasa. Para evaluar la especificidad de la reacción se ensayaron proteínas alternativas: por un lado, alcohol deshidrogenasa de levadura (Sigma) como proteína precipitante a 43 °C, y por otro lado, BSA y EcoTrx como proteínas chaperonas (Erales y col., 2009).

### 3.28 Permeabilización de células de *P. tricornutum*.

Para evaluar actividad de la glucano sintasa *in vivo* se permeabilizaron las células de *P. tricornutum* de modo de asegurar el ingreso de los sustratos correspondientes. Para esto se utilizó una técnica anteriormente descrita (Rees y col., 1995). Una vez crecidas hasta fase exponencial como se describió, las células de diatomea fueron centrifugadas durante 10 min a 1500 g y el sobrenadante de medio de cultivo retirado. El paquete celular fue resuspendido en *buffer* de permeabilización (Hepes-KOH 0,2 M pH 7,9, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 5 mM, DTT 1 mM) en cantidad necesaria para alcanzar una densidad celular de  $5 \cdot 10^7$  cél/ml. Las células fueron inmediatamente fraccionadas en alícuotas, congeladas a -80 °C y almacenadas a -20 °C hasta su uso, momento en el que se descongelaron a 4 °C. La eficiencia de permeabilización fue determinada usando el colorante *Evans Blue* 0,25% (p/v) (Crippen y Perrier, 1974).

### 3.29 Cuantificación de pigmentos.

La extracción de pigmentos se llevó a cabo a partir de  $\sim 7 \cdot 10^7$  células, utilizando acetona 90% (v/v) como solvente, en dos pasos sucesivos. En primer lugar se cosecharon las células en crecimiento exponencial, se resuspendieron en acetona 90% (v/v) y se agitaron vigorosamente y se dejaron en contacto durante, al menos, 30 min. Se centrifugó y se recuperó la fase líquida. El paquete celular resultante fue sonificado en el mismo solvente para completar la extracción, recolectándose el sobrenadante. Todos los pasos de extracción se realizaron a 4 °C y al reparo de la luz para evitar degradación de los pigmentos. El contenido pigmentario se determinó espectrofotométricamente, midiendo el espectro de absorción entre 400 y 700 nm. Los picos de absorción de cada pigmento se observan respectivamente a: Chl *a*, 664 nm; Chl *c*, 625 nm; y carotenos, 470 nm. Las concentraciones de los pigmentos fueron calculadas utilizando las siguientes ecuaciones (Jeffrey y Haxo, 1968; Montero y col., 2002):

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 13,9 \text{ Abs}^{664 \text{ nm}}$$

$$\text{Chl } c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 67,3 \text{ Abs}^{625 \text{ nm}} - 14,1 \text{ Abs}^{668 \text{ nm}}$$

$$\text{Carotenos + Xantófilas (}\mu\text{g/ml)} = 4 \text{ Abs}^{470 \text{ nm}}$$



### **3.30 *Cuantificación de crisolaminarón.***

Para cuantificar el polisacárido de reserva característico de diatomeas se empleó el método de extracción descrito por Granum (Granum y Myklestad, 2002). Las células ( $10^6$ - $10^8$  en número) fueron cosechadas por centrifugación. El crisolaminarón fue extraído mediante la adición de 5 ml de  $H_2SO_4$  0,05 M y calentamiento a 60 °C durante 10 min, en baño de agua. El extracto resultante fue sometido a filtración con leve vacío y la cuantificación del glucano fue analizada en el filtrado utilizando el método fenol-ácido sulfúrico (Dubois y col., 1956). A 2 ml de la solución de crisolaminarón se le adicionó 0,1 ml de fenol 80% (p/v) y 5 ml de  $H_2SO_4$  concentrado e inmediatamente fue agitado. La mezcla se incubó durante 20 min a 25 °C y luego fue enfriada por corriente de agua fría. Finalmente se midió la Abs a 485 nm y se calculó la concentración del glucano en  $\mu g/ml$  y  $pg/célula$ , utilizando una curva de calibrado realizada empleando glucosa como estándar.

### **3.31 *Cromatografía de tamiz molecular para la estimación de masas moleculares.***

Para estimar la MM de las enzimas en estado nativo o evaluar interacción entre proteínas (evidenciando la presencia de los complejos), se utilizó la técnica de cromatografía de filtración por geles, empleando la resina *Superdex 200 Prep. Grade* (Amersham). El *buffer* empleado para ello contenía Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 100 mM y EDTA 0,1 mM. Para realizar la curva de calibrado se utilizaron proteínas de masa molecular conocidas como patrones: anhidrasa carbónica (30,0 kDa), ovoalbúmina (43,0 kDa), BSA (67,0 kDa), IgG de suero equino (140,0 kDa). El Azul de Dextrano fue utilizado para calcular el volumen total de la columna. El flujo utilizado se encontró entre 0,2 y 0,5 ml/min.

### **3.32 *Método de Ferguson.***

Ferguson (Ferguson, 1964) observó que el logaritmo de la movilidad electroforética de una proteína es una función lineal de la concentración del gel

empleado para determinarla. La ecuación que gobierna la movilidad de una proteína en un gel nativo es la siguiente:

$$\log r_f = \log (Y_o) - K_D C$$

donde  $r_f$  es la movilidad relativa, normalizada con el frente de corrida,  $Y_o$  es la movilidad relativa de la proteína en ausencia de matriz,  $K_D$  es el coeficiente de retardamiento (amplitud del efecto de la matriz del gel a la movilidad), y  $C$  es el porcentaje de unidad polimérica del gel. Así, si se grafica  $\log r_f$  vs  $C$ , la pendiente de la recta corresponderá a  $K_D$ , coeficiente cuya raíz cuadrada resulta proporcional a la masa molecular proteica (Ferguson, 1964).

El método consiste en realizar corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida de distintas concentraciones (7,5, 8,5, 9,5 y 10,5%), en condiciones nativas. En los mismos geles se corren marcadores de masas moleculares para PAGE nativo, que serán utilizados para realizar las curvas estándar, en las cuales se interpolará los valores de  $K_D$  obtenidos para las muestras.

### **3.33 Entrecruzamiento.**

Para determinar los estados de oligomerización de la enzima ante la presencia de distintos sustratos, se llevó a cabo el entrecruzamiento de sus subunidades mediante el uso del reactivo bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS) (Staros, 1982). BS es un reactivo entrecruzante soluble en agua, que contiene un éster N-hidroxisulfosuccinimida amino-reactivo a cada extremo de una cadena de 8 carbonos. Este grupo reacciona con aminas primarias, a pH 7-9, formando enlaces amida estables. Las proteínas contienen, generalmente, varios residuos Lys, los cuales presentan aminas primarias en sus cadenas laterales, resultando sustratos adecuados para el entrecruzamiento con BS (Staros, 1982). Se ensayaron dos concentraciones finales de BS: 0,1 mM y 0,5 mM. A 50  $\mu$ l de una solución 0,5-1 mg/ml de la enzima en 50 mM MOPS-NaOH pH 7,5 se le adicionaron 5  $\mu$ l de una solución de BS 11X (preparada en el momento) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se interrumpió la reacción con el agregado de 8,3  $\mu$ l de 50 mM etanolamina en 50 mM MOPS-NaOH pH 7,5, y se adicionaron 50  $\mu$ l de solución solubilizante (3% SDS; 25% sacarosa; 25 mM Tris-HCl

pH 8,0; 2,5 mM EDTA) y se dejó reaccionar por 30 min a 37 °C. Finalmente, se realizó la corrida electroforética en SDS-PAGE al 12,5%, sin previo hervor las muestras.

### 3.34 Modelado molecular por homología de la enzima *PtrPGKasa-1*.

Se realizaron dos modelos moleculares de la estructura de la enzima *PtrPGKasa-1*: uno en su conformación abierta (ausencia de sustratos) y uno de la conformación cerrada (complejo ternario Enzima-ATPMg-3PGA. Para esto se utilizó el programa *Modeller 9v2* (Sali y Blundell, 1993) y los templados las estructuras cristalinas de la PGKasa de músculo de *Sus scrofa* (PDB ID: 1VJC), la PGKasa de *Thermus caldophilus* (PDB ID: 2IE8) y la PGKasa de *Thermotoga maritima* (PDB ID: 1VPE), disponibles en el servidor *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Los alineamientos de secuencias fueron realizados utilizando el programa *BioEdit 7.0.9.0* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>) y la precisión de los modelos fue analizada evaluando los perfiles 1D/3D con el servidor *Verify-3D* ([http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify\\_3D](http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D)) (Bowie y col., 1991; Luthy y col., 1992). Se realizaron 50 modelos para cada conformación de la enzima, eligiéndose como definitivo el que menor valor de molpdf (término arbitrario relacionado con la energía del modelo) y mejor perfil 1D/3D presentara. Las ilustraciones de los modelos fueron realizadas con el programa *VMD* (<http://www.ks.uiuc.edu>). Para evaluar los movimientos sufridos por la molécula al unirse los sustratos, se recurrió al servidor informático *DynDom* (*Protein Domain Motion Analysis*, <http://fizz.cmp.uea.ac.uk/dyndom/dyndomMain.do>) (Hayward y col., 1997; Hayward y Berendsen, 1998).

### 3.35 Ensayos cinéticos de oxido-reducción sobre la enzima *PtrPGKasa-1*.

Todos los ensayos de óxido-reducción fueron llevados a cabo a 25 °C, en *buffer* B, por tratamiento de 0,1 µM de enzima con un exceso molar de los agentes:

✓ oxidantes: diamida 0-1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0-10 mM, nitroprusiato de sodio (NPS) 0-10 mM, glutatión oxidado (GSSG) 0-5 mM;

- ✓ reductores: DTT 0-10 mM, *EcoTrx* 0-10  $\mu$ M, *PtrTrx* 0-5  $\mu$ M.

A cada tiempo indicado, una alícuota de 10  $\mu$ l fue evaluada por actividad enzimática de PGKasa remanente o recuperada, según sea el caso. En los ensayos de oxidación la enzima a evaluar se encontraba, inicialmente, totalmente reducida. Para los estudios de reducción la enzima fue convenientemente oxidada con cada agente, diluida para quitar el exceso de oxidante, y posteriormente incubada con las concentraciones indicadas de los agentes reductores.

Los valores de AE relativa fueron graficados y las constantes cinéticas de los procesos de oxidación y reducción calculadas como se indica en Resultados y Discusión, utilizando el programa *Origin 7.0* (OriginLab Corporation).

### 3.36 Titulación redox de la *PtrPGKasa-1*.

Se examinó la dependencia de la actividad enzimática de la *PtrPGKasa-1* con el potencial redox utilizando la técnica descrita por Hutchison y Ort (Hutchison y Ort, 1995). Para esto se incubó 0,1  $\mu$ M de la enzima totalmente reducida en *buffer* Tris-HCl 25 mM pH 8,0 desgasificado, con distintos potenciales ( $E_h$ ) definidos por diferentes proporciones de 2-ME en sus formas reducida (2-ME) y oxidada (hidroxietildisulfuro, HEDS), en una concentración total fija de 10 mM. Incubaciones de 30 min a 25 °C resultaron suficientes para llegar al equilibrio, luego de lo cual se midió actividad enzimática de PGKasa. Los  $E_h$  de las soluciones de incubación fueron determinados utilizando la ecuación de Nerst:

$$E_h = E_{m,pH} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[R]^n}{[Ox]}$$

donde  $E_{m,pH}$  es el potencial estándar del par redox utilizado, corregido al pH de trabajo, R es la constante de los gases (1,987 cal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>), T es la temperatura, F es la constante de Faraday (23040,612 cal mol<sup>-1</sup> V<sup>-1</sup>), n es el número de electrones transferidos en la reacción, [R] y [Ox] son las concentraciones de las especies reducida y oxidada del par redox que conforman el *buffer*, respectivamente (Rouhier y col., 2004; Elgán, 2009). Se utilizó como  $E_{m;7,0}$  -0,26 V (Lees y Whitesides, 1993), corregido al pH de trabajo (pH 8,0) utilizando el factor  $\Delta E_m/\Delta pH = -0,059$  V, siendo  $E_{m;8,0}$  -0,319 V. n es igual a 2 y RT/F es 0,0257 V a temperatura de 25 °C.

Los valores de actividad enzimática obtenidos luego de la titulación redox fueron ajustados también a la ecuación de Nerst, utilizando el programa *Origin 7.0* (OriginLab Corporation), para hallar el potencial redox de la proteína.

### **3.37 Titulación de sulfhidrilos.**

La cuantificación de tioles libres accesibles al solvente se hizo utilizando el reactivo DTNB [5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato) o reactivo de Ellman]. Este agente reacciona con iones tiolatos mediante una reacción de intercambio tiol-disulfuro, lo que resulta en la formación estequiométrica de un compuesto amarillo,  $TNB^{2-}$ , que absorbe a 412 nm, con un valor de absortividad molar igual a  $13600 M^{-1} cm^{-1}$  (Ellman, 1959). La enzima 12  $\mu M$ , en su forma nativa o desnaturalizada (urea 6 M), se incubó con DTNB 2 mM durante 30 min a 30 °C en *buffer* B desgasificado por sonicación. La Abs fue medida a 405 nm y la concentración de tioles libres fue calculada y expresada como cantidad de tioles/monómero de enzima.

### **3.38 Cuantificación de ácidos sulfénicos.**

Los ácidos sulfénicos fueron cuantificados utilizando dos métodos: reducción con arsenito de sodio (reductor específico de -SOH) (Radi y col., 1991; Saurin y col., 2004) y por cambios en las propiedades espectroscópicas del reactivo 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1, 3, diazole (NBD) (Sigma), que forma aductos con los tioles y con los -SOH que absorben a 420 nm y 347 nm, respectivamente (Ellis y Poole, 1997).

En el primer caso, la enzima (12  $\mu M$ ) fue oxidada reversiblemente con  $H_2O_2$  0,5-2 mM, lavada por 4 ciclos de dilución-concentración en dispositivos de ultrafiltración, e incubada con el reductor específico arsenito de sodio 10 mM durante 1 h a 25 °C, en *buffer* B desgasificado. Luego de lavar la proteína nuevamente, los tioles reducidos fueron cuantificados con DTNB, como se describió en el apartado anterior.

En el ensayo de NBD la enzima (12  $\mu M$ ) fue oxidada reversiblemente con  $H_2O_2$  0,5-2 mM, lavada por 4 ciclos de dilución-concentración en dispositivos de ultrafiltración, e incubada con un pequeño volumen de NBD disuelto en dimetil

sulfóxido (concentración final = 0,8 mM), durante 30 min a 25 °C, en *buffer* B desgasificado, en ausencia de luz. Luego de lavar la proteína nuevamente para remover el NBD no unido, se realizó el espectro de absorción y, utilizando el coeficiente de extinción  $13400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para ambas longitudes de onda, se cuantificó -SH-NBD o -SOH-NBD (Ellis y Poole, 1997).

### **3.39 Alquilación de tioles libres.**

El reactivo alquilante ácido iodoacético (IAA) (Sigma) reacciona irreversiblemente con tioles libres en una sustitución nucleofílica formando el correspondiente derivado carboximetilo (Zander y col., 1998). La enzima, en concentración 12  $\mu\text{M}$ , se incubó con IAA 2 mM durante 1 h a 25 °C en *buffer* B desgasificado. Estas condiciones fueron suficientes para asegurar la alquilación de todas las cisteínas de la enzima reducida.

### **3.40 Inmunoprecipitación.**

Para evaluar la existencia de interacción entre las enzimas *TaeGapC* y *PtrPGKasa-1* se realizó el ensayo de inmunoprecipitación. Para esto se contaba con la resina Proteína G-Agarosa (Sigma) y anticuerpos específicos para la *TaeGapC*. En primer lugar se incubó ambas enzimas (concentración fija de la *TaeGapC* 10  $\mu\text{M}$  y concentración variable de la *PtrPGKasa* 2,5-20  $\mu\text{M}$ ) durante 40 min a 43 °C para favorecer su interacción, y posteriormente con el anticuerpo específico durante 16 h a 4 °C. Se adicionaron luego 50  $\mu\text{l}$  de la resina equilibrada con *buffer* TBS (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM) y se dejó en contacto por 1 h a temperatura ambiente, luego de lo cual se lavó la resina con la fracción proteica adsorbida con 10 volúmenes de TBS. Finalmente se resuspendió la resina en *buffer* de acondicionamiento de muestras para SDS-PAGE, se calentó durante 10 min en baño de agua hirviendo y se sometió a SDS-PAGE 15%.

### **3.41 ANOVA.**

Se realizó el Análisis de la Varianza para densidad celular utilizando la suma de cuadrados tipo III (valor por defecto), es decir se ha medido la contribución de cada factor eliminando los efectos del resto de los valores. Se utilizó el programa informático *Design Expert* 6.0.10 (trial version).

### **3.42 Identificación de proteínas por mapeo peptídico.**

La identificación de proteínas por espectrometría de masa (mapeo peptídico con tripsina y MS/MS) y búsqueda en bancos de datos de secuencia fue llevada a cabo por la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UByPA) del Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay. El equipo utilizado fue MALDI TOF/TOF 4800 ABi. La búsqueda en banco de datos se llevó a cabo utilizando el servidor *Mascot* ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

“% de cobertura” es el porcentaje de la secuencia completa que se logra cubrir con los péptidos identificados significativamente. Se permite 0,05 Da de diferencia entre el valor teórico y el valor medido de masa molecular de los péptidos resultantes para que los resultados sean estadísticamente significativos.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Capítulo 1: Caracterización de la enzima fosfoglicerato quinasa-1 de *P. tricornutum*.

La fosfoglicerato quinasa (E.C. 2.7.2.3, PGKasa) es la enzima que cataliza la fosforilación reversible, dependiente de ATP, de 3PGA a 1,3-bisPGA, utilizando  $Mg^{2+}$  como cofactor esencial. Esta enzima participa en varias vías metabólicas, incluyendo ciclo de Calvin, glicólisis y ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (COPP). En el primero, el sentido de la reacción catalizada es el de fosforilación de 3PGA, mientras que en las dos últimas vías mencionadas el sentido fisiológico es el de producción de ATP y 3PGA (Joao y Williams, 1993). La PGKasa es una enzima monomérica con una MM de alrededor de 45 kDa. Además de esta similitud general entre las PGKasas de distintos organismos, las secuencias aminoácidas muestran un alto grado de conservación a lo largo de la evolución, especialmente en lo que se refiere a residuos funcionales. En base a esto, Fifis y Scopes (Fifis y Scopes, 1978) sugirieron que tanto la estructura terciaria como las regiones del sitio activo se encontraban conservadas.

#### 4.1.1 Clonado y expresión del gen que codifica para la fosfoglicerato quinasa-1 de *P. tricornutum* (PtrPGKasa-1) y purificación de la enzima.

La PtrPGKasa-1 (P. ID. 29157) es una enzima cloroplastídica, por lo que su secuencia completa, obtenida en la base de datos de *GenBank* (AF108451), presenta una pre-secuencia bipartita de localización subcelular en su extremo N-term, necesaria para su importación a través de las cuatro membranas que rodean el cloroplasto de diatomeas (Liaud y col., 2000). Con el fin de expresar la enzima en el sistema heterólogo de *E. coli*, se procedió al clonado molecular de la secuencia codificante exenta de la responsable de la expresión del péptido tránsito (Fig. 4.1.1). La decisión de dónde comenzar a expresar la proteína se basó en la información de la longitud y sitio de procesamiento de este péptido señal/tránsito descrito (Liaud y col., 2000). La amplificación del mismo se realizó mediante la técnica de RT-PCR, a partir de ARNm de *P. tricornutum*, y posterior PCR con el ADNc resultante como molde y los



oligonucleótidos específicos *Ptr*PGK1Fw y *Ptr*PGK1Rv (Tabla 3.1). Una vez obtenido el fragmento buscado (~ 1200 pares de bases), se clonó en el vector pGEM-T *Easy* y su secuencia fue confirmada por secuenciación completa.

		1	50
P1 clonada	(1)	-----KASIEDLS	
P1	(1)	MKFVQAAIFALAASASTTAAFAPAKTFGVRSFAPVSLIELEAKASIEDLS	
		51	100
P1 clonada	(9)	DAELKGKKVLVRCDVNVPLDGKKITDDTRIRSSIPTIEYLKNKGAIIVSVC	
P1	(51)	DAELKGKKVLVRCDVNVPLDGKKITDDTRIRSSIPTIEYLKNKGAIIVSVC	
		101	150
P1 clonada	(59)	SHLGRPKDGPEDKFSLGPCAERMGELLGQTVTLAPDCIGEEVAKIVNDAK	
P1	(101)	SHLGRPKDGPEDKFSLGPCAERMGELLGQTVTLAPDCIGEEVAKIVNDAK	
		151	200
P1 clonada	(109)	EGDVIMLENTRFYKEETKNDPEFVEKLAAPFDLYVNDAFGTAHRAHASTE	
P1	(151)	EGDVIMLENTRFYKEETKNDPEFVEKLAAPFDLYVNDAFGTAHRAHASTE	
		201	250
P1 clonada	(159)	GVTKFLKPSVGGFLLAKELEYLDGAISNGKKPMAAIVGGSKVSSKITVLE	
P1	(201)	GVTKFLKPSVGGFLLAKELEYLDGAISNGKKPMAAIVGGSKVSSKITVLE	
		251	300
P1 clonada	(209)	ALLDKCDKVIIGGGMVFTFLKAKGFNVGTSLVEDDFVDTAKEVLAKAEKL	
P1	(251)	ALLDKCDKVIIGGGMVFTFLKAKGFNVGTSLVEDDFVDTAKEVLAKAEKL	
		301	350
P1 clonada	(259)	GKEILLPIDIVIADKFDAAETKVVSAEEIPDGWMGLDNGPETTAQQKEA	
P1	(301)	GKEILLPIDIVIADKFDAAETKVVSAEEIPDGWMGLDNGPETTAQQKEA	
		351	400
P1 clonada	(309)	LSDCKTIIMNGPMGVFEFEKFAKGTFDLVNILADLSKDKGAITIIGGGDS	
P1	(351)	LSDCKTIIMNGPMGVFEFEKFAKGTFDLVNILADLSKDKGAITIIGGGDS	
		401	441
P1 clonada	(359)	VAATEQSGRAGDMSHISTGGGASLELLEGGKVLPGVAALNDK	
P1	(401)	VAATEQSGRAGDMSHISTGGGASLELLEGGKVLPGVAALNDK	

**Fig. 4.1.1:** Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la *Ptr*PGKasa-1 completa (P1) y de la *Ptr*PGKasa-1 clonada, sin la secuencia tránsito (P1 clonada).

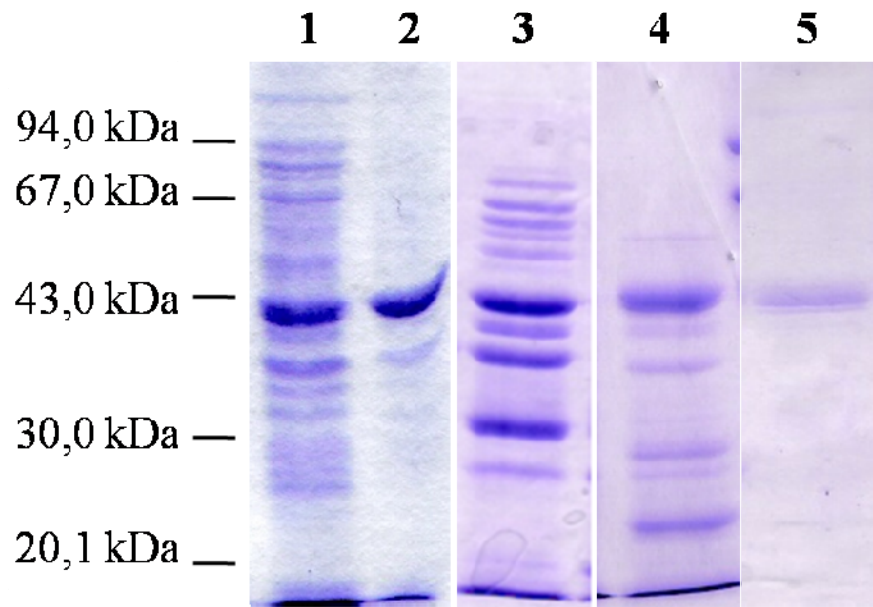
El gen con la secuencia correcta fue subclonado en el vector de expresión pET-24a y expresado en células de *E. coli* Rosetta (DE3) siguiendo el protocolo de inducción descrito en Materiales y Métodos. La proteína expresada en este sistema no presenta la adición de ninguna etiqueta que facilite su purificación o detección.

