

R.15933

TJ-630

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL



Grado de Ingeniería Agrónoma en esta Tesis Doctoral
número 32 número 37 del libro
de tesis doctorales
Sevilla, 1998

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

El Jefe del Negociado de Tesis

[Handwritten signature]

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA VEGETAL Y BIOLOGIA
MOLECULAR

METABOLISMO DEL AZUFRE EN EL ALGA EUCARIOTICA
Monoraphidium braunii. PURIFICACION Y CARACTERIZACION
DE LA O-ACETIL-L-SERINA(TIOL)LIASA

Trabajo realizado para optar al grado de Doctor por el Ingeniero Agrónomo

D. Jorge Guillermo González Arroyo

[Handwritten signature]

Dr. José M. Vega Piqueres
Catedrático de Bioquímica y
Biología Molecular

Directores

[Handwritten signature]

Dr. José Román Pérez Castiñeira
Doctor en Ciencias Químicas

[Handwritten signature]

D. Jorge G. González Arroyo
Ingeniero Agrónomo

A Diana, la Rubia de Flores

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, en el seno del grupo que trabaja en la Facultad de Química de la Universidad Hispalense y que dirige el Dr. José María Vega Piqueres, a quien le agradezco la oportunidad que me ha brindado desde el momento que me aceptó como miembro de su grupo. Además, deseo agradecerle sobremedida la orientación, dedicación y la tarea de dirección que ha desarrollado durante la ejecución de este trabajo. Una mención especial merece su paciencia, su hospitalidad, su apreciación personal del desarraigo y el choque cultural, su humor y su chispa.

Al Dr. Miguel García Guerrero le agradezco su calurosa acogida durante mi estancia en Sevilla, su interés permanente por el estado de avance de mi trabajo y su valoración ecuaníme de los acontecimientos.

Al Dr. José Román Pérez Castiñeira le agradezco su orientación, su visión pragmática muy acertada, su sinceridad y su asistencia en la labor de investigación. Al Dr. José León le agradezco su inestimable ayuda en los comienzos de mi Tesis. A los Dres. Francisco Galván, Antonio Márquez, Cecilia Gotor y Javier Cejudo, les agradezco su colaboración, sus opiniones y enmiendas.

Un agradecimiento profundo a todos los compañeros del laboratorio por los momentos que me tocó compartir en esa quinta planta del edificio, por el aliento, el estímulo, la ayuda y el afecto (que es inmensurable). Muy especialmente a Javier (el Troesma), María José, Elo, Puri, Rosa, Tere, Victoria (el Pimpollo), Carlos (el Abstemio), Fernando, Consuelo, José Manuel, José Luis, Paco (el Bético), Charo (la morena Orgánica), y a todos aquellos que nunca podré excluir de mi memoria. También deseo agradecer a la gente (Doctores, becarios, técnicos y secretarías) del Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, con sede en la Facultad de

Biología, y a muchísimas personas que me han ayudado y que pertenecen a distintos Departamentos con sede en las Facultades de Química y Biología.

A las autoridades y personal del Colegio Mayor Hernando Colón les agradezco la atención esmerada y el trato agradable que recibí durante el tiempo que estuve alojado en sus instalaciones.

A Doña María Luisa Palacios y al personal del Negociado de Investigación y Tercer Ciclo, que me ayudaron desde un principio, y prestaron toda su colaboración para que mi estancia y mi labor de estudio e investigación en la Universidad Hispalense se desarrollara en una atmósfera por demás alegre y agradable.

A los Dres. ultramarinos Norma Kerber, Norma Pucheu y Augusto (Chicho) García, y al Ing. Agr. Carlos Mundt, ex-decano de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. A mis mecenas entrañables: Gari Luquer, Maite Alvarez, Atilio Vasquez y Alberto Taverna. A mis amigos y amigas, a quienes les conozco la fibra.

A mis padres, Trinidad y Guillermo.

A Maricruz por su inestimable ayuda en una etapa crucial de mi trabajo.

A Sevilla, a Granada, a Andalucía y su gente. A la Feria de Sevilla, al Guadalquivir y a los azahares. A los atardeceres sobre el Aljarafe.

Por último, quiero agradecer a la Universidad de Sevilla la concesión de una beca de Investigación predoctoral en el marco de un Programa de Cooperación con Universidades Latinoamericanas y con la finalidad de promover la realización de estudios de posgrado en España; y también agradecer a la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires por el apoyo recibido durante mi estancia en Sevilla. También agradezco a la Junta de Andalucía (Grupo de Investigación CVI 0118) y a la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) (proyecto PB93-0735) el apoyo económico recibido.

(Gracias a *Monoraphidium braunii*)

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
APS	Adenosín-5'-fosfosulfato
Bis-Acrilamida	N,N'-Metilén-bis-acrilamida
BSA	Seroalbúmina bovina
CCCP	Carbonilcianuro- <i>m</i> -clorofenilhidrazona
CD	Cisteína desulfhidrilasa
CHES	Acido 2-(N-ciclohexilamino) etanosulfónico
Chl	Clorofila
DCCD	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DEAE	Dietyl-amino-etil
DTE	Ditioeritritol
DTT	Ditiotreitol
NADPH	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
OAS	O-Acetil-L-serina
OASTL	O-Acetil-L-serina(tiol)liasa
PAPS	3'-Fosfoadenosín-5'-fosfosulfato
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
SAT	Serina-acetil transferasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etilén-diamina
TNBS	Acido 2,4,6-trinitrobencén-sulfónico
Tris	Tris-(hidroximetil) aminometano
U	Unidad de actividad enzimática

INDICE

I. INTRODUCCION	21
1. El azufre en los seres vivos	21
2. Bioquímica de la asimilación de sulfato	22
2.1. <i>Transporte de sulfato</i>	22
2.2. <i>Activación de sulfato</i>	25
2.3. <i>Reducción del azufre inorgánico</i>	29
2.4. <i>Biosíntesis de L-Cisteína</i>	32
3. Genética de la asimilación de sulfato	35
3.1. <i>Estudios en Escherichia Coli</i>	35
3.2. <i>Estudios en Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.3. <i>Estudios en plantas</i>	37
4. Objetivos	39
II. MATERIALES Y METODOS	41
1. Organismo y condiciones de cultivo	41
2. Permeabilización de células y obtención de extractos crudos	42
3. Determinaciones analíticas	43
3.1. <i>L-Cisteína</i>	43
3.2. <i>Clorofila</i>	44
3.3. <i>Proteína</i>	44
3.4. <i>Sulfuro</i>	45
4. Actividades fotosintética y respiratoria	45

5. Actividades enzimáticas	46
5.1. <i>O-acetil-L-serina(tiol)liasa</i>	46
5.2. <i>Cisteína desulfhidrilasa</i>	46
5.3. <i>Alcohol deshidrogenasa</i>	47
6. Determinación del radio de Stokes por filtración en gel	47
7. Concentración de proteínas	48
8. Diálisis	49
9. Reactivos	49
10. Aparatos	50
III. RESULTADOS	53
1. Consumo de sulfato en células de <i>M. braunii</i>	53
1.1. <i>Caraterización del consumo de sulfato</i>	53
1.2. <i>Estudios cinéticos</i>	54
1.3. <i>Regulación del consumo</i>	55
2. Purificación y caracterización de tres isoenzimas con actividad <i>O-acetil-L-serina(tiol)liasa</i> de <i>M. braunii</i>	59
2.1. <i>Caracterización de la Actividad</i>	59
2.2. <i>Purificación de Isoenzimas</i>	60
2.3. <i>Actividad cisteína desulfhidrilasa en las isoenzimas OASTL</i>	69
2.4. <i>Determinación de parámetros moleculares</i>	70
2.5. <i>Estudios cinéticos</i>	74
2.6. <i>Propiedades regulatorias</i>	82

3. Regulación de la expresión de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en células de <i>M. braunii</i>	91
3.1. <i>Efecto de las condiciones ambientales y nutricionales sobre la actividad OASTL</i>	91
3.2. <i>Efecto de las condiciones nutricionales sobre el nivel intracelular de las isoenzimas con actividad OASTL</i>	100
3.3. <i>Efecto de distintas condiciones ambientales y/o nutricionales sobre la inducción de la actividad OASTL</i>	104
3.4. <i>Evolución de la actividad OASTL en sultivos sincrónicos</i>	117
IV. DISCUSION	127
1. Consumo de sulfato en <i>M. braunii</i>	127
2. Purificación y caracterización de tres isoenzimas con actividad OASTL en <i>M. braunii</i>	130
3. Regulación de la expresión de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa de <i>M. braunii</i>	136
V. CONCLUSIONES	141
VI. BIBLIOGRAFIA	145

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Mecanismos de transporte de sulfato al interior celular	24
Fig. 2. Reducción asimilatoria de sulfato	27
Fig. 3. Consumo de sulfato por células de <i>M. braunii</i>	53
Fig. 4. Cinética del consumo de sulfato en células de <i>M. braunii</i>	55
Fig. 5. Efecto de la carencia de azufre sobre el consumo de sulfato en células de <i>M. braunii</i>	56
Fig. 6. Consumo de sulfato en células de <i>M. braunii</i> previamente crecidas en distintas fuentes de azufre	57
Fig. 7. Filtración en gel Sefadex G-200 de una preparación de O-acetil-L-serina(tiol)liasa de <i>M. braunii</i>	62
Fig. 8. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sefacel de una preparación de O-acetil-L-serina(tiol)liasa de <i>M. braunii</i>	63
Fig. 9. Cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa de la preparación OASTL _{A-B} de <i>M. braunii</i>	65

-
- Fig. 10. Cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa de la preparación OASTL_C de *M. braunii* 66
- Fig. 11. Filtración en gel Sephacryl S-300 HR de preparaciones de las isoenzimas OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C de *M. braunii* 68
- Fig. 12. Determinación del radio de Stokes de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa de *M. braunii* 71
- Fig. 13. Determinación del peso molecular de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa de *M. braunii* mediante cromatografía de filtración en gel Sephacryl S-300 HR 72
- Fig. 14. Filtración en gel Sephacryl S-300 HR de una preparación de O-acetil-L-serina(tiol)liasa de *M. braunii* 73
- Fig. 15. Determinación de las Km para O-acetil-L-serina correspondientes a OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C de *M. braunii* 75
- Fig. 16. Determinación de las Km para sulfuro correspondientes a OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C de *M. braunii* 76
- Fig. 17. Temperatura óptima de trabajo para el ensayo de la actividad OASTL de *M. braunii* 77

-
- Fig. 18. Representación de Arrhenius para la determinación de la energía de activación de las reacciones catalizadas por las isoenzimas OASTL_A (●), OASTL_B (■) y OASTL_C (▲) de *M. braunii* 78
- Fig. 19. Inactivación térmica de OASTL_A (●), OASTL_B (■) y OASTL_C (▲) de *M. braunii* 79
- Fig. 20. pH óptimo para el ensayo de la actividad OASTL de *M. braunii* 81
- Fig. 21. Inhibición por O-acetil-L-serina de la actividad de OASTL_A (●), OASTL_B (■) y OASTL_C (▲) de *M. braunii* 82
- Fig. 22. Inhibición por DTE de la actividad OASTL_A (●), OASTL_B (■) y OASTL_C (▲) de *M. braunii* 83
- Fig. 23. Inhibición por L-metionina de la actividad OASTL_A de *M. braunii* 86
- Fig. 24. Inhibición por L-metionina de la actividad OASTL_B de *M. braunii* 87
- Fig. 25. Inhibición por L-metionina de la actividad OASTL_C de *M. braunii* 88
- Fig. 26. Efecto de la calidad de luz sobre la actividad OASTL en células de *M. braunii* 93

Fig. 27. Actividad OASTL en células de <i>M. braunii</i> sometidas a carencia de distintos factores básicos para su crecimiento	99
Fig. 28. Efecto del crecimiento sobre el nivel intracelular de las isoenzimas con actividad OASTL de células de <i>M. braunii</i>	101
Fig. 29. Efecto de la carencia de carbono en el medio sobre el nivel intracelular de las isoenzimas con actividad OASTL de células de <i>M. braunii</i>	102
Fig. 30. Efecto de la carencia de nitrógeno en el medio sobre el nivel intracelular de las isoenzimas con actividad OASTL de células de <i>M. braunii</i>	103
Fig. 31. Efecto de la carencia de azufre en el medio sobre el nivel intracelular de las isoenzimas con actividad OASTL de células de <i>M. braunii</i>	104
Fig. 32. Efecto de la concentración de sulfato en el medio de cultivo sobre la inducción de la actividad OASTL en células de <i>M. braunii</i>	105
Fig. 33. Evolución de la actividad OASTL en células de <i>M. braunii</i> en función de la fuente de azufre del medio	106
Fig. 34. Evolución de la actividad OASTL en células de <i>M. braunii</i> en función de la fuente de azufre del medio	107

Fig. 35. Evolución de la actividad OASTL en células de <i>M. braunii</i> en función de la fuente de azufre del medio	108
Fig. 36. Evolución de la actividad OASTL en células de <i>M. braunii</i> en función de la fuente de azufre del medio	109
Fig. 37. Actividad OASTL en células de <i>M. braunii</i> sometidas a carencia de nitrógeno y azufre	111
Fig. 38. Efecto del CO ₂ sobre la inducción de la actividad OASTL en células de <i>M. braunii</i> carentes de fuente de azufre	113
Fig. 39. Efecto de la luz sobre la inducción de la actividad OASTL en células de <i>M. braunii</i> carentes de fuente de azufre	114
Fig. 40. Efecto del antibiótico cloranfenicol sobre la inducción de la actividad OASTL en células de <i>M. braunii</i> carentes de fuente de azufre	115
Fig. 41. Efecto del antibiótico cicloheximida sobre la inducción de la actividad OASTL en células de <i>M. braunii</i> carentes de fuente de azufre	116
Fig. 42. Efecto de los antibióticos cicloheximida y cloranfenicol sobre la inducción de la actividad OASTL en células de <i>M. braunii</i> carentes de fuente de azufre	117

- Fig. 43. Efecto del cloranfenicol en la evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii* 118
- Fig. 44. Evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii* tratados con cloranfenicol 119
- Fig. 45. Efecto de la cicloheximida en la evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii* 120
- Fig. 46. Evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii* 121
- Fig. 47. Efecto de antibióticos en la evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii* 122
- Fig. 48. Evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii* tratados con antibióticos 123
- Fig. 49. Efecto del paraquat en la evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii* 124

Fig. 50. Evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de <i>M. braunii</i> tratada con paraquat	125
---	-----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes estructurales y enzimas implicadas en la reducción asimilatoria del sulfato	38
Tabla 2. Efecto de sulfito y análogos de sulfato sobre el consumo de sulfato en <i>M. braunii</i>	58
Tabla 3. Caracterización de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa de <i>M. braunii</i>	59
Tabla 4. Caracterización de la actividad cisteína desulfhidrilasa de <i>M. braunii</i>	60
Tabla 5. Separación y purificación de isoenzimas con actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en <i>M. braunii</i>	69
Tabla 6. Comparación de actividades O-acetil-L-serina(tiol)liasa y cisteína desulfhidrilasa en las isoenzimas OASTL _A , OASTL _B Y OASTL _C de <i>M. braunii</i>	70
Tabla 7. Efecto de diferentes aminoácidos sobre la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa de las isoenzimas OASTL _A , OASTL _B Y OASTL _C de <i>M. braunii</i>	84

Tabla 8. Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa de las tres isoenzimas de <i>M. braunii</i>	89
Tabla 9. Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa de las isoenzimas de <i>M. braunii</i>	90
Tabla 10. Efecto de la intensidad de la luz sobre el nivel de actividad de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa en <i>M. braunii</i>	91
Tabla 11. Efecto de la fuente de carbono sobre el nivel de actividad de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa en <i>M. braunii</i>	94
Tabla 12. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el nivel de actividad de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa en <i>M. braunii</i>	95
Tabla 13. Efecto de la fuente de azufre sobre el nivel de actividad de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa en <i>M. braunii</i>	97
Tabla 14. Efecto del ion ferroso sobre el nivel de actividad de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa en <i>M. braunii</i>	98

I. INTRODUCCION

1. El azufre en los seres vivos

Carbono, nitrógeno y azufre son los elementos que sufren las transformaciones químicas más importantes en los seres vivos y su importancia cuantitativa es según el orden que se indica a continuación: el carbono constituye el 50% aproximadamente de la materia seca, el nitrógeno el 10%, mientras que el azufre sólo participa en una proporción inferior al 0,5%. Desde un punto de vista cualitativo todos son importantes y claves para los seres vivos por su especial incidencia en la formación de proteínas. Carbono y nitrógeno participan en los 20 aminoácidos proteinogénicos, mientras que el azufre sólo en dos, L-cisteína y L-metionina.

Microorganismos y organismos fotosintéticos en general toman el azufre de compuestos inorgánicos, siendo el más importante el sulfato, que durante su asimilación lo transforman en tioles, mientras que los animales básicamente ingieren el azufre en forma reducida, principalmente de los aminoácidos L-cisteína y L-metionina que regularmente acompañan a las proteínas, siendo la L-metionina un aminoácido esencial en la dieta del hombre. Cuando degradamos proteínas, el azufre que nos sobra se oxida a sulfato que excretamos a través de la orina, no obstante los ésteres de sulfato cumplen funciones de almacenaje o estructurales significativas. Por su parte, las formas reducidas del azufre no sólo son esenciales como componentes de proteínas, sino también como coenzimas (coenzima A, ácido lipoico, biotina, etc.) y metabolitos (glutatión).

En la interconversión de compuestos azufrados presentes en la biosfera participan una gran variedad de organismos, que vistos en conjunto diseñan el Ciclo del azufre en la biosfera (Siegel, 1975; Cooper, 1983).

2. Bioquímica de la asimilación de sulfato en organismos fotosintéticos

Microalgas y plantas superiores pueden utilizar sulfato como única fuente de azufre para la biosíntesis de su material celular. Estos organismos sintetizan rápidamente, a partir de sulfato, aminoácidos azufrados, sulfolípidos y otros metabolitos que contienen azufre. Para ello procesan el sulfato por medio de cuatro etapas bien diferenciadas:

1. Transporte
2. Activación
3. Reducción
4. Biosíntesis de L-cisteína

2.1. Transporte de sulfato

El sulfato se encuentra en el medio ambiente a concentraciones relativamente altas (25 mM en el agua de mar, 0,1 a 1 mM en el agua dulce y alrededor de 0,5 mM en las tierras cultivables), en comparación con el nitrógeno y el fósforo.

El transporte de sulfato ha sido revisado por Cram (1990) y la información acerca del mecanismo molecular del proceso es ciertamente escasa, siendo más amplia en el caso de procariotas, donde se ha contado con la poderosa ayuda de la genética y técnicas relacionadas que han suministrado un perfil molecular claro del sistema transportador de sulfato. No obstante el mecanismo molecular del proceso permanece por dilucidar.

Por su parte, muchos de los estudios realizados hasta la fecha en organismos fotosintéticos son de consumo de sulfato marcado con azufre-35, y han abarcado a células de plantas superiores (Lass y Ullrich-Eberius, 1984),

algas eucarióticas (Biedlingmaier y Schmidt, 1989; Pérez Castiñeira *et al.*, 1992) y cianobacterias (Green y Grossmann, 1988).

La información hasta la fecha se debate entre organismos que contienen dos o más sistemas de transporte de sulfato, con distinta afinidad, y otros donde aparentemente sólo existe un sistema de transporte.

En *Lemna paucicostata* se ha propuesto la existencia de por lo menos dos sistemas de transporte de sulfato (Datko y Mudd, 1984). En *Saccharomyces cerevisiae* hay evidencia de sistemas múltiples de transporte de sulfato: uno de ellos se expresa de manera constitutiva y tiene una baja afinidad por el sulfato, mientras que el otro constituye un sistema de alta afinidad que se sintetiza cuando caen los niveles de azufre exógeno (Breton y Surdin-Kerjan, 1977). Por su parte, en *Salmonella thyphimurium* y *Escherichia coli* el transporte de sulfato se muestra como un único sistema de transporte activo. Este complejo-permeasa está integrado por tres componentes de la membrana citoplasmática y una proteína de unión específica para el sustrato, que se encuentra localizada en el espacio periplásmico (Ames, 1986; Kredich, 1987). En el caso de *S. thyphimurium* la proteína que se une al sulfato está presente en el espacio periplásmico a muy altos niveles y une una molécula de sulfato por molécula de proteína; en tanto que dos proteínas de la membrana citoplasmática parece que se expanden en la bicapa lipídica y pueden formar un canal por donde pasaría el sustrato. La tercera proteína de la membrana hidroliza el ATP que proporciona la energía requerida para concentrar el sustrato dentro de la célula (Ames *et al.*, 1989).

En el caso de cianobacterias, los hallazgos indican la participación de un sistema de transporte específico para sulfato en condiciones normales de cultivo. Recientemente se ha propuesto que en estos organismos podría sintetizarse una segunda permeasa en condiciones de carencia de azufre (Schmidt y Jäger, 1992). Un sistema de transporte similar podría tener lugar en la envoltura del cloroplasto

de eucariotas fotosintéticos (Laudenbach y Grossman, 1991). También en el alga eucariótica *Chlamydomonas reinhardtii* se postula que, bajo condiciones de hambre de azufre, las células podrían sintetizar un nuevo sistema de transporte de sulfato con alta afinidad (Yildiz *et al.*, 1994).

Se han descrito dos sistemas de transporte de sulfato: a) uno, característico de organismos procarióticos, depende de la hidrólisis de ATP, pero no de gradiente de protones (Ferro-Luzzi Ames y Joshi, 1990; Laudenbach y Grossman, 1991). En este caso, es característica la presencia de una proteína de localización periplásmica que une sulfato y facilita su transporte (Fig. 1B), y; b) otro, característico de organismos eucarióticos, que utiliza una ATPasa para generar un gradiente de protones acoplado a la hidrólisis de ATP. En este caso, el sulfato entraría por un mecanismo de co-transporte de protones a través de una permeasa (Cram, 1990; Lass y Ullrich-Eberius, 1984) (Fig. 1A).

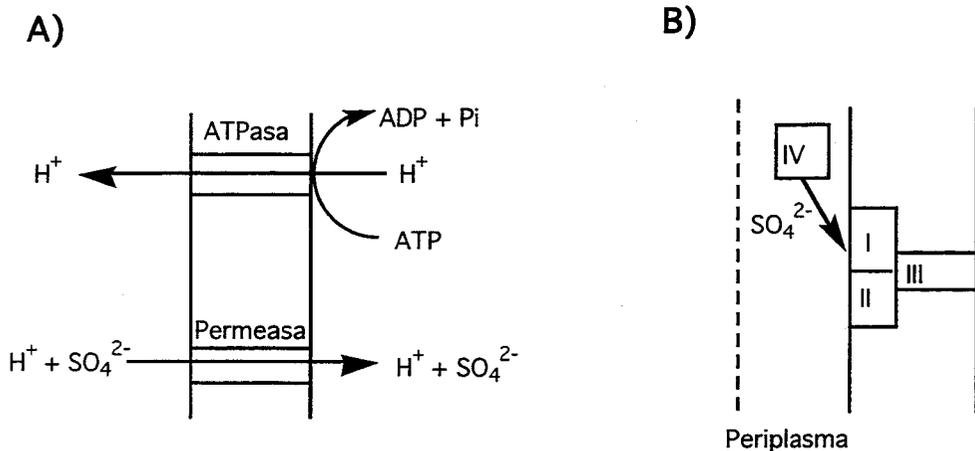


Fig. 1. Mecanismos de transporte de sulfato al interior celular. A) Permeasa que media un co-transporte de protones y sulfato. B) Permeasa periplásmica.

El transporte de sulfato en cianobacterias es dependiente de la luz, lo que indica un requerimiento de energía (Jeanjean y Broda, 1977; Utkilen *et al.*, 1976). En el caso de organismos eucarióticos, el transporte de sulfato al interior de la célula es un proceso dependiente de energía (Smith, 1976) y se inhibe por compuestos que desacoplan el transporte de electrones, como el CCCP y el dinitrofenol, además del DCCD que inhibe la ATPasa. En *S. cerevisiae* el transporte de sulfato depende de un gradiente de pH a través de la membrana plasmática, en tanto que la entrada de SO_4^{2-} se acopla a la entrada de H^+ (Roomans *et al.*, 1979). En *C. reinhardtii* la entrada de sulfato es un proceso que depende de energía y que está gobernado por un bomba de protones (Yildiz *et al.*, 1994). En plantas como *Lemna gibba* (Lass y Ullrich-Eberius, 1984) y *Brassica napus* (Hawkesford *et al.*, 1993) un mecanismo de co-transporte de H^+ interviene en la entrada de sulfato.

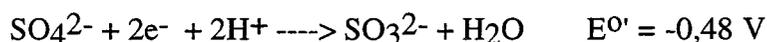
2.2. Activación de sulfato

La reducción del sulfato a sulfito no es posible bajo condiciones fisiológicas debido a que el par redox sulfato\sulfito tiene un potencial de óxido-reducción muy negativo y esto determina una barrera energética importante en el proceso de reducción, lo cual excluye la posibilidad de utilizar los donadores fisiológicos de electrones normales de la célula. Por lo tanto, el primer paso en la reducción asimilatoria del sulfato es su activación mediante la utilización de ATP produciéndose adenilil sulfato o adenosín 5'-fosfosulfato (APS), que implica la formación de una unión anhidro entre los ácidos fosfórico y sulfúrico.

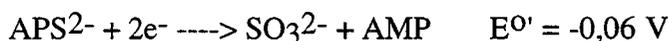


Esta reacción está catalizada por la ATP-sulfurilasa (EC 2.7.7.4) y está fuertemente desplazada hacia la izquierda, por lo que se requiere que una pirofosfatasa inorgánica retire el PPi del medio, desplazando así el equilibrio hacia la derecha.

La importancia de la activación del sulfato para su posterior reducción queda demostrada en el hecho de que los agentes reductores fisiológicos, tienen potenciales de reducción demasiado positivos para poder reducir el sulfato. Así, por ejemplo, el par NADPH/NAD⁺ tiene un E^{0'} = -0,32 V, mientras que la reacción:



Esto significa que la reducción de sulfato por NADPH sería un proceso endergónico; sin embargo la reacción:



Es decir, la reducción de APS por NADPH es termodinámicamente favorable.

El adenosín 5'-fosfosulfato (APS) que se forma es el sustrato para la adenosín 5'-fosfosulfato quinasa (APS quinasa; EC 2.7.1.25), que actúa en un segundo paso de activación para formar 3'-fosfoadenosín 5'-fosfosulfato (PAPS) (Brunold, 1990). En el caso de algas y plantas superiores se encuentran en discusión dos posibles rutas de asimilación del sulfato. En un caso se habla de una ruta APS-sulfito unido a un transportador y, en el otro, de una ruta denominada PAPS-sulfito libre (Figura 2) (Leustek, 1996; Schwenn, 1994).

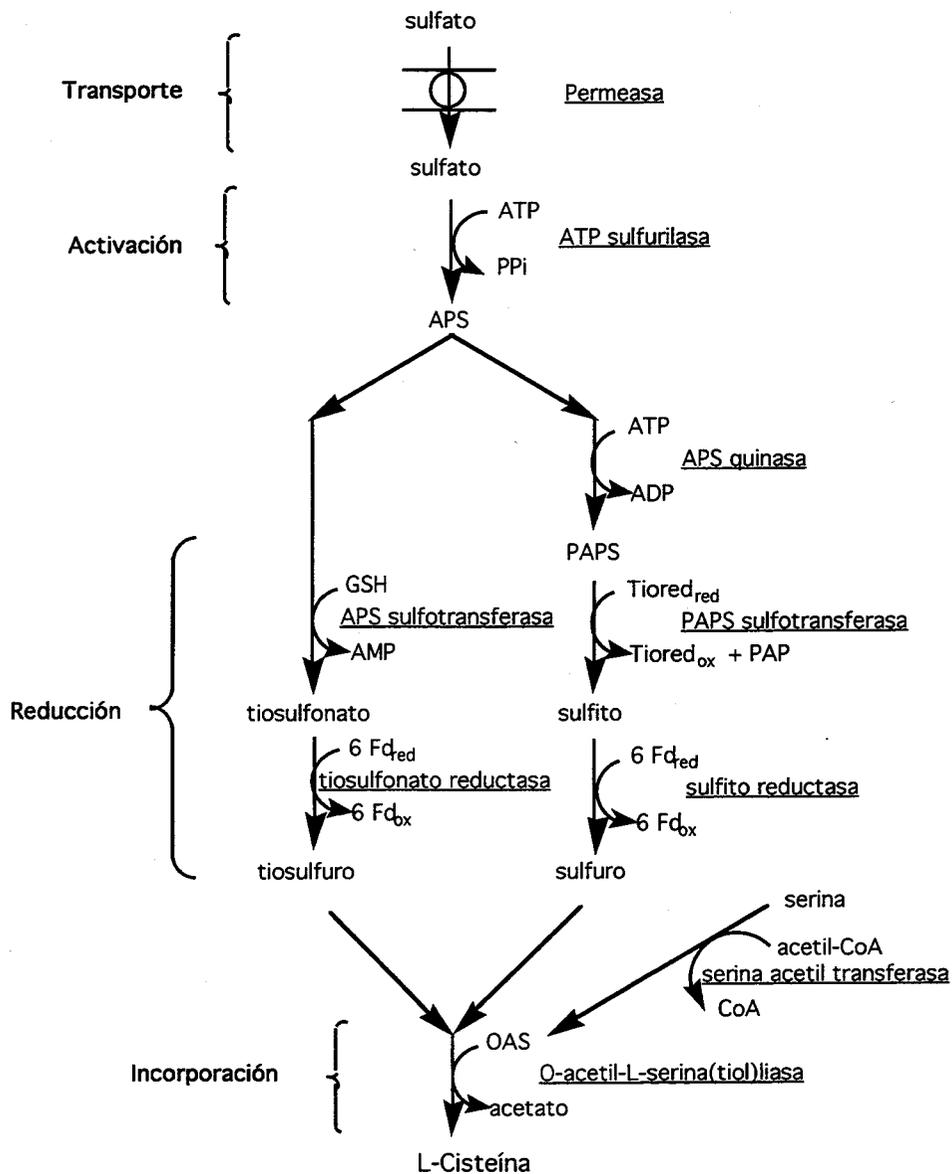
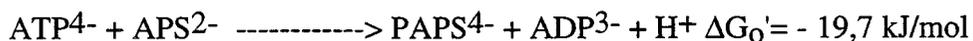


Fig. 2. Reducción asimilatoria de sulfato

Las ATP sulfurilasas han sido estudiadas en profundidad. Se ha detectado su presencia en animales, plantas superiores y microorganismos (Brunold, 1990). Recientemente, a partir de hojas de espinaca, se han aislado dos isoenzimas que representarían las formas plastídica y citosólica de la enzima (Schwenn, 1994). Si bien no se ha detectado una isoforma mitocondrial en plantas, no se descarta esa posibilidad dado que en *Euglena* se ha demostrado la presencia de una ATP sulfurilasa en mitocondrias (Li *et al.*, 1991).

La enzima se inhibe por APS con una K_i de aproximadamente $1 \mu\text{M}$, lo cual demuestra un control del metabolismo asimilatorio de acuerdo con los requerimientos de la célula. Por otro lado, en espinaca se observó que se inhibía por los nucleótidos 5'-AMP y 5'-ADP. En raíces de arroz se ha demostrado que el 5'-ADP actúa como inhibidor de la actividad enzimática mientras que el 5'-AMP cumple una función como activador (Brunold, 1990).

Otro método de desplazar la reacción de activación del sulfato hacia el APS consiste en fosforilar el APS según la reacción:



Esta reacción, también dependiente de cationes divalentes (Mg, Co y Mn), es catalizada por la APS-quinasa, identificada en bacterias asimiladoras de sulfato, hongos, algas y plantas superiores.

En la ruta PAPS-sulfito libre, la ATP sulfurilasa y la APS quinasa se encuentran energéticamente acopladas. La APS quinasa tiene una alta afinidad por el APS y el ATP. Se ha especulado que por medio de una "conducción" del sustrato, el APS pasaría a través de un complejo formado por la ATP sulfurilasa y la APS quinasa. En relación al destino metabólico posterior del PAPS, sería oportuno señalar que la actividad APS quinasa de algas verdes se encuentra

regulada por una carga redox ditiol-disulfuro en la cual la tiorredoxina reducida desempeña un papel clave como activador, en tanto que los disulfuros como el glutatión oxidado actuarían como desactivantes. Un control redox de esta reacción parece que resulte indispensable, ya que la reducción del sulfato activado debe tener lugar con una provisión suficiente de tiorredoxina y ferredoxina reducidas (Schwenn, 1994). La APS quinasa, de localización cloroplástica, se inhibe por APS, pero esta inhibición parece que es mucho más marcada en la enzima de microorganismos que en la de espinaca. En *Chlamydomonas* la enzima tiene una muy baja K_m para el APS (aproximadamente $2 \mu\text{M}$) (Brunold, 1990).

2.3. Reducción del azufre inorgánico

a) Ruta del sulfato unido al transportador

Siempre se ha pensado que la APS-sulfotransferasa catalizaría la transferencia de un grupo sulfónico desde el APS a un tiol-transportador según la siguiente reacción:



El tiol-transportador fisiológico se sugirió que podría ser el glutatión en *Chlorella* o una molécula más grande en espinaca (Schmidt, 1973). Las fitoquelatinas, que tienen funciones específicas en la captura de metales pesados, podrían llegar a cumplir un papel como transportadores de tioles en este caso. Su presencia habría sido detectada en plantas superiores, algas, cianobacterias y en *Euglena*.

La APS-sulfotransferasa de espinaca es inestable y tiene una Km para el APS de 10 μ M. En espinaca y en maíz se ha demostrado que el 5'-AMP la inhibe de forma competitiva (Brunold, 1990). Recientemente, Schiffman y Schwenn (1994) han puesto en tela de juicio el papel de esta enzima y han sugerido que la actividad APS sulfotransferasa es el resultado de una reacción lateral no fisiológica de la APS quinasa en *Arabidopsis thaliana*.

Por otra parte, la tiosulfonato reductasa (tiosulfato orgánico reductasa) es una enzima que catalizaría la reducción del sulfito unido a un transportador para dar lugar a sulfuro unido al transportador, utilizando un donador de electrones como la ferredoxina, según la siguiente reacción:



Su presencia ha sido detectada en espinaca y *Chlorella*. La enzima del alga eucariótica utiliza como sustratos ferredoxina reducida y sulfoglutación (GS- $^{35}\text{SO}_3^-$) para formar GS- ^{35}SH (Brunold, 1990).

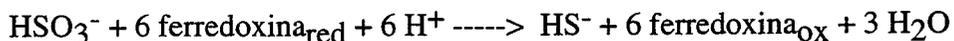
b) Ruta PAPS-sulfito libre

La PAPS reductasa cataliza la formación de sulfito a partir de PAPS utilizando tiorredoxina como reductor. Las tiorredoxinas son proteínas redox, pequeñas y ubicuas, que presentan tioles que funcionan como un grupo redox ditiol-disulfuro. Dos electrones del grupo ditiol se transfieren a la enzima que, en un segundo paso, reduce el sustrato PAPS.



La PAPS reductasa se ha podido detectar en bacterias, cianobacterias y *Spinacia oleracea*. La enzima de espinaca reduce el PAPS cuando la tiorredoxina se encuentra presente en la mezcla de ensayo (Brunold, 1990).

El sulfito que se produce en la reacción catalizada por la PAPS reductasa, se reduce con la participación ya sea de la NADPH-sulfito reductasa (EC 1.8.1.2) o la ferredoxina-sulfito reductasa (EC 1.8.99.1). Las enzimas que dependen de ferredoxina se las puede hallar en los plastidios de las plantas superiores y en las cianobacterias conformando proteínas con sirohemo y agrupaciones (Fe₄/S₄) como grupos prostéticos, que son homopoliméricas. En el caso de las dependientes de NADPH, las enzimas constituyen proteínas con sirohemo y (Fe₄/S₄) que son heterooligoméricas, ya que contienen subunidades adicionales que integran flavinas (FAD o FMN) como grupos prostéticos. Ambos grupos de enzimas llevan a cabo la transferencia de seis electrones al sulfito, que permanece en el centro activo durante el proceso de catálisis (Janick y Siegel, 1982):

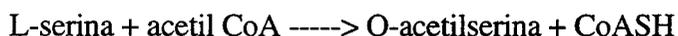


El SO₃²⁻ se une al Fe²⁺ del grupo hemo y posteriormente se reduce para dar lugar al sulfuro. No se llegan a detectar intermediarios; presumiblemente porque habría un aporte de dos electrones en series sucesivas para lograr la ruptura de las uniones S-O (Schwenn, 1994). La enzima se encontró en el alga *Chlorella* y en plantas superiores como *Spinacia oleracea*, *Pisum sativum*, *Triticum* sp y *Zea mays* (von Arb, 1990). Las constantes de afinidad tanto para el sulfito como para la ferredoxina se encuentran dentro del rango micromolar. El sulfuro inhibe a la ferredoxina-sulfito reductasa de hojas de *P. sativum* (von Arb y Brunold, 1985). La enzima se puede localizar en las hojas de maíz a nivel de las células del mesófilo y las túnico-vasculares; en plántulas de *P. sativum* se la

puede detectar en hojas y en raíces, aunque la reducción del sulfito es preponderante en los órganos aéreos.

2.4. Biosíntesis de L-cisteína

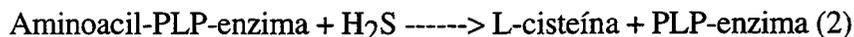
El paso final en la ruta de asimilación del sulfato es la inserción del sulfuro dentro de una molécula de serina activada. En microorganismos y plantas se ha demostrado que la O-acetil-L-serina es el precursor intermediario para fijar el átomo de azufre en una molécula orgánica. La serina-acetil transferasa (SAT, EC 2.3.1.30) es la enzima que cataliza la síntesis de O-acetilserina mediante la siguiente reacción:



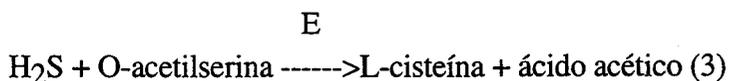
Se requieren altas concentraciones de L-cisteína para causar la inhibición de la actividad enzimática, pero que no tendrían un significado fisiológico (Giovanelli, 1990).

La enzima puede hallarse formando complejos multifuncionales constituyendo la denominada cisteína sintasa, donde se asociarían la serina-acetil transferasa y la O-acetilserina(tiol)liasa (Kredich, 1987). Recientemente se han logrado identificar tres isoenzimas con actividad serina-acetil transferasa en hojas de *P. sativum*; las mismas se encuentran compartimentalizadas en citosol, cloroplastos y mitocondrias (Ruffet *et al.*, 1995).

La enzima responsable del paso terminal en la ruta de asimilación del azufre en plantas, algas y bacterias es la O-acetil-L-serina(tiol)liasa (OASTL, EC 4.2.99.8, y equivalente a: O-acetil-L-serina sulfhidrilasa, o L-cisteína sintasa) e interviene en las siguientes reacciones (Giovanelli, 1990; Schmidt, 1990):



La reacción neta es la siguiente:



Tanto en plantas superiores, como en las algas y enterobacterias, la L-cisteína es el primer producto orgánico de la asimilación del sulfato. En el caso de las levaduras, la homo-L-cisteína constituye la primera molécula orgánica azufrada.

La O-acetil-L-serina(tiol)liasa es una enzima dependiente de piridoxal fosfato (Schwenn, 1994). Se han encontrado isoenzimas en enterobacterias (Kredich, 1987), cianobacterias, algas verdes y plantas superiores (Schmidt y Jäger, 1992). Los estudios fisiológicos que se llevaron a cabo en plantas permitieron detectar la presencia de distintas isoenzimas en compartimentos subcelulares, empleando procedimientos que permitían la separación de orgánulos a partir de hojas de *S. oleracea* (Lunn *et al.*, 1990) y de flores de *Brassica oleracea* (Rolland *et al.*, 1992).

Las isoformas de espinaca, como así también otras de distinto origen, poseen un residuo de lisina y una región circundante, PXXSVKDR, muy conservada. Este residuo de lisina funcional constituye el sitio de unión del cofactor PLP (Saito *et al.*, 1993a).

En *Salmonella typhimurium* los estudios cinéticos de las isoenzimas OASTL-A y OASTL-B revelan la existencia de un mecanismo

predominantemente "Bi Bi Ping Pong", al comparar los patrones de velocidad inicial con bajas concentraciones de sustratos (Tai *et al.*, 1993).

La enzima es específica para el sustrato O-acetil-L-serina, pero puede aceptar otros derivados como ser L-serina, O-fosfo-L-serina, O-acetil-D-serina, DL-homo-L-cisteína y O-fosfo-L-homoserina; aunque la actividad es inferior al 1 %. Tampoco discrimina entre sulfuro y seleniuro, de modo que puede llegar a formar seleno-L-cisteína. Los compuestos como la hidroxilamina, el ácido aminooxiacético y la cicloserina, inhibidores característicos de las enzimas dependientes de PLP, también afectan la actividad de la O-acetil-L-serina(tiol)-liasa (Schmidt, 1990).

3. Genética de la asimilación del sulfato

La genética de la asimilación de sulfato ha sido estudiada en profundidad en aquellos organismos cuya genética clásica era bien conocida y, por tanto, resultaba fácil obtener muchos mutantes diferentes y caracterizarlos. Entre estos organismos destacan fundamentalmente *E. coli* y *S. cerevisiae*.

3.1. Estudios en *Escherichia coli*

En *E. coli* (y en *S. typhimurium*) los genes que codifican las proteínas de la asimilación de sulfato están extendidos a lo largo de cinco regiones diferentes del cromosoma, concretamente en el caso de *E. coli* entre 28 y 80'. Se conocen hasta ahora 18 genes estructurales involucrados en la síntesis de cisteína de este organismo (Tabla 1). Dichos genes se denotan por la palabra *Cys* seguida de una letra mayúscula, ya que cualquier lesión en estos genes produce un requerimiento nutricional por cisteína en la bacteria.

Los genes *Cys* se pueden encontrar aislados o en agrupaciones (*clusters*). Estos últimos forman operones controlados por un mismo promotor, y suelen dar lugar a transcritos de ARNm policistrónicos, es decir, una sola molécula de ARN mensajero codifica todas las proteínas, que se separarán durante la traducción (Leyh, 1993). El llamado regulón de cisteína incluye todos los operones de la ruta biosintética de dicho aminoácido. Está establecido que la mayoría, si no todos los operones del regulón de cisteína, son activados transcripcionalmente por la proteína codificada por el gen *CysB* y un inductor, que puede ser O ó N-acetil-L-serina (Jones-Mortimer, 1968; Kredich, 1971).

El gen *CysB* ha sido clonado y secuenciado y la proteína que codifica (*CysBp*) sobreexpresada y purificada (Ostrowski y Kredich, 1990; Miller y

Kredich, 1987). CysBp estimula la transcripción en los promotores del regulón pero inhibe la transcripción de su propio promotor (Leyh, 1993). Sólo los genes CysG y CysE no están bajo el control de CysBp (Schmidt y Jäger, 1992).

Se ha estudiado la regulación de la activación transcripcional que produce CysBp: Esta se une con elevada afinidad a los promotores (1-10 nM); dicha unión requiere O ó N-acetil-L-serina, que también aumentan la afinidad y especificidad de la interacción de CysBp con el promotor. Sulfuro y tiosulfato inhiben la unión del CysBp al promotor y, por tanto, la transcripción. Curiosamente, este efecto sólo se produce en presencia de N-acetil-L-serina. La L-cisteína no ejerce efecto, al menos, hasta concentraciones del orden de 5 mM (Leyh, 1993).

3.2. Estudios en *Saccharomyces cerevisiae*

La disponibilidad de múltiples mutantes, así como de técnicas de manipulación genética, ha permitido identificar los genes implicados en múltiples rutas metabólicas en este organismo, utilizado profusamente como modelo de célula eucariótica. Una de estas rutas es precisamente la de asimilación de sulfato.

Como ya hemos comentado, la ruta de asimilación de sulfato en levaduras transcurre vía PAPS y además presenta la particularidad de que es de los pocos organismos conocidos donde el primer aminoácido azufrado que se sintetiza no es la L-cisteína, sino la homo-L-cisteína. Esta dará lugar luego a L-metionina y L-cisteína. Los genes involucrados en la síntesis de homocisteína en *S. cerevisiae* se denominan genes *MET* y se nombran con la palabra *MET* seguida por un número. La razón de esta notación se debe a que, al contrario de lo que ocurre en *E. coli*, una lesión en uno de estos genes provoca un requerimiento nutricional por L-metionina en la levadura, en lugar de por L-cisteína, como ocurre en

letra se debe al convenio de notación de genes en *S.cerevisiae* (Thomas *et al.*, 1992).

Se han encontrado múltiples genes implicados de forma más o menos directa en la asimilación de azufre en levaduras (Tabla 1); sin embargo, no se conocen las funciones de todos ellos. Al igual que en el caso de *E. coli* y como consecuencia de los distintos proyectos GENOMA las secuencias de todos estos genes son ya conocidas, si bien el conocimiento de las funciones de las proteínas que codifican dichos genes requerirá un esfuerzo adicional.

3.3. Estudios en plantas

A pesar de que la obtención y caracterización de mutantes en otros organismos que no sean *E. coli* o *S. cerevisiae* no es tan fácil como en éstos, las técnicas de Biología Molecular han permitido aislar y secuenciar genes de algas fotosintéticas y plantas superiores, utilizando la información ya conocida de organismos más simples como bacterias y levaduras. Así, se han podido aislar y secuenciar los genes implicados en el metabolismo asimilatorio del azufre en organismos fotosintéticos.

El gen (o ADNc) que codifica la ATP-sulfurilasa ha sido aislado y secuenciado en *A. thaliana* (Leustek *et al.*, 1994; Murillo y Leustek, 1995; Klonus *et al.*, 1995) y patata (Klonus *et al.*, 1994). La secuencia del ADNc que codifica la APS-quinasa ha sido determinada en *Arabidopsis* (Arz *et al.*, 1994).

Los genes que codifican las distintas isoformas de O-acetil-L-serina (tiol)lasi han sido aislados y secuenciados en *A. thaliana* (Barroso *et al.*, 1995), *Capsicum annuum* (Romer *et al.*, 1992), *Citrullus vulgaris* (Noji *et al.*, 1994), maíz (Brander *et al.*, 1995) y *S. oleracea* (Saito *et al.*, 1993b).

Tabla 1. Genes estructurales y enzimas implicadas en la reducción asimilatoria del sulfato

Enzima	Bacterias	Levadura	Plantas
ATP sulfurilasa	<i>CysDN</i>	<i>MET3</i>	<i>sul</i>
APS quinasa	<i>CysC</i>	<i>MET14</i>	<i>akn</i>
PAPS reductasa	<i>CysH</i>	<i>MET16</i>	<i>par</i>
NADPH:SO ₃ reductasa			
Flavoproteína	<i>CysJ</i>	<i>MET10,18,20</i>	-
Hemoproteína	<i>CysI</i>	<i>MET5</i>	-
Fd:SO ₃ reductasa	-	-	<i>sir</i>
OAS-(tiol)-liasa A	<i>CysK</i>	-	<i>cs</i>
OAS-(tiol)-liasa B	<i>CysM</i>	-	<i>cs</i>
OAHS-(tiol)-liasa	-	<i>MET25</i>	-

4. Objetivos

El desarrollo de este trabajo se ha hecho dentro de la línea de estudio del metabolismo del azufre en organismos fotosintéticos. Dado que la información hasta la fecha era escasa y el campo de trabajo amplio, nuestra atención se ha centrado principalmente en estudios de consumo de sulfato y también en el conocimiento de la enzima O-acetil-L-serina(tiol)liasa que, por catalizar la biosíntesis de L-cisteína, ocupa ciertamente una posición clave en la interconexión de los metabolismos del carbono, nitrógeno y azufre.

En el desarrollo de este trabajo hemos utilizado el alga eucariótica *Monoraphidium braunii*, tradicional en nuestro trabajo por sus innumerables ventajas bioquímicas y fisiológicas.

Parte de los resultados incluídos en este trabajo han sido objeto de publicación como artículos en revistas científicas, o bien se han presentado como comunicaciones a congresos.

a) Publicaciones en revistas y libros

1. Regulation of O-acetil-L-serine sulfhydrylase in eukaryotic algae. J. León, J. González-Arroyo, R. León, J.M. Vega. *Phyton* 32: 73-78 (1992)

2. Purificación y propiedades de tres isoenzimas de O-acetil-L-serina(tiol)liasa de *Monoraphidium braunii*. J. González-Arroyo, J.R. Pérez-Castiñeira, J.M. Vega. En: "Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: De la Fisiología a la Biología Molecular. J.M. Vega, P.J. Aparicio, F. Castillo, J.M. Maldonado (eds.). Servicio de Publicaciones. Universidad de Sevilla. (En prensa).

3. Properties of sulfate uptake in two different eukaryotic microalgae.

J.R. Pérez-Castiñeira, J.L. Prieto, J. González-Arroyo, J.M. Vega. *Journal of Plant Physiology* (en prensa).

*b) Comunicaciones a Congresos***1. Regulation of O-acetil-L-serine sulfhydrylase activity in eukaryotic**

algae. J. León, J. González-Arroyo, R. León, J.M. Vega. Workshop on sulfur metabolism. Abstract SI(9). Gardmisch-Partenkirchen. Alemania 1992.

II. MATERIALES Y METODOS

1. Organismo y condiciones de cultivo

Para la realización de este trabajo se ha utilizado el alga verde unicelular clorofícea *Monoraphidium braunii* cepa 202-7d. Las células se cultivaron a 25 °C, en medio líquido, en recipientes de vidrio de 0,2 a 10 l. Se iluminaron con luz fluorescente blanca de forma continua con una intensidad de luz de 31 W.m⁻² en la superficie de los cultivos.

El medio de cultivo empleado fue el descrito previamente por Kessler *et al* (1963) y modificado en cuanto a la concentración de NaCl. La composición del medio utilizado es la siguiente (en g.l⁻¹): NaPO₄H₂.H₂O, 2; NaPO₄H.12H₂O, 0,9; MgSO₄.7H₂O, 0,25; FeSO₄.7H₂O, 0,01; KNO₃, 1; y 1 ml de los siguientes compuestos (en mg.ml⁻¹): EDTA-Na₂, 8; ZnSO₄.7H₂O, 0,2; MnCl₂.4H₂O, 0,5; CaCl₂.2H₂O, 14,7; HBO₃, 0,5 y NaCl, 464 . Para mantener las células en suspensión se hizo pasar por los cultivos una corriente de aire enriquecido con un 5 % (v/v) de CO₂, que servía como fuente de carbono.

En determinadas ocasiones, las algas se cultivaron bajo condiciones especiales, generalmente relacionadas con la carencia de algún elemento o factor externo relacionado con el crecimiento. Por lo cual, se llevaron a cabo experimentos relacionados con la carencia de azufre, nitrógeno o carbono, así como el grado de iluminación o la calidad de luz a la que fueron sometidas las células durante algunos experimentos.

Para obtener cultivos carentes de azufre se recogieron las células mediante centrifugación, se lavaron con medio fresco de cultivo sin fuente de azufre y se resuspendieron finalmente en el mismo medio, que se preparó de manera similar al previamente descrito, pero sustituyendo el MgSO₄.7H₂O, FeSO₄.7H₂O, ZnSO₄.7H₂O, por los correspondientes cloruros de los

mismos cationes, permaneciendo estos últimos a la misma concentración.

Para la obtención de cultivos deficientes en nitrógeno, las células crecidas en condiciones normales se recogieron mediante centrifugación, se lavaron con medio de cultivo carente de nitrógeno y finalmente, se resuspendieron en este último medio. Los cultivos de células deficientes en fuente de carbono se consiguieron burbujeando los mismos con una corriente de aire, que se hacía circular previamente a través de dos disoluciones de KOH 5 M antes de pasar a través de los cultivos. Finalmente, para mantener los cultivos en oscuridad los recipientes correspondientes se envolvieron con papel de aluminio. Las células se crecieron en condiciones estériles hasta volúmenes de cultivo de 10 l. Para ello, los medios de cultivo y recipientes que los contenían se esterilizaban mediante tratamiento térmico en autoclave.

La cepa de *M. braunii* se conservó en medio sólido, obtenido suplementando el medio de cultivo estándar previamente descrito con agar al 1,75 % (p/v). Después de la inoculación, los cultivos en medio sólido se mantenían iluminados intensamente durante 6-7 días y posteriormente se conservaban en luz difusa. A partir de dichos cultivos se inoculaban nuevos medios sólidos, frescos y estériles, cada 3 meses.

2. Permeabilización de células y obtención de extractos crudos

Para medir actividades enzimáticas *in situ* se tomaron partes alícuotas de 1 a 10 ml (dependiendo de la actividad a medir) de los correspondientes cultivos y se centrifugaron a 3.000 x g durante 5 min. Las células se resuspendieron en 1 ml del tampón adecuado y se trataron con 50 µl de tolueno con agitación continua durante 30 s. La suspensión resultante de células permeabilizadas se utilizó como fuente de enzima.

Para la obtención de extractos, las células se recogieron a partir de

cultivos en fase exponencial de crecimiento, mediante centrifugación a 5.000 x g durante 5 min y se resuspendieron en el tampón correspondiente (1 ml por g de peso húmedo de células). La rotura del material se llevó a cabo en un vibrador (Bühler modelo VI4) utilizando una suspensión de células mezcladas con perlas de vidrio (Φ 0,35 mm) a razón de 5 g por g de peso húmedo de células, que se situaba en recipientes de acero inoxidable y se sometía a 6 períodos de vibración de 1 min, alternados por 5 períodos de reposo de 30 s. En todo momento la temperatura se mantuvo a 4 °C, refrigerando la superficie del recipiente de rotura. El homogenado resultante se filtró a través de 4 capas de gasa para separar las perlas de vidrio, se lavó con tampón de extracción (8-10 ml por g de peso húmedo de células) y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min. Después de descartar el precipitado con restos celulares, se realizó una segunda centrifugación a 15.000 rpm durante 45 min y el sobrenadante se utilizó como extracto crudo libre de células.

3. Determinaciones analíticas

3.1. L-Cisteína

La determinación específica de L-cisteína en presencia de otros aminoácidos se efectuó según el método de Gaitonde (1967) en el que el grupo α -amino del aminoácido reacciona con un reactivo de ninhidrina, preparado inmediatamente antes de usar, y que contiene 0,25 g de este compuesto disuelto en 6 ml de ácido acético y 4 ml de ácido clorhídrico concentrados. A la muestra (conteniendo entre 0 y 400 nmoles de L-cisteína en un volumen máximo de 100 μ l) se le añadieron 100 μ l de ácido acético y 200 μ l del reactivo de ninhidrina descrito. Tras calentar a 100 °C durante 10 min, la mezcla de reacción se enfrió inmediatamente en baño de hielo y

finalmente se le añadió 600 μl de etanol al 96 % (v/v) para estabilizar el complejo coloreado formado. Posteriormente se midió la absorbancia a 560 nm ($\epsilon_{560} = 6,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.2. Clorofila

La concentración de clorofila en el cultivo se determinó mediante el método de Marker (1972). Partes alícuotas entre 0,5-1 ml de suspensión celular de los correspondientes cultivos se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 min, posteriormente, se descartó el sobrenadante y se agregaron 5 ml de metanol. Después de calentar a 70 °C durante 5 min con agitación ocasional, la suspensión se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 min para eliminar restos celulares y se midió la absorbancia del sobrenadante a 665 nm ($\epsilon_{665} = 34,5 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.3. Proteína

La proteína se determinó de manera rutinaria por el método de Bradford (1976) añadiendo a un volumen variable de muestra 200 μl de reactivo de Bradford (Bio-Rad) y completando con agua destilada hasta 1 ml. Tras 10 min a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 595 nm ($\epsilon_{595} = 51 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$). El calibrado del método se realizó con una disolución de seroalbúmina al 0,2 % (p/v), cuya concentración se determinó espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción previamente publicado (Rideal y Roberts, 1951, $\epsilon_{279} = 0,67 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Para la determinación de proteína en los perfiles cromatográficos se midió la absorbancia a 280 nm de las correspondientes fracciones mediante un monitor ultravioleta.

3.4. Sulfuro

La medida de la concentración de sulfuro se basó en la microdeterminación directa de Siegel (1965) que usa un método colorimétrico fundamentado en la incorporación de sulfuro al azul de metileno en presencia de N,N-dimetil-p-fenilendiamina. A una muestra de 1 ml, conteniendo entre 2 y 80 nmoles de sulfuro, en un tubo cerrado con tapón de goma, se le añadían (utilizando una jeringa tipo Hamilton) 0,1 ml de una disolución de sulfato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina 0,02 M disuelta en HCl 7,2 N y 0,1 ml de una disolución de FeCl₃ 0,03 M en HCl 1,2 N. Tras agitación, se mantuvo en la oscuridad durante 20 min y se midió posteriormente la absorbancia a 650 nm ($\epsilon_{650} = 19.000 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

4. Actividades fotosintética y respiratoria

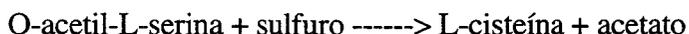
La determinación de O₂ para la evaluación de la actividad fotosintética de células de *M. braunii* se llevó a cabo con un electrodo tipo Clark de Pt/AgCl, utilizando para el oxígeno un coeficiente de solubilidad de 0,253 $\mu\text{moles/ml}$, a 25°C. En la cámara de reacción se colocó una alícuota de 1 ml de cultivo y la evolución del oxígeno se siguió a 25°C mediante un registrador tipo Linseins.

La actividad respiratoria se determinó midiendo el consumo de oxígeno en la oscuridad. Posteriormente, la cámara del electrodo se iluminó con una lámpara de tungsteno que suministraba alrededor de 200 W.m⁻² en la superficie y la cinética de desprendimiento de oxígeno obtenida es el resultado del funcionamiento simultáneo de la fotosíntesis y la respiración celular. La actividad fotosintética propiamente dicha resulta de sumar a la pendiente de la recta obtenida en este último caso, la pendiente correspondiente a la actividad respiratoria previamente calculada.

5. Actividades enzimáticas

5.1. *O*-acetil-L-serina(tiol)liasa

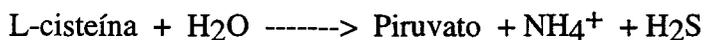
Esta actividad enzimática se midió por determinación colorimétrica de la L-cisteína formada en la reacción:



La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 100 mM de tampón fosfato potásico, pH 7,5; 5 mM de DTT; 50 μM de PLP; 10 mM de O-acetil-L-serina; 5 mM de Na_2S ; y la preparación enzimática necesaria para que se produzcan entre 0 y 400 nmoles de L-cisteína. El Na_2S se disolvió en NaOH 0,05 N. Para la medida de actividad *in situ* se tomaban entre 0 y 100 μl de células toluenizadas (correspondientes a 4 ml de cultivo con una concentración de clorofila aproximada de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) como fuente de enzima. La reacción se inició mediante la adición de la disolución de sulfuro, y tras incubar a 25 °C (extractos crudos) ó 50 °C (células permeabilizadas) durante 5 min, se detuvo por adición de 50 μl de ácido tricloroacético y agitación vigorosa. La L-cisteína formada se determinó según el método previamente descrito. Una unidad de actividad representa la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de L-cisteína por min.