De esta forma se obtuvo la enzima *PtrPGKasa-1* (42,4 kDa) en forma soluble y activa, presentando una actividad enzimática específica (AEe) de 0,5 U/mg en el extracto crudo.

Para su purificación, se siguió la siguiente estrategia:

1. Disrupción celular mediante sonicado de las células en *buffer A* (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 1 mM, 2-ME 1 mM).
2. Fraccionamiento salino con sulfato de amonio en un corte 35-80 % de saturación.
3. Purificación de las proteínas precipitadas y resuspendidas en *buffer A*, por cromatografía hidrofóbica utilizando la resina *Phenyl Sepharose*. Elusión: gradiente salino con sulfato de amonio 30-0 % de saturación.
4. Desalado de las fracciones que presentaron AE fosfoglicerato quinasa, por cromatografía de tamiz molecular en columnas de *BioGel Fast Desalting*.
5. Cromatografía de pseudo-afinidad a colorantes, utilizando la resina *Blue A Sepharose*. Elusión: gradiente de NaCl 0-0,5 M.
6. Desalado de las fracciones con la AE buscada: *BioGel Fast Desalting*.
7. Purificación mediante cromatografía de afinidad, utilizando la resina *2',5'-ADP Sepharose*. Elusión: gradiente salino de NaCl 0-1 M.

De esta forma, se obtuvo una fracción con la enzima *PtrPGKasa-1* con un grado de pureza cercano al 82%, calculado con el programa *LabImage 2.7.0*. (Fig. 4.1.2) y AEe de 10,7 U/mg. La Tabla 4.1.1 muestra la tabla de purificación obtenida a lo largo del proceso.



**Fig. 4.1.2:** SDS-PAGE 12,5% de los extractos de la PGKasa en los pasos de purificación que se indican a continuación: 1: Extracto soluble luego del sonicado; 2: fracción insoluble; fracciones que presentaron AE luego de la cromatografía en columna de: 3: *Phenyl Sepharose*; 4: *Blue A Sepharose*; 5: *2',5'-ADP Sepharose*.

Paso	Volumen (ml)	Proteínas (mg/ml)	AEe (U/mg)	AE total (U)	Recup. (%)	Purif. (veces)
Extracto Crudo	30	5,5	0,5	82,5	100	1,0
<i>Phenyl Sepharose</i>	21	2,5	1,3	68,3	83	2,6
<i>Blue A</i>	6	1,6	5,6	53,8	65	11,2
<i>2',5'-ADP Sepharose</i>	3	0,9	10,7	28,9	35	21,4

**Tabla 4.1.1:** Tabla de purificación de la *PrrPGKasa-1* a lo largo del proceso de purificación descrito en el texto.

Cabe destacar que, como la *Ptr*PGKasa-1 recombinante no presenta la adición de ninguna etiqueta que facilite su purificación, es una posibilidad que durante el proceso descrito co-purificara la PGKasa propia del sistema de expresión. Para comparar los valores de AE intrínsecos con respecto a los del clon transformado, se lograron las siguientes construcciones:

- ✓ *E. coli* Rosetta [pET-24a]
- ✓ *E. coli* Rosetta [pET-24a/*Ptr*GapC1]
- ✓ *E. coli* Rosetta [pET-24a/*Ptr*PGKasa-1]

Se obtuvieron células que estuvieran transformadas con el plásmido de expresión vacío, y con el mismo plásmido ligado a un gen que codifica para otra enzima, en este caso para la Ga3PDHasa (*Ptr*GapC1, expresada en forma insoluble en este sistema heterólogo, en niveles similares a *Ptr*PGKasa-1). Este último se produjo teniendo en cuenta que es la forma más correcta de reproducir lo que ocurre en las células *E. coli* Rosetta [pET-24a/*Ptr*PGKasa-1], donde la maquinaria de transcripción y traducción de *E. coli* estaría abocada a la sobre-expresión de la proteína recombinante, disminuyendo tal vez la expresión de las proteínas propias de las células.

La inducción de los extractos fue hecha bajo las mismas condiciones: IPTG 0,2 mM, durante 16 h a 25 °C. Los extractos así obtenidos se sonicaron y se purificaron según el protocolo descrito (exceptuando el paso de purificación por cromatografía de afinidad). Finalmente, se compararon las AE de PGKasa de cada fracción para cada construcción, obteniéndose los valores mostrados en la Tabla 4.1.2.

	<b>AEe Crudo (U/mg)</b>	<b>AEe Phenyl Sephrose (U/mg)</b>	<b>AEe Blue A (U/mg)</b>
<i>E. coli</i> Rosetta [pET-24a]	0,1	0,25	0,49
<i>E. coli</i> Rosetta [pET-24a/ <i>Ptr</i> GapC1]	0,03	0,06	0,11
<i>E. coli</i> Rosetta [pET-24a/ <i>Ptr</i> PGKasa-1]	0,5	1,35	5,6

**Tabla 4.1.2:** Tabla de purificación de la PGKasa-1 para las construcciones *E. coli* Rosetta [pET-24a], *E. coli* Rosetta [pET-24a/*Ptr*GapC1] y *E. coli* Rosetta [pET-24a/*Ptr*PGKasa-1].

Con los valores presentados en la Tabla 4.1.2 se pudo concluir en primer lugar, que las células que contenían el vector de expresión ligado al gen de Ga3PDH<sub>asa</sub> presentaron menos AEE de PGK<sub>asa</sub> que las transformadas con el plásmido vacío, probando la hipótesis de que la maquinaria de expresión y traducción estaría abocada a la expresión del gen recombinante en cuestión. Finalmente, se pudo suponer que la AE obtenida con la construcción [pET-24a/*Ptr*PGK<sub>asa</sub>-1] fue principal y mayoritariamente (~ 98%) debida a la enzima recombinante de *P. tricornutum*.

#### 4.1.2 Caracterización estructural de la *Ptr*PGK<sub>asa</sub>-1.

La estructura de la PGK<sub>asa</sub> es monomérica y consta de dos dominios de similar tamaño, unidos por una cadena de aminoácidos flexible, que forma una bisagra donde se produce la catálisis. Cada dominio une un sustrato, siendo el N-terminal el que presenta el sitio de unión para 3PGA, mientras que el C-terminal es donde se da la interacción con ATP-Mg (Banks y col., 1979). Los sitios de unión a los sustratos se encuentran significativamente distantes entre ellos, no siendo posible la catálisis en esta conformación de la PGK<sub>asa</sub> llamada “abierta”. Sin embargo, la unión de ambos sustratos a la enzima conlleva un movimiento en una zona de la cadena peptídica flexible conocida como “bisagra” que acerca los dominios, permitiendo así la fosforilación del 3PGA para producir 1,3-bisPGA. La unión de sólo uno de sus sustratos no es suficiente para que se produzca este cierre en la conformación de la enzima, sino que es el complejo ternario PGK<sub>asa</sub>-(ATP-Mg)-3PGA el que presenta la conformación conocida como “cerrada”, en la que los dominios se acercan al rotar el C-terminal entre 12° y 30° (Bernstein y Hol, 1998; Lee y col., 2006).

Se realizaron estudios para caracterizar los aspectos estructurales de la *Ptr*PGK<sub>asa</sub>-1, incluyendo experiencias que ayuden a dilucidar la estructura cuaternaria y estudios *in silico* de modelado molecular de la enzima.

##### 4.1.2.1 Determinación de estructura cuaternaria de la *Ptr*PGK<sub>asa</sub>-1 mediante el método de Ferguson.

Con la finalidad de determinar la MM de la forma nativa de la *Ptr*PGK<sub>asa</sub>-1 y así conocer la estructura cuaternaria de la enzima, se llevó a cabo el método

desarrollado por Ferguson (ver Materiales y Métodos, apartado 3.32) (Ferguson, 1964). Para esto se realizaron PAGEs nativos de concentraciones de polímero 7,5; 8,5; 9,5 y 10,5 % y se sembraron en cada gel 2,6  $\mu\text{g}$  de enzima. Simultáneamente se analizaron marcadores de MM para realizar una curva de calibrado para interpolar el valor de  $K_D$  obtenido para la muestra. Los valores de  $K_D$  se encuentran en la Tabla 4.1.3.

Proteína	MM (kDa)	$K_D$	$\sqrt{K_D}$
Tiroglobulina	669	0,320	0,565
Ferritina	440	0,175	0,418
Catalasa	232	0,120	0,346
Lactato deshidrogenasa	140	0,082	0,287
Fosforilasa b	94	0,072	0,268
BSA	67	0,064	0,252
Ovoalbúmina	43	0,054	0,232
Anhidrasa carbónica	30	0,050	0,223
<i>Ptr</i> PGKasa-1	61,8	0,061	0,247

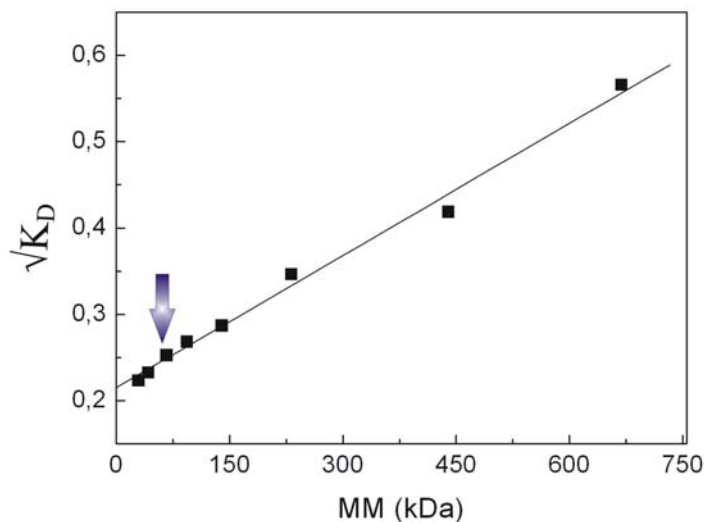
**Tabla 4.1.3:** Valores de MM,  $K_D$  y  $\sqrt{K_D}$  de los marcadores de MM y de la *Ptr*PGKasa-1.

En la Fig. 4.1.3 se observa el ajuste lineal de la curva de la raíz cuadrada de  $K_D$  en función de la MM, del que surge la ecuación:

$$MM = \frac{\sqrt{K_D} - 0,216}{5 \cdot 10^{-4}}$$

De esta relación surge el valor de 61,8 kDa (Tabla 4.1.3). Esta masa corresponde a 1,46 veces el monómero de la *Ptr*PGKasa-1, lo que podría deberse a que, en ausencia de los sustratos, la conformación de la enzima sería la de un monómero laxo, de

conformación abierta por lo que el radio de Stokes sería mayor al esperado para una proteína de igual masa pero de forma globular.



**Fig. 4.1.3:** Curva de calibrado de  $\sqrt{K_D}$  en función de las MM de los marcadores de MM. La flecha indica la posición de la *PtrPGKasa-1* en la gráfica.

#### 4.1.2.2 Determinación de la estructura cuaternaria de la *PtrPGKasa-1* mediante cromatografía de exclusión molecular.

Se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando la resina *Superdex 200 Prep. Grade* (Amersham). La altura de la columna fue de 32 cm, con diámetro interno de 1 cm (volumen de lecho 25 ml). En primer lugar se sembraron proteínas globulares de MM conocidas como marcadores, de forma de realizar una curva estándar para luego inferir la MM de la *PtrPGKasa-1* según el tiempo de elusión ( $t_e$ ) de la misma.

En la Tabla 4.1.4 se muestran los tiempos de elusión de las proteínas utilizadas como patrón y de la *PtrPGKasa-1*. Se realizó la gráfica de log MM de estas proteínas estándar en función del  $t_e$  de la columna de exclusión molecular (Fig. 4.1.4). Al realizar

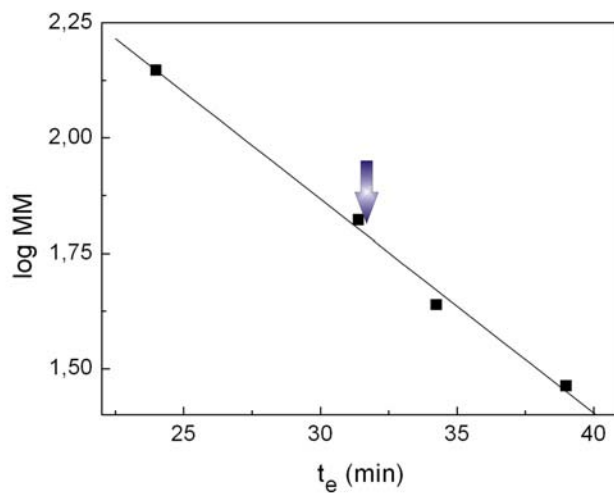
el ajuste lineal de la curva, se obtuvo la siguiente ecuación, la que permitió calcular la masa de la *PtrPGKasa-1*:

$$\log MM = 3,259 - 0,046 \cdot t_e$$

Proteína	MM (kDa)	$t_e$ (min)
Anhidrasa carbónica	30	39,00
Ovoalbúmina	43	34,25
BSA	67	31,40
IgG de suero equino	140	24,00
<i>PtrPGKasa-1</i>	61,44	31,70

**Tabla 4.1.4:** Valores de MM, y  $t_e$  de los marcadores de MM y de la *PtrPGKasa-1*.

La identidad del pico de la PGKasa-1 eluído fue comprobada por medida de actividad enzimática de PGKasa y por SDS-PAGE. Así, la MM obtenida es de 61,44 kDa, coherente con lo explicado en el apartado anterior.



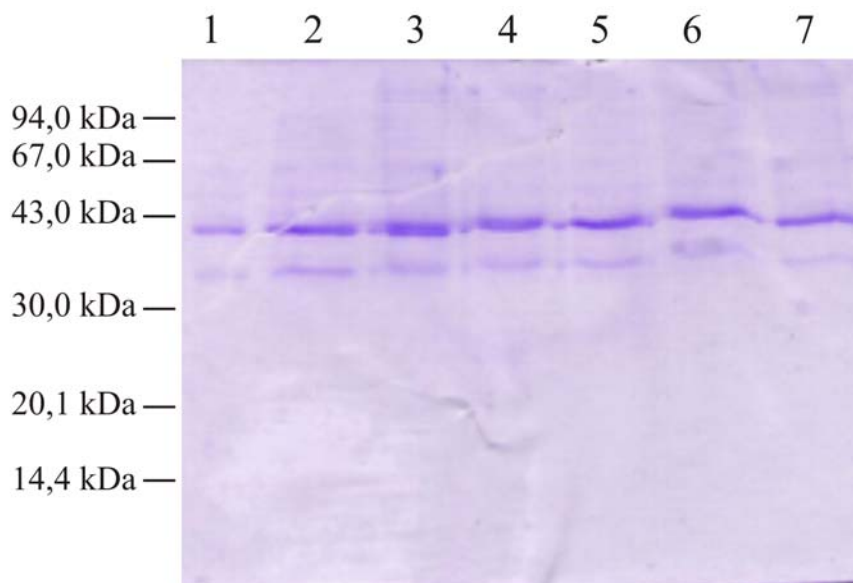
**Fig. 4.1.4:** Curva estándar de  $\log MM$  en función de los tiempos de elución de los marcadores de MM. La flecha indica la posición de la *PtrPGKasa-1* en la gráfica.



#### 4.1.2.3 Determinación de la estructura cuaternaria de la *PtrPGKasa-1* mediante la técnica de entrecruzamiento.

Se llevó a cabo el entrecruzamiento de la *PtrPGKasa-1* con bis(sulfosuccinimidil)suberato con la finalidad de inferir sobre el estado de oligomerización de la misma. Cabe destacar que el éxito del mismo depende de la presencia de aminas primarias cercanas entre distintas subunidades. La incubación se realizó en ausencia y presencia de los sustratos de la enzima: ATP 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y 3PGA 5 mM, en *buffer* MOPS-NaOH pH 8,0. Las muestras así obtenidas fueron sometidas a corrida electroforética en SDS-PAGE al 12,5%. También se incluyó en el gel una muestra conteniendo la enzima sin entrecruzante, como control.

Como se observa en la Fig. 4.1.5, no se advierten bandas de MM distinta a la del monómero.



**Fig. 4.1.5:** SDS-PAGE 12,5% del entrecruzamiento con BS 0,1 mM de la *PtrPGKasa-1*. **1:** Enzima sin tratar; **2:** Enzima tratada, sin BS; **3-7:** Enzima tratada con BS, en presencia de los sustratos: **3:** ninguno; **4:** ATP, MgCl<sub>2</sub> y 3PGA 5 mM; **5:** ATP 5 mM; **6:** ATP y MgCl<sub>2</sub> 5 mM; **7:** 3PGA 5 mM.

Con los resultados expuestos en los apartados 4.1.2.1, 4.1.2.2 y 4.1.2.3, se puede concluir que la conformación de la *PtrPGKasa-1* sería la de un monómero, como está descrito para enzimas de otros organismos, y que en ausencia de sus sustratos la

configuración de la subunidad sería abierta, presentando un radio de Stokes mayor y por lo tanto aparentando una MM superior a la predicha para una proteína globular.

#### 4.1.2.4 Modelado molecular de la *PtrPGKasa-1*.

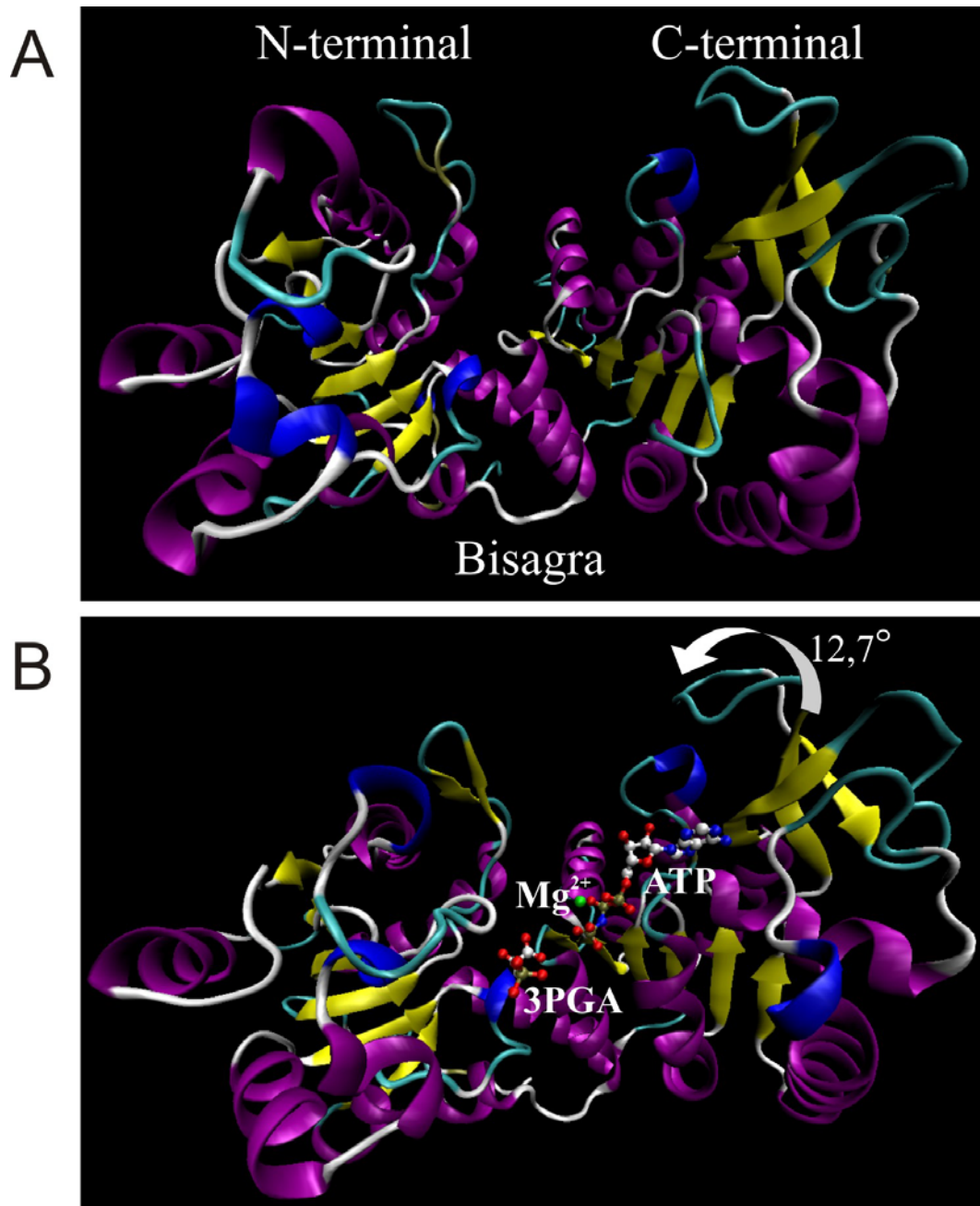
Con la finalidad de visualizar las conformaciones que adopta la *PtrPGKasa-1*, se decidió realizar modelos tridimensionales de la misma en sus conformaciones abierta y cerrada. Para esto fue necesario contar con estructuras cristalinas de enzimas de alta homología con la *PtrPGKasa-1*, para utilizar como molde. Como se dijo, existe gran similitud entre la mayor parte de las PGKasas por ser ésta una enzima muy conservada a lo largo de la evolución. Se eligieron como molde para el modelado molecular:

✓ PGKasa de *Thermotoga maritima* (PDB ID: 1VPE): Conformación cerrada, cristalizada en presencia de ATP-Mg y 3PGA. Presenta 51,7% de identidad con la enzima de *P. tricornutum*.

✓ PGKasa de *Thermus caldophilus* (PDB ID: 2IE8): Cristalizada en ausencia de sustratos (conformación abierta). La identidad con la *PtrPGKasa-1* es del 44,4%.

✓ PGKasa de *Sus scrofa* (PDB ID: 1VJC): Cristalizada en presencia de 3PGA (conformación abierta). La identidad con la *PtrPGKasa-1* es del 44,4%.

Se construyeron 50 modelos tridimensionales de la *PtrPGKasa-1* utilizando como molde a las enzimas descriptas. Luego de un meticuloso análisis de los mismos, se eligió uno de cada conformación (Fig. 4.1.6), en base a sus valores de energía y sus perfiles 1D/3D. Según el servidor gratuito de internet *DynDom (Protein Domain Motion Analysis)*, al unirse ambos sustratos a la enzima se produciría una rotación de 12,7° del dominio C-terminal sobre el N-terminal, provocando un “cierre” en la molécula del 20,2%, lo que permite que los sustratos se acerquen y se produzca la catálisis. Los residuos responsables de este movimiento serían: Leu-180 a Lys-189, Glu-208 a Ala-209, Asp-212 a Lys-213 y Asp-370 a Ile-374.



**Fig. 4.1.6:** Modelos tridimensionales de la *PtrPGKasa-1* en su conformación abierta (A) y cerrada en presencia de los sustratos (B). La enzima se muestra en representación *Cartoon* y coloreada por estructura secundaria. En (A) se indican los dominios C- y N-terminal y la zona de bisagra. En (B) se indica la rotación de 12,7° que ocurre en el complejo ternario y los sustratos, representados como *ball and stick* y coloreados por elemento (C blanco, N azul, P tostado, O rojo, Mg verde).