5.2. *Cisteína desulfhidrilasa*

Esta actividad se midió por determinación colorimétrica del sulfuro formado en la reacción:



La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 100 μmoles de tampón Tris-HCl, pH 9,0; 0,8 μmoles de L-cisteína; 2,5 μmoles de DTE y la cantidad adecuada de enzima. La reacción se inició mediante la adición de L-cisteína y, tras incubar a 25°C durante 10 min, se detuvo por adición de 50 μl de TCA y agitación vigorosa. Una unidad de actividad representa la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de sulfuro por min.

5.3. Alcohol deshidrogenasa

La actividad alcohol deshidrogenasa se determinó midiendo espectrofotométricamente el incremento de absorbancia a 340 nm, debido al NADH formado como consecuencia de la oxidación de etanol hasta acetaldehído. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 126 μmoles de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 126 μmoles de hidrocloreuro de semicarbazida; 37,5 μmoles de tampón glicina-NaOH, pH 8,8; 0,9 μmoles de etanol; 1,5 μmoles de NAD^+ y la adecuada cantidad de enzima. La reacción se llevó a cabo en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, a temperatura ambiente. Una unidad de actividad es la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de NADH por min.

6. Determinación del radio de Stokes por filtración en gel

La filtración en gel Sephacryl S300 HR fue el método empleado para la determinación del radio de Stokes y del peso molecular de las OASTL de *M. braunii*. Se utilizó una columna (1,6 Φ x 85 cm) empaquetada a un flujo máximo de 90 $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$. Se aplicaron muestras de 1 ml con sacarosa al 6 %

(p/v) correspondientes a las OASTL y a las siguientes proteínas como patrones: citocromo c (2 mg), ovoalbúmina (2 mg), seroalbúmina bovina (2 mg), alcohol deshidrogenasa (0,5 mg) y piruvato quinasa (0,5 mg). Se recogieron fracciones de 1,5 ml y las proteínas patrones se detectaron por su absorbancia a 280 nm. Para cada proteína se define una constante de partición K_d dada por la expresión:

$$K_d = (V_e - V_o) \cdot (V_t - V_o)^{-1}$$

Donde V_e es el volumen de elución de dicha proteína, V_o es el volumen vacío de la columna (calculado mediante la determinación del volumen de elución del azul dextrano) y V_t es el volumen total de la misma (calculado mediante la determinación del volumen de elución del ferricianuro). La representación de $(-\log K_{av})^{1/2}$ frente al radio de Stokes de los distintos patrones es una representación lineal a partir de la cual puede obtenerse el valor del radio de Stokes para cualquier proteína, conocido su volumen de elución. En este caso el volumen vacío resultante para la columna utilizada fue de 53,8 ml y el volumen total de 155,8 ml.

Por representación del log del peso molecular frente al volumen de elución de los distintos patrones se obtiene una representación lineal que puede ser utilizada para la determinación del peso molecular de la proteína estudiada.

7. Concentración de proteínas

Las disoluciones de proteína se concentraron mediante ultrafiltración a través de una membrana Diaflo PM-10 (diámetro medio de poro de 1,5 nm) que permite el paso de moléculas de peso molecular inferior a 10.000. El proceso se llevó a cabo a 4 °C en una unidad de ultrafiltración AMICOM

que contenía un máximo de 50 ml de la preparación enzimática a la que se aplicaba una presión de N_2 de 2 kg.cm^{-2} y se mantenía con agitación magnética suave y continua.

8. Diálisis

Para la eliminación de sales y moléculas de pequeño tamaño, las preparaciones enzimáticas se dializaron en bolsas de celulosa de SERVA, con un tamaño de poro de 2,4 nm, que habían sido previamente hervidas durante 20 min con disolución de $NaHCO_3$ al 1 % (p/v) y EDTA al 0,01 % (p/v), y posteriormente lavadas con abundante agua destilada. Las bolsas de diálisis se mantenían en una disolución de azida sódica al 0,02 % (p/v) y se lavaban con abundante agua destilada antes de introducir la muestra. La diálisis se realizó a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por inmersión de las correspondientes bolsas, conteniendo la preparación enzimática, en un volumen de tampón 1.000 veces superior al de la preparación tratada.

9. Reactivos

Las sales utilizadas en gran cantidad para la preparación de medios de cultivo y tampones, así como los ácidos acético, clorhídrico, nítrico y perclórico fueron suministrados por Panreac. Las sales de cationes metálicos, utilizados en la preparación de trazas para la elaboración de medios de cultivo, algunos líquidos como el etilenglicol y etanol absolutos, ácidos como el fosfórico, tricloroacético y sulfámico, compuestos con fines analíticos como ninhidrina y nitroprusiato sódico, fueron adquiridos a Merck. Los compuestos utilizados en la preparación de tampones, como Trizma base y CHES, el reactivo sulfato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina empleado en un método analítico, los aminoácidos y sus derivados, como la

O-acetil-L-serina, y otros compuestos como aminoacetoacetato, DTE, DTT, p-hidroximercuribenzoato, piridoxal-5'-fosfato y sulfato de protamina, fueron suministrados por Sigma.

Bio-Rad suministró la acrilamida, bis-acrilamida, sodio dodecil sulfato y persulfato amónico, utilizados en electroforesis. Pharmacia suministró las matrices cromatográficas DEAE-sefacel y fenil-sefarosa; Difco el agar y Serva las membranas de diálisis.

El agua desionizada fue obtenida utilizando un desionizador Aqualab y el agua destilada mediante un destilador Aquatron A8S.

El anhídrido carbónico empleado como fuente de carbono para el crecimiento de algas y el nitrógeno utilizado para la concentración por ultrafiltración fueron adquiridos a la Sociedad Española del Oxígeno.

10. Aparatos

Para la agitación de las suspensiones se utilizó un Mixer 820 de Swelab funcionando en el interior de una cámara refrigerada a 4 °C.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron a temperatura ambiente en los espectrofotómetros ultravioleta-visible Beckman, modelo DU-7, y Bausch & Lomb, modelo Spectronic 2000, utilizando cubetas de 1 cm de paso de luz, tanto de cuarzo para longitudes de onda inferiores a 340 nm, como de plástico o cristal para el resto.

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas Beckman, modelo J2-21 con rotores JA-20 y JA-14, y Sorvall, modelo RC-5B, con rotores SS-34 y GSA. Las centrifugaciones a temperatura ambiente se hicieron en una centrífuga Heraeus, modelo Labofuge, y Eppendorf, modelo 5415, esta última de muestras inferiores a 1,5 ml.

Las cromatografías se realizaron a 4 °C utilizando columnas de vidrio, bombas peristálticas P1 y Microperpex 2132 y colectores de

fracciones Frac-100 y Redirac 2112 de Pharmacia-LKB. La absorbancia a 280 nm de las fracciones recogidas se midió con un monitor ultravioleta Uvicord SII, modelo 2238, acoplado a un registrador, modelo 2210, ambos de LKB.

Las pesadas se efectuaron en balanzas Metler, modelos PC 2200 y AE 160. Las medidas de pH se realizaron con un pH-metro Beckman, modelo I 71.

La esterilización de recipientes y medios de cultivo se consiguió mediante tratamiento térmico a 121 °C durante 20 min y 1 atmósfera de sobrepresión en autoclaves Selecta, modelos Autester 437-G y 437-P.

Los ensayos a temperatura constante fueron realizados en baños termostatzados Selecta, modelos Tectron S-543. La agitación magnética de disoluciones se consiguió mediante agitadores Selecta, modelo Agimatic.

III. RESULTADOS

1. Consumo de sulfato en células de *M. braunii*

1.1. Caracterización del consumo de sulfato

La representación de la radiactividad (medida en c.p.m.) acumulada dentro de las células de *M. braunii* frente al tiempo resultó ser una línea recta durante los 10-15 primeros minutos del experimento (Fig. 3).

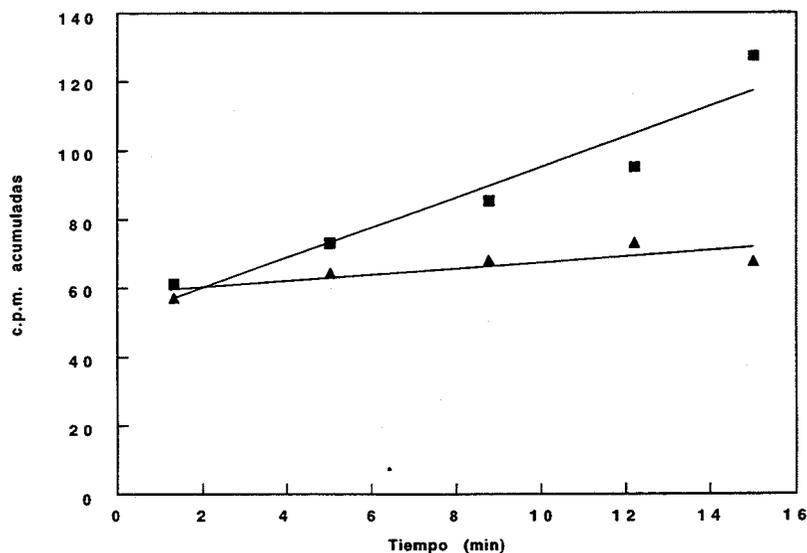


Fig. 3. Consumo de sulfato por células de *M. braunii*. Los ensayos se hicieron con 30 μM sulfato (actividad específica, 330 Ci/mol), según se indica en Materiales y Métodos, tanto en luz (■) como en oscuridad (▲). Se representa la cantidad de radioactividad acumulada en el interior de las células del alga en función del tiempo. Cada punto representa la media de dos experimentos.

La pendiente de la recta se consideró el valor de la velocidad de consumo, que se expresó en nmoles de sulfato acumulados por mg de clorofila y por hora. El consumo de sulfato se mostró absolutamente dependiente de luz (Fig. 3) y no se alteró por la presencia adicional de bicarbonato 20 mM (datos no mostrados).

1.2. Estudios cinéticos

La representación de los valores de velocidad de consumo de sulfato frente a la concentración inicial de sulfato en el medio mostró una cinética tipo Michaelis (Fig. 4), alcanzándose el valor de velocidad máxima a partir de 100-150 μM de sulfato. La representación de inversos (Fig. 4, recuadro interno) demostró la existencia de un solo valor de K_m , alrededor de 5 μM , y el valor de velocidad máxima obtenido fue de 25 nmol sulfato/mg clorofila. h. La representación de Hill de los datos de velocidad frente a concentración inicial de sulfato externo (no mostrado) dio un valor de $n=1$, lo que demuestra la existencia de una cinética simple tipo Michaelis.

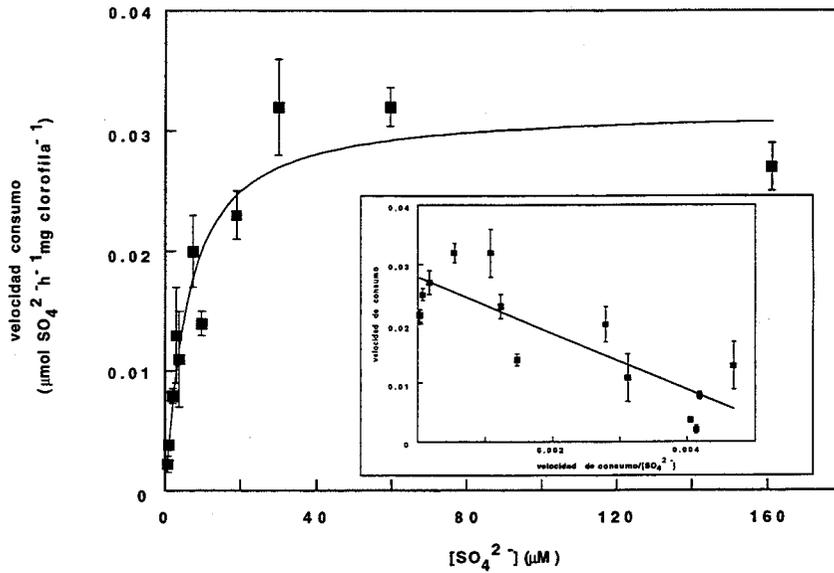


Fig. 4. Cinética del consumo de sulfato en células de *M. braunii*. Se representan los datos de velocidad inicial obtenidos a cada concentración de sulfato en el medio de cultivo. En el interior se muestra la representación de dobles inversos de los datos obtenidos. Cada punto representa la media de tres experimentos y las barras representan el error estándar.

1.3. Regulación del consumo

Se realizaron experimentos de consumo de sulfato en células sometidas a distintos tiempos en condiciones de carencia de azufre. Los resultados mostrados en la Figura 5 indican que al cabo de 10 min de tratamiento, la cantidad de radioactividad acumulada fue 2 veces superior en células sometidas previamente a hambre de azufre durante 1 h y 14 veces superior si el periodo previo de hambre de azufre se alargaba hasta 24 h. No se han podido establecer diferencias claras en los datos de velocidad, debido a

que es tal la afinidad por sulfato de las células sometidas previamente a hambre de azufre que hacen que éstas se llenen inmediatamente de sulfato al iniciar el experimento.

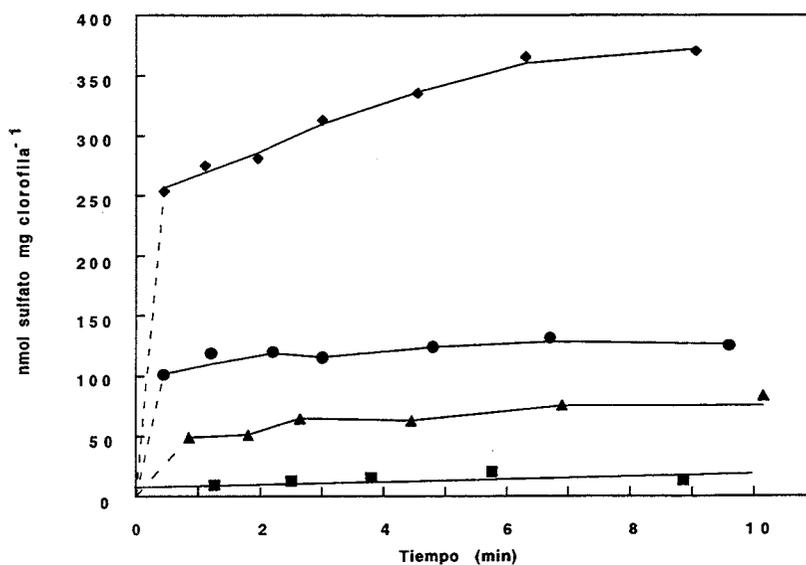


Fig. 5. Efecto de la carencia de azufre sobre el consumo de sulfato en células de *M. braunii*. Se realizaron estudios en condiciones análogas a las de la Fig. 3, pero utilizando células previamente sometidas a hambre de azufre durante: 0 h (■); 2 h (▲); 8 h (●) y 24 h (◆).

Por otro lado, se estudió el efecto del crecimiento en presencia de diferentes fuentes de azufre sobre la velocidad de consumo de sulfato (Figura 6)

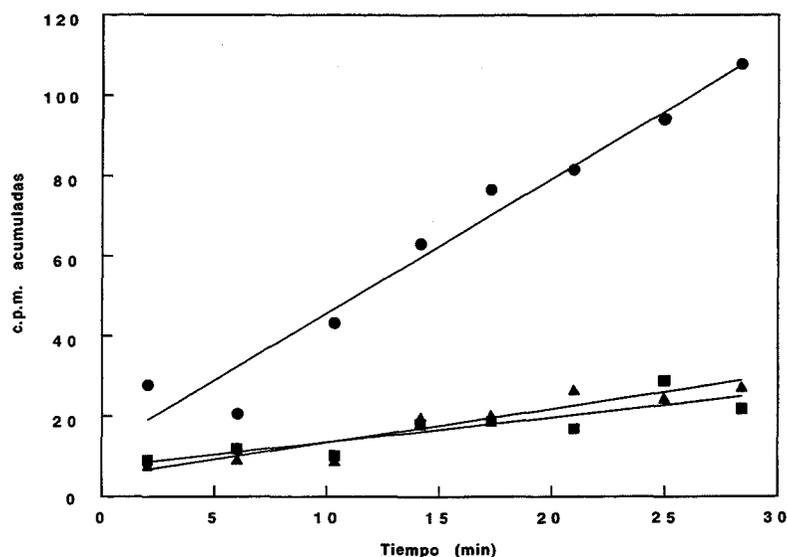


Fig. 6. Consumo de sulfato en células de *M. braunii* previamente crecidas en distintas fuentes de azufre. Las células utilizadas se crecieron en sulfato como única fuente de azufre, se recogieron en fase logarítmica de crecimiento, se lavaron y se resuspendieron en medio fresco de cultivo con sulfato (■), sulfuro (▲) y glutatión (●). Al cabo de 24 h de crecimiento en estas condiciones, se determinó la velocidad de consumo de sulfato que presentaban las diferentes células, utilizando condiciones análogas a las de la Fig. 3.

Puede observarse que células cultivadas en glutatión presentan un aumento de la velocidad de consumo de sulfato, lo cual sugiere estas células no habrían utilizado el glutatión por lo que presentan cierto grado de hambre de azufre. Esto significaría que el glutatión no puede penetrar en las células a la velocidad requerida para su crecimiento normal. Resultados análogos se obtuvieron cuando se incubaron las células durante 24 h con L-metionina (datos no mostrados).

Se estudió también el efecto de la presencia de diferentes aniones del tipo XO_4^{2-} sobre el consumo de sulfato en condiciones de saturación (1 mM de sulfato externo). Los resultados mostrados en la Tabla 2 indican que en todos los casos hay inhibición apreciable, si bien sulfito y cromato resultaron ser los más eficaces al inhibir completamente el consumo de sulfato, cuando su concentración en el medio fue de 3 mM.

Tabla 2. Efecto de sulfito y análogos de sulfato sobre el consumo de sulfato en *M. braunii*

Inhibidores	Velocidad de consumo (%)		
	0,3 mM	1 mM	3 mM
Sulfito	42	22	0
Tiosulfato	82	56	61
Seleniato	60	26	21
Cromato	43	23	0
Molibdato	72	40	35
Wolframato	84	77	45

La cantidad inicial de sulfato presente fue de 1 mM en todos los casos.

2. Purificación y caracterización de tres isoenzimas con actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa de *M. braunii*

2.1. Caracterización de la actividad

a) Actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa

La actividad enzimática O-acetil-L-serina(tiol)liasa de *M. braunii* medida, tanto *in situ* con células permeabilizadas, como *in vitro* utilizando extractos o preparaciones parcialmente purificadas, requiere O-acetil-L-serina 10 mM y sulfuro 5 mM, como sustratos de la reacción (Tabla 3). La presencia de piridoxal-5'-fosfato, cofactor de la enzima, o de un tiol como el DTT, no parece afectar significativamente la actividad enzimática.

Tabla 3. Caracterización de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa de *M. braunii*

Sistema	Actividad OASTL (%)	
	<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>
Completo	100	100
- O-acetil-L-serina	4	3
- Sulfuro	4	2
- Células o extracto	0	2
- PLP	98	96
- Ditioneitol	90	93

El sistema completo contenía en un volumen final de 500 μ l: 50 mM de tampón fosfato potásico, pH 7,5; 2,5 mM de ditioneitol; 50 μ M de piridoxal-5'-fosfato; 5 mM de O-acetil-L-serina; 5 mM de sulfuro sódico y la cantidad adecuada de células permeabilizadas o de preparación enzimática que dé lugar a 0-400 nmoles de L-cisteína. El sulfuro sódico se disolvió en NaOH 0,05 N. El 100 % de actividad OASTL en células permeabilizadas fue de 40 mU/ml de cultivo y para la preparación enzimática *in vitro* fue de 5,8 U/ml.

b) Actividad cisteína desulfhidrilasa

La actividad cisteína desulfhidrilasa de *M. braunii* medida en extractos o preparaciones parcialmente purificadas, requiere 0,8 mM de L-cisteína como sustrato (Tabla 4). La presencia de un tiol como el DTE afecta significativamente la actividad enzimática.

Tabla 4. Caracterización de la actividad cisteína desulfhidrilasa de *M. braunii*.

Sistema	Actividad (%)
Completo	100
- L-cisteína	1
- DTE	2
- Enzima	0

El sistema completo contenía en un volumen final de 1 ml: 100 μ moles de tampón Tris-HCl, pH 9,0; 0,8 μ moles de L-cisteína; 2,5 μ moles de DTE y la cantidad adecuada de enzima. El 100 % de actividad cisteína desulfhidrilasa fue de 60,1 mU/ml.

2.2. Purificación de isoenzimas

La O-acetil-L-serina(tiol)liasa de *M. braunii* se purificó mediante un procedimiento que incluye un tratamiento térmico del extracto crudo, la separación de pigmentos y ácidos nucleicos por precipitación con sulfato de protamina y sucesivas cromatografías en Sefadex G-200, DEAE-Sefacel, Fenil-sefarosa y Sephacryl S-300 HR.

a) Tratamiento con sulfato de protamina

Esta etapa se utiliza para eliminar el exceso de pigmentos y ácidos nucleicos presentes en el extracto crudo, y es necesaria para evitar interferencias en las cromatografías que posteriormente realizaremos. Se añadió al extracto una disolución al 0,2% (p/v) de sulfato de protamina en tampón fosfato potásico 25 mM, pH 7,5; 2 mM de DTT; 1 mM de EDTA- Na_2 y 10 μM de PLP (*tampón estándar*) con agitación suave y continua durante 15 min a 4°C. Una vez completada la precipitación se centrifugó a 27,000 x g durante 15 min y el sobrenadante se utilizó para continuar la purificación.

b) Tratamiento térmico

La preparación enzimática resultante de la etapa anterior se incubó durante 2 min en un baño termostatzado a 60°C con agitación suave y continua, alcanzándose en la preparación enzimática una temperatura de 55°C. Inmediatamente después se enfrió el extracto en un baño de hielo y se centrifugó a 27,000 x g durante 15 min a 4°C, y el sobrenadante resultante se utilizó para la siguiente etapa de purificación.

c) Cromatografía en Sefadex G-200

La preparación enzimática se precipitó con sulfato amónico al 80% de saturación y posteriormente se resuspendió en tampón hasta un volumen de 21 ml, y una concentración de proteína de 8,6 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. La muestra se filtró a través de una columna empaquetada con Sefadex G-200 y las proteínas se eluyeron con tampón estándar en fracciones de 1,5 ml. El perfil cromatográfico resultante se muestra en la Fig. 7. Las fracciones con más

actividad se mezclaron y la disolución resultante se sometió al siguiente paso de purificación.

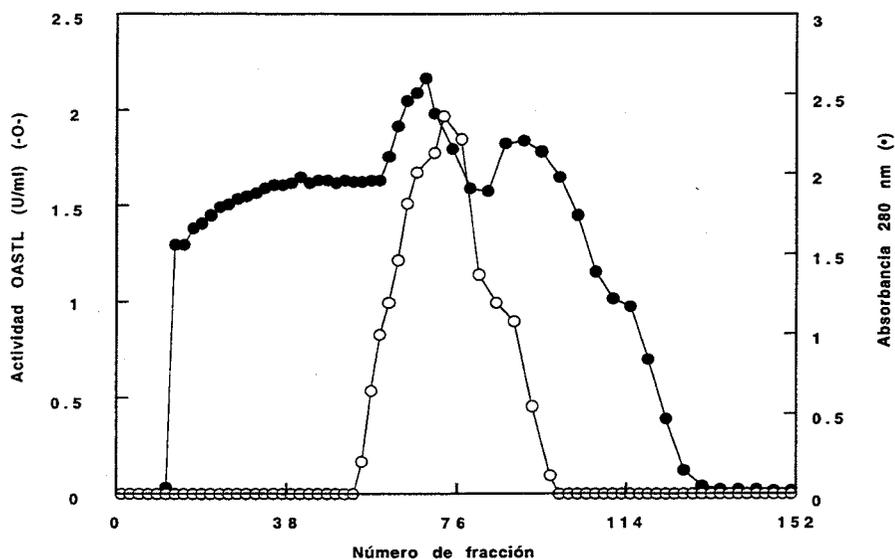


Fig. 7. Filtración en gel Sefadex G-200 de una preparación de O-acetil-L-serina(tiol)lasi de *M. braunii*. La muestra se filtró a través de una columna (1,6 Φ x 85 cm) empaquetada con Sefadex G-200 y equilibrada con el tampón estándar a un flujo máximo de 25 ml/h. Se recogieron fracciones de 1,5 ml, en las que se determinó la actividad OASTL y la A_{280} .

d) Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sefacel

Esta técnica separa las proteínas de la preparación enzimática según la fuerza de interacción iónica con la matriz, y por consiguiente en base a la carga neta de las moléculas de proteína. Para ello, la preparación procedente de la etapa anterior se filtra a través de una columna empaquetada con DEAE-Sefacel. El tampón B utilizado en esta etapa de purificación tiene la siguiente composición: 10 mM de fosfato potásico, pH 7,5; 2 mM de DTT; 1 mM de

EDTA- Na_2 . Tras el paso de la muestra, el lecho de columna se lavó sucesivamente con 500 ml del tampón B; 150 ml de un gradiente de 0 a 0,25 M de NaCl en tampón de lavado; 150 ml de otro gradiente, de 0,25 a 0,5 M de NaCl en el tampón; y finalmente con 45 ml del mismo tampón conteniendo 1 M de NaCl. La Fig. 8 muestra el perfil de elución de la actividad OASTL y la A_{280} correspondiente.

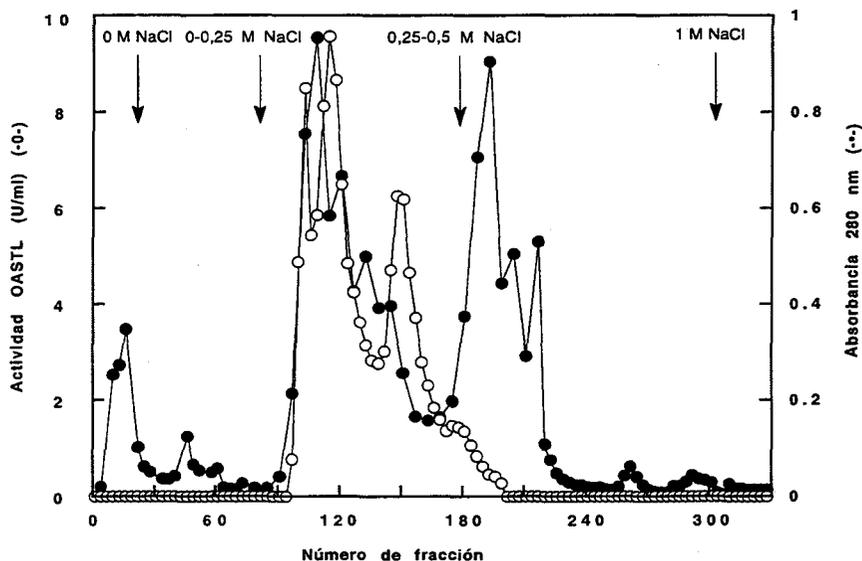


Fig. 8. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sefacel de una preparación de O-acetil-L-serina(tiol)lasi de *M. braunii*. La preparación enzimática se aplicó a una columna (1,6 Φ x 30 cm) empaquetada con DEAE-sefacel y equilibrada con el tampón B a un flujo máximo de 30 ml/h. Las flechas indican la concentración de NaCl añadida al tampón de lavado. Inicialmente se recogieron fracciones de 9 ml y a partir del gradiente 0-0,25 M de NaCl las fracciones recogidas fueron de 1,5 ml, en las que se midió la actividad OASTL y la A_{280} .

Se obtuvieron dos picos de actividad y un posible tercer pico, que se corresponden con las concentraciones de 70, 145 y 210 mM de NaCl. Las

fracciones 90-140 (OASTL_{A-B}) y 141-165 (OASTL_C) se mezclaron por separado, se concentraron y dializaron frente al tampón estándar.

e) Cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa de las preparaciones OASTL_{A-B} y OASTL_C

La preparación enzimática, OASTL_{A-B}, procedente de la etapa anterior se suplementó con sulfato amónico hasta un 15% de saturación, antes de ser aplicada a una columna empaquetada con fenil-sefarosa, y equilibrada con tampón estándar igualmente saturado al 15% con sulfato amónico, a un flujo máximo de 30 ml.h⁻¹. Posteriormente se lavó el lecho de la columna de manera sucesiva con tampón estándar, conteniendo sulfato amónico o etilenglicol, recogándose fracciones de 1,5 ml, según se indica en la Fig. 9, que muestra el perfil de elución resultante, con una separación clara de las isoenzimas OASTL_A (fracciones 50-75) y OASTL_B (fracciones 90-150). En cada caso, las fracciones más activas se mezclaron por separado, se concentraron mediante ultrafiltración y se dializaron frente al tampón estándar antes de continuar la purificación.

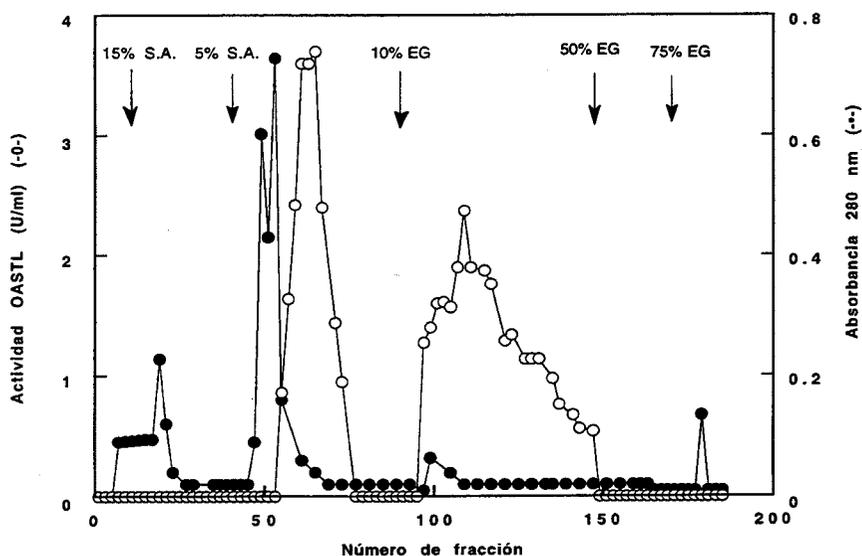


Fig. 9. Cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa de la preparación OASTL_{A-B} de *M. braunii*. La preparación enzimática, que contenía un 15% de saturación de sulfato amónico, se filtró a través de una columna (1,6 Φ x 4 cm) empaquetada con fenil sefarosa y equilibrada con el tampón estándar conteniendo un 15% de saturación de sulfato amónico, a un flujo máximo de 30 ml/h. Posteriormente, se realizaron lavados sucesivos con el tampón estándar, conteniendo sulfato amónico o etilenglicol tal como se indica mediante flechas en la figura. Se recogieron fracciones de 1,5 ml donde se determinó la actividad OASTL y la A_{280} .

De forma análoga se procedió con la preparación OASTL_C procedente de la etapa anterior, y el perfil de elución resultante se muestra en la Fig. 10.

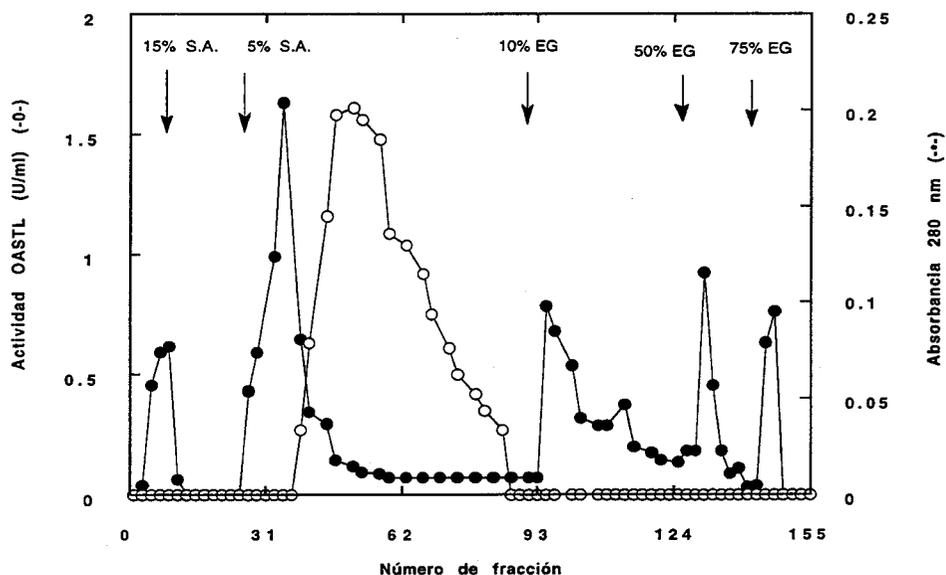


Fig. 10. Cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa de la preparación OASTL_C de *M. braunii*. La preparación enzimática, que contenía un 15% de saturación de sulfato amónico, se filtró a través de una columna (1.6 Φ x 4 cm) empaquetada con Fenil-sefarosa y equilibrada con el tampón estándar conteniendo un 15% de saturación de sulfato amónico, a un flujo máximo de 30 ml/h. Posteriormente, se realizaron lavados sucesivos con dicho tampón, conteniendo sulfato amónico o etilenglicol tal como se indica mediante flechas en la figura. Se recogieron fracciones de 1,5 ml donde se determinó la actividad OASTL y la A₂₈₀.

f) Filtración en gel Sephacryl S-300 HR de las isoenzimas OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C

Las preparaciones enzimáticas, concentradas hasta un volumen máximo de 2 ml, se filtraron a través de una columna empaquetada con Sephacryl S-300 HR. Las proteínas se eluyeron de la columna con tampón C (50 mM de fosfato potásico, pH 7,5; 2 mM de DTT; 1 mM de EDTA-Na₂ y 10 µM de PLP) y se recogieron fracciones de 1,5 ml en las que se determinó la actividad OASTL y la A₂₈₀. El perfil de elución resultante se muestra en la Fig. 11. En cada caso las fracciones con actividad se mezclaron y las preparaciones resultantes, después de concentradas por ultrafiltración, se guardaron a 4 °C hasta su utilización.

El procedimiento de purificación aquí descrito se resume en la Tabla 5 y permite obtener a partir de 30 g de células preparaciones de tres isoenzimas de OASTL con actividades específicas de 47,8; 33,3 y 56,6 U.mg⁻¹ respectivamente, que representan un 8,8; 9,7 y 7,1 % de la actividad total de partida.

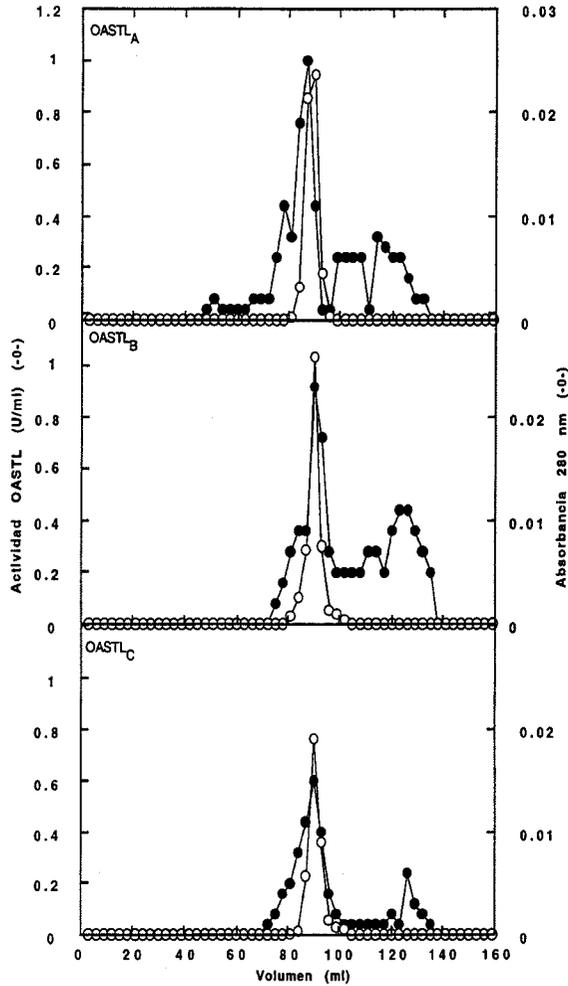


Fig. 11. Filtración en gel Sephacryl S-300 HR de preparaciones de las isoenzimas OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C de *M. braunii*. Las preparaciones de OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C se concentraron y aplicaron a una columna (1,6 Φ x 85 cm) empaquetada con Sephacryl S-300 HR equilibrada con el tampón C a un flujo máximo de 90 ml/h. Las proteínas se eluyeron de la columna con el tampón C. Se recogieron fracciones de 1,5 ml en las cuales se determinó la actividad OASTL y la A₂₈₀.

Tabla 5. Separación y purificación de isoenzimas con actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en *M. braunii*.

Etapas	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Act. Total (U)	Act.Espec . (U/mg)	Rec. (%)
Extracto crudo	251	552,2	1516	2,8	100
Sbte. Protamina	270	264,6	1488	5,6	98,2
Sbte. 55 °C	168	186,5	1166	6,3	76,9
Ppdo. (NH ₄) ₂ SO ₄	20	170,0	1165	6,9	76,8
Sephadex G-200	55	38,7	962	24,8	63,5
DEAE-sefacel					
OASTL _{A-B}	60	26,4	420	15,9	27,7
OASTL _C	49	11,3	174	15,4	11,5
Fenil-sefarosa					
OASTL _A	11	2,8	133,8	47,8	8,8
OASTL _B	8,5	4,4	146,6	33,3	9,7
OASTL _C	7,1	1,9	107,6	56,6	7,1

El proceso de purificación se realizó a partir de 30 g de peso húmedo de células crecidas en condiciones estándar. El ensayo de actividad y la determinación de proteína se describe en Materiales y Métodos.

2.3 Actividad cisteína desulfhidrilasa en las isoenzimas OASTL

En la Tabla 6 se muestra la determinación de una actividad enzimática alternativa en las tres isoenzimas. Se puede observar que la actividad cisteína desulfhidrilasa se encuentra presente en la OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C. Esta actividad representa alrededor del 1 % de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa, característica de estas isoenzimas.

Tabla 6. Comparación de actividades O-acetil-L-serina(tiol)liasa y cisteína desulfhidrilasa en las isoenzimas OASTL_A, OASTL_B Y OASTL_C de *M. braunii*

Isoenzima	Actividad (U/ml)	
	CD	OASTL
OASTL _A	0,0346	3,5
OASTL _B	0,0304	3,1
OASTL _C	0,0343	3,5

Las actividades enzimáticas se determinaron tal como se describe en Materiales y Métodos. En el caso de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa, una unidad de actividad representa la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de L-cisteína por min. Para la cisteína sulfhidrilasa, una unidad de actividad representa la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de sulfuro por min.

2.4. Determinación de parámetros moleculares

A partir de los datos obtenidos en las filtraciones de las distintas isoenzimas a través de Sephacryl S-300 HR se han determinado los radios de Stokes de las isoenzimas de OASTL de *M. braunii*, que resultaron ser de 3 nm para la OASTL_A y de 3,1 nm para OASTL_B y OASTL_C (Fig. 12), así como sus pesos moleculares que se estimaron en 49.500 daltons para OASTL_A y 54.000 daltons para OASTL_B y OASTL_C (Fig. 13).

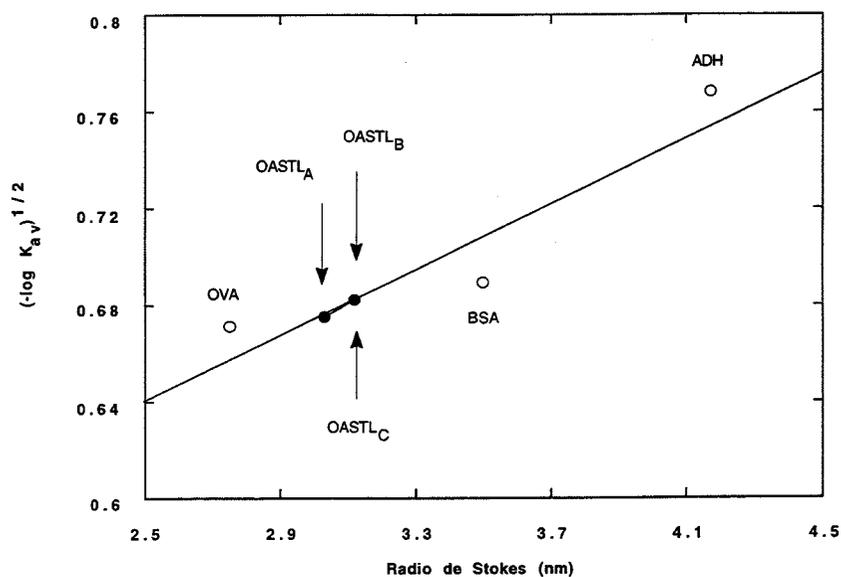


Fig. 12. Determinación del radio de Stokes de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa de *M. braunii*. Se utilizaron las siguientes proteínas como patrones: ovoalbúmina (OVA) (2,75 nm), seroalbúmina bovina (BSA) (3,50 nm) y alcohol deshidrogenasa (ADH) (4,17 nm). Las flechas indican la posición correspondiente a las distintas isoenzimas con actividad OASTL.

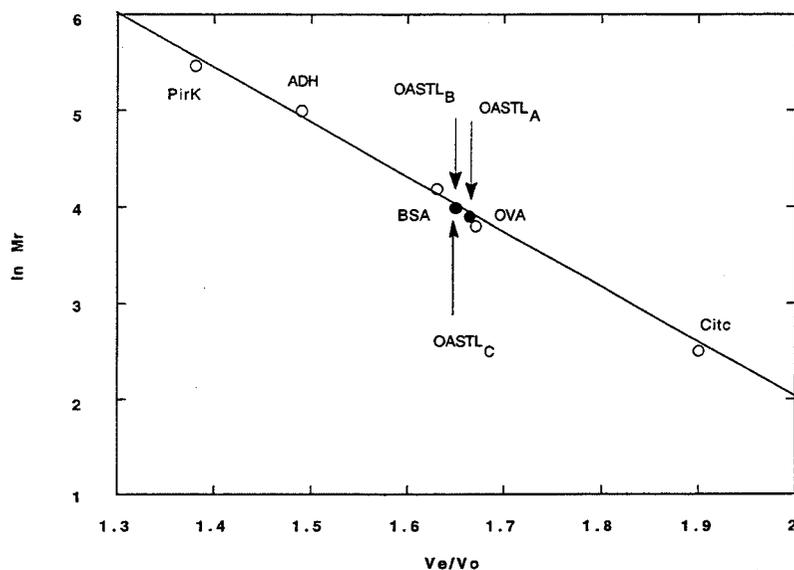


Fig. 13. Determinación del peso molecular de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa de *M. braunii* mediante cromatografía de filtración en gel Sephacryl S-300 HR. Los patrones utilizados en el calibrado de la columna fueron: piruvato quinasa (PirK: 237.000 Da), alcohol deshidrogenasa (ADH: 148.000 Da), seroalbúmina bovina (BSA: 66.000 Da), ovoalbúmina (OVA: 45.000 Da) y citocromo c (Citc: 12.300 Da).

Con el propósito de determinar la posible existencia de un complejo multienzimático (SAT-OASTL) de alto peso molecular entre la serina-acetil transferasa y la O-acetil-L-serina(tiol)liasa, se llevó a cabo una filtración de una preparación enzimática a través de Sephacryl S-300 HR. En la Fig. 14 se muestra el cromatograma obtenido, que revela la presencia de proteínas con actividad OASTL entre los 49.000 y 55.000 daltons, descartándose la hipótesis del complejo multienzimático SAT-OASTL.

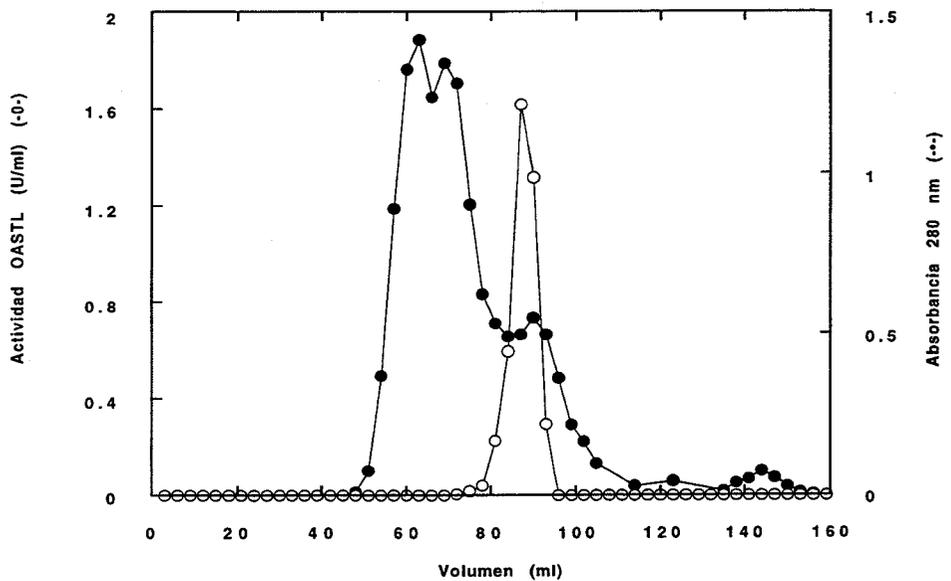


Fig. 14. Filtración en gel Sephacryl S-300 HR de una preparación de O-acetil-L-serina(tiol)liasa de *M. braunii*. La preparación enzimática, tras sucesivos tratamientos, se precipitó finalmente con sulfato amónico al 80% de saturación. Luego se resuspendió el precipitado en tampón de extracción. Se agregó sacarosa al 6% (p/v) y se aplicó a una columna (1,6 Φ x 85 cm) empaquetada con Sephacryl S-300 HR y equilibrada con el tampón de extracción a un flujo máximo de 90 ml/h. El volumen aplicado fue de 1 ml. Se recogieron fracciones de 1,5 ml. Se determinó la actividad OASTL y la A_{280} .

2.5. Estudios cinéticos

a) Determinación de los valores de K_m para los sustratos mostrados por las tres isoenzimas de OASTL

Se ha hecho un estudio comparativo de la afinidad que cada una de las isoenzimas muestra por los sustratos con objeto de obtener información clave que nos ayude a interpretar el posible papel fisiológico de cada una de ellas, dentro del metabolismo del azufre. La Fig. 15 muestra la representación de dobles inversos de Lineweaver-Burk para la determinación del valor de K_m para la O-acetil-L-serina. Se obtienen valores análogos para las tres isoenzimas, alrededor de 2,4 mM. La Fig. 16 muestra la representación de dobles inversos de Lineweaver-Burk para la determinación del valor de K_m para el sulfuro. Se obtienen valores de 230 μM , 310 μM y 80 μM , para OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C, respectivamente.

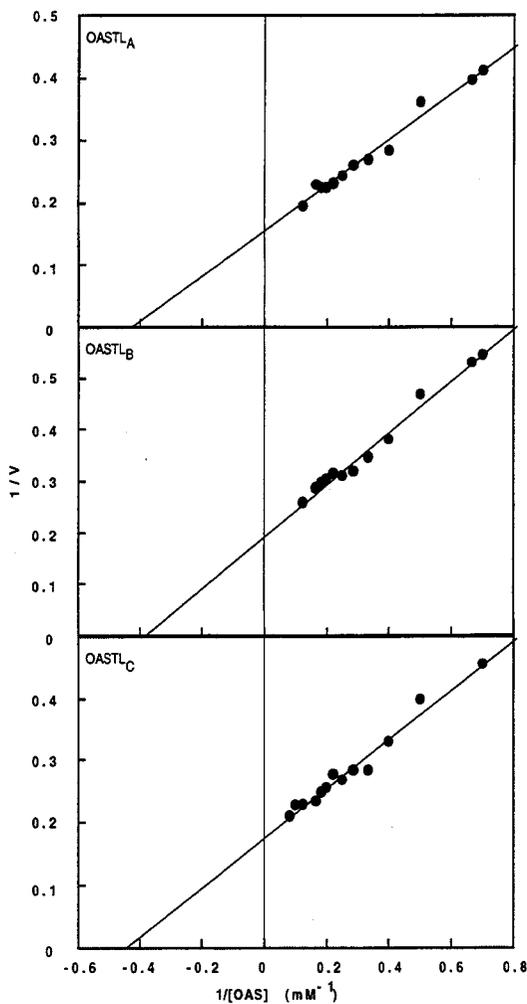


Fig. 15. Determinación de las K_m para O-acetil-L-serina correspondientes a OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C de *M. braunii*. La actividad OASTL se midió tal como se ha descrito en Materiales y Métodos excepto en lo que se refiere a la concentración de O-acetil-L-serina en la mezcla que varió según se indica en la figura. Las velocidades iniciales están expresadas en μ moles de L-cisteína formada por min.

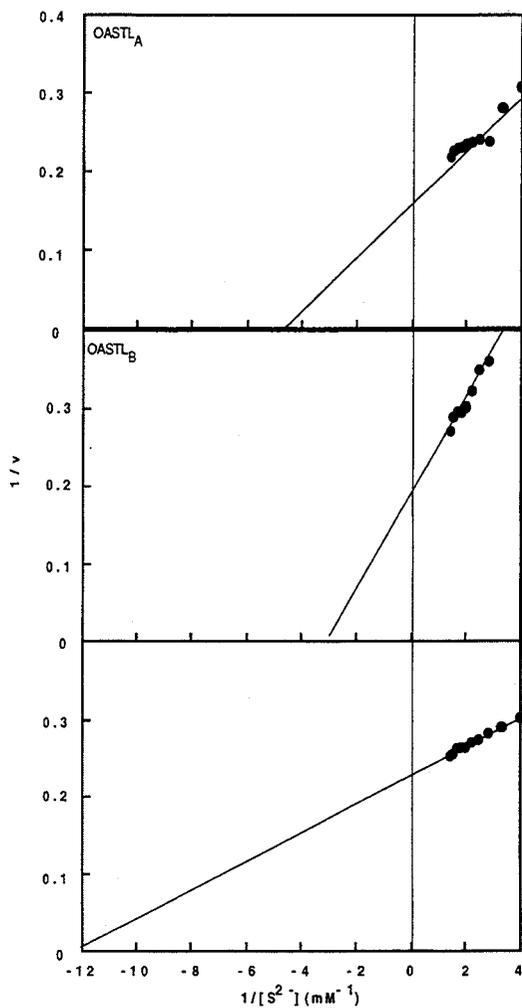


Fig. 16. Determinación de las K_m para sulfuro correspondientes a $OASTL_A$, $OASTL_B$ y $OASTL_C$ de *M. braunii*. La actividad OASTL se midió tal como se describe en Materiales y Métodos excepto en lo que respecta a la concentración de sulfuro en la mezcla de reacción que varió según se indica en la figura. Las velocidades iniciales están expresadas en μ moles de L-cisteína formada por min.

b) Efecto de la temperatura sobre la actividad OASTL

La Fig. 17 muestra la dependencia de la actividad OASTL de las isoenzimas con la temperatura en el intervalo comprendido entre 25 y 70°C. La actividad máxima se alcanza a 60°C para OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C.

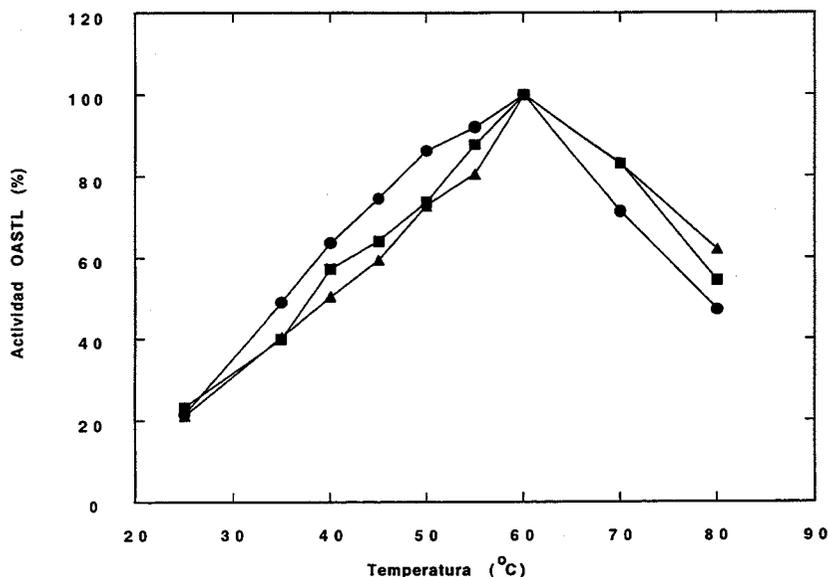


Fig. 17. Temperatura óptima de trabajo para el ensayo de la actividad OASTL de *M. braunii*. La actividad de preparaciones purificadas de OASTL_A (●), OASTL_B (■) y OASTL_C (▲) se midió según se describe en Materiales y Métodos aunque incubando la mezcla de reacción durante 5 min a las temperaturas indicadas. El 100% de actividad correspondió a 20 U/ml

Por otra parte la Fig. 18 muestra la representación de Arrhenius de las velocidades máximas obtenidas a cada temperatura. Los valores obtenidos en el intervalo entre 25 y 60 °C se disponen linealmente distinguiéndose dos pendientes distintas para cada una de las isoenzimas.

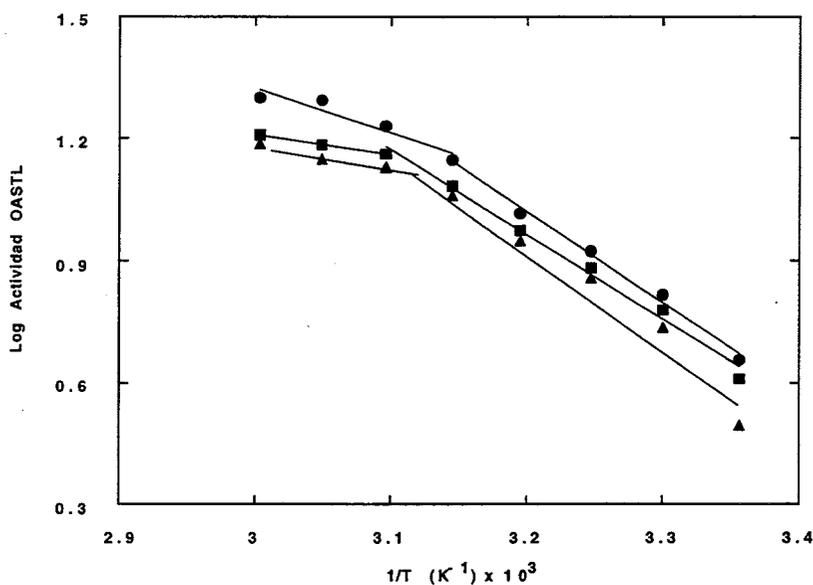


Fig. 18. Representación de Arrhenius para la determinación de la energía de activación de las reacciones catalizadas por las isoenzimas OASTL_A (●), OASTL_B (■) y OASTL_C (▲) de *M. braunii*. Se representa el logaritmo de la actividad OASTL frente al inverso de la temperatura, en el intervalo comprendido entre 25 y 60°C.

La existencia de dos valores de energía de activación distintos para cada isoenzima implicaría por su parte un mecanismo de reacción con dos pasos cinéticos. Finalmente a temperaturas superiores a 60°C, la actividad de las isoenzimas decae como consecuencia de su desnaturalización.

En la Fig. 19 se observa un descenso de la actividad de las tres isoenzimas como consecuencia de un proceso de termoinactivación.

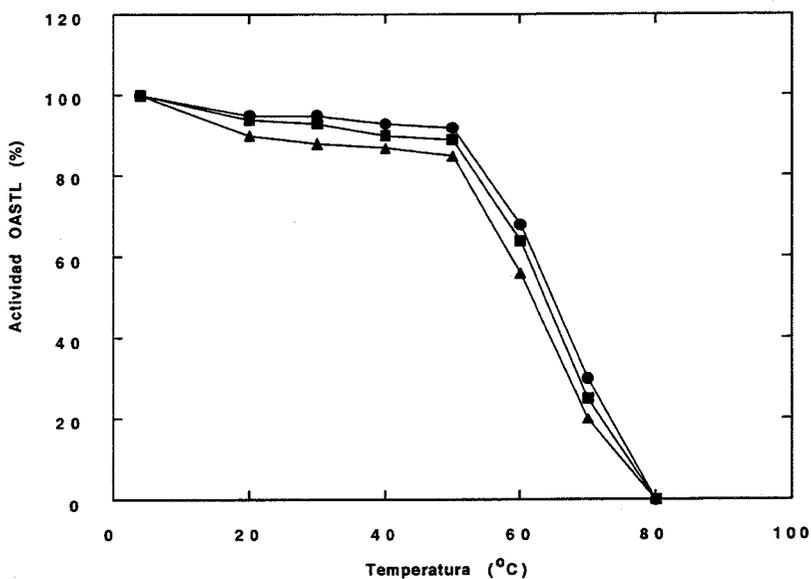


Fig. 19. Inactivación térmica de OASTL_A (●), OASTL_B (■) y OASTL_C (▲) de *M. braunii*. Preparaciones parcialmente purificadas de OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C fueron incubadas durante 10 min a la temperaturas indicadas antes de ser empleadas para la medida de su actividad, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El 100 % de actividad, correspondiente a las preparaciones conservadas a 4 °C, fue de 3,6 U.ml⁻¹, 3,1 U.ml⁻¹ y 3,05 U.ml⁻¹ respectivamente.

b) Efecto del pH sobre la actividad OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C

La Fig. 20 muestra la dependencia de la actividad OASTL de las correspondientes isoenzimas con el pH en el intervalo de 4 a 10. Puede observarse que a valores de pH inferiores a 6 apenas puede detectarse actividad, probablemente debido a pérdidas de sulfuro por volatilización. La actividad máxima se alcanza a pH 8,5 con tampón Tris-HCl y a pH 9,0 con CHES-KOH, para OASTL_B y OASTL_A respectivamente. Sin embargo a valores de pH superiores a 8,0 se produce un desplazamiento del grupo acetilo, transformándose la O-acetil-L-serina en N-acetil-L-serina, lo que de hecho aconseja que la medida de la actividad OASTL se haga entre pH 7,0 y 7,5.