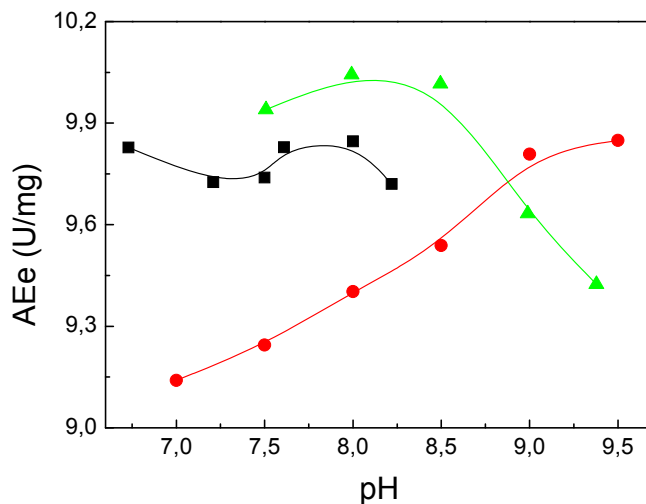
#### 4.1.3 Caracterización funcional de la PtrPGKasa-1.

Se evaluó la AE de la PtrPGKasa-1 en el sentido fisiológico cloroplastídico (ciclo de Calvin), es decir la fosforilación del sustrato 3PGA a 1,3-bisPGA. La enzima recombinante purificada presentó una AEe de 10,7 U/mg proteína, en presencia de ATP 5 mM, 3PGA 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y 2-ME 10 mM.

##### 4.1.3.1 Dependencia de la actividad con el pH.

Se procedió a determinar el pH y compuesto químico regulador óptimos para la actividad de la PtrPGKasa-1. Para tal fin se preparó cada medio de reacción con el *buffer* indicado, se adicionó la enzima en dilución adecuada e inmediatamente después se inició la reacción por agregado del sustrato 3PGA, sin incubación previa. Es decir, se midió la capacidad de catálisis de PtrPGKasa-1 a cada pH, no la estabilidad de la misma. Los *buffers* utilizados fueron: Tris-HCl pH 7,5; 8,0 y 9,0; MOPS-NaOH pH 6,7; 7,2; 7,6; 7,5; 8,0 y 8,2, y Tricina pH 7,0; 7,5; 8,0, 8,5; 9,0 y 9,5, todos en concentraciones de 50 mM.

Los resultados, expuestos en la Fig. 4.1.7, llevaron a determinar que el pH óptimo de trabajo es pH 8,0 y el *buffer* a utilizar es Tris-HCl. Cabe destacar que se midió la AE de la enzima acoplada (Ga3PDHase) en las distintas condiciones, descartándola así como responsable de lo observado.

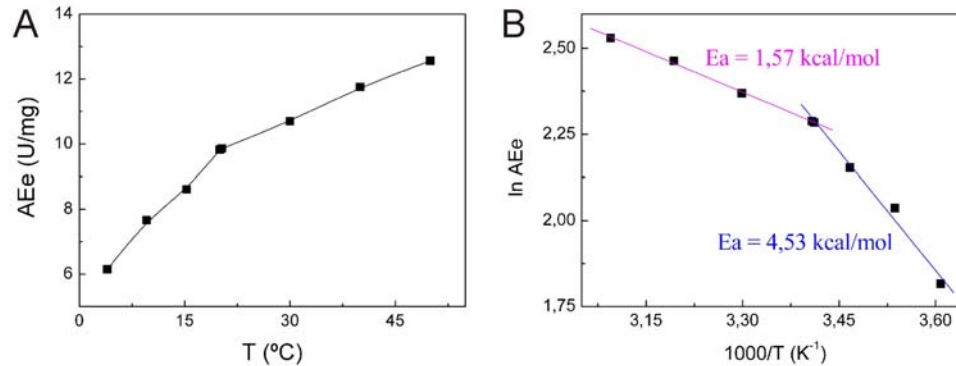


**Fig. 4.1.7:** Curva de AEe en función del pH y del *buffer* utilizado (50 mM): MOPS-NaOH (■), Tricina (●) y Tris-HCl (▲).

#### 4.1.3.2 Dependencia de la actividad enzimática con la temperatura y cálculo de la Energía de activación (Ea).

Se continuó con la búsqueda de la temperatura óptima para la actividad de la *PtrPGKasa-1*. Para esto se incubó el medio de reacción a cada temperatura indicada durante 10 min y se inició la reacción con la adición de la enzima conservada a 4 °C, midiéndose así la capacidad de catálisis de la *PtrPGKasa-1* a cada temperatura. Como se observa en la Fig. 4.1.8 (A), la capacidad de catálisis aumenta con la temperatura, hasta la temperatura medida (50 °C), obteniéndose una gráfica con dos tendencias distintas que se corresponden con las dos pendientes que muestra el gráfico de Arrhenius (Fig. 4.1.8, B), de las cuales se calcularon dos energías de activación (Ea) diferentes. De la pendiente que corresponde al intervalo de 4 a 20 °C se obtuvo una Ea = 4,53 kcal/mol (18,96 kJ/mol), valor similar al obtenido para enzimas de animales (Stewart y Scopes, 1978), y de la que corresponde a temperaturas mayores a los 20 °C se calculó una Ea = 1,57 kcal/mol (6,55 kJ/mol). Así, la *PtrPGKasa-1* adquiriría una conformación distinta, que conduciría a una menor Ea al superar la temperatura de 20 °C. Está descrito para PGKasas de levaduras esta disminución en la energía de

activación a partir de 20 °C, efecto atribuido a una disminución en la barrera de entalpía al aumentar la temperatura (Dryden y col., 1992).



**Fig. 4.1.8:** (A) Curva de AEE en función de la temperatura. (B) Gráfica de Arrhenius utilizando los datos de la curva de actividad de (A).

En vista de los resultados obtenidos, se medirá AE a 30 °C para asegurar la máxima catálisis de la *PtrPGKasa-1*.

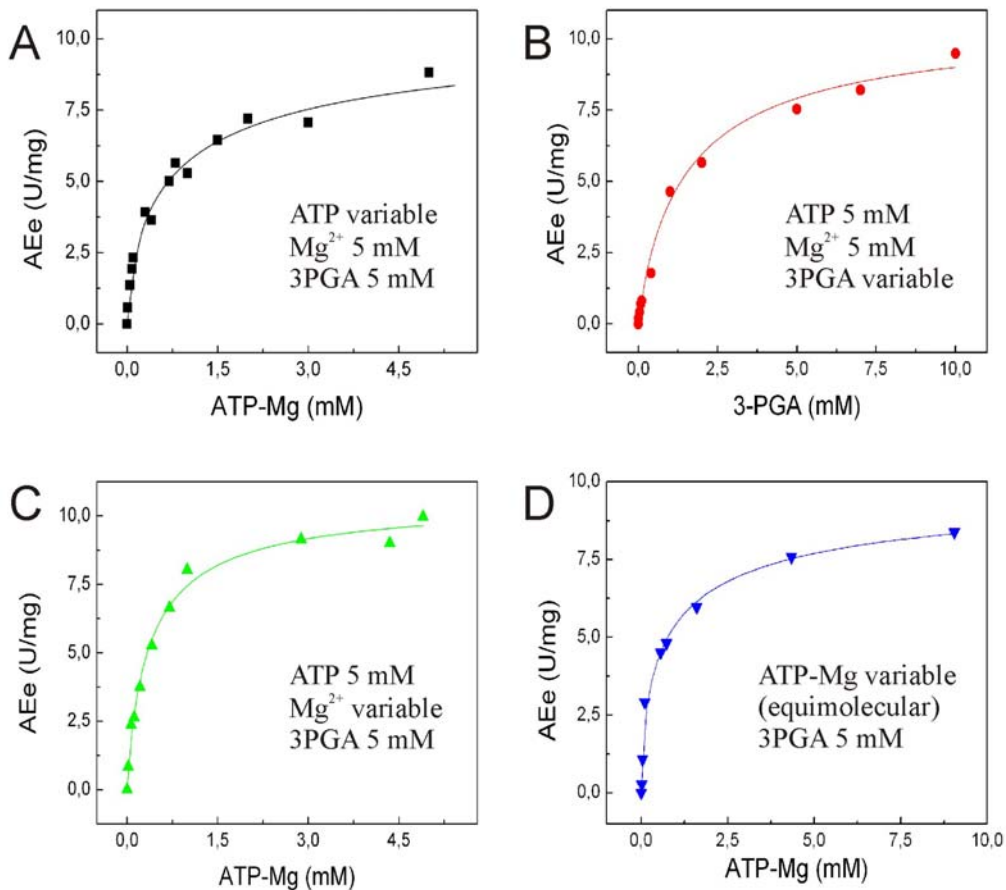
De la misma forma que con la curva de pH, se ensayó la AE de la *Ga3PDH*asa utilizada en el acople de la medida enzimática de la *PGKasa*, no mostrando efecto considerable.

#### 4.1.3.3 Obtención de los parámetros cinéticos.

Se procedió a la obtención de los parámetros cinéticos  $S_{0,5}$  (concentración de sustrato que corresponde al 50 % de la velocidad máxima) y  $n_H$  (coeficiente de Hill) para cada sustrato. Para esto se realizaron curvas de AEE en función de la concentración de un sustrato, manteniendo al resto de los componentes en concentraciones saturantes (Fig. 4.1.9). A partir de estas gráficas y utilizando la ecuación de Hill, se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 4.1.5. Las respectivas concentraciones saturantes de los sustratos y cofactor esencial fueron:  $[ATP] = [3PGA] = [MgCl_2] = 5$  mM. Las concentraciones reales de ATP-Mg fueron obtenidas según:

$$C = \frac{(K_d + M + S) - \left( (K_d + M + S)^2 - 4 \cdot M \cdot S \right)^{1/2}}{2}$$

donde C es la concentración del complejo ATP-Mg, M es la concentración total de  $Mg^{2+}$ , S es la concentración total de ATP y  $K_d$  es la constante de disociación del complejo, en este caso igual a 0,1 mM (Morrison y col., 1961). Se ha descrito que el verdadero sustrato de la PGKasa es el complejo ATP-Mg (Joao y Williams, 1993), por lo que las gráficas de saturación de los sustratos ATP y  $Mg^{2+}$  se graficaron en función de la concentración de este complejo (Fig. 4.1.9, A y C).



**Fig. 4.1.9:** AEE en función de la concentración de los sustratos, siendo el sustrato variable: ATP (A), 3PGA (B),  $Mg^{2+}$  (C), ATP-Mg (D) Los datos de cada gráfica se ajustaron a la ecuación de Hill mediante el uso del programa *Origin 7.0*, obteniendo así los valores de los parámetros cinéticos.

	$S_{0,5}$ (mM)	$n_H$	$V_M$ (U/mg)
3PGA	$1,55 \pm 0,19$	$1,0 \pm 0,1$	10,7
ATP-Mg (sustrato variable ATP; $Mg^{2+}$ 5 mM)	$0,89 \pm 0,10$	$0,6 \pm 0,1$	
ATP-Mg (sustrato variable $Mg^{2+}$ ; ATP 5 mM)	$0,36 \pm 0,04$	$0,9 \pm 0,1$	
ATP-Mg (equimoleculares)	$0,83 \pm 0,09$	$0,6 \pm 0,1$	

**Tabla 4.1.5:** Parámetros cinéticos:  $V_M$ ,  $S_{0,5}$  y  $n_H$ , obtenidos ajustando los datos de las curvas de la Fig. 4.1.9 a la ecuación de Hill.

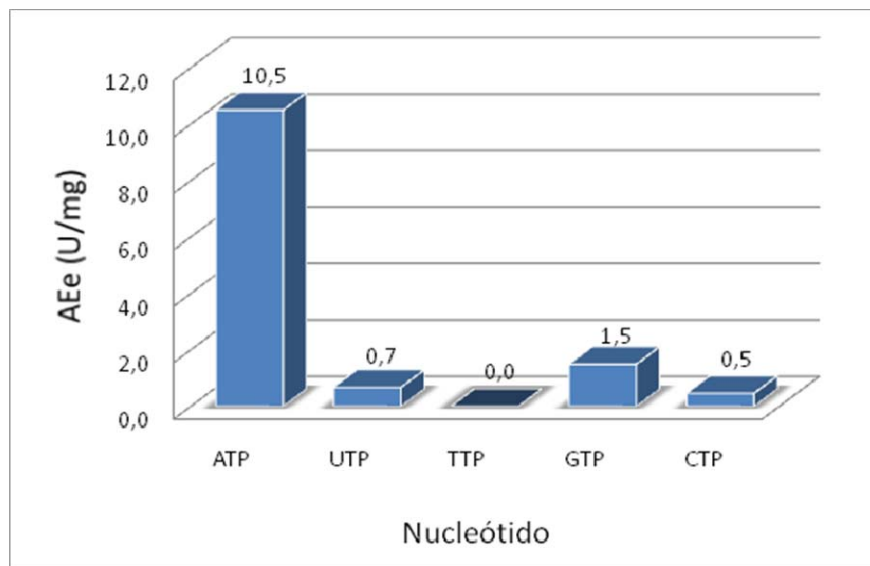
Los valores de los parámetros cinéticos detallados en la Tabla 4.1.5 son similares a los reportados para las enzimas de otros organismos (Kuntz y Krietsch, 1982; Pawluk y col., 1986; Zomer y col., 1998). Como puede observarse en la Fig. 4.1.9 y en la Tabla 4.1.5, los valores de  $S_{0,5}$  y  $n_H$  para el sustrato ATP-Mg varían según las condiciones en las que se realizaron las experiencias. Así, al realizar la curva de saturación de ATP, existe un exceso de  $Mg^{2+}$  en el medio de reacción cuando las concentraciones de ATP son bajas (Fig. 4.1.9, A). En este caso, los parámetros resultantes son idénticos a los de la curva de ATP-Mg equimoleculares en la que no existe exceso de ninguno de estos dos sustratos (Fig. 4.1.9, D). En cambio, en la curva en la que se varía la concentración de  $Mg^{2+}$  (Fig. 4.1.9, C), existe un exceso de ATP al comienzo de la curva y los parámetros resultantes se ven modificados. Esto sugiere que el ATP libre actuaría como modificador de la enzima, efecto que se estudiará en el apartado 4.1.3.8.

#### 4.1.3.4 Estudio de sustratos alternativos.

Se ensayó la actividad de la *Ptr*PGKasa-1 con sustratos alternativos al ATP, manteniendo  $[3PGA] = [MgCl_2] = 5$  mM. Las moléculas ensayadas fueron UTP, TTP, GTP y CTP, todos en concentraciones de 5 mM. Los resultados, mostrados en la Fig. 4.1.10, señalan que la *Ptr*PGKasa-1 es capaz de utilizar GTP como sustrato para la



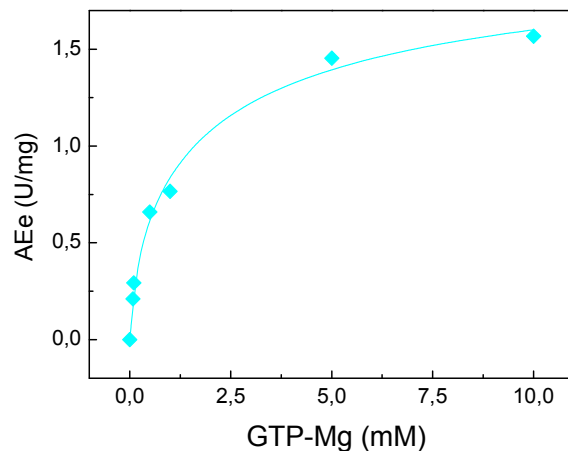
fosforilación del 3PGA, produciendo, a esta concentración de sustrato, una velocidad de reacción del 14% con respecto a la obtenida con ATP.



**Fig. 4.1.10:** Gráfica de AEe para los sustratos nucleotídicos alternativos: UTP, TTP, GTP y CTP, todos en concentración 5 mM.  $[3\text{PGA}] = [\text{MgCl}_2] = 5 \text{ mM}$ . Sobre cada barra se indican los valores de AEe.

#### 4.1.3.4.1 Obtención de parámetros cinéticos utilizando GTP como nucleótido alternativo.

En vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se procedió a realizar la curva de saturación de GTP ( $[3\text{PGA}] = [\text{MgCl}_2] = 5 \text{ mM}$ ) y a calcular los parámetros  $V_M$ ,  $S_{0,5}$  y  $n_H$  (Fig. 4.1.11 y Tabla 4.1.6). Al comparar las constantes obtenidas para GTP-Mg y ATP-Mg, puede observarse que el descenso de la velocidad máxima de reacción (menor constante catalítica) y la disminución en la afinidad de la *PtrPGKasa-1* por GTP-Mg (mayor  $S_{0,5}$ ) son responsables de la menor eficiencia catalítica de la enzima cuando utiliza GTP como sustrato de la fosforilación. No obstante, la mayor incidencia en esta disminución es debida a la constante catalítica.



**Fig. 4.1.11:** Curva de saturación de GTP, graficado como AEe en función de la concentración de GTP-Mg. [3PGA] = [MgCl<sub>2</sub>] = 5 mM. A cada gráfica se le ajustó la ecuación de Hill mediante el uso del programa *Origin 7.0*, obteniendo así los valores de los parámetros cinéticos.

Parámetro / Sustrato	ATP-Mg	GTP-Mg
$V_M$ (U/mg)	$10,7 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,3$
$S_{0,5}$ (mM)	$0,89 \pm 0,09$	$1,52 \pm 0,09$
$n_H$	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
Eficiencia catalítica $K_{cat}/S_{0,5}$ (mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	500	60

**Tabla 4.1.6:** Parámetros cinéticos:  $V_M$ ,  $S_{0,5}$ ,  $n_H$ , y eficiencia catalítica obtenidos ajustando a la ecuación de Hill las gráficas de saturación de ATP-Mg y GTP-Mg.

#### 4.1.3.5 Estudio de efectos reguladores por metabolitos.

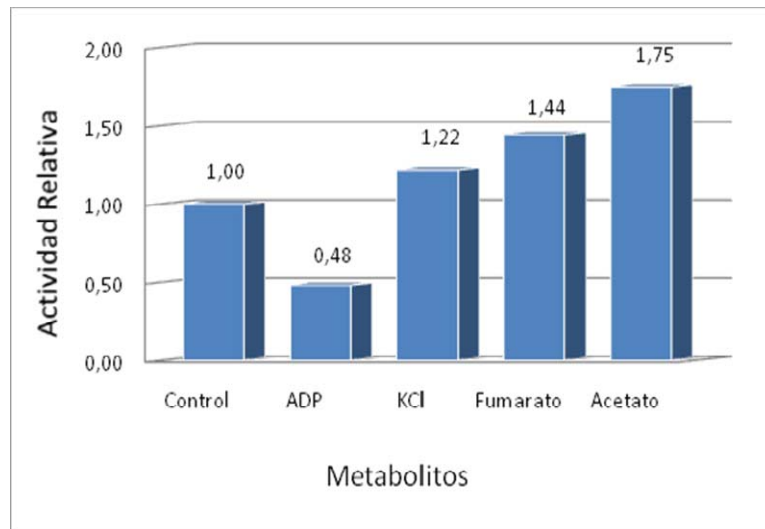
Se analizó la actividad de la *PtrPGKasa-1* ante la presencia de metabolitos intermediarios en vías metabólicas del C para estudiar si alguno de ellos resultaba efector de la enzima. Para esto se adicionó al medio de reacción el compuesto a la concentración indicada a continuación (concentraciones elegidas en base a bibliografía sobre regulación de las PGKasas de otros organismos). Sólo se realizó el estudio de

inhibición con concentraciones saturantes de los sustratos. Cabe destacar que se realizaron todos los controles para asegurar que los efectos observados no fueran causados sobre la enzima de acople en el medio de reacción.

Las moléculas ensayadas pueden dividirse en tres grupos:

- *Compuestos que no resultaron efectores de la PtrPGKasa-1:* Glc-6P (2 mM), fructosa-6P (2 mM), FBP (2 mM), fosfoenolpiruvato (2 mM), piruvato (2 mM), Pi (2 mM), PPI (2 mM), ribosa-5P (2 mM), ADP-Glc (2 mM), Glc-1P (2 mM), trehalosa (2 mM), oxalacetato (30 mM), isocitrato (30 mM), glutamina (30 mM), Cis-aconitato (30 mM),  $\alpha$ -ceto-glutarato (30 mM), citrato (30 mM), aspartato (30 mM), glutamato (9 mM), GTP (2 mM), AMP (2 mM), ITP (2 mM), UTP (2 mM), TTP (2 mM).
- *Compuesto que produjo inhibición leve:* ADP (2 mM) (Fig. 4.1.12).
- *Compuestos que tuvieron un leve efecto activador:* fumarato (30 mM), acetato de sodio (200 mM), KCl (30 mM) (Fig. 4.1.12).

En la Fig. 4.1.12 puede observarse que los metabolitos que resultaron activadores e inhibidores no presentaron un efecto marcado en la actividad de la PtrPGKasa-1, a excepción del ADP (producto de la reacción catalizada por la PGKasa-1) y del acetato de sodio, de los que se hablará en los próximos apartados.



**Fig. 4.1.12:** Gráfica de la Actividad Relativa (respecto al Control sin efector) de los metabolitos que presentaron un leve efecto en la actividad de la PtrPGKasa-1. ADP: 2 mM, KCl: 30 mM, fumarato: 30 mM, acetato de sodio: 200 mM.

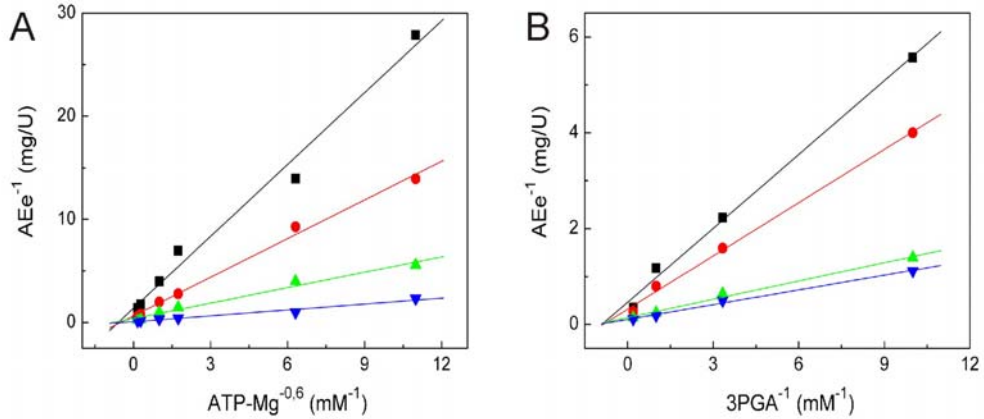
#### 4.1.3.6 Estudio del mecanismo de reacción de *PtrPGKasa-1*.

La *PtrPGKasa-1* cataliza una reacción de dos sustratos que son utilizados para formar dos productos, es decir, un mecanismo bi-bi. Existen varios mecanismos por los cuales una enzima puede llevar a cabo este tipo de reacción, algunos de ellos son (Copeland, 2005):

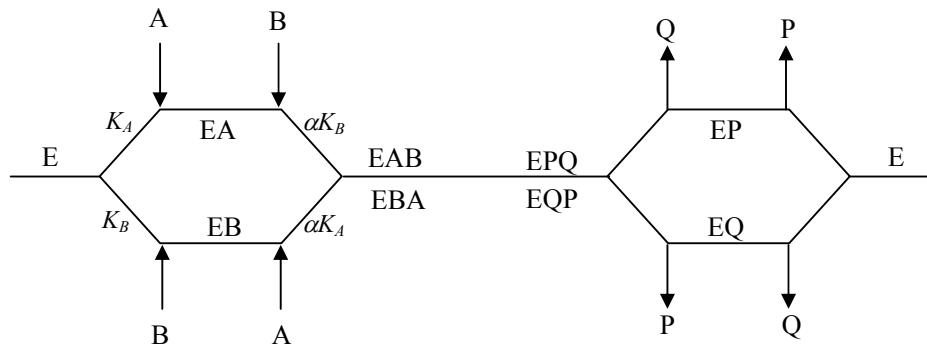
- *ping pong*
- secuencial al azar
- secuencial ordenado

En el mecanismo *ping pong*, tras la unión del primer sustrato se libera uno de los productos, en una reacción parcial en la que se genera una forma modificada de la enzima. Esta forma une al siguiente sustrato, catalizando la formación del segundo producto con regeneración de la forma nativa de la enzima. Contrariamente, en el mecanismo *secuencial* existe la unión de ambos sustratos al centro activo de la enzima antes de producirse la catálisis y liberación de los productos. Este mecanismo presenta dos variables: *al azar*, cuando la formación del complejo ternario de la enzima con sus dos sustratos es independiente del orden de unión de los sustratos; y *ordenada*, si la formación de este complejo debe producirse en un orden determinado para que el mismo sea productivo desde el punto de vista catalítico (Copeland, 2005).