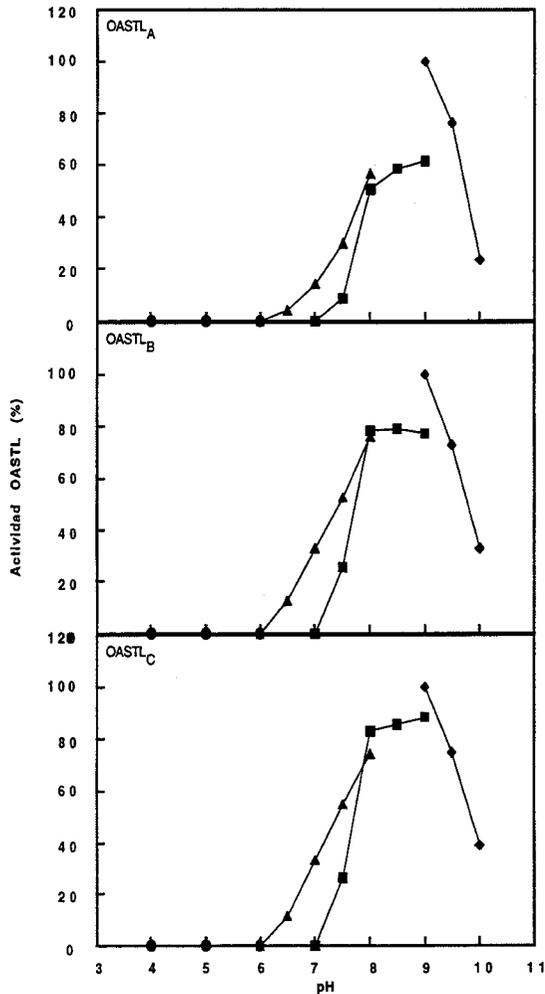


Fig. 20. pH óptimo para el ensayo de la actividad OASTL de *M. braunii*. La actividad de preparaciones parcialmente purificadas de OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C se midió según se describe en Materiales y Métodos, utilizando los tampones acetato (●), fosfato (▲), TRIS (■) y CHES (◆) a una concentración final de 100 mM. El 100 % de actividad fue de 13,65 U.ml⁻¹, 6,78 U.ml⁻¹ y 6,69 U.ml⁻¹ respectivamente.

2.6. Propiedades regulatorias

a) Inhibición por sustrato de OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C

OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C se inhiben a partir de concentraciones de OAS de 12, 10 y 11 mM, respectivamente (Fig. 21). El sulfuro inhibe, a concentraciones próximas a 30 mM, las tres isoenzimas (datos no mostrados).

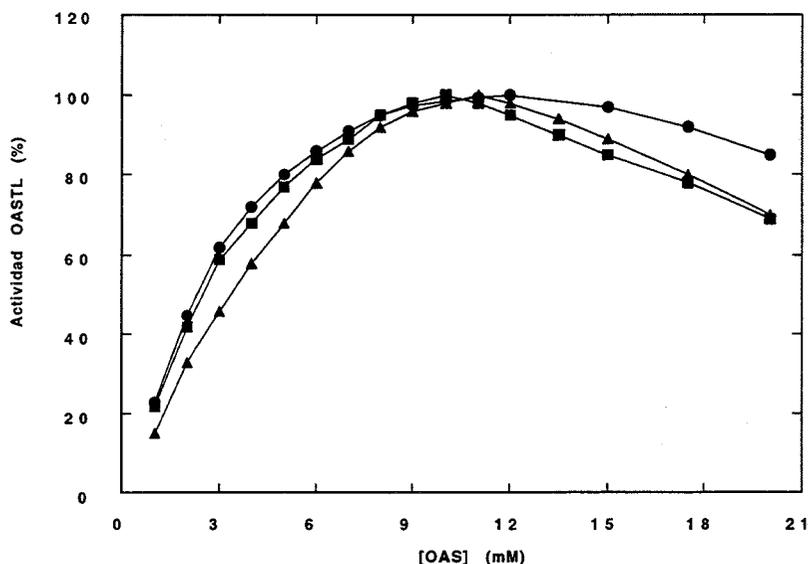


Fig. 21. Inhibición por O-acetil-L-serina de la actividad de OASTL_A (●), OASTL_B (■) y OASTL_C (▲) de *M. braunii*. Se midió la actividad como se describe en Materiales y Métodos, excepto que se incluyeron las concentraciones indicadas de O-acetil-L-serina. El 100 % de actividad, correspondiente a concentraciones de sustrato de 12, 10 y 11 mM, fue de 3,7 U.ml⁻¹, 3,2 U.ml⁻¹ y 3,08 U.ml⁻¹ para OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C, respectivamente.

b) Efecto del DTE sobre OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C

La incubación de las tres isoenzimas con un ditiol como el DTE 5 mM no afecta al nivel de actividad OASTL, tal como se muestra en la Fig. 22. En cambio, esta sustancia inhibe fuertemente la actividad de las isoenzimas a concentraciones superiores a 10 mM en la mezcla de reacción, siendo casi total a concentraciones de 30 mM o superiores.

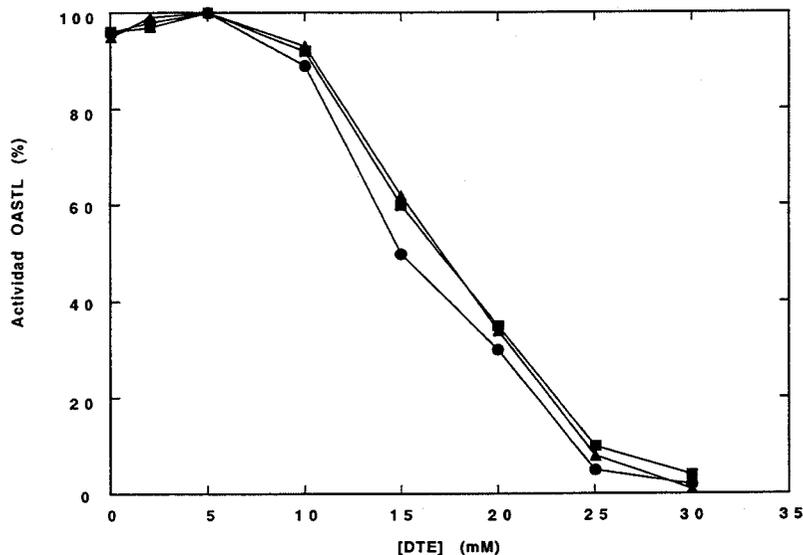


Fig. 22. Inhibición por DTE de la actividad OASTL_A (●), OASTL_B (■) y OASTL_C (▲) de *M. braunii*. La actividad OASTL se midió tal como se describe en Materiales y Métodos pero incluyendo en la mezcla de reacción las concentraciones de DTE indicadas. El 100 % de actividad fue de 3,4 U.ml⁻¹, 3,02 U.ml⁻¹ y 3,48 U.ml⁻¹ respectivamente.

c) Efecto de diferentes aminoácidos sobre la actividad OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C

En la Tabla 7 se muestra el efecto de diferentes aminoácidos sobre la actividad OASTL. Sólo la L-metionina a una concentración 5 mM inhibe significativamente la actividad OASTL. Se observan niveles de inhibición de 41 %, 42 % y 40 %, para OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C, respectivamente.

Tabla 7. Efecto de diferentes aminoácidos sobre la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa de las isoenzimas OASTL_A, OASTL_B Y OASTL_C de *M. braunii*.

Aminoácido	Actividad (%)		
	OASTL _A	OASTL _B	OASTL _C
Ninguno	100	100	100
L-Arginina	98	99	105
L-Asparragina	103	94	96
Glicina	106	100	103
L-Glutamina	100	93	87
L-Histidina	91	96	96
L-Leucina	98	98	96
L-Metionina	41	42	40
L-Serina	91	108	100

La actividad OASTL se determinó según se describe en Materiales y Métodos, pero en presencia de 5 mM de los aminoácidos indicados. El 100% de actividad fue de 3,40; 2,83 y 3,04 U.ml⁻¹ para las isoenzimas OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C, respectivamente.

d) Inhibición por L-metionina de la reacción catalizada por la OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C

Con el fin de realizar un estudio relacionado con la naturaleza de la inhibición producida por la L-metionina, se ha medido la actividad OASTL a concentraciones variables de O-acetil-L-serina en presencia de diferentes concentraciones de L-metionina. Las correspondientes representaciones de Lineweaver-Burk para OASTL_A (Fig. 23), OASTL_B (Fig. 24) y OASTL_C (Fig. 25) permiten determinar que la L-metionina inhibe a las tres isoenzimas con respecto a OAS. La naturaleza de la inhibición es de la llamada mixta, donde el inhibidor afecta tanto los valores de V_{\max} como los de K_m de la reacción catalizada enzimáticamente. Los valores de K_i obtenidos son de 1,44 mM, 1,53 mM y 1,95 mM, para OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C, respectivamente.

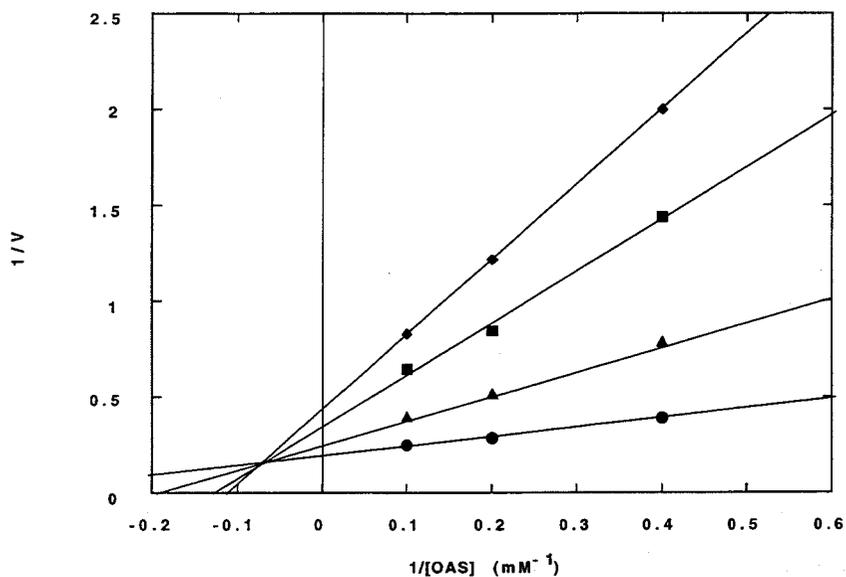


Fig. 23. Inhibición por L-metionina de la actividad OASTL_A de *M. braunii*. Se midió la actividad OASTL tal como se describe en Materiales y Métodos pero variando la concentración de O-acetil-L-serina e incluyendo la L-metionina en la mezcla de reacción a 0 (●); 2,5 (▲); 5 (■) y 7,5 (◆) mM. Las velocidades iniciales se expresan en μmoles de L-cisteína formada por min.

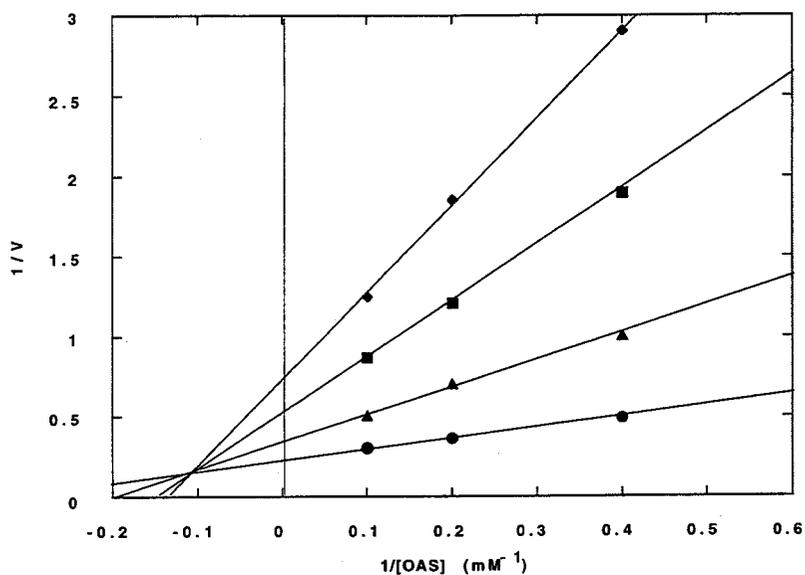


Fig. 24. Inhibición por L-metionina de la actividad OASTL_B de *M. braunii*. Se midió la actividad OASTL tal como se describe en Materiales y Métodos pero variando la concentración de O-acetil-L-serina e incluyendo la L-metionina en la mezcla de reacción como en la figura anterior. Las velocidades iniciales se expresan en μmoles de L-cisteína formada por min.

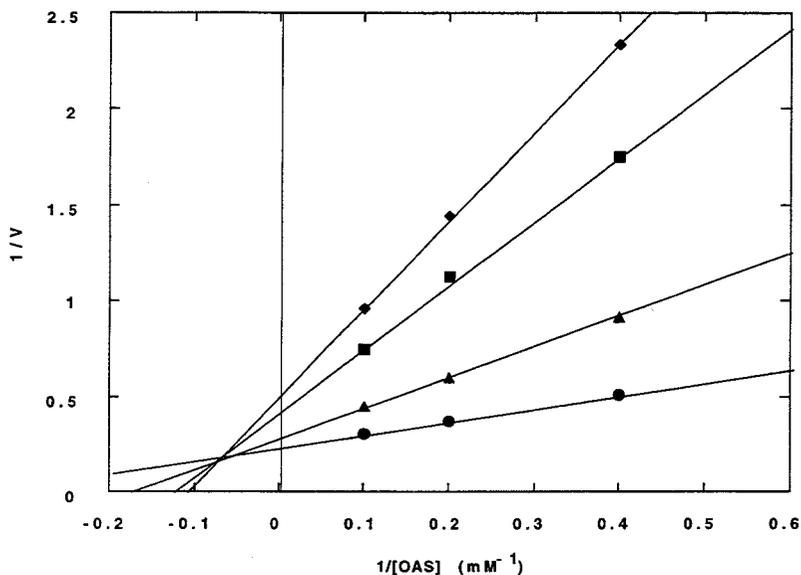


Fig. 25. Inhibición por L-metionina de la actividad OASTL_C de *M. braunii*. Se midió la actividad OASTL tal como se describe en Materiales y Métodos pero variando la concentración de O-acetil-L-serina e incluyendo la L-metionina en la mezcla de reacción como en la figura 23. Las velocidades iniciales se expresan en μ moles de L-cisteína formada por min.

e) Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad de las isoenzimas OASTL

En la Tabla 8 se observa el efecto de distintos compuestos sobre la actividad OASTL. No se observa una disminución de la actividad tras la adición de acetato 5 mM a la mezcla de reacción. En cambio, tanto el tiocianato 5 mM y el maleato 5 mM, inhiben la actividad de las tres isoenzimas.

Tabla 8. Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa de las tres isoenzimas de *M. braunii*.

Compuesto	Actividad (%)		
	OASTL _A	OASTL _B	OASTL _C
Ninguno	100	100	100
Acetato	97	98	96
Tiocianato	59	66	44
Maleato	46	58	55

La actividad OASTL se determinó según se describe en Materiales y Métodos, en presencia 5 mM de los compuestos reseñados. El 100 % de actividad fue de 3,54; 3,04 y 3,50 U/ml para las isoenzimas A, B y C, respectivamente.

En la Tabla 9 se muestra el efecto de diferentes compuestos, entre los que se encuentran inhibidores de enzimas dependientes de piridoxal-5'-fosfato y agentes quelantes de metales. Se observa que el ácido aminooxiacético 5 mM inhibe significativamente la actividad de las tres isoenzimas, en tanto que la hidroxilamina 5 mM inhibe selectivamente la actividad de la OASTL_A y OASTL_B, pero no la de la OASTL_C. La D-cicloserina 5 mM inhibe parcialmente la actividad de las tres isoenzimas.

Tabla 9. Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa de las isoenzimas de *M. braunii*.

Compuesto	Actividad (%)		
	<i>OASTL_A</i>	<i>OASTL_B</i>	<i>OASTL_C</i>
Ninguno	100	100	100
Hidroxilamina	78	87	100
Ac.Aminooxiacético	15	16	19
D-cicloserina	77	91	87
2-Mercaptoetanol	98	98	97
NaCN	98	101	99
H ₃ BO ₃	99	98	97
EDTA-Na ₂	100	101	102

Mismas condiciones que la Tabla 7 con la excepción del NaCN, cuya concentración fue de 1 mM. El 100 % de actividad fue de 3,62; 3,12 y 3,02 U.ml⁻¹ para *OASTL_A*, *OASTL_B* y *OASTL_C*, respectivamente.

3. Regulación de la expresión de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en células de *M.braunii*

3.1. Efecto de las condiciones ambientales y nutricionales sobre la actividad OASTL.

a) Efecto de la intensidad lumínica

En la Tabla 10 se muestra el efecto de distintas intensidades de luz sobre el nivel de actividad de la OASTL.

Tabla 10. Efecto de la intensidad de la luz sobre el nivel de actividad de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa en *M. braunii*

Intensidad de luz $W.m^{-2}$	Actividad OASTL $U.mg\text{ clorofila}^{-1}$	
	0 h	24 h
53	2,80	3,50
40	2,85	2,90
31	2,78	2,85
23	2,82	2,80
18	2,85	2,85

Células crecidas en condiciones estándar, con una intensidad lumínica de 31 W.m^{-2} , se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio fresco hasta unos $20\text{ }\mu\text{g clorofila.ml}^{-1}$. A tiempo 0, fracciones del cultivo original se sometieron a distintas intensidades de luz y tras 24 h, se midió la actividad OASTL en células permeabilizadas.

Se puede observar que tras 24 h de iluminación continua, los resultados indican un aumento de la actividad específica OASTL del 25 % en células sometidas a una intensidad de luz de 53 W.m^{-2} , en tanto que la

actividad no parece afectarse entre intensidades de 18 y 40 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$. En todos los casos, las células más que duplican la cantidad de clorofila, a las 24 h (datos no mostrados). No obstante el efecto observado hemos seleccionado para nuestros cultivos una intensidad lumínica de 31 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ en los experimentos de esta tesis, porque se adecuaba mejor a nuestras condiciones de trabajo sin afectar significativamente nuestros objetivos.

b) Efecto de la calidad de luz

Las células que crecen con luz roja o luz azul muestran una disminución de la actividad OASTL en las primeras 12 h (Fig. 26). Por otra parte, en ambas situaciones, a partir de ese momento los resultados indican un aumento de la actividad OASTL hasta situarse en niveles próximos a 3 $\text{U}\cdot\text{mg clorofila}^{-1}$ a las 48 h. Se observa que los niveles máximos en el contenido de clorofila son inferiores, tanto en condiciones de luz roja ($37 \mu\text{g clorofila}\cdot\text{ml}^{-1}$) como de luz azul ($21 \mu\text{g clorofila}\cdot\text{ml}^{-1}$), a los alcanzados bajo condiciones de iluminación con luz blanca ($60 \mu\text{g clorofila}\cdot\text{ml}^{-1}$), a las 48 h. Teniendo en cuenta que mostramos actividades relativas a clorofila, es obvio que la actividad OASTL total es significativamente más alta en los cultivos con luz blanca.

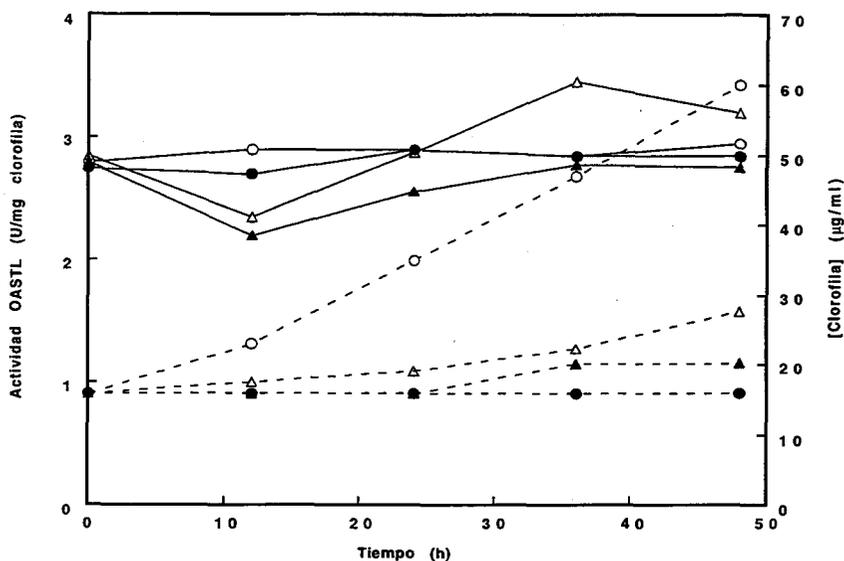


Fig. 26. Efecto de la calidad de luz sobre la actividad OASTL en células de *M. braunii*. Células cultivadas en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio fresco, a una concentración inicial de clorofila de $16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. A tiempo 0 se sometieron a luz blanca (O), azul (Δ), roja (\blacktriangle) y oscuridad (\bullet). La intensidad de luz fue en todos los casos de $31 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$. Se midió la actividad OASTL (líneas continuas), en células permeabilizadas, y el contenido de clorofila (líneas punteadas).

c) Efecto de la fuente de carbono

En la Tabla 11 se muestra el efecto de la utilización de distintas fuentes alternativas de carbono sobre la actividad OASTL. Se observa que en las células sometidas a carencia de carbono bajo condiciones de iluminación continua disminuye la actividad específica de la OASTL en un 26 % con respecto al testigo (dióxido de carbono y luz). Además, no se evidenciaron incrementos en el nivel de clorofila (datos no mostrados). La combinación de carencia de la fuente de carbono y oscuridad revela un brusco descenso de la

actividad específica en las células (-38 % respecto al testigo dióxido de carbono y luz). Las células que crecían con fuentes orgánicas alternativas de carbono muestran un aumento de la actividad específica OASTL, tanto bajo situaciones de luz como de oscuridad, a las 24 h.

Tabla 11. Efecto de la fuente de carbono sobre el nivel de actividad de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa en *M. braunii*

Fuente de carbono	Actividad OASTL <i>U.mg clorofila⁻¹</i>	
	0 h	24 h
+CO ₂ (luz)	2,80	2,90
+CO ₂ (oscuridad)	2,85	2,80
- C (luz)	2,75	2,14
- C (oscuridad)	2,80	1,80
+Acetato (luz)	2,82	3,24
+Acetato (oscuridad)	2,78	3,06
+Glucosa (luz)	2,70	3,38
+Glucosa (oscuridad)	2,75	3,46

Células crecidas en condiciones estándar, con dióxido de carbono 5% (v/v) y con una intensidad de luz de 31 W.m⁻²; se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio fresco hasta alcanzar unos 20 µg clorofila.ml⁻¹. A tiempo cero y donde se indica se añadió a cada cultivo CO₂ al 5% (v/v) en aire, acetato, 12 mM, o glucosa 10 mM, como fuente de carbono. Tras 24 h, se midió la actividad OASTL en células permeabilizadas.

Es más importante por tanto la disponibilidad de una fuente de carbono para mantener, o incluso aumentar el nivel intracelular de la actividad OASTL, que el efecto de la luz, ya que la oscuridad no afecta significativamente.

d) Efecto de la fuente de nitrógeno

En la Tabla 12 se muestra el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el nivel intracelular de la OASTL. La carencia de nitrógeno en el medio de cultivo determina un descenso de la actividad específica OASTL y también de la clorofila (datos no mostrados), insinuándose una clorosis incipiente en las células. El amonio 5 mM se revela como una fuente alternativa de nitrógeno, pero a mayores concentraciones determina una clorosis en las células y una parada del crecimiento (datos no mostrados). La hidroxilamina 5 mM determina un descenso de la actividad OASTL del orden del 72% con respecto al nitrato como fuente alternativa, a la vez que clorosis y detención del crecimiento (datos no mostrados).

Tabla 12. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el nivel de actividad de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa en *M. braunii*

Fuente de nitrógeno	Actividad OASTL <i>U.mg clorofila⁻¹</i>	
	0 h	24 h
Ninguna	2,80	2,52
Nitrato	2,82	2,90
Nitrito	2,78	2,85
Amonio	2,80	2,57
Hidroxilamina	2,85	0,81

Células crecidas en condiciones estándar, con una concentración de nitrato 10 mM, se recogieron, lavaron y resuspendieron en un medio fresco carente de nitrógeno hasta alcanzar unos 20 μg Clorofila. ml^{-1} . A tiempo 0 y según se indica se añadió a cada cultivo ; nitrato o nitrito, 10 mM, y amonio o hidroxilamina, 5 mM. Tras 24 h de crecimiento, se midió en los correspondientes cultivos la actividad OASTL en células permeabilizadas.

e) Efecto de la fuente de azufre

En la Tabla 13 se muestra el nivel de actividad OASTL de células de *M. braunii* creciendo en diferentes fuentes de azufre. Durante el crecimiento se observó que aquellos compuestos inorgánicos del azufre oxidado, como sulfato, sulfito y tiosulfato, permiten el crecimiento celular del alga, y llegaron a duplicar el contenido de clorofila en los cultivos tras 24 h de ensayo, mientras que las células tratadas con tetrionato no llegan a duplicar su contenido de clorofila en el mismo tiempo (datos no mostrados). El aumento de la actividad específica OASTL observado en células tratadas con tetrionato es similar a las células que crecen en condiciones de carencia de azufre.

Por otra parte, las células de *M. braunii* pueden utilizar sulfuro como fuente de azufre para su crecimiento, duplicando su contenido de clorofila a las 24 h y no aumentando significativamente la actividad OASTL (datos no mostrados).

En cuanto a la utilización de fuentes de azufre orgánicas por parte de *M. braunii*, observamos que en las células tratadas con L-cisteína, L-metionina, glutatión y dodecil sulfato, como única fuente de azufre, el contenido de clorofila se duplica tras 24 h, y los niveles de actividad OASTL sólo muestran ligeras diferencias entre sí. Sin embargo, las células tratadas con ácido sulfámico como fuente alternativa de azufre, no alcanzan a duplicar el contenido de clorofila (datos no mostrados) en 24 h, y se observa un aumento de la actividad OASTL.

En las células que crecen en situación de carencia de azufre en el medio de cultivo, se observa un aumento de la actividad OASTL y el contenido de clorofila no alcanza a duplicarse tras 24 h (datos no mostrados).

Tabla 13. Efecto de la fuente de azufre sobre el nivel de actividad de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa en *M. braunii*

Fuente de azufre	Actividad OASTL <i>U.mg clorofila⁻¹</i>	
	<i>0 h</i>	<i>24 h</i>
Ninguna	2,85	4,23
Sulfato	2,80	2,90
Sulfito	2,85	2,83
Tiosulfato	2,83	2,95
Tetrationato	2,85	4,35
Sulfuro	2,78	3,08
Ac. sulfámico	2,88	4,07
SDS	2,75	2,70
L-Cisteína	2,90	2,85
L-Metionina	2,88	3,16
Glutación	2,90	3,05

Células crecidas en condiciones estándar, con una concentración de sulfato 1 mM, se recogieron, lavaron y resuspendieron en un medio fresco carente de azufre. A tiempo 0 se añadieron, a los correspondientes cultivos celulares que contenían alrededor de 20 μg clorofila. ml^{-1} , las fuentes de azufre que se indican a una concentración 1 mM. Tras 24 h, se midió la actividad OASTL en células permeabilizadas.

f) Efecto de la concentración de ión ferroso en el medio de cultivo

En la Tabla 14 se muestra el efecto del ión ferroso sobre la actividad OASTL. En las células que crecen en un medio carente de hierro, se observa un aumento de la actividad OASTL a las 48 h.

Tabla 14. Efecto del ion ferroso sobre el nivel de actividad de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa en *M. braunii*

Concentración μM	Actividad OASTL $U.mg\text{ clorofila}^{-1}$		
	0 h	24 h	48 h
0	2,80	2,90	4,05
20	2,90	2,85	2,90
40	2,88	2,90	2,85
60	2,87	2,85	2,90
80	2,85	2,90	2,95
100	2,86	2,90	3,00
150	2,95	2,95	3,05
200	2,88	2,90	3,08

Células crecidas en condiciones estándar, con una concentración de ión ferroso de $36\ \mu M$; se recogieron, lavaron y resuspendieron en un medio fresco carente de hierro. A tiempo 0 se añadieron, a los correspondientes cultivos celulares que contenían alrededor de $20\ \mu g$ clorofila. ml^{-1} , las concentraciones indicadas de cloruro ferroso (Cl_2Fe). Tras 24 y 48 h de cultivo, se midió la actividad OASTL en células permeabilizadas.

g) Efecto de la carencia de distintos factores básicos para el crecimiento celular

En la Fig. 27 se observa que la carencia de nitrógeno, carbono, o bien luz, no tiene un efecto significativo sobre el nivel intracelular de la OASTL, en las primeras 36 h. La adición de la fuente de nitrógeno al medio de cultivo, determina un aumento de la actividad OASTL hasta alcanzar un máximo de $4,3\ U.mg\text{ clorofila}^{-1}$ a las 16 h posteriores al momento de la reposición. Con el transcurso del tiempo la actividad disminuye hasta situarse próxima a los valores encontrados en las condiciones normales de

crecimiento ($2,7-2,9 \text{ U.mg clorofila}^{-1}$). Las células que crecen en un medio carente de nitrógeno muestran clorosis como consecuencia del descenso en la cantidad de clorofila del cultivo con respecto al valor inicial de partida ($16 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

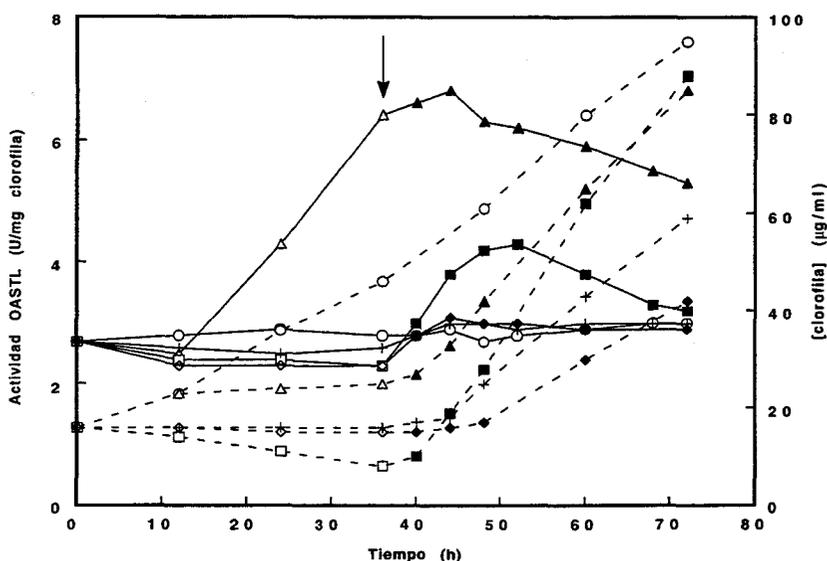


Fig. 27. Actividad OASTL en células de *M. braunii* sometidas a carencia de distintos factores básicos para su crecimiento. Células cultivadas en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos con nitrato 10 mM se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio fresco, a una concentración inicial de clorofila de $16 \mu\text{g.ml}^{-1}$ y en las condiciones indicadas. La flecha indica el punto de transición desde la situación de carencia de azufre (Δ), nitrógeno (\square), carbono (O) y luz (+) a la reposición de sulfato (\blacktriangle), nitrato (\blacksquare), CO_2 (\blacklozenge) y luz (+) a la reposición del mismo. Se midieron la actividad OASTL (líneas continuas), en células permeabilizadas, y el contenido de clorofila (líneas punteadas) a los tiempos indicados.