Para dilucidar el mecanismo de reacción de la *PtrPGKasa-1*, se realizaron gráficas de A/Ee en función de ATP-Mg (en presencia de  $Mg^{2+}$  en exceso), a varias concentraciones fijas del 3PGA, y viceversa (Fig. 4.1.13). Si al graficar los dobles recíprocos, las rectas se cortan en un punto, entonces se trata de un mecanismo secuencial. Si, en cambio, las rectas resultan paralelas, se está frente a una enzima con mecanismo *ping pong*. Por lo observado en la Fig. 4.1.13, se trata de un mecanismo secuencial. Por otro lado, se ha logrado cristalizar las PGKasas con uno u otro sustrato unido (Watson y col., 1982; Lee y col., 2006). Por lo tanto, en base a ambas evidencias, se trata de un mecanismo secuencial al azar, como el que se muestra en la Fig. 4.1.14.



**Fig. 4.1.13:** Representación de dobles recíprocos de AEe en función de la concentración de ATP-Mg (A) y de 3PGA (B), ambas elevadas a su correspondiente  $n_H$ , a varias concentraciones fijas del otro sustrato (5 mM). Concentración del sustrato variable: (A) 0,1 mM (■); 0,3 mM (●); 1 mM (▲) y 5 mM (▼); (B) 0,5 mM (■); 1 mM (●); 5 mM (▲) y 10 mM (▼).



**Fig. 4.1.14:** Esquema del mecanismo de reacción secuencial al azar, según la nomenclatura de Cleland (Cleland, 1963). E: *P<sub>tr</sub>*PGKasa-1, A: ATP-Mg, B: 3PGA, P: ADP-Mg, Q: 1,3-bisPGA.

La ecuación que describe el mecanismo de reacción secuencial al azar es:

$$\frac{v}{V_M} = \frac{[A][B]}{\alpha K_A K_B + \alpha K_A [B] + \alpha K_B [A] + [A][B]}$$

donde [A] y [B] son las concentraciones de ATP-Mg y 3PGA,  $K_A$  y  $K_B$  son las constantes de disociación de la PGKasa-ATP-Mg y PGKasa-3PGA, respectivamente, y  $\alpha$  es el factor por el cual la unión de un sustrato modifica la constante disociación del otro. Por lo observado en la Fig. 4.1.13, el punto de intersección de todas las rectas sería

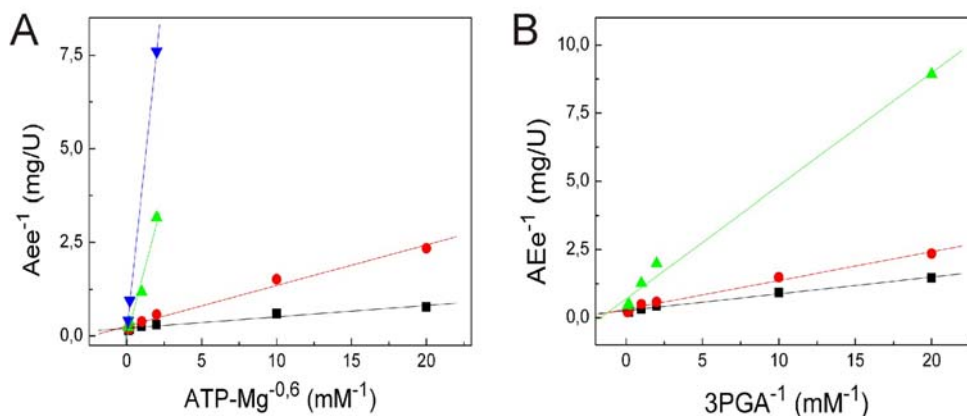
sobre la absisa ( $y = 0$ ), por lo que  $\alpha$  sería igual a uno y la unión de un sustrato no alteraría la unión del otro (Segel, 1993). En este caso, la absisa al origen para cada representación sería igual a  $-1/K_A$  y  $-1/K_B$ . Así,  $K_A$  es igual a 1,42 mM y  $K_B$ , 1,15 mM.

#### 4.1.3.7 Inhibición producida por ADP.

Para aportar mayor evidencia al mecanismo de reacción, se estudió la inhibición causada por ADP, uno de los productos de reacción, ya que el patrón de inhibición va a ser representativo del mecanismo seguido por la *PtrPGKasa-1* (Copeland, 2005). Cabe aclarar que no fue posible estudiar el patrón de inhibición seguido por el otro producto, 1,3-bisPGA, ya que es muy inestable y se descompone velozmente.

Un inhibidor que se une exclusivamente a la enzima libre se llama competitivo, ya que la unión del sustrato y la del inhibidor a la enzima son mutuamente excluyentes y produce un aumento del  $S_{0,5}$  aparente. Por otro lado, si además de unirse a la enzima libre puede hacerlo al complejo enzima-sustrato, se lo llama inhibidor mixto; en este caso, si la afinidad aparente por la enzima libre y el complejo enzima-sustrato son iguales, la inhibición es no competitiva, no se afecta el  $S_{0,5}$  aparente y disminuye la  $V_M$ . Si, en cambio, sólo puede interaccionar con el complejo enzima-sustrato, es un inhibidor acompetitivo, y produce una alteración de ambos parámetros en la misma dirección. PGKasa es una enzima bisustrato y la forma en que se comporta el inhibidor con respecto a cada sustrato va a depender del mecanismo de reacción de la enzima (Copeland, 2005).

Se realizaron curvas de cada sustrato a distintas concentraciones del inhibidor, con la finalidad de conocer el tipo de inhibición producida por ADP. De la forma que adopten las gráficas de los dobles recíprocos dependerá el tipo de inhibidor del que se trata. En la Fig. 4.1.15 se observa que esta inhibición es competitiva con respecto a ATP-Mg (A) y no competitiva con respecto a 3PGA (B). Cabe aclarar que, en (B), los  $S_{0,5}$  parecen iguales o muy similares y el efecto mayoritario se observa sobre la  $V_M$ , por lo que la inhibición resulta no competitiva. Este patrón de inhibición es coherente con el mecanismo de reacción secuencial al azar hallado en el apartado anterior (Copeland, 2005).



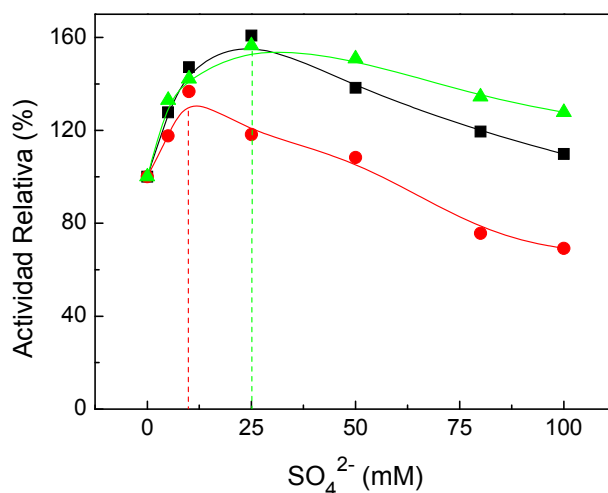
**Fig. 4.1.15:** Curvas de dobles recíprocos de AEE en función de la concentración de ATP-Mg (A) y de 3PGA (B), ambas elevadas a su correspondiente  $n_H$ , a distintas concentraciones de ADP: 0 mM (■); 0,1 mM (●); 1 mM (▲) y 5 mM (▼).

#### 4.1.3.8 Doble efecto de iones sobre la *PtrPGKasa-1*

Se ha descrito que algunos iones, como sulfato, fosfato y acetato, en menor medida, afectan la actividad de la PGKasa activándola a bajas concentraciones del efector e inhibiéndola cuando se encuentran en grandes cantidades (Scopes, 1978b). Este comportamiento peculiar se debe a la existencia de un sitio de unión de aniones que se solapa parcialmente con el sitio de unión del 3PGA. La constante de disociación del producto de la reacción 1,3-bisPGA de la enzima es muy baja (para levaduras: 0,05  $\mu\text{M}$ ), es decir, su unión es realmente fuerte, mucho mayor que la de los sustratos ( $K_d^{3\text{PGA}} = 0,036 \text{ mM}$  para la enzima de levaduras). Se ha descrito que los aniones, al unirse a bajas concentraciones a este sitio propuesto, favorecerían la liberación del producto y por lo tanto la catálisis, aumentando la velocidad de reacción. En cambio, a altas concentraciones, estos aniones actuarían como inhibidores competitivos del 3PGA (Watson y col., 1982; Joao y Williams, 1993). Si bien en el caso de proteínas oligoméricas alostéricas en las que el sustrato se une en forma cooperativa se ha planteado la posibilidad que un inhibidor competitivo actúe como un activador a bajas concentraciones, la enzima en estudio es monomérica, por lo que se supone que ambos efectos no pueden ser causados por la unión del anión a precisamente el mismo sitio.

En la Fig. 4.1.16 se observa que a bajas concentraciones del ión sulfato existe un efecto activador sobre la *PtrPGKasa-1*, y que a partir de una cierta concentración,

aparece un efecto inhibitorio (curva negra). Es notable que cuando la concentración de 3PGA es no saturante (curva roja), el efecto inhibitorio se hace evidente a menores concentraciones del ión, lo que es coherente con la inhibición competitiva del sulfato con respecto al 3PGA. En cambio, cuando la concentración de ATP es del orden del  $S_{0,5}$  y la de 3PGA es saturante (curva verde), el efecto inhibitorio del sulfato disminuye ligeramente.



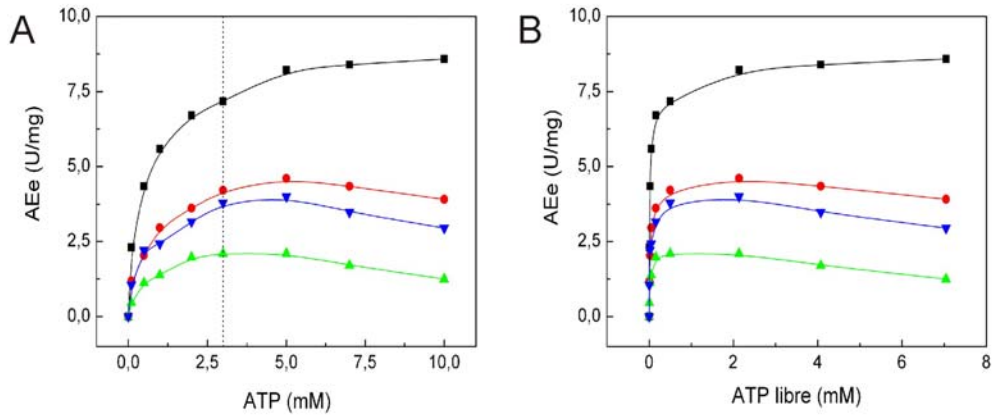
**Fig. 4.1.16:** Curvas de Actividad Relativa (siendo 100% la AEE en ausencia de sulfato, en cada condición) en función de la concentración de sulfato. Concentraciones de sustratos: ATP 1 mM, 3PGA 5 mM (■); ATP 5 mM, 3PGA 1 mM (●); ATP 5 mM, 3PGA 5 mM (▲).  $[MgCl_2] = 5$  mM en todas las curvas. En líneas de puntos se indican los máximos de las curvas negra y verde (---), y roja (---).

Este efecto causado por sulfato es también producido por el ATP libre, es decir cuando no está unido a  $Mg^{2+}$ . Así, la *P<sub>tr</sub>PGKasa-1* tiene dos sitios de unión para ATP: uno catalítico, al que se uniría el complejo ATP-Mg, y uno alternativo (sitio de unión a aniones), al que se uniría el ATP libre y actuaría de la misma forma que los iones descriptos (Watson y col., 1982).

Como inhibidor competitivo, el efecto del ATP sobre la actividad de la *P<sub>tr</sub>PGKasa-1* sólo es visible a concentraciones no saturantes de 3PGA, ya que no modifica  $V_M$  sino el  $S_{0,5}$ . Para comprobar esto se realizaron curvas de AEE en función de la concentración de ATP en un rango 0-10 mM, en presencia de  $Mg^{2+}$  3 mM y 3PGA en cuatro concentraciones: 0,5 mM, 0,75 mM, 1,5 mM (concentración igual al  $S_{0,5}$ ) y 5



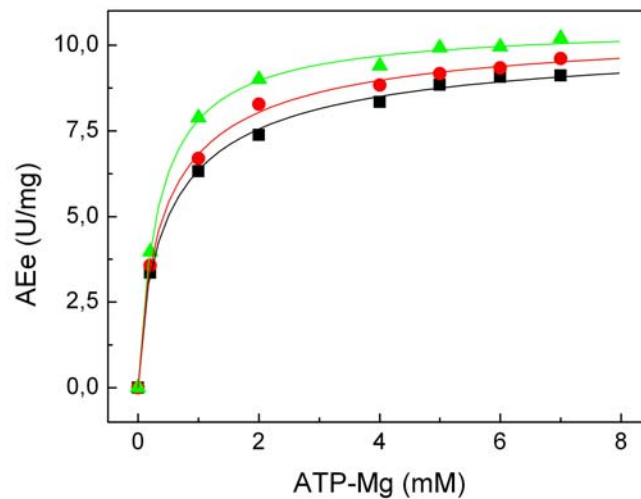
mM, siendo las primeras tres concentraciones del sustrato no saturantes, mientras que la última sí lo es. Como se advierte en la Fig. 4.1.17 (A), a partir de 3 mM se observa una disminución en la actividad de la *Ptr*PGKasa-1, correspondiente a la aparición de ATP libre ( $[ATP] > [Mg^{2+}]$ ) [también visualizable en la Fig. 4.1.17 (B), al graficar AEe en función de la concentración de ATP libre]. Este efecto de inhibición es más marcado cuando la concentración de 3PGA es no saturante, siendo los porcentajes de inhibición del 41%, 26%, 15% y 0% (de menor a mayor concentración de 3PGA). Cabe aclarar que los cambios observados en la actividad enzimática son modestos, no lográndose altos niveles de inhibición.



**Fig. 4.1.17:** Curvas de AEe en función de la concentración de ATP, en presencia de  $MgCl_2$  3 mM y concentraciones variables de 3PGA. 3PGA: 5 mM (■); 1,5 mM (●); 0,75 mM (▼); 0,5 mM (▲). La AEe se graficó en función de la concentración de ATP total (A) y en función de la concentración de ATP libre (B). En (A), la línea de puntos indica la concentración de ATP 3 mM.

Comprobado el modesto efecto inhibitor del ATP libre sobre la enzima *Ptr*PGKasa-1 a concentraciones no saturantes de 3PGA, se buscó evidenciar el efecto activador causado por el ATP libre sobre la misma al estar en contacto con concentraciones saturantes de 3PGA. Para esto, se realizaron curvas de AEe en función de la concentración del complejo ATP-Mg (en cantidades equimoleculares), en presencia de 3PGA 5 mM y ATP libre (en exceso con respecto al  $Mg^{2+}$ ) en tres concentraciones: 0, 2 y 5 mM. Como se observa en la Fig. 4.1.18 y en la Tabla 4.1.7, al aumentar la concentración de ATP libre disminuye el  $S_{0,5}$  del ATP-Mg y aumenta el  $n_H$

hasta hacerse iguales a los obtenidos a partir de la curva de saturación obtenida al variar la concentración de  $Mg^{2+}$  (Tabla 4.1.5 y Tabla 4.1.7), observándose también un leve aumento de la  $V_M$ . Estos resultados evidenciarían el efecto activador del ATP libre sobre la enzima, especialmente a bajas concentraciones de ATP-Mg, y explicarían por qué el valor del  $S_{0,5}$  del ATP-Mg obtenido a partir de la curva de saturación con  $Mg^{2+}$  variable es menor que el obtenido a partir de las curvas de saturación con ATP variable y con ATP-Mg equimoleculares.



**Fig. 4.1.18:** Curvas de AEE en función de la concentración del complejo ATP-Mg, en presencia de 3PGA 5 mM y concentraciones variables de ATP libre: 0 mM (■); 2 mM (●); 5 mM (▲).

Parámetro / Sustrato	ATP-Mg (equimolecular) (a)	ATP-Mg, ATP libre = 2 mM (b)	ATP-Mg, ATP libre = 5 mM (c)	ATP-Mg, sustrato variable $Mg^{2+}$ , ATP 5 mM (d)
$V_M$ (U/mg)	$10,7 \pm 0,3$	$11,1 \pm 0,2$	$11,8 \pm 0,2$	$10,7 \pm 0,3$
$S_{0,5}$ (mM)	$0,83 \pm 0,09$	$0,48 \pm 0,05$	$0,34 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,04$
$n_H$	$0,6 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$

**Tabla 4.1.7:** Parámetros cinéticos:  $V_M$ ,  $S_{0,5}$  y  $n_H$  del ATP-Mg, calculados a partir de curvas de saturación en las que las velocidades se midieron en función de: concentraciones crecientes de: ATP-Mg equimolecular sin exceso de ATP libre (a) o en presencia de ATP libre 2 mM (b) y 5 mM (c); concentraciones crecientes de  $Mg^{2+}$  en presencia de ATP 5 mM (d).

El  $Mg^{2+}$  libre no produce cambios en la actividad de la *PtrPGKasa-1*, no observándose inhibición ni activación, aún a concentraciones de  $MgCl_2$  de 50 mM (datos no mostrados).

Concluyendo, comprobamos que *PtrPGKasa-1* muestra el comportamiento descrito para otras PGKasas en las que el ATP libre de  $Mg^{2+}$ , al unirse a un segundo sitio, actuaría como activador o inhibidor, dependiendo este comportamiento de la presencia o no del 3PGA en condiciones saturantes. Si el 3PGA se encuentra en condiciones saturantes, el efecto inhibitor se neutraliza, lo que coincidiría con lo que se ha postulado, que podría actuar en forma competitiva con el mismo. En esta condición, el efecto activador se manifiesta, de acuerdo a nuestros resultados, disminuyendo el  $S_{0,5}$  del ATP-Mg. Cuando tanto el 3PGA como el ATP-Mg se encuentran en exceso ambos efectos parecen minimizarse, ya que no se observan cambios marcados en la  $V_M$  en presencia de ATP libre. Sin embargo, no se descarta la posibilidad descrita en la bibliografía de que la unión de ATP libre favorecería la liberación del producto de reacción 1,3-bisPGA (Joao y Williams, 1993).

Volviendo a las curvas de saturación de la Fig. 4.1.9, se pueden señalar las siguientes cuestiones:

✓ En la curva de saturación de ATP, el 3PGA se encuentra en concentración saturante y, como se dijo anteriormente, el efecto inhibitor del ATP libre no es visible en estas condiciones. Además, al encontrarse el  $Mg^{2+}$  en exceso, la concentración de ATP libre es mínima, teniendo en cuenta el valor de la  $K_d^{ATP-Mg}$ .

✓ En la curva de saturación de  $Mg^{2+}$ , tanto el 3PGA como el ATP están en exceso al principio de la curva, por lo tanto existe una gran cantidad de ATP libre. Sin embargo, la concentración de 3PGA saturante no permite que se haga visible la inhibición por este ión. A bajas concentraciones de  $MgCl_2$ , el ATP libre estaría actuando como activador de *PtrPGKasa-1*, razón por la cual el  $S_{0,5}$  del  $Mg^{2+}$  sería bajo (0,36 mM, ver Tabla 4.1.5 y Tabla 4.1.7), y explicaría por qué es menor que el del verdadero sustrato ATP-Mg. En la curva de ATP-Mg la concentración de ATP libre sería mínima, no observándose este efecto activador.

✓ En la curva de saturación de 3PGA, tanto el  $Mg^{2+}$  como el ATP se encuentran en altas concentraciones, pero pequeñas cantidades de ATP libre existen,

debido al equilibrio de unión entre el ATP y el  $Mg^{2+}$ . Cuando el 3PGA se encuentra en pequeñas cantidades, el ATP libre podría estar actuando como inhibidor de la *PtrPGKasa-1*, por lo que tal vez el  $S_{0.5}$  estaría siendo sobreestimado. Sin embargo, este efecto no fue comprobado experimentalmente.

#### 4.1.4 Clonado, expresión y purificación de la *PtrPGKasa-1-CHis* y la *PtrPGKasa-1-NHis*.

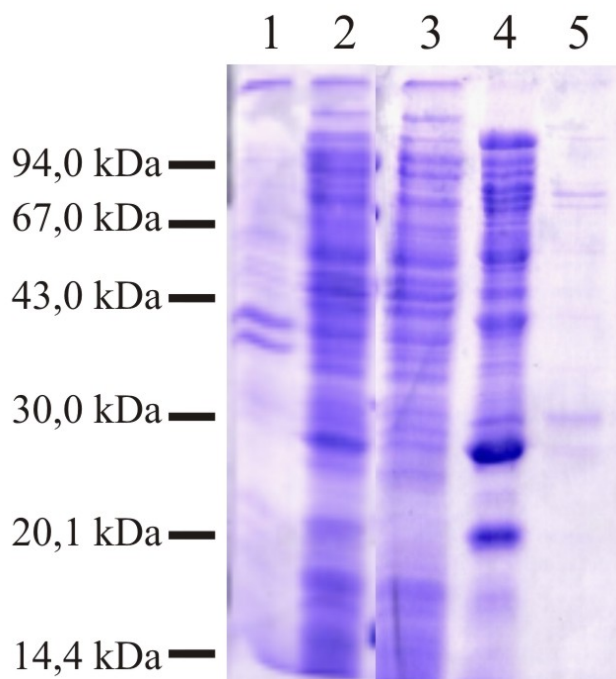
Con el objeto de facilitar la purificación de la *PtrPGKasa-1* y asegurar que sólo se está caracterizando la proteína de la diatomea, libre de la del sistema de expresión, se decidió proceder al clonado molecular de la misma fusionada a una secuencia que introduce una etiqueta de histidinas en la proteína codificada. Se llevaron a cabo dos estrategias distintas a fin de producir la enzima con este agregado en sus dos extremos: N- y C-terminal (*PtrPGKasa-1-NHis* y *PtrPGKasa-1-CHis*, respectivamente).

##### 4.1.4.1 Clonado, expresión y purificación de la *PtrPGKasa-1-CHis*.

Para lograr la construcción que contenía la adición de la etiqueta en el extremo C-terminal de la enzima codificada, se llevó a cabo la técnica de PCR a partir de la construcción pET-24a/*PtrPGKasa-1* lograda en el apartado 4.1.1 y los oligonucleótidos específicos *PtrPGK1Fw* y *PtrPGK1RvCHis* (Tabla 3.1). Este último oligonucleótido delecionó el codón de finalización de la traducción, de forma de obtener una secuencia codificante que, al ligarse al vector pET-24b expresara la proteína con la etiqueta de histidinas en su extremo C-terminal. Una vez obtenido el fragmento buscado (~ 1200 pares de bases), se clonó en el vector pGEM-T *Easy* y su secuencia fue confirmada por secuenciación completa. El gen con la secuencia correcta fue subclonado en el vector de expresión pET-24b, entre los sitios de clonado *NdeI* y *NotI*, y expresado en células de *E. coli* Rosetta (DE3) siguiendo el protocolo de inducción descrito en Materiales y Métodos. Se ensayaron dos tiempos de inducción: 4 y 16 h.

Para la purificación de la *PtrPGKasa-1-CHis* se llevó a cabo la técnica de IMAC, utilizando la resina IDA con níquel como metal inmovilizado. Como se observa en la Fig. 4.1.19, no hubo expresión de la enzima (45 kDa), resultado idéntico para

ambos tiempos de inducción. Tampoco se detectó actividad enzimática distinta a la basal de las células de *E. coli* Rosetta (DE3).



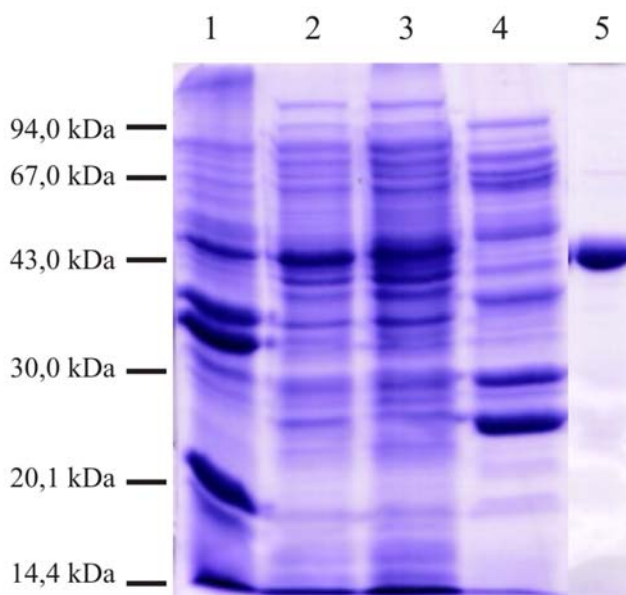
**Fig. 4.1.19:** SDS-PAGE 12,5% de la purificación por IMAC de la *PtrPGKasa-1-CHis*. **1:** Fracción insoluble luego del sonicado; **2:** extracto soluble; **3:** exclusión de la resina  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA; **4:** lavado con imidazol 35 mM; **5:** elución con imidazol 300 mM.

#### 4.1.4.2 Clonado, expresión y purificación de la *PtrPGKasa-1-NHis*.

Con el fin de obtener la *PtrPGKasa-1* con el agregado de la etiqueta de histidinas en su extremo N-terminal, se llevó a cabo la técnica de *QuickChange* para mutar y eliminar el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *HindIII* interno del gen. De esta forma se posibilitó el subclonado desde el vector pET-24a al plásmido pET-19b con las enzimas de restricción *NdeI* - *HindIII*. La construcción así obtenida permite la expresión de la proteína con la adición de histidinas en el extremo N-terminal. Se utilizó como molde para la *QuickChange* el vector pET-24a/*PtrPGKasa-1* obtenido en el apartado 4.1.1, y los oligonucleótidos *PtrPGK1NHis1* y *PtrPGK1NHis2* (Tabla 3.1). Una vez confirmada la secuencia por secuenciación completa, se transformaron células *E. coli* Rosetta (DE3) y se procedió a

la expresión y purificación de la *PtrPGKasa-1-NHis* mediante IMAC, de idéntica manera que para la *PtrPGKasa-1-CHis*.

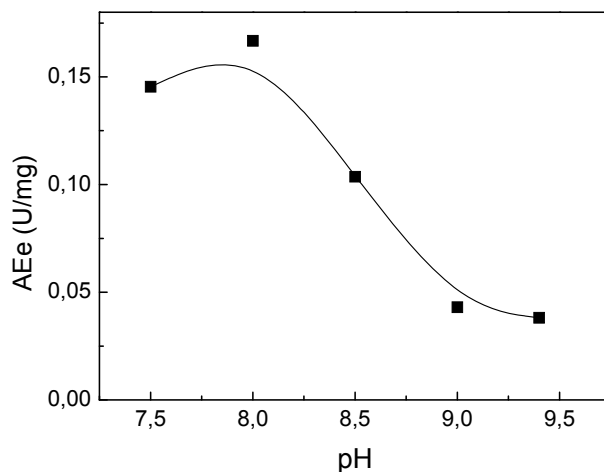
Como se observa en la Fig. 4.1.20, la *PtrPGKasa-1-NHis* (45 kDa) se sobre-expresó y se logró obtener con un alto grado de pureza (94%, calculado con el programa *LabImage* 2.7.0). Mediante ciclos de dilución-concentración, se eliminó el imidazol del medio y se obtuvo la enzima *PtrPGKasa-1-NHis* en el *buffer*: Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM; glicerol 10%.



**Fig. 4.1.20:** SDS-PAGE 12,5% de la purificación por IMAC de la *PtrPGKasa-1-NHis*. **1:** Fracción insoluble luego del sonicado; **2:** extracto soluble; **3:** exclusión de la resina  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA; **4:** lavado con imidazol 35 mM; **5:** elución con imidazol 300 mM.

#### 4.1.4.2.1 Caracterización funcional de la *PtrPGKasa-1-NHis*.

La *PtrPGKasa-1-NHis* purificada presentó una AEe de 0,16 U/mg, 67 veces menor a la de la enzima salvaje. El medio de reacción contenía ATP 5 mM, 3PGA 5 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM. En primer lugar se procedió a realizar la curva de AE en función del pH (*buffer* Tris-HCl 50 mM), de forma de evaluar si la adición de las histidinas cambiaba el pH óptimo para la catálisis. Los resultados obtenidos muestran el mismo perfil que la enzima salvaje: pH óptimo de reacción 8,0 (Fig. 4.1.21).



**Fig. 4.1.21:** Curva de AEe en función del pH de la *PtrPGKasa-1-NHis*, en *buffer* Tris-HCl 50 mM. [ATP] = [3PGA] = [MgCl<sub>2</sub>] = 5 mM.

Por otro lado, se realizaron las curvas de saturación para los distintos sustratos, con la finalidad de evaluar si existía modificación en la afinidad hacia los mismos. Los valores de los parámetros cinéticos fueron similares a los obtenidos para la *PtrPGKasa-1*.

Con el propósito de determinar si esta disminución en la actividad enzimática se debía a la adición de la etiqueta de histidinas, se intentó clivar este agregado mediante el uso de la proteasa enteroquinasa, ya que la expresión en pET-19b incluye un sitio de corte de esta enzima entre la etiqueta y la proteína clonada. Se probaron distintas condiciones de corte: concentraciones de enteroquinasa entre 0,001 y 4 U, tiempos de reacción entre 4 y 16 h, temperaturas de 0 y 4 °C, incubando la *PtrPGKasa-1-NHis* en solución o adsorbida a la resina Ni<sup>2+</sup>-IDA. Ninguna de estas condiciones resultó exitosa, ya que en todos los casos la *PtrPGKasa-1-NHis* era totalmente degradada por la proteasa.

Finalmente, se decidió comparar las condiciones en las que se encontraban la *PtrPGKasa-1* y la *PtrPGKasa-1-NHis*, para evaluar si la menor velocidad máxima de reacción podía deberse a diferencias en el *buffer* de almacenamiento de las mismas o en la forma de medida de su actividad. Se encontró que existían dos discrepancias:

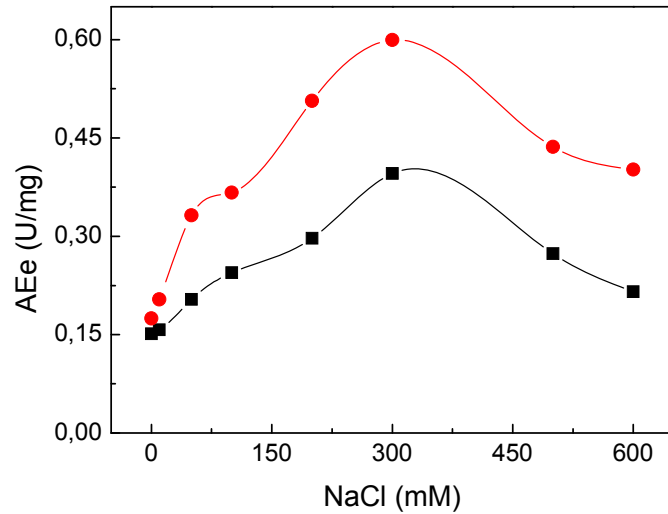
✓ Concentración de NaCl: la enzima *Ptt*PGKasa-1 se encontraba almacenada a la concentración salina con la que eluyó de la columna *2',5'-ADP Sepharose*, alrededor de 300 mM, en cambio la *Ptt*PGKasa-1-NHis fue lavada luego de la purificación por IMAC y obtenida en un *buffer* sin agregado de NaCl.

✓ Concentración de 2-ME: Por error se exceptuó la adición del reductor tanto al *buffer* de almacenamiento de la *Ptt*PKasa-1-NHis, como en el medio de reacción. Recordando, la enzima sin el agregado de la etiqueta de histidinas se encontraba en un *buffer* con 2-ME 1 mM, y su actividad enzimática era medida en presencia del mismo reductor en concentración de 10 mM.

En vista de estas evidencias, se llevaron a cabo las medidas de AE en función de las concentraciones de NaCl y de 2-ME.

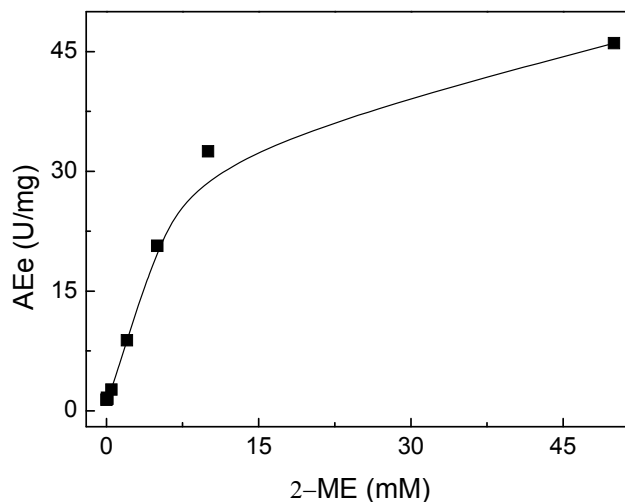
Se realizaron dos experiencias para evaluar si existía modulación de la actividad por la sal (Fig. 4.1.22). Se midió AE de PGKasa en presencia de distintas concentraciones de NaCl, con y sin incubación previa de la *Ptt*PGKasa-1-NHis con el mismo durante 5 min (curvas roja y negra, respectivamente). Como se observa en esta figura, la AE aumenta con la concentración de la sal hasta 300 mM, luego de la cual disminuye (efecto dual de iones descrito en el apartado 4.1.3.8). Por otro lado, es notorio que la preincubación de la enzima con NaCl favorece la catálisis en mayor medida. Por lo expuesto, se decidió agregar al *buffer* de almacenamiento NaCl 0,3 M. Cabe aclarar que se realizaron los controles pertinentes con la enzima acoplada en el medio de reacción. La Ga3PDH no fue regulada por NaCl.





**Fig. 4.1.22:** Curvas de AEe en función de la concentración de NaCl; sin incubación previa de la enzima con la sal (■), o incubando la enzima con el NaCl durante 5 min (●). [ATP] = [3PGA] = [MgCl<sub>2</sub>] = 5 mM, [2-ME] = 0.

Se procedió luego con la evaluación del efecto del 2-ME sobre la actividad. Se realizó una curva de AE en función de la concentración del reductor, incubando la la *PtrPGKasa-1-NHis* durante 2 min con el mismo antes de comenzar la reacción. Como se observa en la Fig. 4.1.23, la enzima en presencia del 2-ME exhibe una actividad hasta 290 veces mayor que en ausencia del mismo. También se observó que este crecimiento en la velocidad de reacción sería dependiente del tiempo de incubación de la *PtrPGKasa-1-NHis* con el reductor. Esto llevó a pensar en la posibilidad de que la enzima *PtrPGKasa-1* fuera regulada por el estado redox en el que se encontrase. La Ga3PDHasa es una enzima regulada por óxido-reducción. Sin embargo, el efecto observado no se debe a la acción del reductor sobre la enzima acoplada, como lo demostraron los controles pertinentes.



**Fig. 4.1.23:** Curva de AEe de la *PtrPGKasa-1-NHis* en función de la concentración de 2-ME. [ATP] = [3PGA] = [MgCl<sub>2</sub>] = 5 mM.

Por otro lado se incubó una alícuota de la *PtrPGKasa-1* salvaje con 2-ME en concentración de 10 mM y luego se midió su AE. El contacto con el reductor no produjo aumento en la actividad, por lo que se concluyó que esta enzima se encontraba totalmente reducida en el *buffer* de almacenamiento, el cual contenía 2-ME 1 mM.

Para continuar trabajando, se incubó la *PtrPGKasa-1-NHis* con 2-ME 10 mM durante 30 min a 0 °C, luego de lo cual se quitó el reductor mediante el uso de resinas de tamiz molecular y se concentró la enzima. De esta forma se obtuvo la proteína totalmente reducida y activa en *buffer* B (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM; NaCl 0,3 M; glicerol 10%), libre de reductor. La AEe de la misma fue de 43 U/mg. Su caracterización cinética demostró que los valores de  $S_{0,5}$  y  $n_H$  eran equivalentes a los de la enzima sin la adición de la etiqueta de histidinas. Todos los estudios que continúan fueron hechos con la *PtrPGKasa-1-NHis* almacenada bajo estas condiciones, a la que se referirá, de ahora en más, como *PtrPGKasa-1*.

#### 4.1.5 Caracterización redox de PtrPGKasa-1.

La generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) y del nitrógeno (ERNs) es un fenómeno que ocurre transitoriamente en organismos aerobios (Pinto y col., 2003). La especie más importante de ERNs es el óxido nítrico (NO); mientras que EROs incluyen el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singlete [ $O_2 (^1\Delta_g)$ ] y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Estas especies son productos normales del metabolismo oxidativo y funcionan como moléculas de señalización que alteran la expresión génica y modulan la actividad de proteínas de defensa. Sin embargo, su producción aumentada y consecuente alta concentración pueden ser perjudiciales para los organismos, ya que oxidan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Pinto y col., 2003). Los daños al ADN pueden causar mutaciones si no son revertidos por los mecanismos de reparación del ADN, y los de lípidos alteraciones en la estructura celular, mientras que los daños a las proteínas causan la inhibición de enzimas, la desnaturalización y la degradación de las mismas.

En organismos fotosintéticos el  $O_2^-$  es producido por la reducción del oxígeno molecular en la cadena de electrones, por lo que compartimentos como la mitocondria y el cloroplasto, que presentan un alto flujo de electrones, son especialmente susceptibles al daño oxidativo. Aunque en condiciones normales la generación de EROs es lenta, factores como iluminación excesiva, exposición al UV, metales contaminantes y condiciones ambientales pueden acelerarla, especialmente en plástidos. Es por esto que resulta de suma importancia la existencia de antioxidantes, ya sea enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa) o no enzimáticos (glutatión, ácido ascórbico, carotenoides) (Pinto y col., 2003).

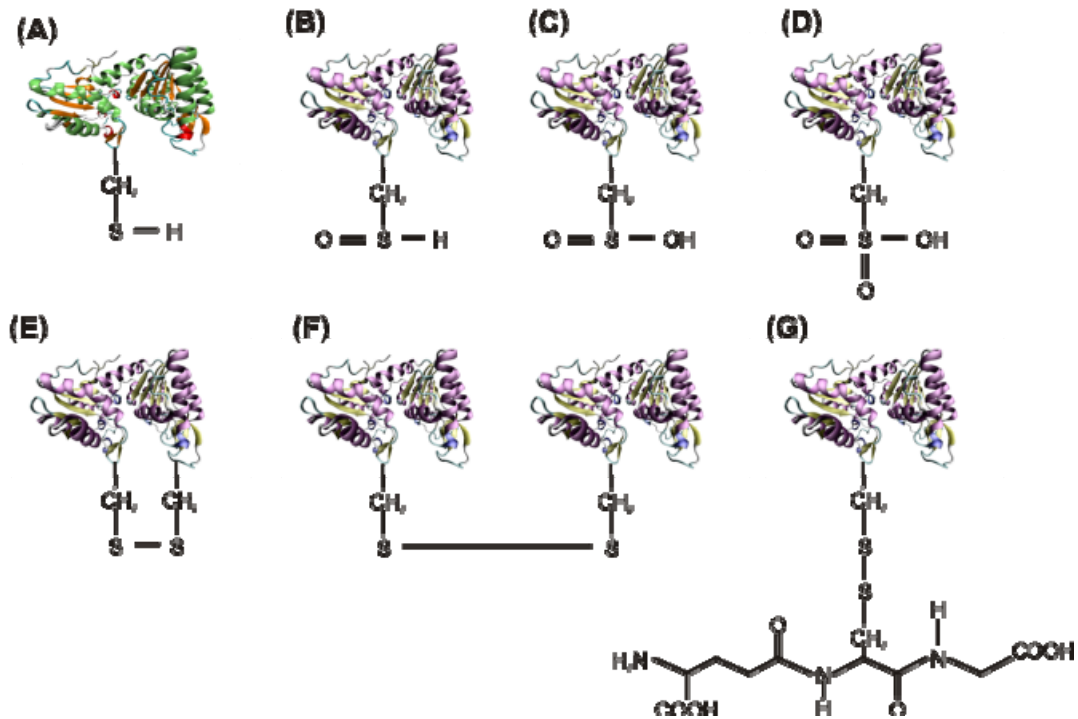
Las Cys reaccionan con EROs y ERNs, así como con otros reactivos modificadores de grupos tioles y metales, originando diversas reacciones redox, según la especie oxidante, su concentración y el tiempo de exposición. La velocidad de reacción del tiol y los productos de la misma dependerán de la accesibilidad de este grupo en la estructura tridimensional de la proteína y la reactividad de la Cys, que a su vez está influenciada por los aminoácidos que la rodean (Dalle-Donne y col., 2007).

La oxidación de residuos Cys puede llevar a la formación de varias especies. Una de ellas es el ácido sulfénico (R-SOH), principal producto formado por el contacto con  $H_2O_2$ , el cual es muy inestable y reactivo, y es generalmente un intermediario en la

posterior oxidación a ácidos sulfínico (R-SO<sub>2</sub>H) y sulfónico (R-SO<sub>3</sub>H), o en la formación de puentes disulfuro (cistina) intra o intermolecular (R-S-S-R), al reaccionar con una Cys vecina o accesible (Fig. 4.1.24). Sin embargo, en algunas proteínas, el ácido sulfénico puede resultar estable, dependiendo del entorno apolar que limite la accesibilidad del solvente y la ausencia de grupos tiol vecinales (Bindoli y col., 2008). La formación de ácidos sulfénicos y puentes disulfuros puede ser fácilmente revertida por la acción de un reductor, como glutatión o tiorredoxina. La forma sulfínica sólo se revierte por acción de la sulfirredoxina. En cambio el ácido sulfónico (mayor estado de oxidación alcanzado por el grupo tiol) es irreversible y puede llevar a mal plegamiento de las proteínas y agregación.

El estado redox celular es controlado por dos importantes sistemas: el de tiorredoxina y el del glutatión. Glutatión (GSH como forma reducida y GSSG como forma oxidada) es el tiol no proteínico predominante en las células, y es capaz de intercambiar sus electrones funcionando como antioxidante sulfhídrico o como sustrato de enzimas importantes en la protección ante el estrés oxidativo, como la glutatión reductasa, que a su vez cede los electrones a enzimas como glutatión transferasas, glutatión peroxidasas y glutarredoxinas. También puede formar disulfuros mixtos, proceso conocido como S-glutationilación (Fig. 4.1.24, G), protegiendo así los grupos tioles de oxidaciones posteriores irreversibles. Se cree también que estos tioles mixtos podrían tener funciones de señalización celular (Bindoli y col., 2008).

El sistema tiorredoxina incluye a tiorredoxina reductasas y tiorredoxinas (Trxs), que actúan secuencialmente transfiriendo los electrones del NADPH, dador de equivalentes de reducción. Trxs son pequeñas enzimas oxidorreductasas de disulfuros, que se encuentran en todos los organismos vivos, muy importantes en la regulación redox ya que intercambian sus tioles/disulfuro con sus proteínas blanco (Bindoli y col., 2008).



**Fig. 4.1.24:** Modificaciones oxidativas de tioles en proteínas. (A): cisteína (grupo sulfhidrido); (B): ácido sulfénico; (C): ácido sulfinico; (D): ácido sulfónico; (E): puente disulfuro intramolecular; (F): puente disulfuro intermolecular; (G): S-glutationilación. Figura adaptada de (Dalle-Donne y col., 2007).

Como se explicó en la introducción, los cloroplastos de diatomeas fueron adquiridos por endosimbiosis secundaria de un alga eucariota con un plásmido primario, dentro de otro organismo eucariota, con su subsecuente reducción a una organela. Es por esto que su estructura celular y vías metabólicas son más complejas, y presentan características propias, disímiles de plantas y de otros organismos fotosintéticos. Algunas de las diferencias observadas a nivel cloroplastídico son la presencia de cuatro membranas alrededor de la organela, la acumulación extra-cloroplástidica del poliglucano de reserva, la falta aparente del COPP completo, y la supuesta menor cantidad de enzimas reguladas por el sistema tiorredoxina (Michels y col., 2005; Weber y col., 2009).

En los cloroplastos de plantas el COPP convierte las hexosas-P en pentosas-P, generando poder reductor como NADPH. El Ciclo de Calvin, también llamado ciclo reductor de pentosas-P, es contrario al COPP. En organismos fotosintéticos, al estar

ambos en el mismo compartimiento, resulta de suma importancia la regulación estricta de las dos vías para que no se produzcan ciclos fútiles (Martin y col., 2004). Así, en presencia de luz, el sistema ferredoxina/tiorredoxina reductasa mantiene las tiorredoxinas cloroplastídicas constantemente reducidas, las que a su vez reducen y activan enzimas involucradas en el ciclo de Calvin, como por ejemplo la PRKasa, la Ga3PDHasa, la FBPAldasa y la seduheptulosa-1,7-bisfosfatasa (Hirasawa y col., 1999; Wilhelm y col., 2006). En cambio la enzima Glc-6PDHasa del COPP es inhibida por reducción mediante tiorredoxina, manteniendo así el equilibrio entre los ciclos oxidativo y reductivo de las pentosas-P. En plantas se identificaron dos Trx cloroplastídicas, llamadas Trx f y Trx m, que son responsables de la regulación redox dependiente de luz de varias enzimas involucradas en el metabolismo de hidratos de carbono, incluyendo algunas del ciclo de Calvin (Hirasawa y col., 1999).

Es poco lo que se sabe de la regulación redox en cloroplastos de diatomeas. Algunos autores aseguran, mediante estudios *in silico* de la secuencia completa del microorganismo, la falta de algunas enzimas involucradas en el COPP en cloroplastos (Weber y col., 2009), y proponen que por esta razón no sería necesaria la regulación redox en este compartimiento (Michels y col., 2005). Por otro lado, también por estudios de secuencias, sostienen que las enzimas del ciclo de Calvin que son reguladas mediante óxido-reducción en plantas no lo serían en diatomeas por no poseer las Cys conservadas responsables del fenómeno, como por ejemplo la subunidad  $\gamma$  de la ATPasa (Panic y Strotmann, 1993; Wilhelm y col., 2006) y la malato deshidrogenasa (Ocheretina y col., 2000). Sin embargo, hasta la actualidad son pocos los estudios realizados *in vitro* o *in vivo* que demuestren esta falta de regulación redox de las enzimas involucradas en el ciclo reductivo de las pentosas de diatomeas, con la excepción de la enzima PRKasa que mostró inactivación por oxidación, pero con valores de potenciales redox muy positivos, lo que haría que la regulación por Trx fuera poco probable *in vivo* (Michels y col., 2005). En cloroplastos de diatomeas existe una Ga3PDHasa, llamada GapC1, que no contiene las Cys responsables de regulación redox en plantas, y ha sido reportado que no sería afectada por oxidación o reducción (Michels y col., 2005; Kroth y col., 2008).