La reposición de la fuente de carbono o el reestablecimiento de las condiciones de iluminación habituales, sólo determina un ligero aumento de la actividad OASTL en las células, con picos ligeramente evidentes a las 8 h posteriores. En el caso de las células que crecían sin fuente de carbono, la

reposición de la misma determina un incremento menor de la cantidad de clorofila en el cultivo en relación a los otros tratamientos.

La carencia de azufre determina una inducción marcada de la actividad OASTL en las células a partir de las 12 h. La adición de sulfato 1 mM determina una disminución de la actividad específica pero el valor alcanzado a las 36 h posteriores es de 5,5 U.mg clorofila⁻¹, superior en un 110 % al control.

3.2. Efecto de las condiciones nutricionales sobre el nivel intracelular de las isoenzimas con actividad OASTL

Durante el procedimiento de purificación de la O-acetil-L-serina(tiol)liasa se identificaron tres isoenzimas, OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C. En una cromatografía hidrofóbica en fenil-sefariosa las isoenzimas OASTL_B y OASTL_C con sulfato amónico al 5 % de saturación en tampón estándar; en tanto que la isoenzima OASTL_A eluye en el mismo tampón con 30% (v/v) de etilenglicol. Mediante este procedimiento, hemos estudiado la incidencia de factores nutricionales o ambientales sobre la inducción diferencial de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en las tres isoenzimas de *M. braunii*.

a) Efecto del crecimiento

En la Fig. 28 se puede observar que los cultivos de *M. braunii* con 20 µg clorofila. ml⁻¹ expresan dos grupos de isoenzimas con una relación de actividades OASTL_{B-C}:OASTL_A de 1. Mientras que los cultivos con 60 µg Clorofila.ml⁻¹ las expresan en una proporción OASTL_{B-C}:OASTL_A de 2, indicando que a medida que avanza el crecimiento celular, la actividad

OASTL_A decrece algo, mientras que aumenta de forma significativa el nivel de las otras dos isoenzimas.

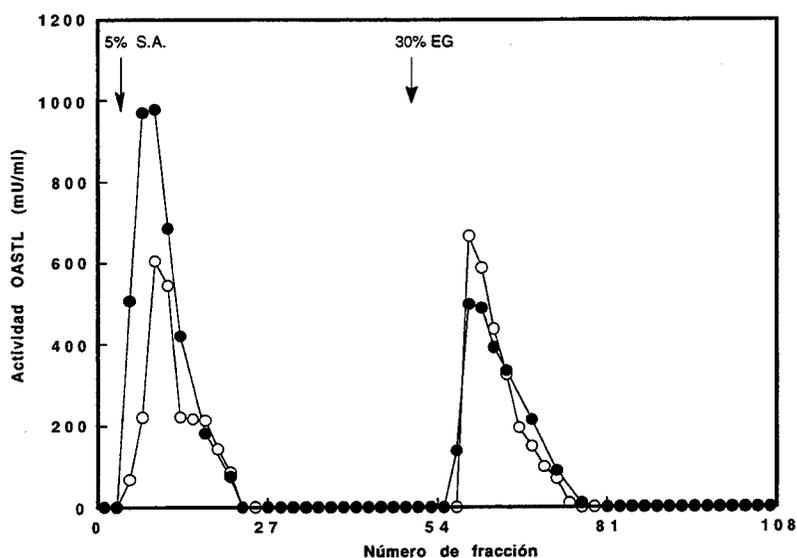


Fig. 28. Efecto del crecimiento sobre el nivel intracelular de las isoenzimas con actividad OASTL de células de *M. braunii*. A extractos crudos de células cultivadas y cosechadas en dos momentos distintos de la fase de crecimiento exponencial (20 (○) y 60 (●) μg Clorofila. ml^{-1}), se les adicionó sulfato de protamina 10% (v/v) para la eliminación de pigmentos, tal como se indicó en Materiales y Métodos. Los correspondientes sobrenadantes se aplicaron a una columna de fenil-sefarosa (Φ 1,6 x 2 cm) empleando tampón estándar, pH 6,8, conteniendo sulfato amónico al 15% de saturación. Se indican los sucesivos lavados para la elución de las isoenzimas, conteniendo sulfato amónico (S.A.) o etilenglicol (EG), según corresponda. Se recogieron fracciones de 1,5 ml y se midió la actividad OASTL.

b) Efecto de la carencia de carbono en el medio de cultivo

Se observa una disminución de la actividad OASTL en ambos grupos de isoenzimas bajo una situación de carencia de carbono en relación a los controles (Fig. 29). La relación de actividades OASTL_{B-C}:OASTL_A es de

0,9. Por otra parte es interesante mencionar que la actividad OASTL_C permanece constante las 24 h en presencia de CO₂, mientras que las otras isoenzimas aumentan algo su actividad.

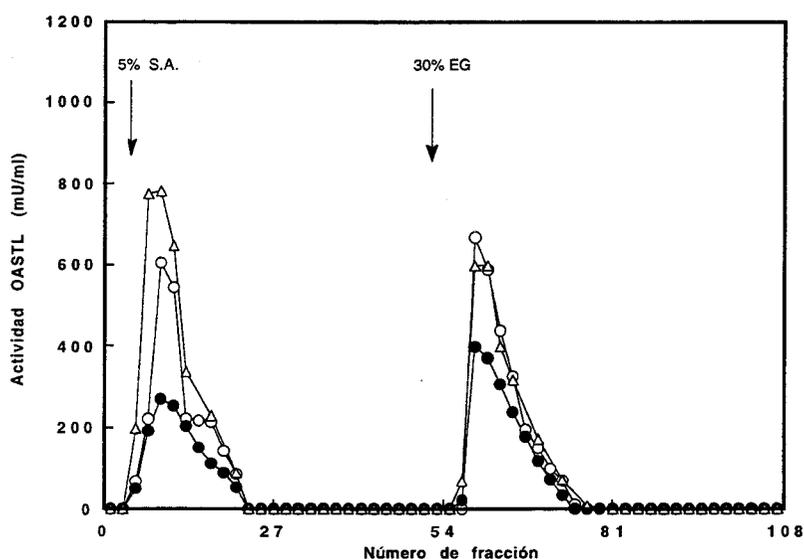


Fig. 29. Efecto de la carencia de carbono en el medio sobre el nivel intracelular de las isoenzimas con actividad OASTL de células de *M. braunii*. A extractos crudos de células cultivadas, sometidas a carencia de fuente de carbono durante 24 h (●), se les sometió al mismo tratamiento que el indicado en la figura 28. Se recogieron fracciones de 1,5 ml y se midió la actividad OASTL. (O) es un control a tiempo cero y (Δ) es un control con células crecidas durante 24 h con CO₂.

c) Efecto de la carencia de nitrógeno en el medio de cultivo

La carencia de nitrógeno en el medio determina una expresión reducida de ambos grupos de isoenzimas en relación a los controles (Fig. 30). La relación de actividades OASTL_{B-C}:OASTL_A es de 0,8.

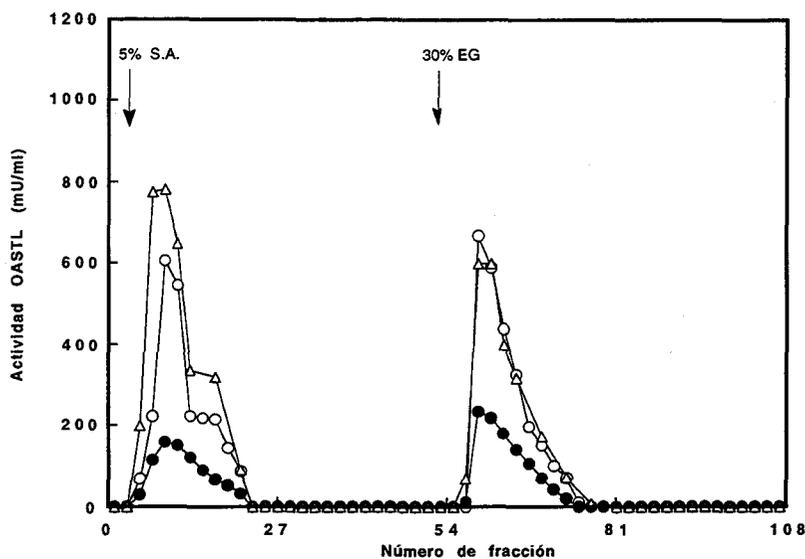


Fig. 30. Efecto de la carencia de nitrógeno en el medio sobre el nivel intracelular de las isoenzimas con actividad OASTL de células de *M. braunii*. Extractos crudos de células cultivadas, sometidas a carencia de fuente de nitrógeno durante 24 h (●), se trataron como se indica en la figuras 28. Se recogieron fracciones de 1,5 ml y se midió la actividad OASTL. (O) es un control a tiempo cero y (Δ) es un control con células crecidas durante 24 h con nitrato.

d) Efecto de la carencia de azufre en el medio de cultivo

En la Fig. 31 se puede observar el incremento marcado del grupo de isoenzimas OASTL_{B-C}, con el transcurso del tiempo en células carentes de azufre, que llega a multiplicarse por 6 después de 60 horas en hambre de azufre, indicando una inducción de la actividad OASTL que estudiaremos a continuación. Paralelamente a como se ha observado en el caso de carbono y nitrógeno, la actividad OASTL_C es la que menos se afecta por la carencia del nutriente

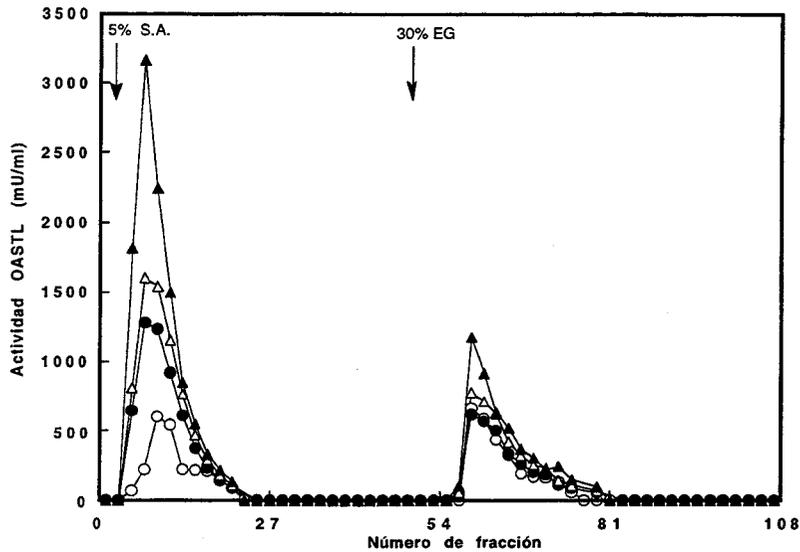


Fig. 31. Efecto de la carencia de azufre en el medio sobre el nivel intracelular de las isoenzimas con actividad OASTL de células de *M. braunii*. A extractos crudos de células cultivadas, sometidas a carencia de fuente de azufre durante 0 (○), 36 (●), 48 (△) y 60 (▲) h, se les sometió al mismo tratamiento que en la figura 28. Se recogieron fracciones de 1,5 ml y se midió la actividad OASTL.

3.3. Efecto de distintas condiciones ambientales y/o nutricionales sobre la inducción de la actividad OASTL

a) Efecto de la fuente de azufre en el medio de cultivo

En la Fig. 32 se puede observar que para concentraciones de sulfato entre 0,5 y 5 mM en el medio de cultivo, el nivel de actividad específica OASTL y clorofila en las células de *M. braunii* no evidencian cambios significativos. Por otra parte, la carencia de azufre en el medio de cultivo determina, como hemos citado anteriormente, un incremento de la actividad

enzimática hasta alcanzar valores de $9,3 \text{ U} \cdot \text{mg clorofila}^{-1}$, en tanto que la cantidad de clorofila permanece prácticamente constante a partir de las 12 h. Sin embargo este incremento de actividad OASTL necesita un tiempo de 12 h para comenzar, por lo que estimamos tiene que bajar la concentración intracelular de metabolitos azufrados para que se dispare el proceso.

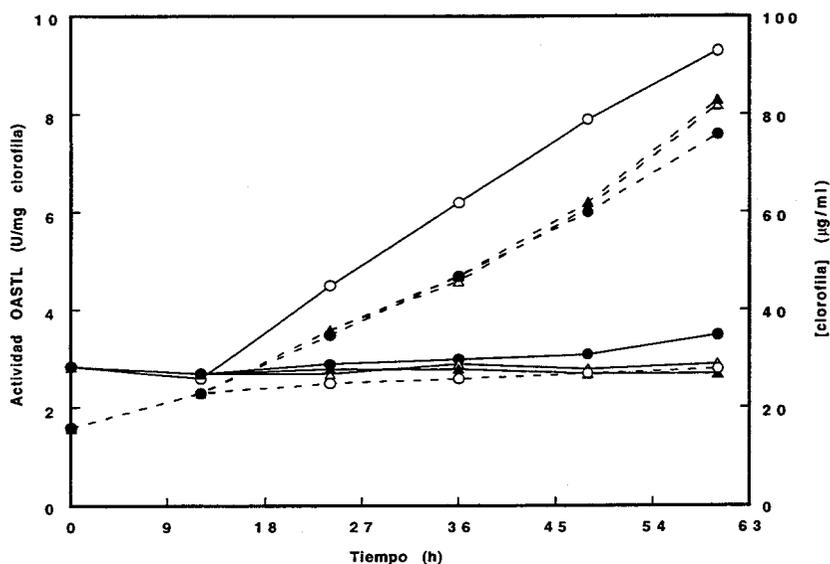


Fig. 32. Efecto de la concentración de sulfato en el medio de cultivo sobre la inducción de la actividad OASTL en células de *M. braunii*. Células cultivadas en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio fresco carente de azufre, a una concentración inicial de clorofila de $16 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. A tiempo 0 se añadió sulfato 0 (○), 0,5 (●), 1 (△) y 5 (▲) mM. Se midió la actividad OASTL (líneas continuas), en células permeabilizadas, y el contenido de clorofila (líneas punteadas).

En la Fig. 33 se observa que la adición de sulfito 1 mM al medio de cultivo, detiene casi inmediatamente la inducción de la actividad OASTL en *M. braunii* provocada por el hambre de azufre. No se evidencia una diferencia significativa entre la situación de adición de sulfato y la de sulfito, indicando esto que es probablemente la fuente de azufre la que revierte el

proceso y no se debe a un efecto específico de algún metabolito en concreto. Los niveles de actividad alcanzados tras las 24 h posteriores a la reposición son similares en ambos casos. Por otra parte, también se observa en la figura como se dispara la síntesis de clorofila al añadir la fuente de azufre.

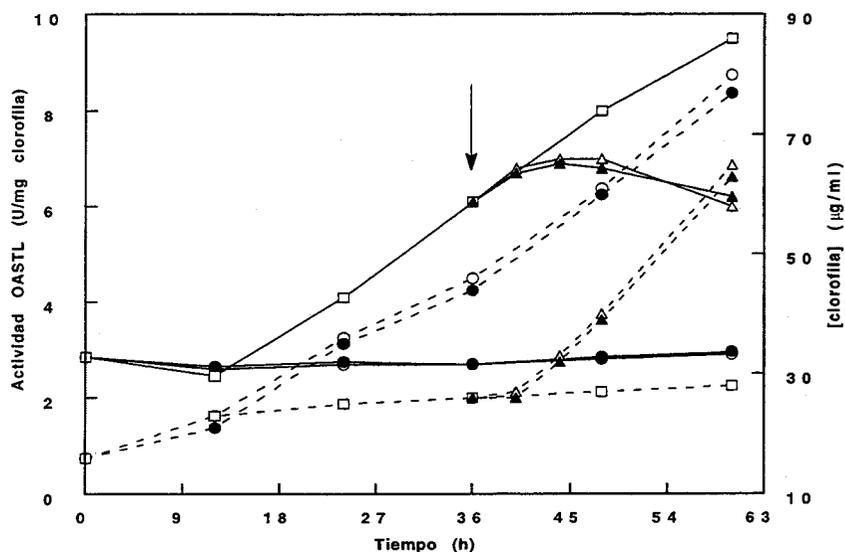


Fig. 33. Evolución de la actividad OASTL en células de *M. braunii* en función de la fuente de azufre del medio. Se crecieron células en presencia de sulfato (O) y sulfito (●) 1 mM y en ausencia de fuente de azufre (□). A estas últimas se les añadió sulfato (Δ) o sulfito (▲) 1 mM donde indica la flecha. A los tiempos indicados, se midió la actividad OASTL (líneas continuas), en células permeabilizadas, y el contenido de clorofila (líneas punteadas).

La adición de L-cisteína 1 mM al medio de cultivo evita y revierte el aumento de la actividad OASTL en células que experimentan carencia de azufre (Fig. 34). Se observa que el descenso de la actividad OASTL es más marcado si se utiliza L-cisteína en vez de sulfato. Los niveles de actividad OASTL, al cabo de 24 h posteriores a la reposición, se sitúan en valores de $4,5 \text{ U} \cdot \text{mg clorofila}^{-1}$, para el caso donde se repone L-cisteína, y de $5,8$

U.mg clorofila⁻¹, para el caso de sulfato. Al igual que hicieran otras fuentes de azufre, la L-cisteína también repone la síntesis de clorofila.

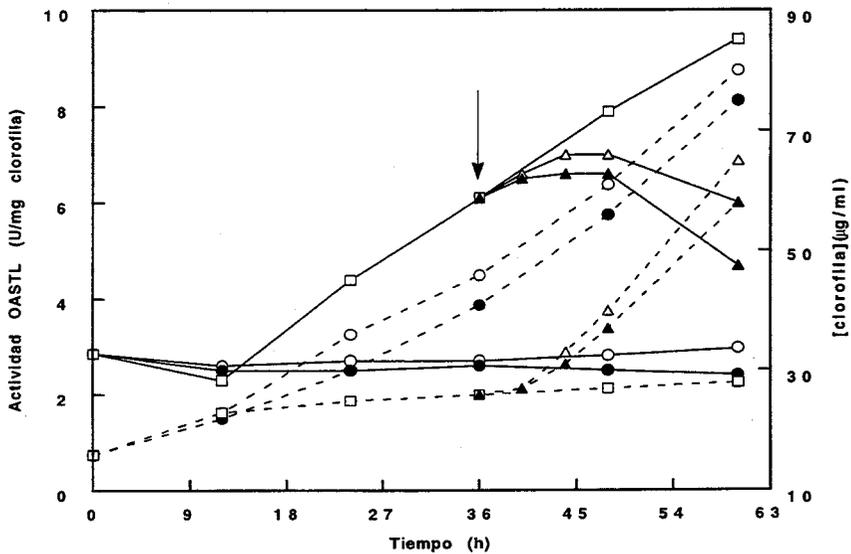


Fig. 34. Evolución de la actividad OASTL en células de *M. braunii* en función de la fuente de azufre del medio. Se crecieron células en presencia de sulfato (O) y cisteína (●) 1 mM y en ausencia de fuente de azufre (□). A estas últimas se les añadió sulfato (Δ) o cisteína (▲) 1 mM donde indica la flecha. A los tiempos indicados, se midió la actividad OASTL (líneas continuas), en células permeabilizadas, y el contenido de clorofila (líneas punteadas).

En la Fig. 35 se puede observar que la adición de L-metionina 1 mM al medio de cultivo determina la reversión de la situación de incremento de actividad OASTL en las células de *M. braunii* crecidas en carencia de azufre. El descenso de la actividad OASTL se evidencia a partir de las 4 h posteriores a la reposición en los cultivos donde se agregó L-metionina. En tanto que en los que se agregó sulfato, se manifiesta un descenso de la actividad enzimática a partir de las 8 h posteriores. Los niveles de actividad a

las 24 h de la adición, son análogas en las células que crecen en L-metionina ($5,5 \text{ U.mg clorofila}^{-1}$) en relación a las que lo hacen en sulfato ($5,8 \text{ U.mg clorofila}^{-1}$). Sin embargo, los niveles de clorofila alcanzados por ambas son significativamente distintos, $48 \mu\text{g clorofila.ml}^{-1}$ en las primeras y $65 \mu\text{g clorofila.ml}^{-1}$ en las últimas. En los testigos se observa un nivel de actividad análogo en las células que crecen continuamente con L-metionina ($2,9\text{-}3 \text{ U.mg clorofila}^{-1}$) en relación a las que crecen en sulfato ($2,8\text{-}2,9 \text{ U.mg clorofila}^{-1}$).

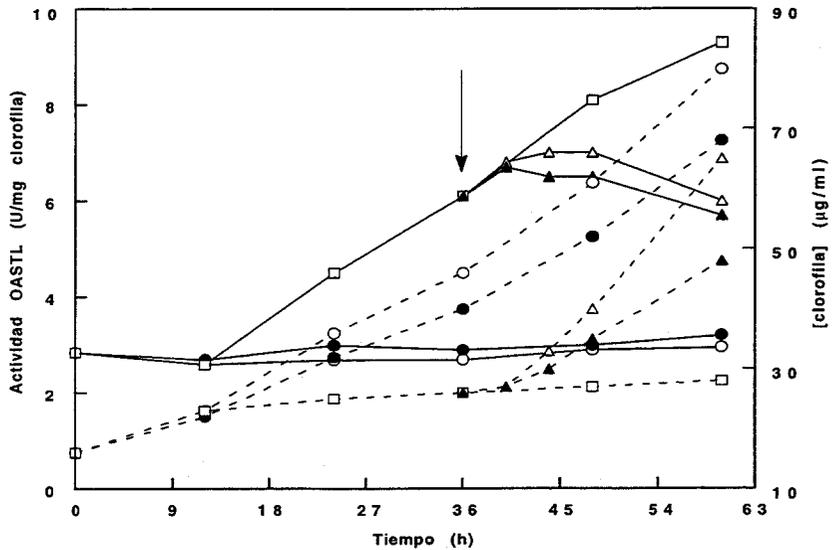


Fig. 35. Evolución de la actividad OASTL en células de *M. braunii* en función de la fuente de azufre del medio. Se crecieron células en presencia de sulfato (O) y metionina (●) 1 mM y en ausencia de fuente de azufre (□). A estas últimas se les añadió sulfato (Δ) o metionina (▲) 1 mM donde indica la flecha. A los tiempos indicados, se midió la actividad OASTL (líneas continuas), en células permeabilizadas, y el contenido de clorofila (líneas punteadas).

En la Fig. 36 se puede observar que la adición de glutatión al medio de cultivo revierte la inducción de la actividad OASTL en células carentes de azufre. Se manifiesta un brusco descenso de la actividad OASTL en las células a partir de las 4 h posteriores a la reposición, y tras 24 h su nivel es un 22% menor que en las células donde se ha repuesto sulfato. Además, se observan diferencias significativas en los niveles de clorofila alcanzados tras 24 h posteriores a la reposición de las fuentes de azufre. En los cultivos testigo también se observa que la síntesis de clorofila es algo menor en los crecidos con glutatión que en los crecidos con sulfato.

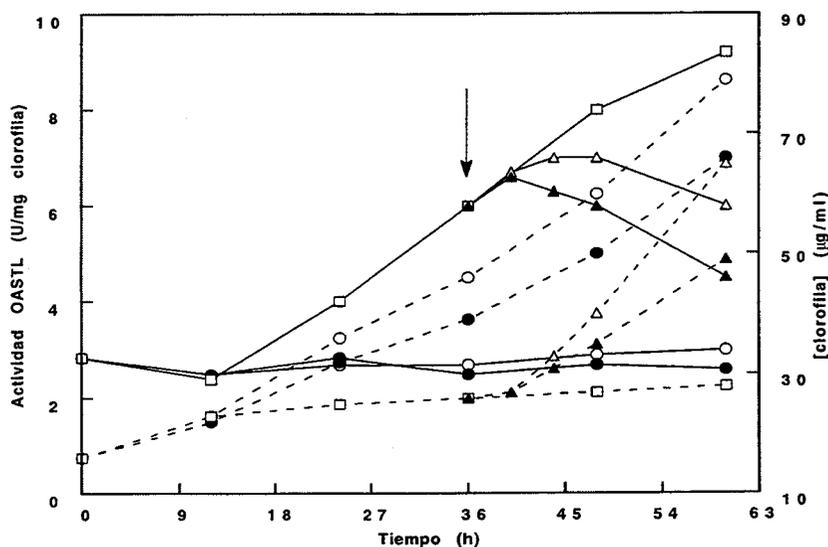


Fig. 36. Evolución de la actividad OASTL en células de *M. braunii* en función de la fuente de azufre del medio. Se crecieron células en presencia de sulfato (O) y glutatión (●) 1 mM y en ausencia de fuente de azufre (□). A estas últimas se les añadió sulfato (Δ) o glutatión (▲) 1 mM donde indica la flecha. A los tiempos indicados, se midió la actividad OASTL (líneas continuas), en células permeabilizadas, y el contenido de clorofila (líneas punteadas).

b) Actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en células sometidas a carencia de nitrógeno y azufre

En la Fig. 37 podemos observar que la actividad OASTL en células sometidas a carencia de nitrógeno y azufre disminuye en las primeras 36 horas. Además, se evidencia una disminución de la actividad fotosintética, las células se muestran cloróticas y se manifiesta un descenso en el nivel de clorofila (datos no mostrados). La adición de nitrato 10 mM al medio de cultivo determina un brusco aumento de la actividad OASTL y la actividad fotosintética con máximos a las 12 y 6 horas, respectivamente. Se produce un aumento de la cantidad de clorofila hasta alcanzar niveles de 20 μg clorofila. ml^{-1} (datos no mostrados) 48 horas después de la reposición se observa que la actividad OASTL ha disminuído hasta un nivel próximo al del testigo (1,9 U. mg clorofila $^{-1}$), en tanto que la actividad fotosintética es de 80 μmoles O_2 . mg clorofila $^{-1}$. h^{-1} , muy por debajo del testigo (105 μmoles O_2 . mg clorofila $^{-1}$. h^{-1}).

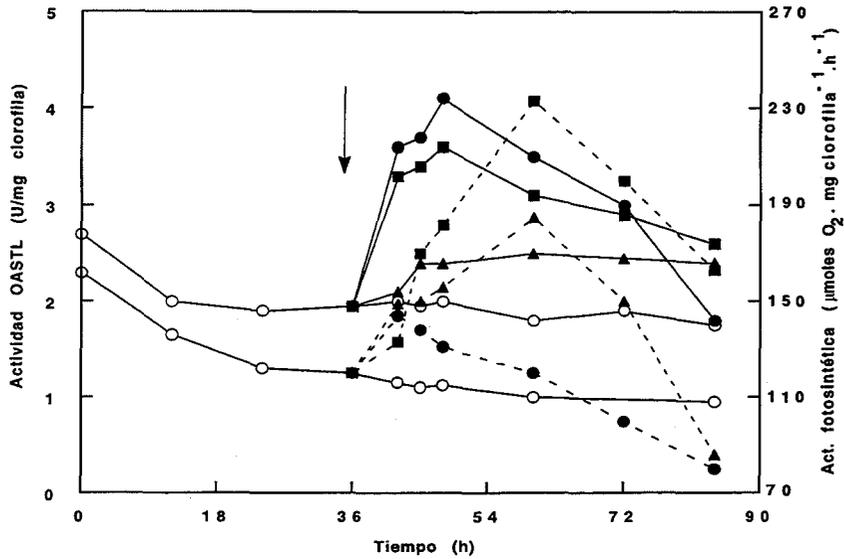


Fig. 37. Actividad OASTL en células de *M. braunii* sometidas a carencia de nitrógeno y azufre. Células cultivadas en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos con nitrato 10 mM y sulfato 1 mM, se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio fresco carente de nitrógeno y azufre, a una concentración inicial de clorofila de $16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y en las condiciones descritas. La flecha indica el punto de transición desde la situación de carencia (O) a la reposición de sulfato (▲), nitrato (●) o de ambos (■) a la vez. Se midieron actividad OASTL (líneas continuas), en células permeabilizadas, y la actividad fotosintética (líneas punteadas).

Con la adición de sulfato 1 mM al medio de cultivo, se puede observar un ligero aumento de la actividad OASTL a partir de las 9 h posteriores a la reposición. La actividad fotosintética aumenta hasta alcanzar un pico a las 24 h, disminuyendo luego hasta un valor de $82 \mu\text{moles O}_2\cdot\text{mg clorofila}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ a las 48 h. Se observó que las células mantenían su estado clorótico y no se detectaron incrementos de la cantidad de clorofila (datos no mostrados).