Está descrito que las PGKasas de mamíferos y otros organismos superiores serían inactivadas por reactivos modificadores de grupos tiol (Krietsch y Bucher, 1970),

comportamiento no observado en levaduras y algas (Markland y col., 1975). Organismos eucariotas como salmón, caballo, conejo, ratón, cerdo y el propio ser humano tienen PGKasas que cuentan con 7 residuos Cys, 2 de los cuales se encuentran adyacentes en la estructura primaria y serían los responsables de la inactivación de la enzima (Cserpan y Vas, 1983). Esto ha sido demostrado mediante mutación de la enzima de levadura, que cuenta con una sola Cys y es insensible al tratamiento con agentes modificadores de grupos tiol, a la que se le adicionaron estas dos Cys, convirtiéndola así en susceptible a la pérdida de actividad por tratamiento con DTNB (Minard y col., 1989). Por otro lado, se encontró que la modificación de una de las 2 Cys que tiene la PGKasa de espinaca conlleva a la inactivación de la enzima (Kuntz y Krietsch, 1982), aún cuando estos dos residuos no se encuentran adyacentes en la estructura primaria. La *Ptr*PGKasa-1 cuenta con 6 Cys, ninguna de las cuales está adyacente a otra en la cadena polipeptídica. Sin embargo, el modelo tridimensional construido por homología (ver apartado 4.1.2.4), muestra que algunos de estos residuos se encontrarían cercanos en la estructura terciaria. En la Tabla 4.1.8 se enumeran las Cys presentes en la *Ptr*PGKasa-1 y las distancias entre ellas en ambas conformaciones (abierta y cerrada).

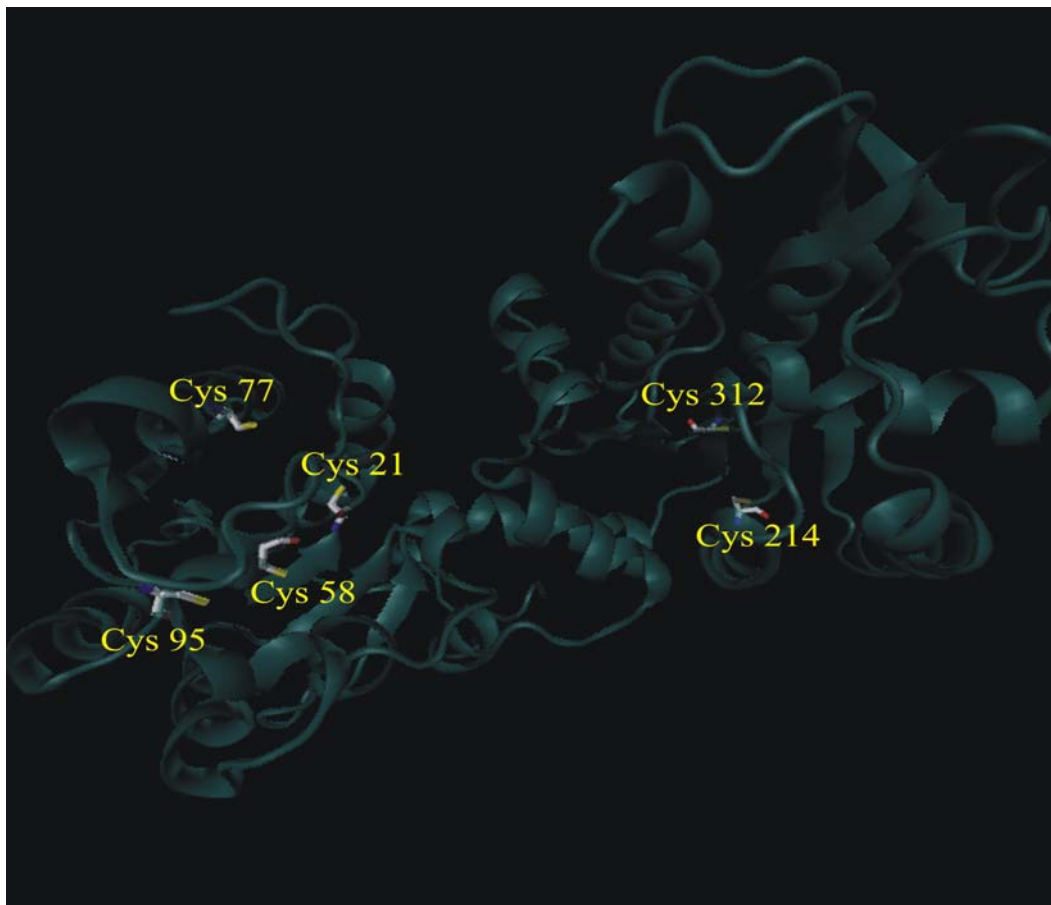
Número del residuo Cys	Distancia en la Conformación Abierta (Å)	Distancia en la Conformación Cerrada (Å)
21 – 58	8,6	10,3
21 – 77	10,9	8,3
21 – 95	14,6	15,5
58 - 77	13,0	11,3
58 – 95	6,0	8,5
77 – 95	15,0	12,1
214 – 312	8,0	8,7

**Tabla 4.1.8:** Distancias en Å entre las Cys de la *PtrPGKasa-1* según los modelos moleculares creados por homología, en su conformación abierta y cerrada.

Observando la Tabla 4.1.8 es evidente que las distancias entre los residuos de cada dominio podrían llevar a la formación de uno o más puentes disulfuro. Debe tenerse en cuenta que ninguno de los modelos utilizados como plantados en el modelado por homología cuenta con Cys en las posiciones indicadas, por lo que la posición predicha para cada uno de estos residuos podría no ser totalmente confiable. Por otro lado se debe considerar la posibilidad de movimiento de las cadenas laterales de los aminoácidos y la flexibilidad de la cadena polipeptídica en zonas de *loops*, lo que podría acercar los sulfhidrilos y llevar a la formación de puentes disulfuro.

Como se evidencia en la Fig. 4.1.25, las Cys-21, 59, 77 y 95 se encuentran en el dominio de unión a 3PGA, y cercanas al sitio de interacción de este sustrato con *PtrPGKasa-1*. Los residuos 214 y 312 se encuentran en el dominio de unión a ATP, alejados del sitio de catálisis.





**Fig. 4.1.25:** Modelo tridimensional de la *PtrPGKasa-1* en su conformación abierta. La enzima se muestra en representación *Cartoon*, las Cys en *Bond* y coloreadas por elemento (C blanco, N azul, S amarillo y O rojo).

A continuación se detallará un estudio minucioso de las características redox de la *PtrPGKasa-1*, que incluye:

✓ Oxidación de la *PtrPGKasa-1* con oxidantes como diamida, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), GSSG y nitroprusiato de sodio (NPS), y cálculo de las constantes cinéticas del fenómeno.

✓ Protección a la oxidación por los sustratos 3PGA, ATP y ATP-Mg y obtención de  $K_d$ .

✓ Reducción de la *PtrPGKasa-1* con DTT y Trxs de *E. coli* (*EcoTrx*) y de *P. tricornutum* (*PtrTrx*), con la obtención de los parámetros cinéticos de esta regulación.

- ✓ Titulación redox y cálculo del potencial de reducción de la *PtrPGKasa-1*.
- ✓ Geles no reductores para inferir sobre la estructura adquirida por *PtrPGKasa-1* en sus formas oxidada y reducida.
- ✓ Titulación de tioles susceptibles a oxidación y de ácidos sulfénicos, para determinar las Cys involucradas en la inactivación por oxidación.
- ✓ Obtención y estudio de mutantes simples en los 6 residuos Cys.

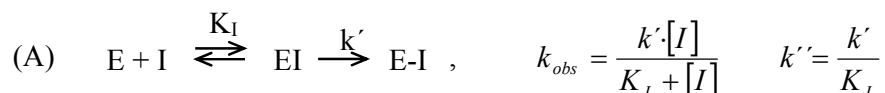
#### 4.1.5.1 Introducción a la inactivación irreversible.

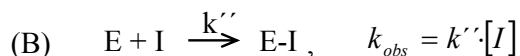
Cuando un inhibidor es irreversible, la inactivación causada por éste conlleva la formación de un enlace covalente, por lo que la inhibición debe ser estudiada en función del tiempo de interacción entre la enzima y el compuesto que produce la modificación. Como generalmente el inhibidor se encuentra presente a concentraciones mucho mayores que la de la enzima, la inactivación de la misma transcurre con cinéticas de pseudo-primer orden (Copeland, 2005). Si se grafica el porcentaje de AE remanente [Actividad Relativa (%)] en función del tiempo de incubación de la enzima (E) con el inhibidor (I) la velocidad a la que se inactiva la enzima es determinada por la constante cinética de pseudo-primer orden  $k_{obs}$  (tiempo<sup>-1</sup>), que depende de la concentración de I utilizada en cada caso. Resulta evidente que a mayor concentración de inhibidor, mayor será la  $k_{obs}$  (Copeland, 2005). La derivada de la concentración de enzima activa en función del tiempo resulta directamente proporcional a su propia concentración, siendo la constante de proporcionalidad  $k_{obs}$ . Resolviendo esta derivada se llega a:

$$\text{Actividad Relativa (\%)} = 100 \cdot e^{-k_{obs}t}$$

donde Actividad Relativa (%) es el porcentaje de AEe remanente, tomando como 100% la AE a tiempo cero, y t es el tiempo de incubación de la enzima con el inhibidor.

Esta inhibición puede responder a dos mecanismos, de uno o dos pasos:





En el caso de (A) la inhibición sigue un mecanismo de dos pasos. El primero es la unión reversible de I a E, con la formación de un complejo intermediario EI, y el segundo involucra la formación del enlace covalente inactivador. La gráfica de  $k_{obs}$  vs [I] es hiperbólica, como lo muestra la ecuación en (A).  $k'$  representa la máxima rapidez con la que ocurre la inactivación a concentración infinita de I.  $K_I$  define la concentración de I necesaria para alcanzar una velocidad de inactivación igual a la mitad de  $k'$ . La relación entre ambas es igual a la constante de segundo orden  $k''$  (concentración<sup>-1</sup> tiempo<sup>-1</sup>), que da idea de la eficacia de inactivación del inhibidor irreversible, de su potencia (Copeland, 2005).

En (B) la dependencia de  $k_{obs}$  con [I] parece no saturante, por lo que la gráfica de la constante en función de I es lineal y pasa por el origen. La pendiente de esta recta es igual a  $k''$ . En este caso se puede asumir que  $k'$  es muy alta, por lo que el complejo EI tiene una vida media muy corta.

#### 4.1.5.2 Estudio de la oxidación de la PtrPGKasa-1.

Respondiendo a lo explicado en la sección anterior, para obtener los parámetros cinéticos de la oxidación es necesario evaluar la AEe remanente de la PtrPGKasa-1 cuando es expuesta a distintas concentraciones del oxidante, a medida que transcurre el tiempo. De estas curvas se obtienen los valores de  $k_{obs}$  para cada [I]. Finalmente, al graficar  $k_{obs}$  vs concentración del oxidante, es posible conocer el mecanismo de la inhibición y las constantes correspondientes al mismo.

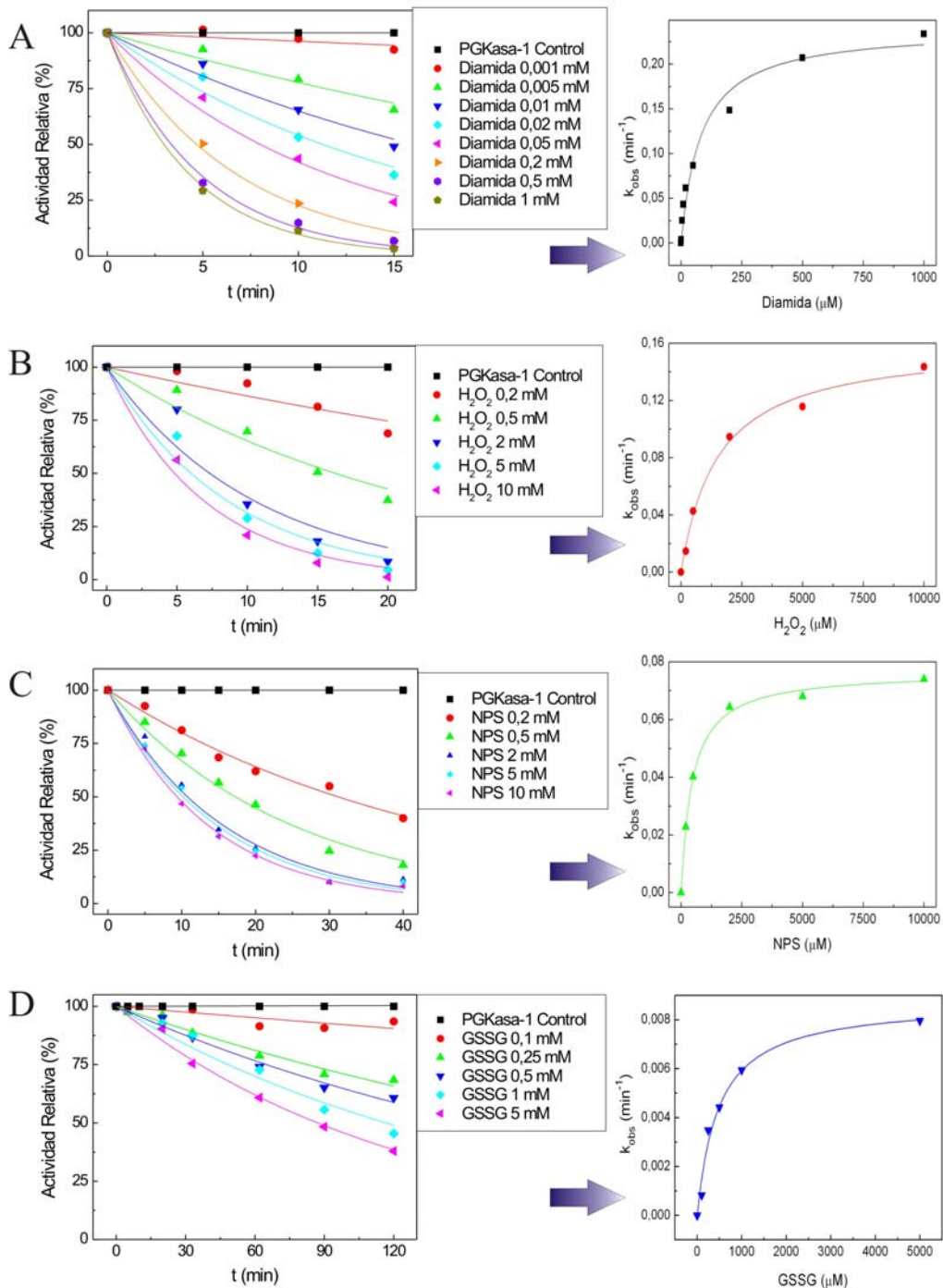
De esta forma se trabajó con los siguientes oxidantes:

- Diamida: Concentraciones: 0 – 1 mM. Tiempo de incubación: 0 – 15 min, al reparo de la luz.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Concentraciones: 0 – 10 mM. Tiempo de incubación: 0 – 20 min, al reparo de la luz.

- GSSG: Concentraciones: 0 – 5 mM. Tiempo de incubación: 0 – 120 min.
- NPS: Concentraciones: 0 – 10 mM. Tiempo de incubación: 0 – 40 min, en presencia de luz blanca, ya que la descomposición fotolítica del NPS genera NO.

En todos los casos la medida de actividad enzimática se realizó a pH 8,0, en presencia de concentraciones saturantes de los sustratos ( $[ATP] = [3PGA] = [MgCl_2] = 5 \text{ mM}$ ), en ausencia de reductor. El agua utilizada fue desgasificada por sonicado. La enzima ensayada fue la *PtrPGKasa-1-NHis* totalmente reducida, como se explicó en el apartado 4.1.4.2.1. La incubación con los oxidantes se llevó a cabo en presencia de 0,1  $\mu\text{M}$  de enzima ( $E \ll I$ ), a temperaturas de 25 °C, en *buffer* B también desgasificado. Para cada oxidante se realizaron dos controles del método acoplado de medida: el efecto del inhibidor arrastrado del medio de preincubación al de medida de actividad sobre la Ga3PDHasa y sobre el sustrato cuya desaparición se mide, el NADH, tomando las medidas pertinentes para minimizar cada interferencia.

En primer lugar se realizó el ensayo con diamida, obteniéndose las gráficas de Actividad Relativa (%) vs tiempo y de  $k_{\text{obs}}$  vs concentración del oxidante observadas en la Fig. 4.1.26 (A). Al ser la diamida un compuesto sintético no presente en las células, resultó de mayor interés llevar a cabo el mismo estudio con oxidantes de importancia biológica como especies reactivas del oxígeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), del nitrógeno (óxido nítrico, producido por fotólisis del NPS) y con GSSG. Los resultados gráficos se exponen en la Fig. 4.1.26 (B), (C) y (D) y los valores de las constantes cinéticas obtenidas a partir de los mismos se muestran en la Tabla 4.1.9.



**Fig. 4.1.26:** Curvas de Actividad Relativa (%) en función del tiempo y de  $k_{obs}$  vs concentración del oxidante: (A) Diamida; (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (C) NPS; (D) GSSG. La incubación de la enzima se realizó a 25 °C.  $[PtrPGKasa-1] = 0,1 \mu\text{M}$ , en *buffer* B desgasificado. En el medio de reacción:  $[\text{ATP}] = [\text{3PGA}] = [\text{MgCl}_2] = 5 \text{ mM}$ .

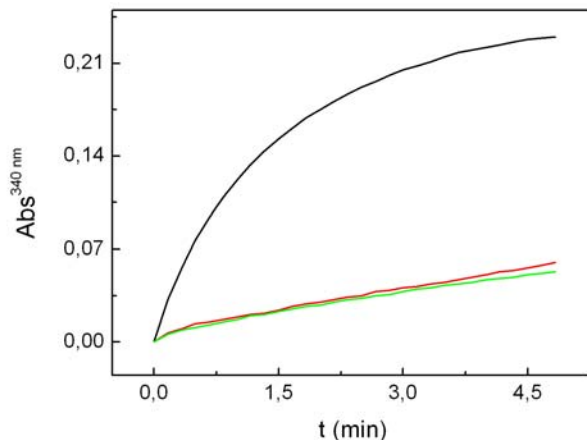
Oxidante	$k' \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$K_I \text{ (}\mu\text{M)}$	$k'' \text{ (M}^{-1}\text{ s}^{-1}\text{)}$
Diamida	$0,240 \pm 0,014$	$82 \pm 10$	48,78
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$0,160 \pm 0,007$	$1.504 \pm 177$	1,77
NPS	$0,076 \pm 0,001$	$437 \pm 47$	2,90
GSSG	$0,009 \pm 0,001$	$481 \pm 51$	0,31

**Tabla 4.1.9:** Constantes cinéticas correspondientes a la oxidación de la *Ptr*PGKasa-1 con los oxidantes diamida, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NPS y GSSG. La incubación de la enzima se realizó a 25 °C. [*Ptr*PGKasa-1] = 0,1  $\mu$ M, en *buffer* B desgasificado a pH 8,0.

Como se observa en las gráficas de  $k_{\text{obs}}$  en función de las concentraciones de los distintos oxidantes (Fig. 4.1.26), el mecanismo seguido por estos inhibidores es el de dos pasos (modelo A) descrito en el apartado anterior (4.1.5.1). Esto significa que hay una primera etapa de unión de la *Ptr*PGKasa-1 al oxidante, que responde a una constante  $K_I$  la cual es inversamente proporcional a la afinidad de E por I; y una segunda etapa en la que E es modificada irreversiblemente, con la máxima velocidad de inhibición siendo representada por la constante  $k'$ . Como se observa en la Tabla 4.1.9, los valores globales de la potencia o eficiencia de inactivación ( $k''$ ) son distintos para cada oxidante, siendo mayor para la diamida, y menor para GSSG. Es claro que estas diferencias no se deben a distintas  $k'$ , sino a cambios en las afinidades de cada inhibidor por la enzima ( $K_I$ ), a excepción de NPS y GSSG cuyas  $K_I$  son similares.

También se estudió la oxidación de la *Ptr*PGKasa-1 midiendo AE en el sentido glicolítico: transferencia de un grupo fosfato desde 1,3-bisPGA al ADP complejado con  $\text{Mg}^{2+}$ , para producir 3PGA y ATP. Se midieron las velocidades de producción de NADH del sistema en presencia de la *Ptr*PGKasa-1 reducida y oxidada, comparándose las pendientes en la gráfica de Abs a 340 nm en función del tiempo de reacción (Fig. 4.1.27). La *Ptr*PGKasa-1 (0,1  $\mu$ M) incubada con DTT 1 mM durante 20 min a 25 °C presentó una pendiente de  $0,140 \text{ min}^{-1}$ . Cuando la enzima fue incubada a la misma temperatura y durante el mismo lapso de tiempo con diamida 0,1 mM la pendiente medida demostró un consumo de  $\text{NAD}^+$  similar al del control sin enzima:  $0,002 \text{ min}^{-1}$ , detectándose un porcentaje de oxidación similar al obtenido cuando se estudió en el sentido de formación de 1,3-bisPGA (Fig. 4.1.26). Es decir, la oxidación de la

*Ptr*PGKasa-1 lleva a la pérdida de AE en ambos sentidos de reacción, como era de esperarse por el principio de reversibilidad microscópica.

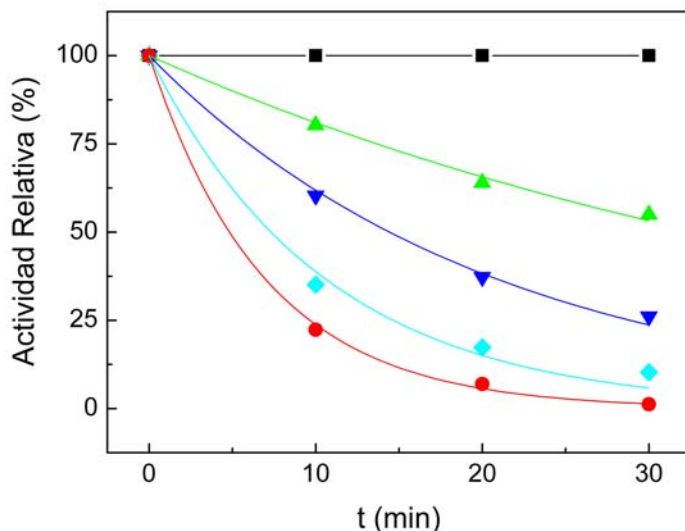


**Fig. 4.1.27:** Medida cualitativa de AE en el sentido glicolítico de reacción, medida de cambios en la Abs<sup>340 nm</sup> en función del tiempo de reacción. La *Ptr*PGKasa-1 0,1 μM fue incubada con DTT 1 mM (curva negra) o diamida 0,1 mM (curva roja) durante 20 min, a 25 °C, en *buffer* B, pH 8,0. Un control sin la PGKasa fue realizado para detectar la producción de NADH por descomposición del 1,3-bisPGA (curva verde).

#### 4.1.5.3 Protección a la oxidación mediada por sustratos y cálculo de K<sub>d</sub>.

La *Ptr*PGKasa-1 tiene seis Cys, cuatro de las cuales (21, 58, 77 y 95) se encuentran en el dominio de unión a 3PGA y muy cercanas a los residuos responsables de establecer interacciones con este sustrato, y dos (214 y 312) halladas en el dominio de unión a ATP, pero lejanas al sitio de interacción en sí (Fig. 4.1.25).

Se analizó la existencia de protección contra la oxidación por parte de los sustratos 3PGA, ATP y ATP-Mg. La *Ptr*PGKasa-1 0,1 μM fue incubada a 25 °C en *buffer* B en presencia de 5 mM de cada sustrato, y luego se le adicionó diamida 0,1 mM. A cada tiempo indicado se tomó una alícuota y se midió actividad enzimática remanente [Actividad Relativa (%)]. En la Fig. 4.1.28 se puede observar que 3PGA ( $k_{\text{obs}} = 0,021 \text{ min}^{-1}$ , en ausencia de sustratos  $k_{\text{obs}} = 0,144 \text{ min}^{-1}$ ) realiza un mejor efecto protector que el ATP ( $k_{\text{obs}} = 0,048 \text{ min}^{-1}$ ) o el ATP-Mg ( $k_{\text{obs}} = 0,095 \text{ min}^{-1}$ ).



**Fig. 4.1.28:** Protección a la oxidación con diamida, mediada por sustratos. Curvas de Actividad Relativa (%) en función del tiempo de oxidación, a 25 °C. La *Ptr*PGKasa-1 0,1 μM fue incubada con diamida 0,1 mM en presencia de 5 mM de cada sustrato: ninguno (●); 3PGA (▲); ATP (▼); ATP y MgCl<sub>2</sub> (◆). Se realizó el control sin oxidante para cada condición (■).

El grado de protección lograda por cada sustrato resultó dependiente de la concentración del mismo, hecho que fue utilizado para calcular las constantes de disociación para la unión del sustrato X a la enzima ( $K_d^X$ ), mediante el método desarrollado por Mildvan y Leigh (Mildvan y Leigh, 1964). Así,  $K_d^X$  está relacionada con la constante de velocidad de inactivación de primer orden obtenida en ausencia ( $k'$ ) o en presencia ( $k_{obs}$ ) de diferentes concentraciones de X, según la ecuación:

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{k'} + \frac{[X]}{K_d^X \cdot k'}$$

En primer lugar se grafica Actividad Relativa (%) en función del tiempo de incubación con el agente oxidante, y se obtienen los valores de  $k_{obs}$  para cada concentración de sustrato. Finalmente, la gráfica de la inversa de las  $k_{obs}$  resultantes vs la concentración del sustrato evaluado resulta en una línea recta que permite calcular el valor de  $K_d$  para ese sustrato.

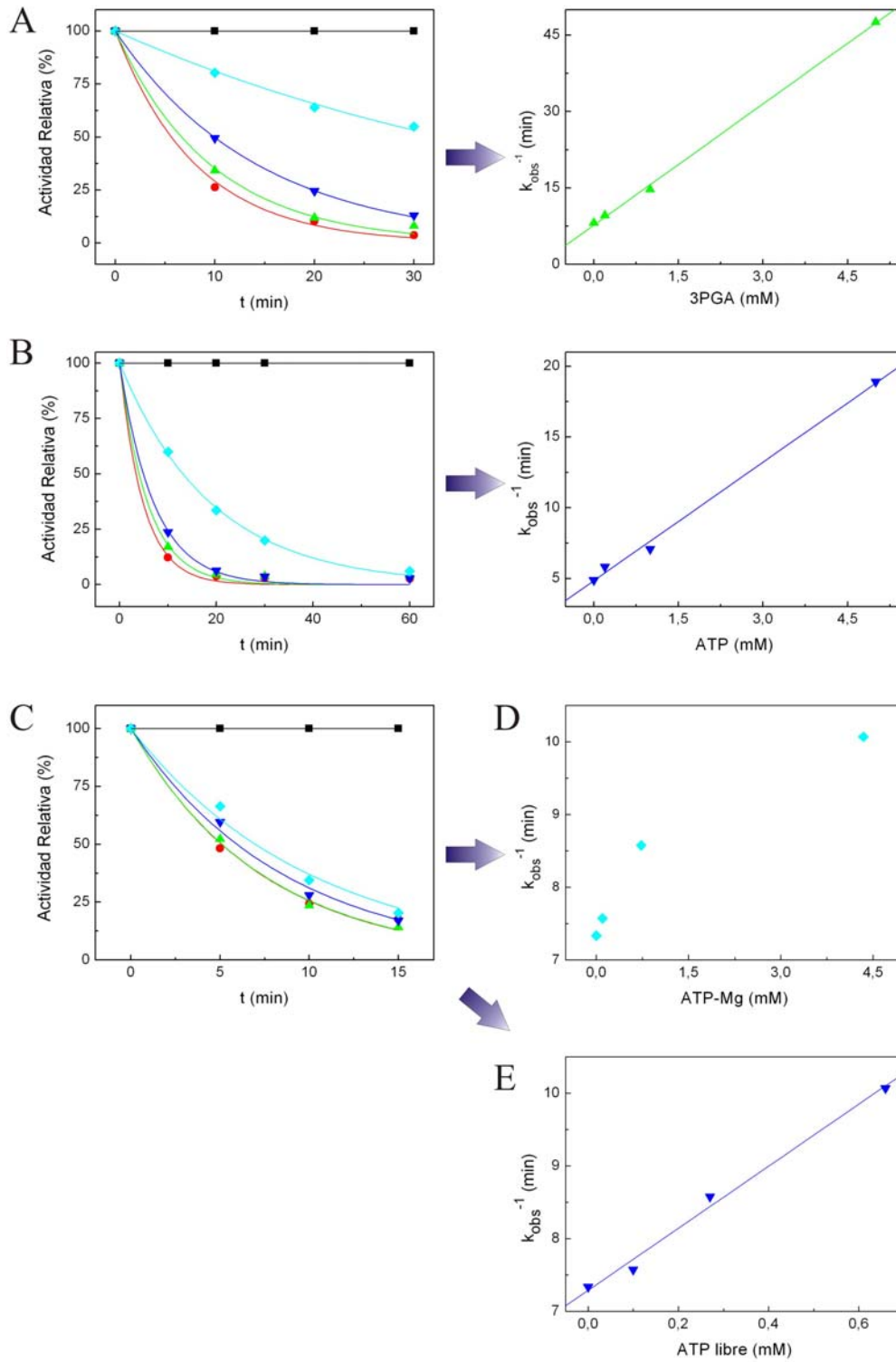
De la Fig. 4.1.29 (A) puede obtenerse el valor de  $K_d^{3PGA}$ , el cual resulta 0,969 mM, del mismo orden que el  $S_{0,5}$  aunque levemente menor, lo que sugiere que la unión del 3PGA a la *Ptr*PGKasa-1 ocurriría con una ligera mayor afinidad que la estimada por



medidas cinéticas. Como se explicó, las Cys-21, 58, 77 y 95 se encuentran muy cercanas al sitio de unión del 3PGA por lo que la protección por este sustrato era esperada. Este efecto podría deberse a una protección del tipo estérica o porque la unión del sustrato conllevaría cambios conformacionales en el complejo binario PGKasa-3PGA que alejarían u ocultarían las Cys susceptibles al oxidante.

Como se explicó en la introducción, ATP tiene dos sitios de unión a la *Ptr*PGKasa-1, que unirán distintamente este sustrato dependiendo de si está acomplejado al  $Mg^{2+}$  o no. Así, el ATP-Mg se une al sitio catalítico ubicado en el dominio C-terminal y el ATP libre se une a una zona básica que se solapa, al menos en parte, con el sitio de unión del 3PGA (dominio N-terminal) (Watson y col., 1982; Graham y Williams, 1991). Se evaluó la protección por ATP [Fig. 4.1.29 (B)] obteniéndose una  $K_d^{ATP}$  de 1,733 mM. Esta constante de disociación corresponde a la unión del ATP al sitio no catalítico, por lo que no puede ser comparada con el valor de  $S_{0,5}$ .

El  $Mg^{2+}$  libre no demostró protección alguna contra la oxidación. Por otra parte, se evaluó la existencia de protección contra la oxidación con diamida por parte del ATP-Mg [Fig. 4.1.29 (C)]. En este caso se graficaron los valores de  $k_{obs}$  en función de la concentración de ATP-Mg real [Fig. 4.1.29 (D)] y en función de la concentración de ATP libre [Fig. 4.1.29 (E)]. En el primer caso [Fig. 4.1.29 (D)] no se observó una respuesta lineal de  $k_{obs}$  en función de la concentración de ATP complejado al metal, pero si las constantes eran graficadas en función del ATP libre [Fig. 4.1.29 (E)], la recta resultante reflejaba un valor de  $K_d^{ATP}$  de 1,709 mM, igual al obtenido a partir de Fig. 4.1.29 (B). Es decir, la protección se da por la unión del ATP al sitio no catalítico, por lo que la misma debería deberse a efectos similares los planteados para 3PGA: estéricos o de cambio de conformación o de ocultamiento de los tioles afectados en la oxidación. En conclusión, la unión de los sustratos a sitios cercanos a las Cys-21, 58, 77 y 95 es la responsable de disminuir la oxidación. No fue posible calcular  $K_d^{Mg-ATP}$  por este método ya que no presentó protección sobre la *Ptr*PGKasa-1.



**Fig. 4.1.29:** Protección por sustratos de la *Ptr*PGKasa-1 a la oxidación por diamida y cálculo de  $K_d$ . Izquierda: Actividad Relativa (%) vs tiempo de oxidación. La *Ptr*PGKasa-1 0,1  $\mu$ M fue incubada con diamida 0,1 mM a 25 °C en presencia de (A) 3PGA; (B) ATP; (C) ATP-Mg, todos en concentraciones: 0 mM (●); 0,2 mM (▲); 1 mM (▼); y 5 mM (◆). Se realizó el control sin oxidante (■). A cada tiempo especificado se tomó una alícuota y se la ensayó por actividad enzimática. Derecha: Gráficas de inversa de  $k_{obs}$  vs concentración del sustrato: (D) complejo ATP-Mg; (E) ATP libre.

#### 4.1.5.4 Estudio de la reducción de la *Ptr*PGKasa-1.

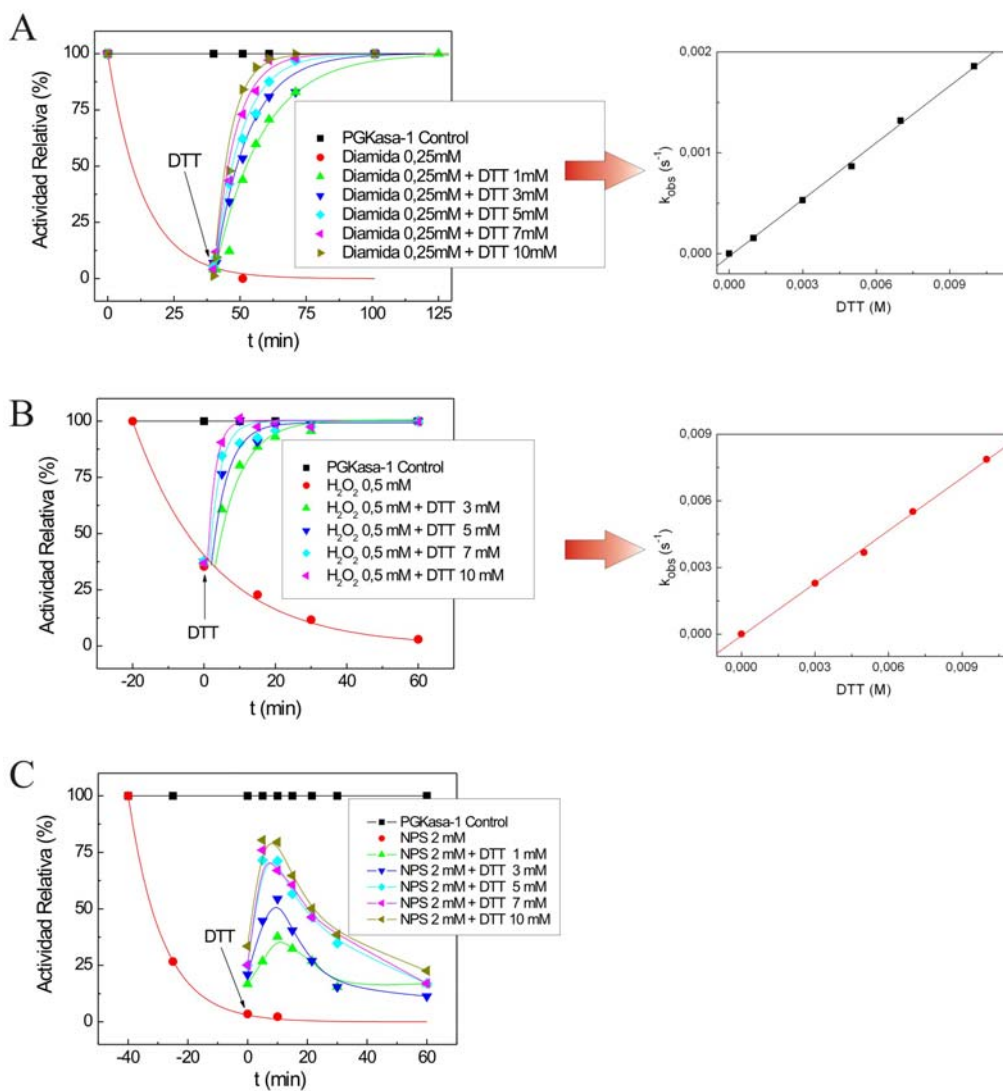
La regulación redox *in vivo* de una proteína no involucra solamente la inhibición por oxidación, sino que este fenómeno debe poder ser revertido por agentes reductores intracelulares. Por lo tanto, la pregunta que hay que responder ahora es si la oxidación de la *Ptr*PGKasa-1 es revertida por incubación con reductores y el grado de reversión que es posible lograr luego de la exposición a cada oxidante.

Un estudio similar al que se hizo para dilucidar el mecanismo de oxidación puede hacerse para entender el fenómeno de reducción. En este caso,  $k_{obs}$  está definida a partir de:

$$\text{Actividad Relativa (\%)} = 100 \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot t})$$

donde Actividad Relativa (%) es la actividad enzimática medida al tiempo  $t$ , tomando como 100% la AE a tiempo cero. Se oxidó la *Ptr*PGKasa-1 con una concentración dada del inhibidor, durante un tiempo determinado, luego de lo cual se la diluyó para reducir la concentración del oxidante y se la incubó con distintas concentraciones del agente reductor, midiendo el porcentaje de actividad enzimática recuperado. Las incubaciones se realizaron a pH 8,0 en *buffer* B, con 0,1  $\mu$ M de enzima, a temperaturas de 25 °C. La medida de actividad enzimática se realizó en presencia de concentraciones saturantes de los sustratos ( $[ATP] = [3PGA] = [MgCl_2] = 5$  mM), en ausencia de reductor en la mezcla de reacción.

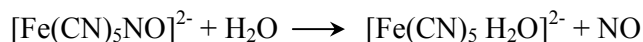
El primer ensayo realizado fue el de oxidación con diamida y posterior reducción con DTT. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.1.30 (A). También se evaluó si este reductor era capaz de revertir la oxidación producida por  $H_2O_2$  y NPS [Fig. 4.1.30 (B) y (C)].



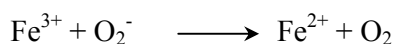
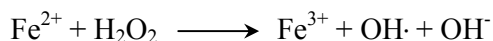
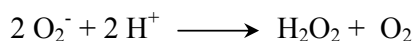
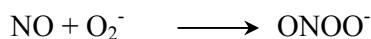
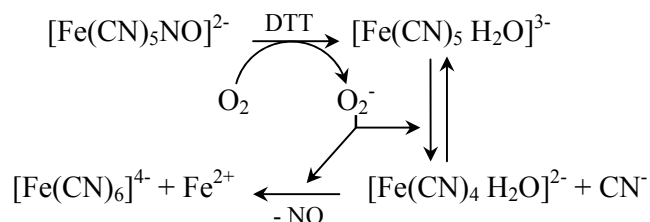
**Fig. 4.1.30:** Curvas de Actividad Relativa (%) en función del tiempo y de  $k_{obs}$  vs concentración de DTT, luego de la oxidación con distintos agentes oxidantes: **(A)** Diamida; **(B)** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **(C)** NPS. La incubación de la enzima se realizó a 25 °C. [*Ptr*-PGKasa-1] = 0,1 μM, en *buffer* B desgasificado.

Como se observa en la Fig. 4.1.30, el DTT revierte la oxidación causada por diamida y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, recuperándose el 100% de la AE inicial. La reducción en los casos (A) y (B) responden al mecanismo de un solo paso descrito en 4.1.5.1 (B), y sus constantes de segundo orden se muestran en la Tabla 4.1.10. Para el caso de la adición de DTT a la *Ptr*-PGKasa-1 oxidada con NPS, se observa una recuperación parcial de la actividad

seguida por la disminución en la misma hasta hacerse casi nula. La descomposición fotolítica del nitroprusiato de sodio sigue la siguiente reacción:



En presencia de DTT, la reducción aeróbica del NPS lleva a la formación de radicales hidroxilos libres mediante la reacción de Fenton (Fenton, 1894), debida a la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  según (Aleryani y col., 1999):

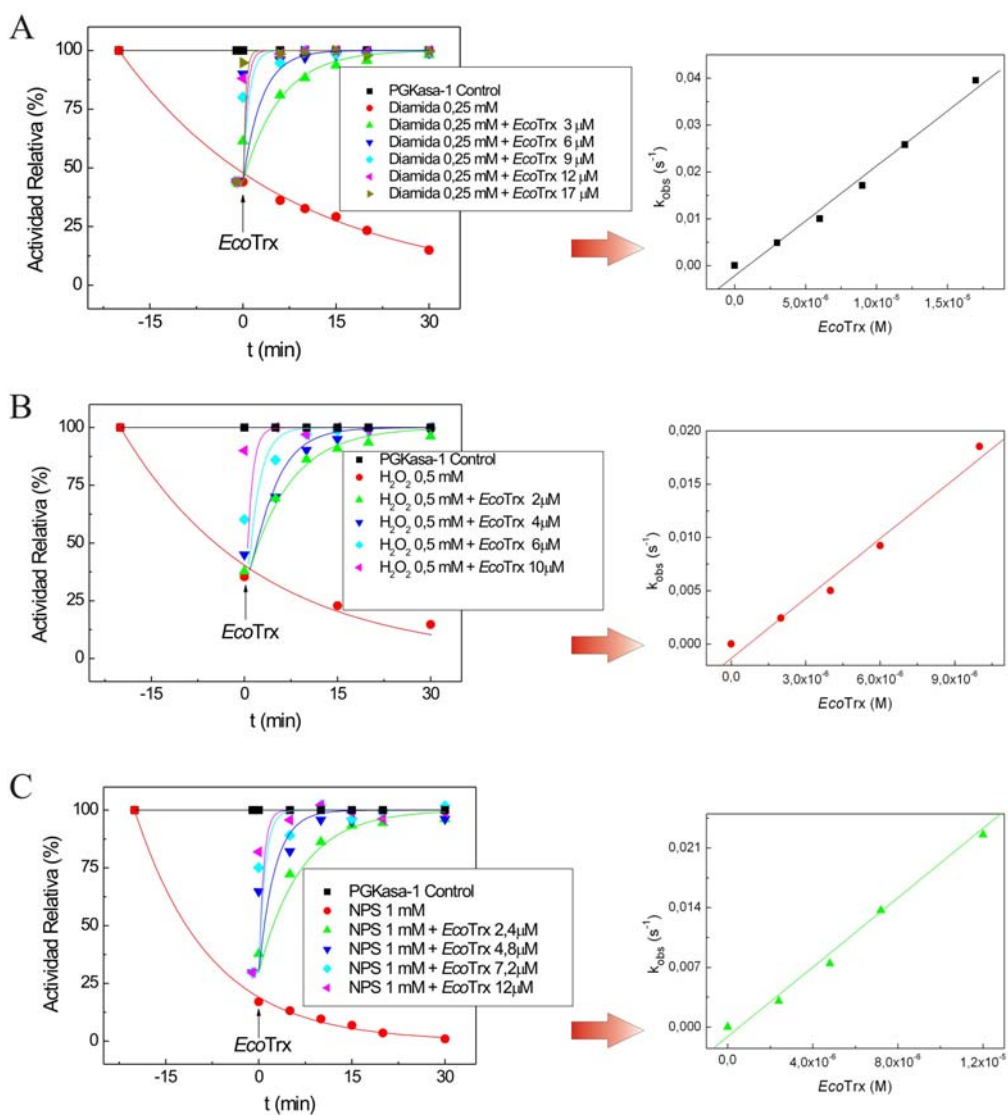


Según estas reacciones, la pérdida de actividad enzimática podría deberse a dos razones: la consecuente oxidación de la *Ptr*PGKasa-1 por el peróxido de hidrógeno formado durante la reducción del NPS, o por proteólisis de la enzima por reacción de los radicales libres sobre los enlaces peptídicos. Se realizó un SDS-PAGE de la reacción y no se observó clivaje total de la proteína, pero sí una banda más difusa (se ahondará en el tema en el apartado 4.1.5.6).

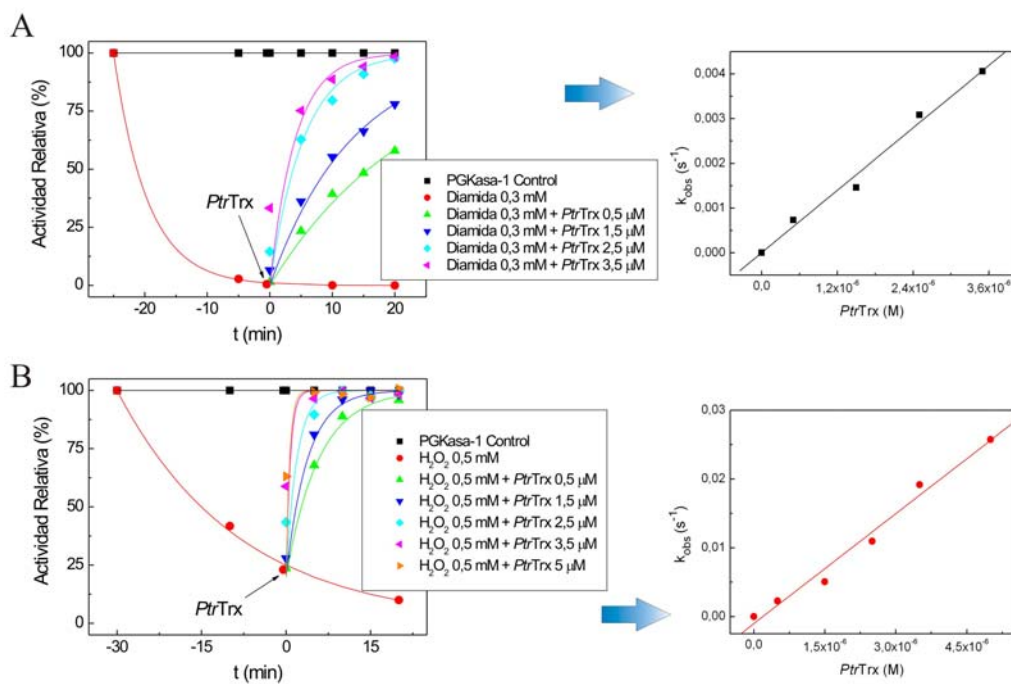
En cuanto a la reducción de la *Ptr*PGKasa-1 oxidada con GSSG, por cuestiones de estabilidad de la enzima al pH de incubación alcanzado con este oxidante, no fue posible hacer las curvas de recuperación de AE en función del tiempo de incubación con DTT o GSH a distintas concentraciones. En cambio, se oxidó la *Ptr*PGKasa-1 con GSSG 5 mM durante 60 min, luego de lo cual se le adicionó un exceso de DTT (10 mM) o GSH (10 mM), sin lavado previo del oxidante. Ambos reductores lograron recuperar el 100% de la actividad enzimática inicial, aunque GSH lo hizo con menor velocidad.

DTT es un compuesto sintético que no se encuentra en las células. Para poder inferir sobre la regulación redox de la *PtrPGKasa-1 in vivo*, es necesario contar con reductores fisiológicos, de importancia biológica, como las Trxs. Se han logrado identificar varios genes codificantes para Trxs en *P. tricornutum*, incluyendo tres Trx h (dos localizadas en el RE/espacio periplástico y una en el citosol), una Trx o mitocondrial y cuatro cloroplastídicas: f, m y dos y (Weber y col., 2009). Se logró expresar la enzima *PtrTrx-h2* (de ahora en más *PtrTrx*), localizadas en el RE/espacio periplástico, soluble y activa a partir de células *E. coli* Rosetta [pRSET-A/*PtrTrx-h2*], y se purificó mediante IMAC alcanzándose un alto grado de pureza. No se contaba con ninguna Trx cloroplastídica de la diatomea, por lo que se ensayó la reducción de la *PtrPGKasa-1* oxidada mediante la adición de la *EcoTrx* y de la *PtrTrx* reducidas. La *EcoTrx* presenta una homología de 27-30% con las *PtrTrxs* de cloroplasto.