La adición simultánea de nitrato 10 mM y sulfato 1 mM al medio de cultivo ocasiona un aumento de la actividad OASTL en las células, alcanzando un pico a las 12 h posteriores a la reposición, y es inferior al nivel de actividad que muestran células a las que sólo se les repuso la fuente nitrogenada. La actividad fotosintética muestra un pico a las 24 h, a partir del cual revierte su tendencia hasta alcanzar valores de $165 \mu\text{moles O}_2 \cdot \text{mg clorofila}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, superiores a los del testigo.

c) Efecto del CO₂

La presencia de CO₂ es necesaria para que se produzca la inducción de la actividad OASTL en un cultivo carente de fuente de azufre. Análogamente ocurre cuando se quita el CO₂ de un cultivo de *M. braunii* que lleva ya 24 h en hambre de azufre y el proceso inductivo de la actividad OASTL ya estaba en marcha (Fig. 38). Las células testigos que se encuentran en condiciones de carencia de fuente de azufre y de carbono, evidencian una disminución de la actividad OASTL, a través del tiempo. En tanto que, a partir de las 12 h de iniciado el experimento, las células no experimentan cambios en la cantidad de clorofila.

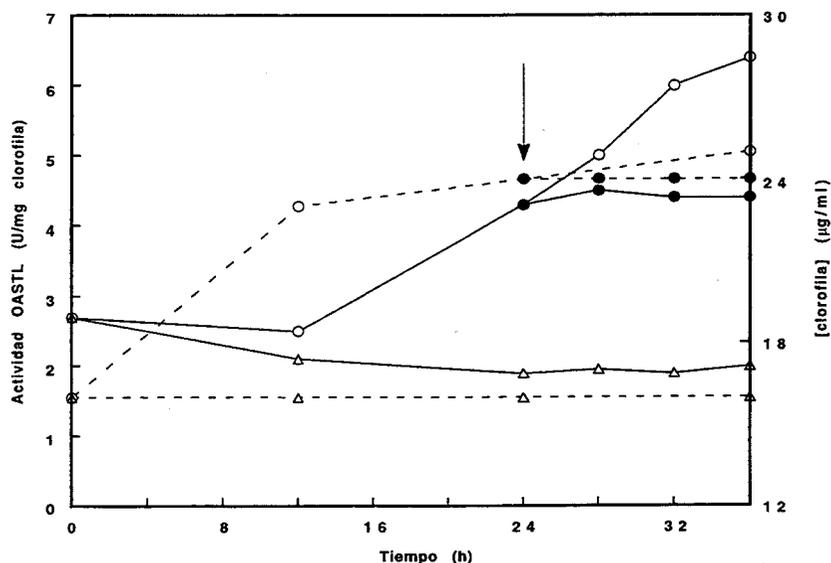


Fig. 38. Efecto del CO₂ sobre la inducción de la actividad OASTL en células de *M. braunii* carentes de fuente de azufre. Células cultivadas en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos con sulfato 1 mM, se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio fresco carente de azufre, a una concentración inicial de clorofila de 16 µg.ml⁻¹, en presencia (O) o ausencia (Δ) de un 5 % (v/v) de CO₂. La flecha indica la transición de las células crecidas con CO₂ a crecimiento sin fuente de carbono (●). A los tiempos señalados, se midió la actividad OASTL (líneas continuas), en células permeabilizadas, y el contenido en clorofila (líneas punteadas).

d) Efecto de la luz

En la Fig. 39 podemos observar que a partir del momento que las células carentes de fuente de azufre se someten a condiciones de oscuridad, se revierte la inducción de la actividad OASTL. Se trata de un comportamiento muy paralelo al observado con el caso del CO₂ por lo que el efecto que aquí observamos pudiera ser un efecto indirecto provocado por la disponibilidad de la fuente de carbono.

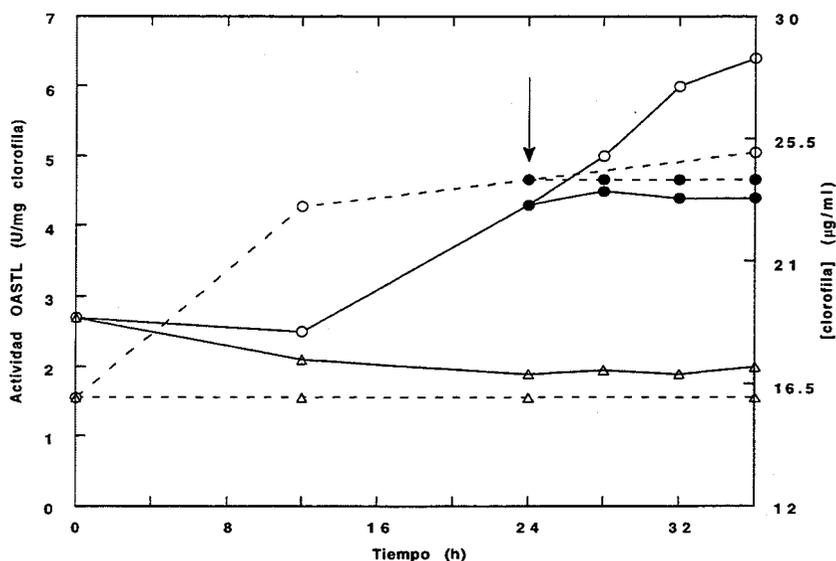


Fig. 39. Efecto de la luz sobre la inducción de la actividad OASTL en células de *M. braunii* carentes de fuente de azufre. Células cultivadas en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos con sulfato 1 mM, se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio fresco carente de azufre, a una concentración inicial de clorofila de $16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, en presencia (O) o ausencia (Δ) de luz. La flecha indica la transición de las células crecidas con luz a crecimiento en oscuridad (●). A los tiempos señalados, se midió la actividad OASTL (líneas continuas), en células permeabilizadas, y el contenido en clorofila (líneas punteadas).

e) Efecto de antibióticos

La adición del antibiótico cloranfenicol a la concentración indicada afecta significativamente a la velocidad de expresión de la actividad OASTL, si bien no llega a evitar completamente la inducción en las células carentes de azufre. En la Fig. 40 se puede observar que tras la adición del antibiótico continúa el incremento del nivel de actividad OASTL en las células; sin embargo, al cabo de 24 h el nivel alcanzado es inferior al del testigo (-S). Además, se pone en evidencia que la reposición de la fuente de azufre y la

adición de cloranfenicol determinan una reversión del fenómeno de inducción de la actividad, y se observa, al cabo de 24 h, un aumento del contenido de clorofila en las células.

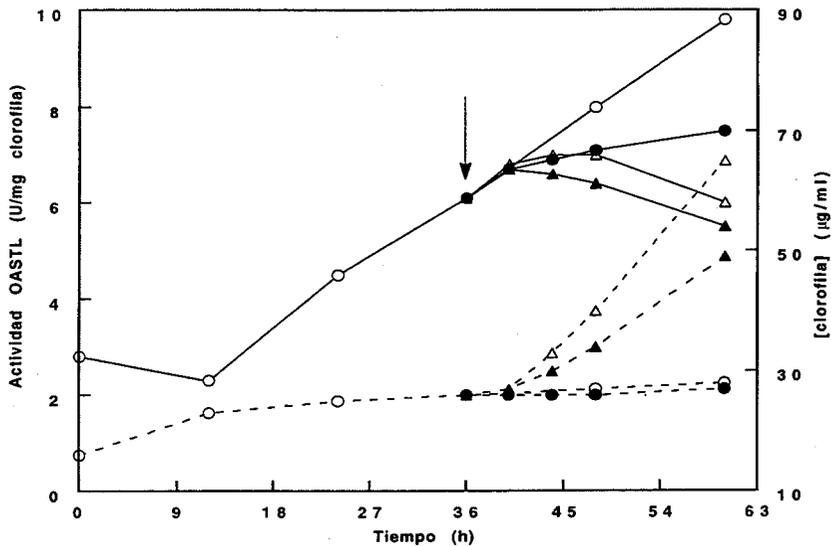


Fig. 40. Efecto del antibiótico cloranfenicol sobre la inducción de la actividad OASTL en células de *M. braunii* carentes de fuente de azufre. Células cultivadas en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio fresco carente de azufre, a una concentración inicial de clorofila de $16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (○). Donde se indica, se añadió cloranfenicol (●), sulfato (Δ) o ambos (▲). La concentración de cloranfenicol fue de $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y la de sulfato 1 mM. A los tiempos indicados, se midió la actividad OASTL (líneas continuas), en células permeabilizadas, y el contenido de clorofila (líneas punteadas).

En la Fig. 41 se puede observar que la adición de cicloheximida a la concentración indicada, evita la inducción de la actividad OASTL en células carentes de azufre. La incorporación de sulfato al medio de cultivo o la adición de cicloheximida, muestran los mismos efectos que la sola adición de

cicloheximida. La inhibición de la síntesis de clorofila es total por parte de este antibiótico.

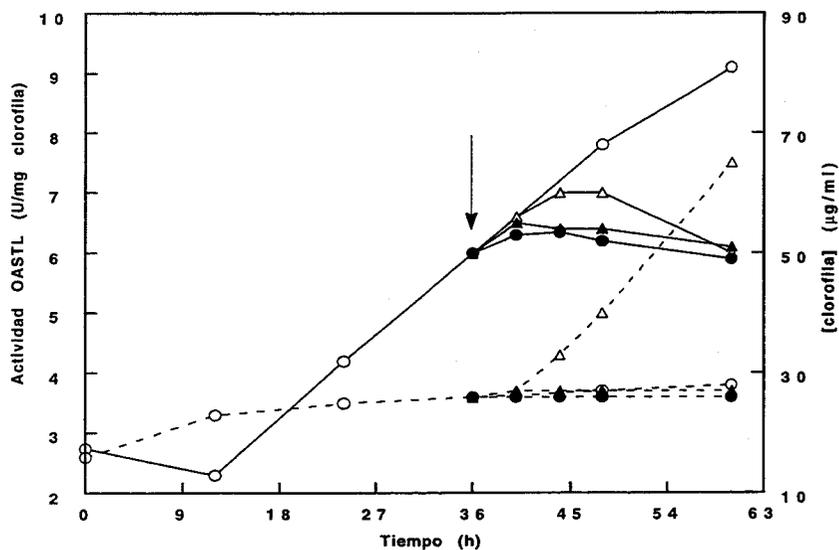


Fig. 41. Efecto del antibiótico cicloheximida sobre la inducción de la actividad OASTL en células de *M. braunii* carentes de fuente de azufre. Células cultivadas en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio fresco carente de azufre, a una concentración inicial de clorofila de $16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (○). Donde se indica, se añadió cicloheximida (●), sulfato (Δ) o ambos (▲). La concentración de cicloheximida fue de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y la de sulfato 1 mM. A los tiempos indicados, se midió la actividad OASTL (líneas continuas), en células permeabilizadas, y el contenido de clorofila (líneas punteadas).

La adición simultánea de cicloheximida y cloranfenicol a las concentraciones indicadas, a cultivos de células carentes de azufre, evita la inducción de la actividad OASTL (Fig. 42).

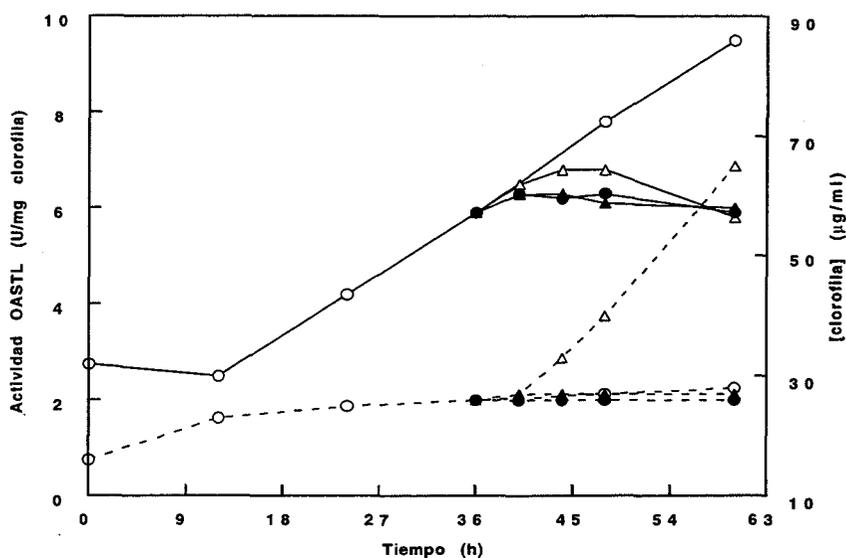


Fig. 42. Efecto de los antibióticos cicloheximida y cloranfenicol sobre la inducción de la actividad OASTL en células de *M. braunii* carentes de fuente de azufre. Células cultivadas en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos, se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio fresco carente de azufre, a una concentración inicial de clorofila de $16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (○). Donde se indica, se añadió cloranfenicol y cicloheximida (●), sulfato (Δ) o sulfato, cloranfenicol y cicloheximida (▲). La concentración de cloranfenicol fue de $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, la de cicloheximida $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y la de sulfato 1 mM . A los tiempos indicados, se midió la actividad OASTL (líneas continuas), en células permeabilizadas, y el contenido de clorofila (líneas punteadas).

3.4. Evolución de la actividad OASTL en cultivos sincrónicos

a) Efecto del antibiótico cloranfenicol sobre la evolución de la actividad OASTL

En la Fig. 43 se puede observar que los cultivos que crecen en presencia de cloranfenicol a la concentración indicada, muestran un aumento

de la actividad OASTL durante el período de luz hasta alcanzar un valor máximo de $33 \text{ mU}\cdot\text{ml}^{-1}$. En el período de oscuridad se observa un descenso de la actividad OASTL hasta alcanzar un valor de $29 \text{ mU}\cdot\text{ml}^{-1}$ en el inicio de la fase luminosa subsiguiente. Se evidencia un aumento de clorofila durante el período luminoso, aunque los incrementos son inferiores a los del control. Durante la fase oscura no hay variación en la cantidad de clorofila. En este estudio el cloranfenicol muestra una ligera inhibición de la expresión de la actividad OASTL.

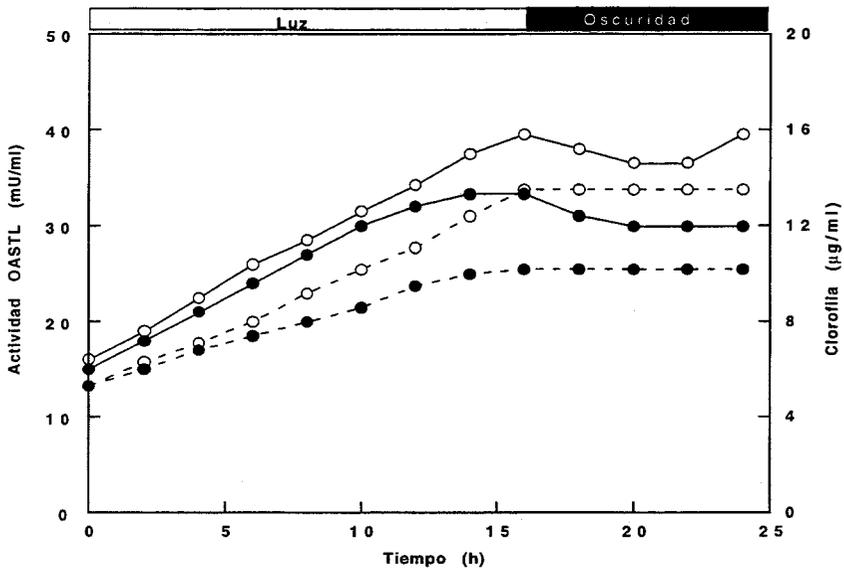


Fig. 43. Efecto del cloranfenicol en la evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii*. Las células crecían en frascos de Roux bajo un régimen de luz-oscuridad de 16h/8h. La temperatura de crecimiento fue de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la intensidad de luz de $30 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$. Se adicionó cloranfenicol ($200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (●), 10 min antes del inicio del período de luz, y se tomaron muestras cada 2 h. Se determinó la cantidad de clorofila (líneas punteadas) y la actividad OASTL (líneas continuas) en células permeabilizadas. (O) es el control sin antibiótico.

En la Fig. 44 se muestra el efecto del antibiótico cuando se aplica a las 12 h de iniciado el período luminoso. Se observa en este caso una mayor inhibición por parte del cloranfenicol ya que en el período de luz subsiguiente hay un aumento leve de la actividad OASTL y de la cantidad de clorofila. Se evidencia durante la fase de oscuridad una inhibición de la división celular (datos no mostrados).

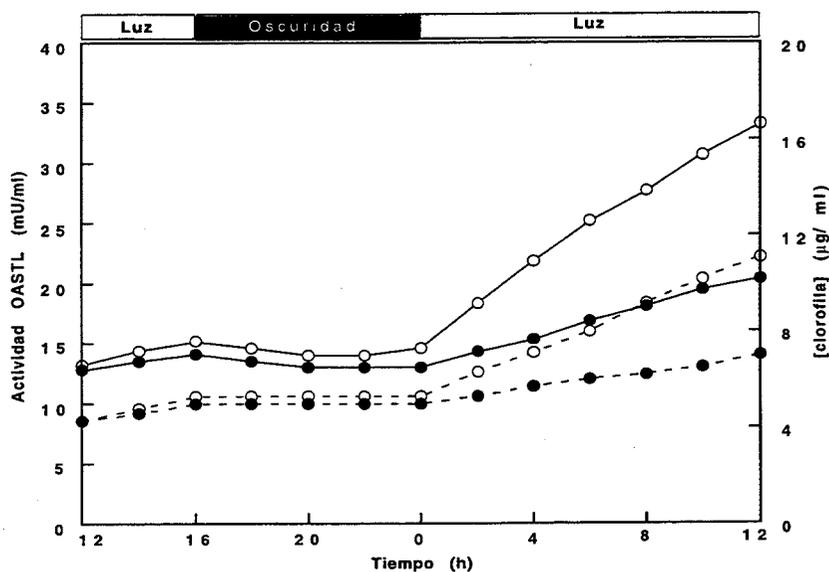


Fig. 44. Evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii* tratados con cloranfenicol. Las células crecían en frascos de Roux bajo un régimen de luz-oscuridad de 16h/8h. La temperatura de crecimiento fue de 25 °C y la intensidad de luz de 30 W.m⁻². A las 12 h se adicionó cloranfenicol (200 µg.ml⁻¹) (●) y se tomaron muestras cada 2 h. Se determinó la cantidad de clorofila (líneas punteadas) y la actividad OASTL (líneas continuas) en células permeabilizadas. (O) es un control sin antibiótico.

b) Efecto del antibiótico cicloheximida sobre la evolución de la actividad OASTL en cultivos sincrónicos

La actividad OASTL se estabiliza a partir de la octava hora de luz en 20 mU.ml⁻¹. Se observa también en la Fig. 45 un descenso en el período oscuro hasta un valor de 17 mU.ml⁻¹. La cantidad de clorofila alcanza su nivel máximo a las 8 h con 6,6 µg.ml⁻¹. Se observa una inhibición de la división celular durante la fase oscura (datos no mostrados).

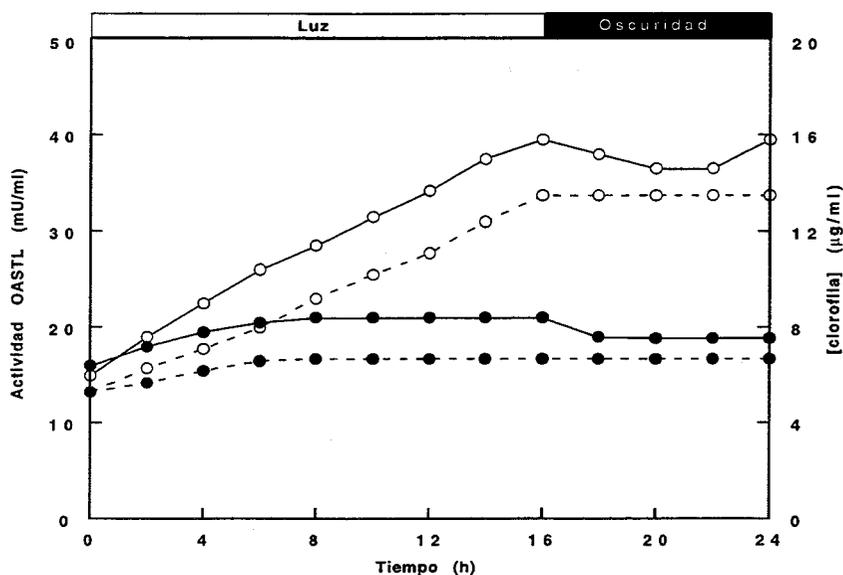


Fig. 45. Efecto de la cicloheximida en la evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii*. Las células crecían en frascos de Roux bajo un régimen de luz-oscuridad de 16h/8h. La temperatura de crecimiento fue de 25 °C y la intensidad de luz de 30 W.m⁻². Se adicionó cicloheximida (1 µg.ml⁻¹) (●), 10 min antes del inicio del período de luz, y se tomaron muestras cada 2 h. Se determinó la cantidad de clorofila (líneas punteadas) y la actividad OASTL (líneas continuas) en células permeabilizadas. (○) es el control sin antibiótico.

En la Fig. 46 se muestra que tras la adición del antibiótico 12 h después de iniciada la fase luminosa, no hay aumento de la actividad OASTL ni de la cantidad de clorofila. Se evidencia una inhibición de la división celular durante la fase de oscuridad.

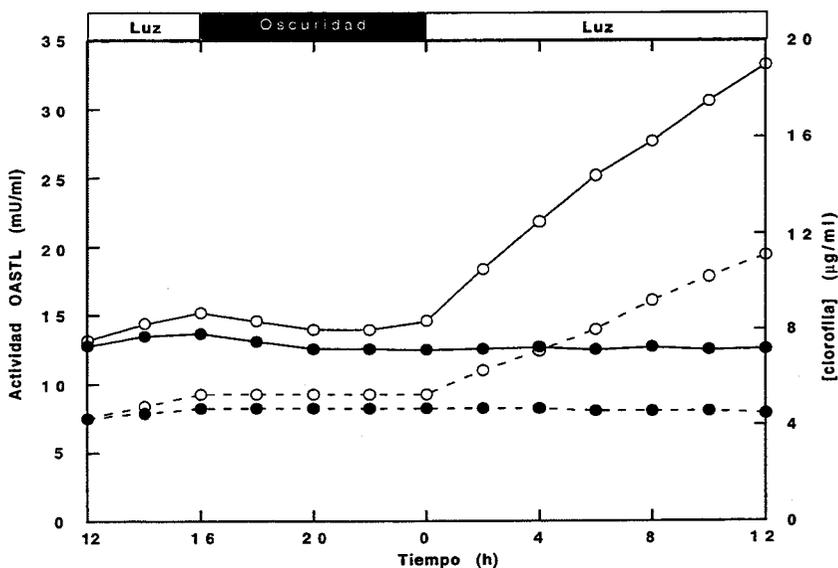


Fig. 46. Evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii*. Las células crecían en frascos de Roux bajo un régimen de luz-oscuridad de 16h/8h. La temperatura de crecimiento fue de 25 °C y la intensidad de luz de 30 W.m⁻². A las 12 h se adicionó cicloheximida (1 µg.ml⁻¹) (●) y se tomaron muestras cada 2 h. Se determinó la cantidad de clorofila (líneas punteadas) y la actividad OASTL (líneas continuas) en células permeabilizadas. (○) es un control sin antibiótico.

c) Efecto de los antibióticos cicloheximida y cloramfenicol sobre la evolución de la actividad OASTL en cultivos sincrónicos

Se observa que prácticamente no hay alteración en los valores de actividad OASTL durante todo el ciclo (Fig. 47). Asimismo, no se evidencia

aumentos en la cantidad de clorofila. No hay división celular (datos no mostrados).

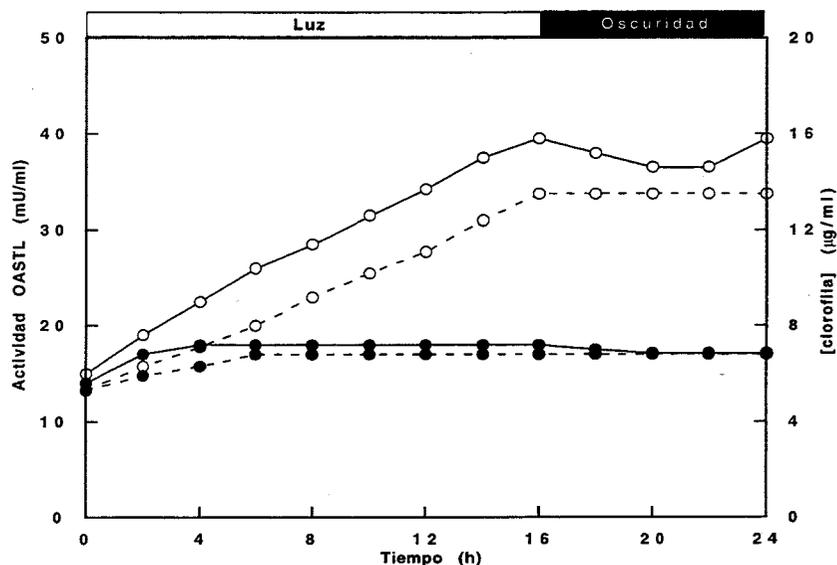


Fig. 47. Efecto de antibióticos en la evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii*. Las células crecían en frascos de Roux bajo un régimen de luz-oscuridad de 16h/8h. La temperatura de crecimiento fue de 25 °C y la intensidad de luz de 30 W.m⁻². Se adicionó cloranfenicol (200 µg.ml⁻¹) y cicloheximida (1 µg.ml⁻¹) (●), 10 min antes del inicio del período de luz, y se tomaron muestras cada 2 h. Se determinó la cantidad de clorofila (líneas punteadas) y la actividad OASTL (líneas continuas) en células permeabilizadas. (O) es el control sin antibiótico.

En la Fig. 48 se observa el efecto de la adición de los antibióticos a las 12 h de iniciado el período de luz. La actividad OASTL no sufre prácticamente variación y lo mismo ocurre con la cantidad de clorofila. No tiene lugar la división de las células.

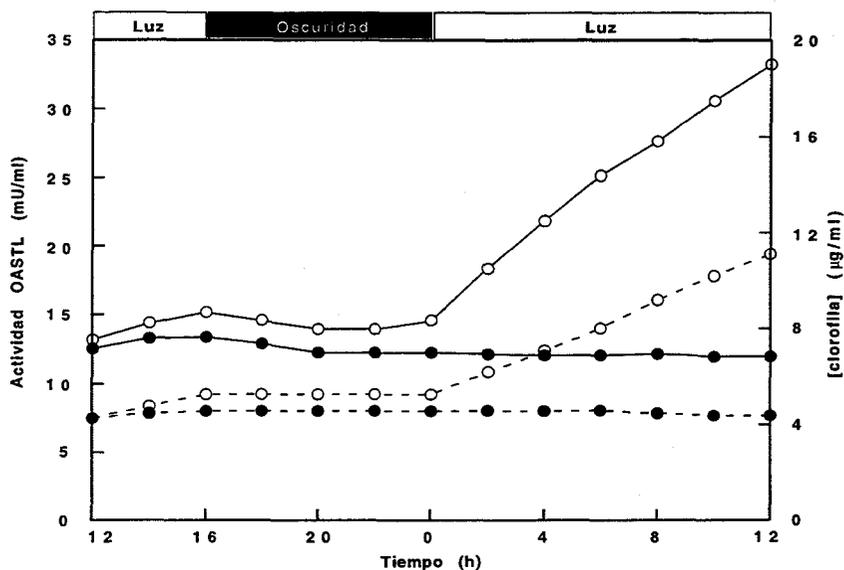


Fig. 48. Evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii* tratados con antibióticos. Las células crecían en frascos de Roux bajo un régimen de luz-oscuridad de 16h/8h. La temperatura de crecimiento fue de 25 °C y la intensidad de luz de 30 W.m⁻². A las 12 h se adicionó cloranfenicol (200 µg.ml⁻¹) y cicloheximida (1 µg.ml⁻¹) (●) y se tomaron muestras cada 2 h. Se determinó la cantidad de clorofila (líneas punteadas) y la actividad OASTL (líneas continuas) en células permeabilizadas. (O) es un control sin antibiótico.

d) Efecto del herbicida paraquat sobre la evolución de la actividad OASTL en cultivos sincrónicos

La actividad OASTL aumenta durante el período de luz tras la adición de paraquat a la concentración indicada (Fig. 49). El máximo valor se alcanza al inicio de la fase oscura con 30 mU.ml⁻¹, un 33 % inferior al control. Se observa un descenso de la actividad durante la fase oscura. La

clorofila aumenta en la fase luminosa hasta alcanzar un valor máximo de $12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, un 12 % inferior al control; estabilizándose en la fase oscura.