Las gráficas y los valores de las constantes cinéticas obtenidos de la reducción con las Trxs se muestran en la Fig. 4.1.31, Fig. 4.1.32 y Tabla 4.1.10. Como se observa, los valores de las constantes de segundo orden para DTT están en el orden de la unidad ( $M^{-1} s^{-1}$ ), mientras que las Trxs reducen la enzima con una  $k''$  3 órdenes de magnitud mayor. La oxidación con diamida es revertida por la *PtrTrx* con la mitad de eficiencia que por la *EcoTrx*, mientras que la inactivación mediada por peróxido es revertida tres veces más eficazmente por la Trx de la diatomea.



**Fig. 4.1.31:** Curvas de Actividad Relativa (%) en función del tiempo y de  $k_{obs}$  vs concentración de la EcoTrx, luego de la oxidación con distintos agentes oxidantes: **(A)** Diamida; **(B)**  $H_2O_2$ ; **(C)** NPS. La incubación de la enzima se realizó a 25 °C.  $[PtrPGKasa-1] = 0,1 \mu M$ , en *buffer* B desgasificado.



**Fig. 4.1.32:** Curvas de Actividad Relativa (%) en función del tiempo y de  $k_{obs}$  vs concentración de la *PtrTrx*, luego de la oxidación con distintos agentes oxidantes: **(A)** Diamida; **(B)**  $H_2O_2$ . La incubación de la enzima se realizó a 25 °C.  $[PtrPGKasa-1] = 0,1 \mu M$ , en *buffer* B desgasificado.

Oxidante	Reductor	$k''$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )
Diamida	DTT	0,188
	<i>EcoTrx</i>	2.345
	<i>PtrTrx</i>	1.163
$H_2O_2$	DTT	0,790
	<i>EcoTrx</i>	1.873
	<i>PtrTrx</i>	5.328
NPS	DTT	n.d. <sup>a</sup>
	<i>EcoTrx</i>	2.034
	<i>PtrTrx</i>	n.d.



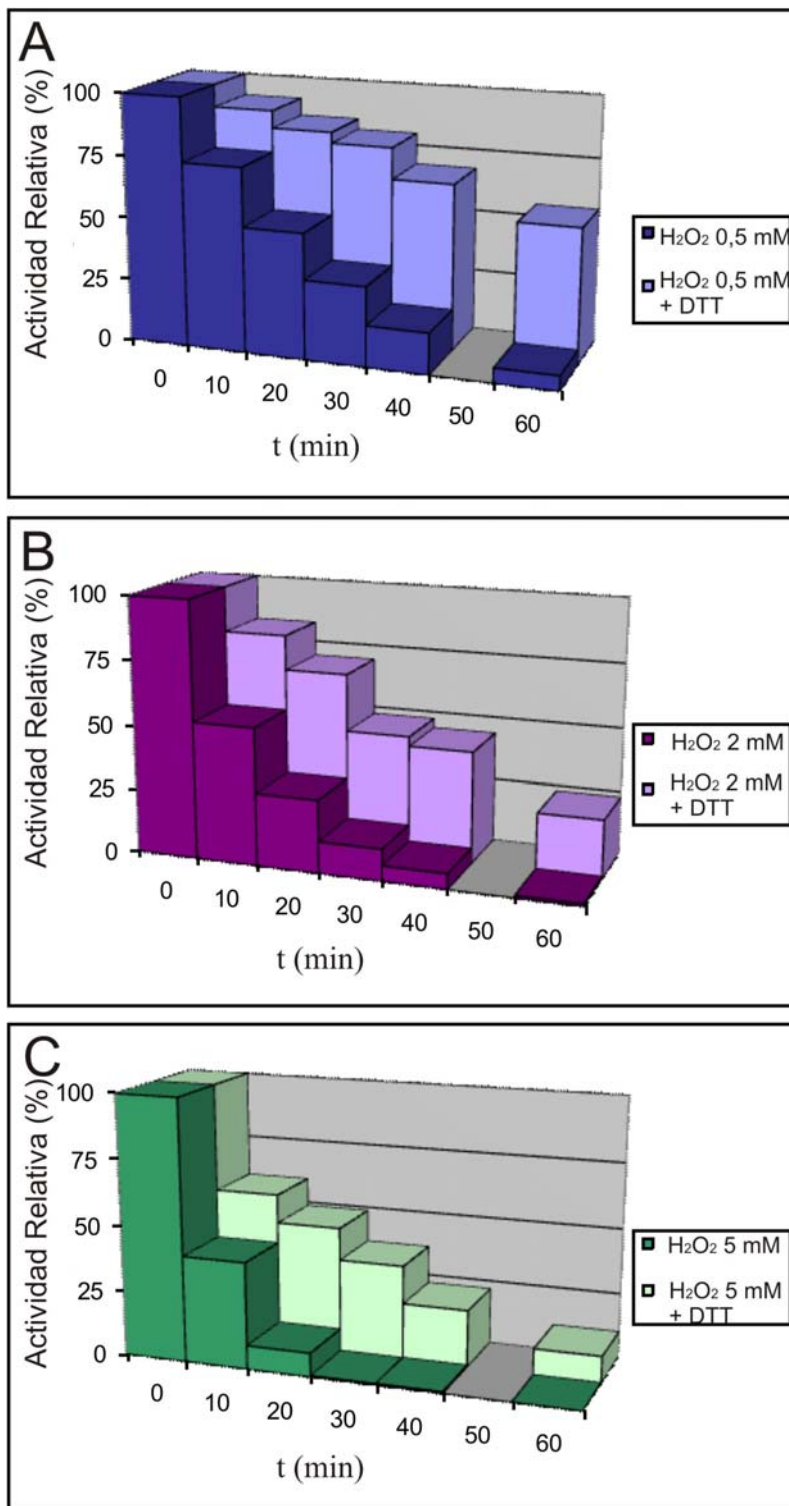
**Tabla 4.1.10:** Constantes cinéticas correspondientes a la reducción de la *Ptr*PGKasa-1 con DTT, *Eco*Trx y *Ptr*Trx, luego de la oxidación con diamida, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NPS. La incubación de la enzima se realizó a 25 °C. [*Ptr*PGKasa-1-NHis] = 0,1 μM, en *buffer* B desgasificado, pH 8,0. <sup>a</sup> n.d., no determinado.

El mecanismo de activación que sigue el fenómeno de reducción por las Trxs corresponde al de un paso, al igual que para el DTT. Se observa que los tres agentes reductores ensayados son capaces de recuperar el 100% de la actividad enzimática inicial para los oxidantes, en las concentraciones y tiempos ensayados.

Por lo observado hasta ahora, podría suponerse que la *Ptr*PGKasa-1 sería regulada *in vivo*, ya que sus constantes cinéticas de oxidación y reducción se encuentran en el orden de las descriptas para otras enzimas que lo son (Ballicora y Wolosiuk, 1994; Geck y Hartman, 2000).

La oxidación causada por peróxido de hidrógeno es un fenómeno más complejo que el causado por oxidantes como la diamida. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene la capacidad de llevar a la formación de ácidos sulfénicos que pueden finalmente convertirse en puentes disulfuro o sobre-oxidarse dando como productos ácido sulfínico y sulfónico, los cuales no son revertidos por DTT o Trx. Se ensayó la dependencia de la reversión de la oxidación causada por este agente, con la concentración del oxidante y con el tiempo de incubación con la *Ptr*PGKasa-1. La enzima fue incubada con una concentración dada del inhibidor, durante distintos tiempos, luego de lo cual se la diluyó para reducir la concentración del oxidante y se la incubó con el agente reductor DTT en concentración 20 mM durante 15 min, para asegurar la reducción máxima posible. Se midió el porcentaje de actividad enzimática recuperado [Actividad Relativa (%)]. Las incubaciones se realizaron a pH 8,0 en *buffer* B, con 0,1 μM de la *Ptr*PGKasa-1, a temperaturas de 25 °C. La medida de actividad enzimática se realizó en presencia de concentraciones saturantes de los sustratos ([ATP] = [3PGA] = [MgCl<sub>2</sub>] = 5 mM), en ausencia de reductor en la mezcla de reacción. Se ensayaron tres concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0,5, 2 y 5 mM, con tiempos de oxidación entre 0 y 60 min.

Los resultados se observan en la Fig. 4.1.33.



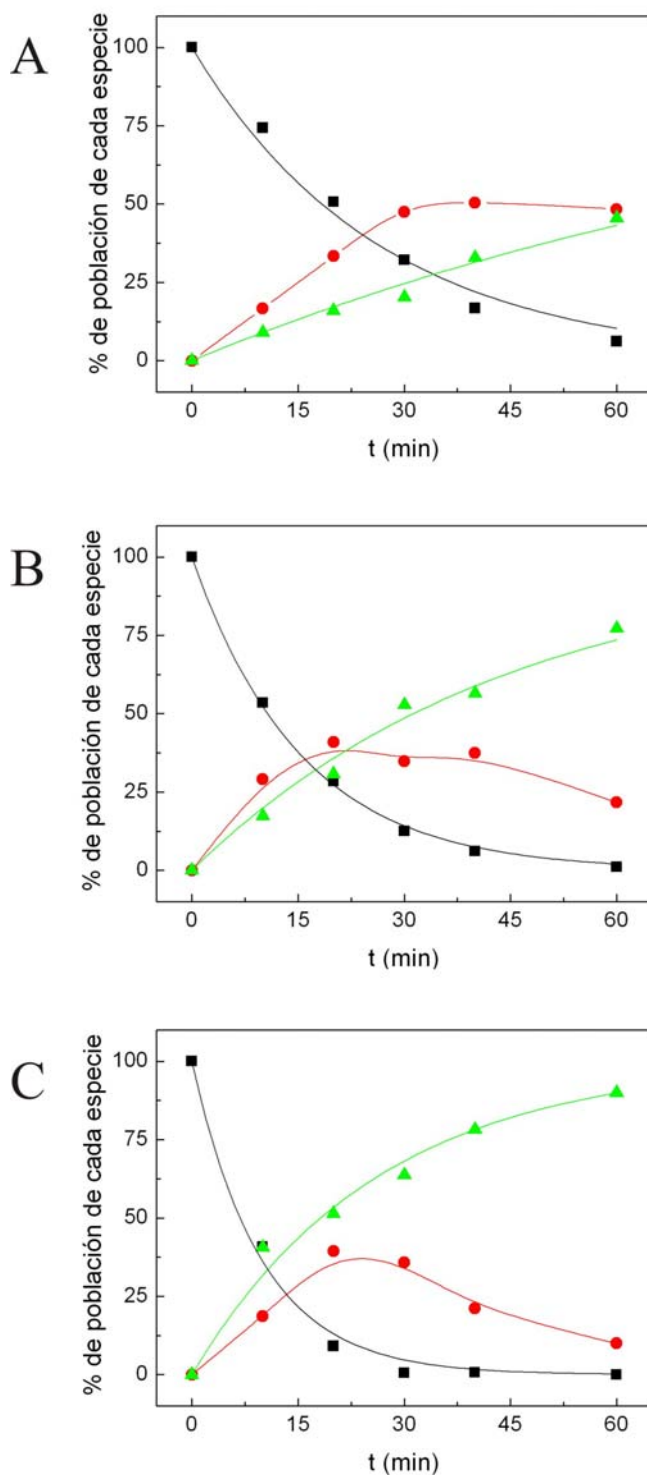
**Fig. 4.1.33:** Gráficas de Actividad Relativa (%) en función del tiempo de oxidación, con / sin la posterior reducción con DTT 20 mM durante 15 min. El agente oxidante utilizado fue H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en concentraciones 0,5 mM (A), 2 mM (B) y 5 mM (C). [*Ptr*-PGKasa-1] = 0,1 μM. T = 25 °C.

Como puede observarse en la Fig. 4.1.33, a medida que aumenta el grado de inactivación la oxidación se torna más irreversible. Esto puede deberse a sobre-oxidaciones en las Cys que no son revertidas por el DTT. Otra forma de expresar estos resultados es hacerlo como proporción de especies oxidadas que pueden ser revertidas y de las que resultan no revertidas por reductores (Sohn y Rudolph, 2003). Así, si consideramos:

$$\%AE_{rev} = \%AE_{rec} - \%AE_{rem}$$

$$\%AE_{irrev} = 100 - \%AE_{rev} - \%AE_{rem}$$

donde  $\%AE_{rev}$  es el porcentaje de actividad enzimática que puede ser revertida por el agente reductor luego de la oxidación, que resulta igual a la resta entre el porcentaje de actividad recuperado luego de la incubación de la *PtrPGKasa-1* parcialmente oxidada con el reductor ( $\%AE_{rec}$ ) y el porcentaje de AE remanente de la enzima parcialmente oxidada ( $\%AE_{rem}$ ).  $\%AE_{irrev}$  es el porcentaje de actividad enzimática no recuperable luego de la incubación de agentes reductores. Así  $\%AE_{rev}$  incluye las formas oxidadas sulfénico y puente disulfuro, mientras que  $\%AE_{irrev}$  representa la población de Cys que se encuentran como ácidos sulfínicos y sulfónicos (Sohn y Rudolph, 2003). Si graficamos estos porcentajes para cada concentración de  $H_2O_2$  de la Fig. 4.1.33, obtenemos lo observado en la Fig. 4.1.34.

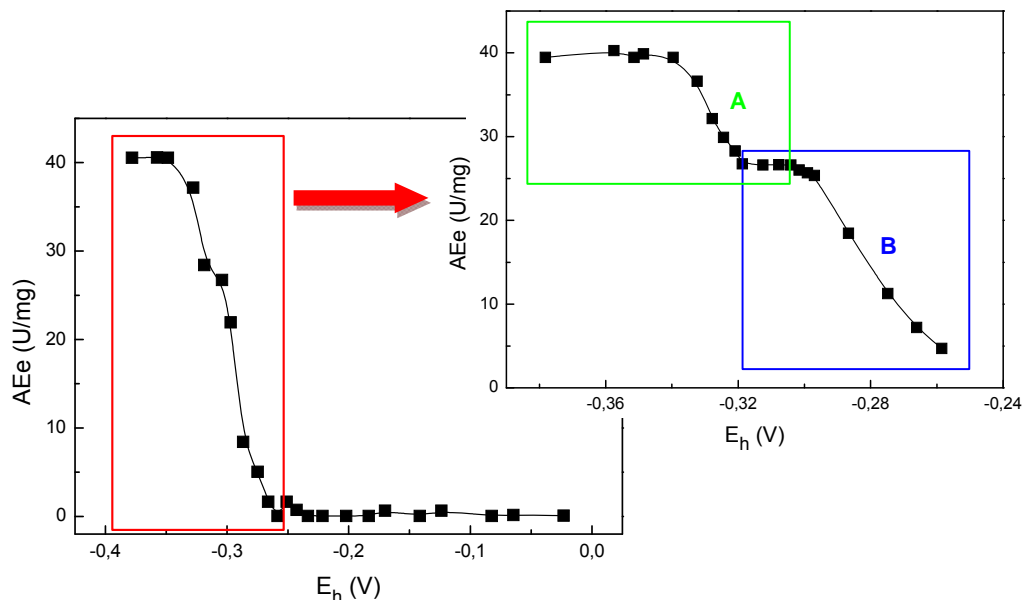


**Fig. 4.1.34:** Curvas de desaparición de cisteínas libres (■), aparición de formas oxidadas que pueden ser revertidas por reductores (sulfénico y disulfuro, ●), y aparición de formas oxidadas que no lo son (ácidos sulfínico y sulfónico, ▲) en función del tiempo, medidas por AE. (A)  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,5 mM; (B)  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM; (C)  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 mM.

Es necesario aclarar que los porcentajes de cada población en la Fig. 4.1.34 sólo involucran a las Cys responsables de la pérdida de AE. Si existieran modificaciones en algunos residuos que no causaran inactivación, no serían detectadas por este método. En la Fig. 4.1.34 puede observarse cómo la aparición de formas oxidadas no revertidas por agentes reductores es mayor y más rápida cuando más alta es la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.1.5.5 Titulación redox y cálculo del potencial de reducción de la PtrPGKasa-1.

La oxidación y reducción de moléculas involucra el intercambio de electrones. El potencial de reducción o potencial redox ( $E_h$ ) es una medida de la tendencia de un compuesto de adquirir electrones de otro que se oxida, es decir es la capacidad de reducción del primer compuesto.  $E_h$  es medido en V y representa la afinidad de una sustancia por los electrones, su electronegatividad (Elgán, 2009). El potencial redox de una proteína a un pH dado ( $E_{m;pH}$ ) es el valor de potencial para el cual las concentraciones de las formas oxidada y reducida de la misma son iguales. Para hallarlo se incuba la enzima en un *buffer* redox de potencial definido ( $E_h$ ) a un pH y temperatura fijos, se deja que llegue a equilibrio y luego se mide AE. Es importante que el agua utilizada para la preparación del medio de incubación esté desgasificada. Finalmente se grafica AE en función de  $E_h$  y se ajusta a la ecuación de Nerst. Los resultados obtenidos se observan en la Fig. 4.1.35.



**Fig. 4.1.35:** Titulación redox de la *PtrPGKasa-1*. Gráfica de AEe en función del potencial redox. [2ME] + [HEDS] = 10 mM; pH 8,0; T = 25 °C; t de equilibrado = 30 min. A la izquierda se muestra la titulación en un rango de  $E_h$  de -0,4 a 0 V. A la derecha, la curva a  $E_h$  más negativos (-0,4 a -0,25 V). Los recuadros **A** y **B** muestran dos zonas de la curva (ver texto). Los valores experimentales fueron ajustados a la ecuación de Nerst para un sistema redox de dos electrones.

Como se esperaba, la AE máxima se logró a valores de  $E_h$  más negativos, coherente con el hecho de que la actividad de la *PtrPGKasa-1* es mayor cuando se encuentra totalmente reducida (Fig. 4.1.35). La titulación redox de la enzima exhibió una curva bifásica, lo que resultó en la obtención de dos potenciales estándar distintos, uno correspondiente a la zona demarcada como **A** en la Fig. 4.1.35 y otro a potenciales más positivos (**B**). Ajustando los valores de Actividad Relativa (%) obtenidos a partir de estas gráficas a la ecuación de Nerst para un sistema redox de dos electrones, se obtienen los potenciales estándar ( $E_m$ ) para cada zona de la curva:

$$\text{Actividad Relativa (\%)} = \frac{100}{1 + 10^{(E_m - E_h) p}}$$

donde  $p$  es la pendiente de la gráfica (Krimm y col., 1998).

Así, los valores obtenidos para los potenciales de reducción son:

**A:**  $E_{m,8,0} = (-0,329 \pm 0,001) \text{ V}$

**B:**  $E_{m,8,0} = (-0,282 \pm 0,001) \text{ V}$

Esto indica la existencia de más de un centro redox en la *PtrPGKasa-1*, con características diferenciales, en lo que se refiere a las Cys involucradas en AE. Los dos valores de  $E_m$  caen dentro del rango de potenciales reportados para otras proteínas reguladas por el estado redox, incluyendo Trxs, ferredoxina-tiorredoxina reductasas y de enzimas reguladas por Trx: -0,280 a -0,330 V (Hutchison y Ort, 1995; Hirasawa y col., 1999; Hutchison y col., 2000; Hicks y col., 2007), sugiriendo que la *PtrPGKasa-1* podría ser tan sensible a los cambios intracelulares ambientales como las enzimas de plantas de las que se sabe tienen importantes roles en sistemas de balance redox.

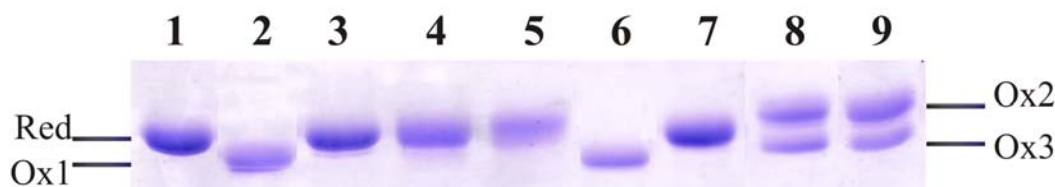
#### 4.1.5.6 Geles no reductores de la *PtrPGKasa-1* oxidada y reducida.

La formación de puentes disulfuro puede llevar a cambios en la conformación de la macromolécula, dependiendo de los residuos involucrados en este enlace covalente. Así, si las Cys implicadas en el puente son de cadenas distintas, la formación de este enlace intercatenario llevará a la visualización de bandas de MM de mayor tamaño en un SDS-PAGE sin el agregado de agente reductor. Si, en cambio, el puente disulfuro fuera intracatenario, dependiendo de la distancia en la secuencia aminoacídica entre las Cys responsables del enlace, la movilidad electroforética sería mayor por existir una compactación en la conformación, en presencia de SDS (Loferer y col., 1995; Kang y col., 1999). Si los residuos involucrados estuvieran cercanos en la estructura primaria, el efecto sobre la movilidad podría ser inapreciable en el gel desnaturante. La formación de ácidos sulfénicos tampoco resulta evidente con esta técnica.

Se realizó un SDS-PAGE no reductor al 8,5% de la *PtrPGKasa-1* bajo distintas condiciones redox, como se observa en la Fig. 4.1.36. La enzima (2  $\mu\text{M}$  en *buffer* B) se trató de la siguiente forma (T = 25 °C):

1. *PtrPGKasa-1* totalmente reducida: DTT 10 mM, 10 min.
2. *PtrPGKasa-1* oxidada con diamida: Diamida 1 mM, 10 min.

3. *PtrPGKasa-1* oxidada con diamida y reducida con DTT: Diamida 1 mM, 10 min, luego de lo cual se la redujo con DTT 10 mM, 10 min.
4. *PtrPGKasa-1* oxidada con NPS: NPS 10 mM, 30 min.
5. *PtrPGKasa-1* oxidada con NPS y reducida con DTT: NPS 10 mM, 30 min, luego de lo cual se la redujo con DTT 10 mM, 10 min.
6. *PtrPGKasa-1* oxidada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM, 10 min. En este caso la oxidación sería revertida por agentes reductores.
7. *PtrPGKasa-1* oxidada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y reducida con DTT: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM, 10 min, luego de lo cual se la redujo con DTT 10 mM, 10 min.
8. *PtrPGKasa-1* oxidada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en alta concentración: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 450 mM, 20 min. Este carril correspondería a la oxidación irreversible causada por el peróxido de hidrógeno.
9. *PtrPGKasa-1* oxidada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en alta concentración y reducida con DTT: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 450 mM, 20 min, luego de lo cual se la redujo con DTT 10 mM, 10 min.



**Fig. 4.1.36:** SDS-PAGE no reductor 8,5% de la *PtrPGKasa-1* bajo distintas condiciones redox: **1:** reducida; **2:** oxidada con diamida; **3:** oxidada con diamida y reducida con DTT; **4:** oxidada con NPS; **5:** oxidada con NPS y reducida con DTT; **6:** oxidada con baja concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **7:** oxidada con baja concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y reducida con DTT; **8:** oxidada con alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **9:** oxidada con alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y reducida con DTT. “Red” indica la forma reducida de la enzima, “Ox1”, “Ox2” y “Ox3” señalan las formas oxidadas (ver texto). Se sembraron 2 µg de enzima en cada carril.

En primer lugar, al oxidar la *PtrPGKasa-1* no se observaron bandas proteicas que correspondieran a la enzima oligomerizada, por lo que se descarta la formación de puentes disulfuro intercatenarios. Por otro lado, la *PtrPGKasa-1* tratada con diamida (Fig. 4.1.36, carril **2**) presenta una banda de movilidad electroforética mayor (“Ox1”) que la de la enzima reducida (“Red”), probablemente causada por un puente disulfuro