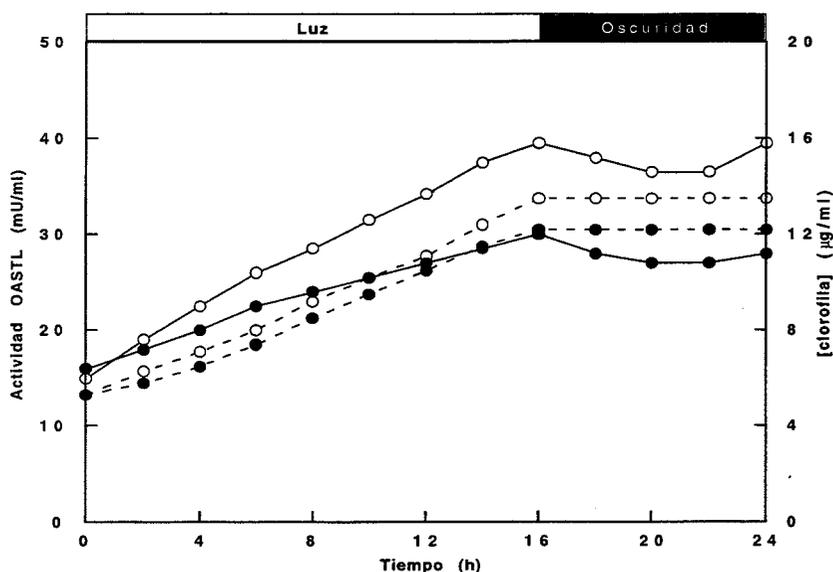


Fig. 49. Efecto del paraquat en la evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii*. Las células crecían en frascos de Roux bajo un régimen de luz-oscuridad de 16h/8h. La temperatura de crecimiento fue de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la intensidad de luz de $30\text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$. Se adicionó paraquat ($10\text{ }\mu\text{M}$) (●), 10 min antes del inicio del período de luz, y se tomaron muestras cada 2 h. Se determinó la cantidad de clorofila (líneas punteadas) y la actividad OASTL (líneas continuas) en células permeabilizadas. (O) es el control sin antibiótico.

En la Fig. 50 se muestra el efecto causado por el herbicida tras ser aplicado a las 12 h de iniciado el período de luz. Se observa que hay un aumento de la actividad OASTL durante el período luminoso subsiguiente y el valor máximo alcanzado es un 40% inferior al del control. La cantidad de clorofila aumenta también en la fase de luz.

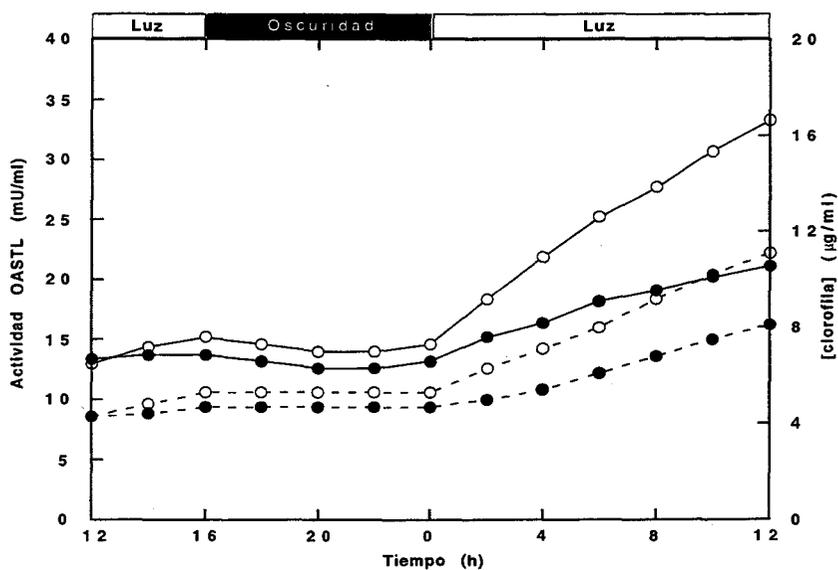


Fig. 50. Evolución de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en cultivos sincrónicos de *M. braunii* tratada con paraquat. Las células crecían en frascos de Roux bajo un régimen de luz-oscuridad de 16h/8h. La temperatura de crecimiento fue de 25 °C y la intensidad de luz de 30 W.m⁻². A las 12 h se adicionó paraquat (10 µM) (●) y se tomaron muestras cada 2 h. Se determinó la cantidad de clorofila (líneas punteadas) y la actividad OASTL (líneas continuas) en células permeabilizadas. (O) es un control sin antibiótico.

IV. DISCUSION

1. El consumo de sulfato en *M.braunii*

El sulfato inorgánico es una fuente comúnmente encontrada en medios terrestres y acuosos, que puede ser utilizada como fuente de azufre por plantas y microorganismos. La primera etapa en su utilización implica su transporte al interior celular. El transporte de sulfato ocurre en procariotas por la actividad de un sistema específico (Ames, 1986).

Los estudios realizados en *M. braunii* ponen de manifiesto que el consumo de sulfato es un proceso que tiene lugar bajo condiciones de luz siendo prácticamente despreciable en oscuridad. Esto podría sugerir que la fotofosforilación puede estar proporcionando la energía necesaria para el proceso de transporte. Este fenómeno se ha observado en distintas cepas del alga eucariótica *C. reinhardtii* (Pérez-Castiñeira *et al.*, 1992; Yildiz *et al.*, 1994), así como otros organismos procarióticos y eucarióticos (Roomans *et al.*, 1979; Smith, 1976).

El consumo de sulfato en *M. braunii* tiene características consistentes con la existencia de sitios de unión específicos para este anión en la membrana plasmática de dicho organismo. Dichos sitios pueden discriminar entre aniones tipo XO_4^{2-} según su tamaño. Estos resultados son similares a los obtenidos para otros organismos como *Chlorella fusca* y *C. reinhardtii* (Biedlingmaier and Schmidt, 1989; Pérez-Castiñeira *et al.*, 1992).

Existen dos mecanismos reguladores del consumo de sulfato: a) en bacterias se señala a la L-cisteína como una señal reguladora de retroalimentación que controla la entrada de sulfato al interior de la célula, por lo cual se sugiere que la molécula de L-cisteína *per se* o un metabolito estrechamente relacionado serían las posibles señales regulatorias; b) en algas

verdes y cianobacterias se sugiere que el tamaño del *pool* de sulfato determina el consumo del anión. Además, en plantas superiores se muestran evidencias que coinciden con lo expresado en último lugar (Schmidt y Jäger, 1992).

También se observó una rápida entrada de sulfato en células de *M. braunii* incubadas previamente y durante distintos períodos de tiempo en medio de cultivo carente de azufre. La velocidad inicial de entrada de sulfato en las células era dependiente del tiempo de preincubación en medio sin azufre. Este efecto ha sido observado en otros organismos asimiladores de sulfato y probablemente indica un mecanismo de regulación (Biedlingmaier y Schmidt, 1989; Green y Grossman, 1988; Pérez-Castiñeira *et al.*, 1992). Las variaciones en la velocidad inicial de entrada de sulfato en células preincubadas en medio carente de éste parecen ser demasiado rápidas para ser atribuidas a un control a nivel genético, habiéndose propuesto la hipótesis de que es un efector formado durante la asimilación del sulfato, que aparece en presencia de éste y desaparece en su ausencia, el que controla la velocidad de consumo (Vallée y Jeanjean, 1968). Sin embargo, Yildiz *et al.* (1994) han mostrado síntesis *de novo* de proteína en la membrana plasmática de *C. reinhardtii* en condiciones de hambre de azufre. En este trabajo se sugiere que *C. reinhardtii* dispone de un solo sistema de transporte de sulfato en condiciones normales de crecimiento, sintetizando otro sistema de alta afinidad en ausencia de dicho anión. Los trabajos de Pérez-Castiñeira *et al.* (1997) muestran sin embargo que el sistema de alta afinidad está también presente en condiciones normales, si bien se induciría cuando las células se someten a hambre de fuente de azufre.

En *C. fusca*, la carencia de sulfato altera de afinidad aparente de las células por sulfato (Biedlingmaier y Schmidt, 1989) mientras que en *A. nidulans* sólo se alteran los valores de V_{max} (Green y Grossman, 1988). Nuestra aproximación experimental hacía muy difícil la determinación de

velocidades iniciales de consumo muy elevadas, por lo que no se efectuaron estudios cinéticos en condiciones de hambre de azufre.

El consumo de sulfato en *M. braunii* resultó ser un proceso monofásico, lo cual difiere significativamente de los resultados obtenidos para una gran cantidad de organismos eucarióticos donde se han visto cinéticas multifásicas, por ejemplo, en *S. cerevisiae* (Breton y Surdin-Kerjan, 1977), *C. fusca* (Biedlingmaier and Schmidt, 1989), plantas superiores (Nissen y Nissen, 1983) y *C. reinhardtii* (Pérez-Castiñeira *et al.*, 1992); si bien, en este último caso se ha sugerido también la existencia de una cinética de consumo monofásica (Yildiz *et al.*, 1994).

Nuestros resultados indican que las células de *M. braunii* muestran un único valor de K_m 1 mM, que resulta ser del mismo orden de magnitud que el de uno de los valores de K_m encontrados para *C. reinhardtii* (Pérez-Castiñeira *et al.*, 1992) y *C. fusca* (Biedlingmaier y Schmidt, 1989). El valor de la K_m de *M. braunii* resulta ser también muy similar al encontrado para la cianobacteria *A. nidulans* (Green y Grossman, 1988), este dato, junto con el hecho de que la cinética de este organismo es también monofásica, sugeriría que ambos organismos podrían tener sistemas de transporte de sulfato similares.

Las cinéticas multifásicas, habituales en organismos eucariotas (ver arriba), pueden ser explicadas por modelos que consideran el transporte del sulfato como un proceso mediado por una permeasa acoplada a un gradiente de protones producido por una ATPasa de la membrana plasmática (Sanders, 1990). De hecho, se ha comprobado en varios organismos eucarióticos que el transporte de sulfato al interior celular es realmente un co-transporte H^+/SO_4^{2-} (Roomans *et al.*, 1979; Lass y Ullrich-Eberius, 1984; Hawkesford *et al.*, 1993).

Por el contrario, las cinéticas monofásicas, propias de procariotas, son características de transportadores periplásmicos (Ferro-Luzzi Ames y

Joshi, 1990; Laudenbach y Grossman, 1991). Las permeasas de *Salmonella typhimurium* y *E.Coli* son muy similares y están constituídas por tres componentes intrínsecos de la membrana citoplásmica y una proteína de unión específica para el sulfato, localizada en el espacio periplásmico (Ames, 1986; Kredich, 1987). De los polipéptidos localizados en la membrana, dos de ellos conformarían el canal de entrada y el tercero hidroliza el ATP necesario para acumular el sulfato en contra de gradiente en el interior celular (Ames *et al.*, 1989)

M. braunii sería por tanto un organismo eucariótico que dispondría en su membrana plasmática de un sistema de transporte de sulfato característico de procariotas. Otra interpretación de este resultado podría ser que el consumo de sulfato en *M. braunii* está determinado por el transporte de sulfato al interior del cloroplasto, donde sí se ha postulado la existencia de sistemas de transporte de tipo cianobacteriano (Laudenbach y Grossman, 1991).

2. Purificación y caracterización de tres isoenzimas con actividad OASTL de *M. braunii*

Se detectó actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en células permeabilizadas y extractos crudos de *M. braunii*, dicha actividad resultó ser absolutamente dependiente de la presencia de los dos sustratos (sulfuro y OAS) en el medio de ensayo y no se alteró por la presencia de tioles (DTE) o del co-factor de la enzima, piridoxal-5'-fosfato. Por el contrario, la presencia de PLP en los tampones utilizados durante la purificación resultó ser esencial para mantener la actividad enzimática durante todo el proceso. Este resultado se ha observado para otros organismos y podría sugerir que el PLP puede estar unido a la apoenzima de forma lábil (Bertagnolli y Wedding, 1977).

El PLP se presume que está unido a un residuo de lisina en la isoenzima A de *E. coli* (Levy y Danchin, 1988; Rolland *et al.*, 1993a), que parece conservarse en otras OASTL caracterizadas (Rolland *et al.*, 1993b; Sirko *et al.*, 1990; Byrne *et al.*, 1988) y, además, se ha sugerido que podría estar conservado en otras enzimas dependientes de piridoxal fosfato como la treonina sintasa, la treonina dehidratasa, la serina dehidratasa y la triptófano sintasa (Parsot, 1986; Kielland-Brandt *et al.*, 1984; Schiltz y Schmidt, 1981; Yanofsky *et al.*, 1981; Burns y Yanofsky, 1989; Rolland *et al.*, 1993b).

A partir de extractos crudos de *M. braunii* se han podido separar y purificar parcialmente tres isoenzimas con actividad OASTL. Se ha descrito para otros organismos que el tratamiento con calor no sólo es efectivo para la purificación de la enzima sino también para su estabilización (Masada *et al.*, 1975), siendo un procedimiento bastante utilizado para la purificación de este tipo de proteínas (Murakoshi *et al.*, 1985; Ikegami *et al.*, 1987; 1988a; 1988b). En la separación y purificación de isoenzimas con actividad OASTL en *M. braunii*, se observa un incremento de la actividad específica, tras un tratamiento térmico a 55 °C.

La presencia de isoenzimas de OASTL ha sido observada en bacterias, cianobacterias, algas verdes y plantas superiores (Kredich, 1987; Prieto *et al.*, 1997; Schmidt y Jäger, 1992). No se sabe con exactitud el significado fisiológico de la presencia de isoformas con actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa, si bien se ha especulado acerca de la imposibilidad de transportar L-cisteína entre los distintos compartimentos celulares y de ahí la necesidad de disponer de isoenzimas OASTL en cloroplasto, mitocondria y citosol (Lunn *et al.*, 1990).

Las tres isoformas de OASTL de *M. braunii* presentaron pesos moleculares de 49,5 kDa para la isoenzima A y de 54 kDa para B y C. Los pesos moleculares descritos para las isoenzimas OASTL de otros organismos varían ampliamente, así, en la crucífera *Brassica juncea* se purificó una

enzima con actividad OASTL con un peso molecular de 52 kDa (Ikegami *et al.*, 1988b), mientras que en *S. typhimurium* las isoenzimas A y B tienen una masa molecular de 68,9 y 64 kDa, respectivamente (Byrne *et al.*, 1988; Tai *et al.*, 1993; Schnackerz y Cook, 1995).

En *S. typhimurium*, las proteínas con actividad OASTL se pueden encontrar en forma libre o asociadas a la serina-acetil transferasa, formando un complejo multienzimático de 309 kDa, donde participan dos moléculas de O-acetil-L-serina(tiol)liasa y una de serina-acetil transferasa (Kredich y Tomkins, 1966; Becker *et al.*, 1969; Kredich *et al.*, 1969). Droux y colaboradores (1992) observaron que entre 3 y 5% de la actividad OASTL en cloroplastos de *Spinacia oleracea* está asociada a un complejo de 310 kDa y además contiene actividad serina-acetil transferasa. En el alga *M. braunii* no se pudo encontrar ninguna evidencia de un complejo similar en los extractos crudos que eluían de una columna de filtración empaquetada con un gel Sephacryl S 300 HR, tampoco se pudo detectar tal complejo en tejidos verdes de la leguminosa *Phaseolus* sp. (Bertagnolli y Wedding, 1977) y en cultivos celulares no fotosintéticos de la solanácea *Datura innoxia* (Kuske *et al.*, 1994).

La caracterización cinética de las tres isoenzimas de OASTL de *M. braunii* evidenciaron una baja afinidad por la serina activada (OAS). Los valores de Km encontrados son inferiores a los descritos para las isoenzimas de *C. reinhardtii* (Prieto *et al.*, 1997) y aproximados a los de la enzima cloroplástica de *S. oleracea*, (Droux *et al.*, 1992). Por otro lado, los valores de Km para OAS de las isoenzimas de *M. braunii* resultaron ser muy aproximados, al contrario de organismos tales como *C. reinhardtii* donde las isoenzimas asumen valores de Km de 2,5, 6,5 y 10 mM (Prieto *et al.*, 1997), y en la bacteria *Rhodospirillum tenue*, con valores tan extremos como 2,9 y 50 mM para las dos isoformas, respectivamente (Hensel y Truper, 1983).

Los valores de K_m para el sulfuro muestran una mayor afinidad por este sustrato en las tres isoenzimas de *M. braunii*. En el caso de la OASTL_A y OASTL_B, los valores se aproximan a la isoenzima cloroplástica de espinaca ($K_m = 250 \mu\text{M}$) (Droux *et al.*, 1992). La OASTL_C de *M. braunii* revela un valor de K_m de $80 \mu\text{M}$, que es más aproximado a lo descrito en plantas ($30\text{--}60 \mu\text{M}$) (Ikegami *et al.*, 1988a; 1988b; Murakoshi *et al.*, 1985). Estudios recientes realizados con la proteína recombinante de la isoforma cloroplastídica de espinaca, muestran dos valores de K_m para el sulfuro, lo que sugeriría que la enzima posee dos sitios catalíticos con reactividades desiguales hacia el aminoácido sustrato (Rolland *et al.*, 1996). En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que la volatibilidad del sulfuro presenta dificultades para la determinación precisa de las K_m para este sustrato.

Las concentraciones de sulfuro libre en plantas y algas se encuentran dentro de un rango micromolar (Schmidt y Jägger, 1992), y resulta 1000 veces más pequeña que la necesaria para alcanzar la saturación a nivel funcional de la O-acetil-L-serina(tiol)-liasa, lo que ha llevado a especular con la posibilidad de que el donador de azufre *in vivo* pudiera no ser el sulfuro (Rolland *et al.*, 1996).

En los análisis *in vitro* las isoenzimas de *M. braunii* se mostraron más altamente activas a temperaturas superiores que las fisiológicamente normales, siendo el máximo de actividad a los 60°C en los tres casos (Fig. 15). Las isoenzimas OASS de la solanácea *Datura innoxia* se muestran activas para un amplio rango de temperaturas, con un máximo de actividad entre los 42 y 58°C ; por lo que Kuske *et al.* (1994) sugieren la existencia de un mecanismo que incrementaría la síntesis de cisteína en respuesta a las temperaturas elevadas. En este sentido, se ha demostrado que en las plantas expuestas a choque térmico se observa un aumento de la concentración de glutatión (Nieto-Sotelo y Ho, 1986).

Por otro lado, se pudo observar la existencia de dos valores distintos en la determinación de la energía de activación. Esto implicaría la participación de un mecanismo de reacción con dos pasos que controlaría el desarrollo de la actividad catalítica; de modo que uno de ellos actuaría a bajas temperaturas y el otro lo haría a temperaturas elevadas y próximas a la de máxima actividad. La inactivación térmica de las isoenzimas OASTL de *M. braunii* en preparaciones parcialmente purificadas se produce de manera acentuada a partir de la temperatura óptima.

Las isoformas de OASTL de *M. braunii* presentaron valores de pH óptimo de alrededor de 9. En *C. reinhardtii* se concluyó que el valor óptimo de pH para las isoenzimas OASTL es de aproximadamente 8 (Prieto *et al.*, 1997), mientras que las enzimas de plantas superiores muestran valores comprendidos entre 8 y 8,3 (Ikegami *et al.*, 1987, 1988b; Murakoshi *et al.*, 1985, 1986). A este respecto cabría decir que a valores de pH superiores a 8 se produce un desplazamiento del grupo acetilo de la O-acetil-L-serina, que se transforma en N-acetil-L-serina, lo cual podría dar lugar a artefactos en el cálculo de pH óptimos en este tipo de enzimas (León, 1990).

Las tres isoenzimas de *M. braunii* muestran un mismo patrón de inhibición moderada por O-acetilserina a partir de concentraciones superiores a 10-12 mM. Este tipo de inhibición también se observa para la isoenzima B de *Phaseolus vulgaris* pero no para la isoenzima A de dicha leguminosa (Bertagnolli y Wedding, 1977). Las isoenzimas A y B de *Allium tuberosum* no muestran ningún tipo de inhibición por O-acetilserina hasta concentraciones de 25 mM (Ikegami *et al.*, 1993).

No se ha observado inhibición de la actividad enzimática en las tres isoformas de *M. braunii* para sustrato sulfuro a concentraciones por debajo de 30 mM. Sin embargo en *P. vulgaris* y *P. polyanthus* se observa que hay una inhibición de la actividad enzimática en las isoformas aunque existen diferencias en cuanto al grado de la inhibición (Bertagnolli y Wedding,

1977). En cualquier caso, las elevadas concentraciones de ambos sustratos necesarias para observar inhibición de las actividades OASTL en los distintos organismos arrojan serias dudas sobre el significado fisiológico de dicha inhibición.

La L-metionina resultó ser un inhibidor tipo mixto de las isoenzimas OASTL de *M. braunii*, afectando tanto los valores de V_{max} como los de K_m de los sustratos con valores de K_i de 1,44, 1,53 y 1,95 mM para OASTL_A, OASTL_B y OASTL_C, respectivamente. Dado que la L-cisteína es sustrato para la síntesis de L-metionina, es probable que exista una inhibición *feedback* de la OASTL por metionina en las tres isoenzimas *in vivo*. Las tres isoenzimas OASTL de *C. reinhardtii* se inhiben de manera competitiva por L-metionina, con valores de K_m del mismo orden que en *M. braunii* (Prieto *et al.*, 1997), asimismo, en trigo se ha observado la existencia de una enzima con actividad OASTL que se inhibe de manera competitiva por metionina (Ascaño y Nicholas, 1977); sin embargo, la isoenzima cloroplástica de espinacas no parece inhibirse por L-metionina (Droux *et al.*, 1992).

Con respecto al efecto de otros inhibidores sobre la actividad de las isoenzimas OASTL de *M. braunii*, el acetato no mostró ningún tipo de inhibición, al contrario que en las isoenzimas A y B de la bacteria *Salmonella typhimurium* en las que el acetato es un inhibidor competitivo en relación al sulfuro y no competitivo en relación a la O-acetil-L-serina (Tai *et al.*, 1993).

El tiocianato determina la inhibición de las tres isoenzimas de *M. braunii*. Se ha demostrado que el tiocianato es inhibidor competitivo respecto al sulfuro de la isoforma A de *S. typhimurium*; mientras que es un inhibidor incompetitivo respecto a la O-acetilserina de las isoformas A y B del mismo organismo. El maleato, un análogo de la O-acetilserina, inhibe la actividad de las isoenzimas OASTL en *M. braunii*. Este hecho también se observa para la isoforma B de *S. typhimurium*, donde se comporta como un inhibidor no competitivo respecto a la OAS (Tai *et al.*, 1993).

Entre los inhibidores de enzimas dependientes de PLP, el aminooxiacetato inhibe significativamente la actividad de las tres isoenzimas, en tanto que la hidroxilamina sólo inhibe parcialmente la actividad de OASTL_A y OASTL_B, pero no la de OASTL_C. El efecto de la D-cicloserina fue muy limitado. Otras sustancias tales como tioles, cianuro, borato o EDTA no ejercieron ninguna inhibición observable sobre las isoenzimas OASTL de *M. braunii*. En otros organismos, como la crucífera *Brassica juncea*, inhibidores como la hidroxilamina y el cianuro a concentraciones de 1 mM, afectan tan sólo en un 15% la actividad enzimática (Ikegami *et al.*, 1988b).

3. Regulación de la expresión de la actividad O-acetil-L-serina(tiol)liasa en células de *M. braunii*

La actividad específica OASTL de *M. braunii* no se afectó significativamente ni por la intensidad de luz ni por la longitud de onda de la misma, si bien, la cantidad total de actividad es significativamente más alta en los cultivos crecidos con luz blanca frente a los crecidos con luz azul o roja. En oscuridad, el nivel de actividad OASTL no disminuye significativamente al cabo de 24 h, mientras que en *C. reinhardtii* la actividad OASTL disminuye significativamente (León *et al.*, 1988). En *A. thaliana* se ha publicado que la luz no influye de manera significativa en los niveles de la OASTL citosólica; mientras que sí induce un incremento del ARNm de la OASTL plastídica (Hell *et al.*, 1994).

La ausencia de fuente de carbono determina una caída de la actividad específica OASTL en un 30% en 24 h, indicando esto que la disponibilidad de una fuente de carbono es necesaria para el mantenimiento de dicha actividad, siendo otras fuentes de carbono alternativas, como acetato o glucosa, las que determinaron un aumento apreciable de la actividad OASTL

tanto en luz como en oscuridad. Este efecto no se ha observado en *C. reinhardtii*, cuya actividad OASTL no parece afectarse significativamente por la disponibilidad ni por la procedencia del carbono (León, 1990).

El cultivo de células de *M. braunii* en ausencia de fuente nitrogenada provocó una disminución de la actividad OASTL al cabo de 24 h. Nitrato, nitrito y amonio son indistintamente utilizados como fuente de nitrógeno, mientras que la hidroxilamina produjo una caída de la actividad OASTL de más de un 50% en 24 h. Resultados similares se obtuvieron en células de *C. reinhardtii* (León, 1990). En este contexto, se ha descrito que células de tabaco cultivadas heterotróficamente con nitrato más amonio tienen menor actividad OASTL que aquellas cultivadas con nitrato como única fuente de nitrógeno (Bergman *et al.*, 1980).

Particularmente ineresante resulta la sobreexpresión de la actividad OASTL de *M. braunii* después de 24 h en ausencia de fuente de azufre, efecto ya observado en *C. reinhardtii* (León, 1990), *P. vulgaris* (Smith, 1972) y en hojas de maíz (Passera y Ghisi, 1982). En cambio, en células de tabaco la actividad de OASTL no es sensible a la disponibilidad de azufre (Smith, 1980). Análogamente, la ausencia de ion ferroso también indujo la actividad OASTL al cabo 48 h.

Por otro lado, *M. braunii* puede crecer utilizando una amplia variedad de compuestos azufrados, tanto reducidos como oxidados, como fuente de este elemento, manteniéndose en todos ellos un nivel adecuado de actividad enzimática. Una versatilidad parecida, en cuanto a capacidad de utilizar distintas fuentes de azufre se ha visto en *C. fusca* (Krauss y Schmidt, 1987), *Lemna minor*, células de tabaco y *Phaseolus vulgaris* (Brunold y Schmidt, 1978; Brunold *et al.*, 1981; Wyss y Brunold, 1979). Por el contrario, en *C. reinhardtii* se observa que tanto el glutati6n como la cisteína inducen la actividad OASTL de forma similar a la carencia de azufre, lo que indica que esta alga no puede utilizar estos compuestos como fuente de azufre. Por otro

lado, el tiosulfato demostró ser una fuente de azufre tan efectiva como sulfato o sulfito, lo que es consistente con lo encontrado para *C. reinhardtii* (León, 1990) y *Chlorella pyrenoidosa* (Hodson *et al.*, 1968).

Nuestros resultados indican que *M. braunii* puede sostener su crecimiento con ácidos sulfónicos, al contrario que algunas cianobacterias, como es el caso de *Synechococcus 6301* (Schmidt *et al.*, 1982). Los sulfonatos pueden encontrarse en el ambiente como consecuencia de la actividad metabólica de los organismos o de los productos químicos que sintetiza el hombre (Biedlingmaier y Schmidt, 1983; 1986). *M. braunii* tendría, por tanto, buenas perspectivas como un agente de detoxificación de sistemas acuáticos.

La adición de sulfato revierte el incremento de actividad OASTL experimentado por células carentes de azufre, por el contrario, la adición de nitrato a células crecidas en ausencia de nitrógeno determinó un aumento transitorio de la actividad OASTL. La reposición de luz o fuente de carbono no provocó diferencias significativas en el nivel de OASTL.

Nuestros resultados demuestran que la expresión de las isoenzimas OASTL de *M. braunii* está diferencialmente regulada según las distintas condiciones nutricionales y/o ambientales. Así, la relación $OASTL_{B-C} : OASTL_A$ varía según la fase de crecimiento celular, cultivos con alto nivel de clorofila (60 $\mu\text{g/ml}$) muestran una relación $OASTL_{2-3} / OASTL_A$ de 1,68, frente a un valor de 1 para esta relación en cultivos con una concentración de clorofila de 20 $\mu\text{g/ml}$. Esto indicaría una expresión diferencial de las isoformas probablemente debida al agotamiento de la fuente de azufre en el medio de cultivo o a condiciones insuficientes de luz.

La expresión de las isoenzimas OASTL de *M. braunii* requiere de la provisión de una fuente carbonada ya que hay una disminución de actividad de las tres isoenzimas, si bien $OASTL_A$ se vería menos afectada. Un hecho similar se observa en cultivos donde se ha omitido la fuente de nitrógeno.

Esto nos indicaría que una adecuada síntesis *de novo* de proteínas demandaría una provisión adecuada de fuente de carbono celular y nitrógeno disponibles. Por otro lado, también se observó que, si bien hay un aumento de actividad OASTL en ambos grupos de isoenzimas en condiciones de hambre de azufre, la isoenzima A se afectó de nuevo menos que las B y C.

La inducción de la actividad OASTL por carencia de azufre fue estudiada detenidamente en una serie de experimentos. El incremento lineal de la actividad OASTL en *M. braunii* en cultivos sometidos a carencia de azufre se revierte por la presencia de una fuente de azufre asimilable por *M. braunii*, tales como sulfato, sulfito, L-cisteína, L-metionina o glutatión.

Por otro lado, la inducción de la actividad OASTL por carencia de azufre demostró ser dependiente de CO₂ y de luz, y se inhibió por antibióticos como cloranfenicol o cicloheximida. Estos resultados apoyan la idea de que la inducción de la actividad OASTL implica la síntesis *de novo* de proteína. Resultados similares se han obtenido en *C. reinhardtii* (León, 1990).

En los cultivos sincrónicos de *M. braunii* se observa un incremento de la actividad OASTL desde el comienzo de la fase lumínica en los cultivos que crecen en condiciones normales. La inexistencia de una fase de retardo podría indicar la presencia de ARNm durante el período de oscuridad, lo que sugeriría que se sigue produciendo transcripción pero hay un control a nivel de traducción. Esto concuerda con los estudios relacionados con la inducción enzimática en algas (Herrin *et al.*, 1986; Kirk y Kirk, 1985; Toguri *et al.*, 1989). Los niveles relativamente estables de actividad OASTL durante el período de oscuridad indicarían que el nivel de recambio de las isoenzimas OASTL sería muy bajo, o bien que no serían tan susceptibles de degradación por acción de las proteasas.

Un patrón similar relacionado con la evolución estable de la actividad durante el período de oscuridad se ha podido observar en las enzimas

vinculadas al ciclo de la glutamato sintasa (glutamina sintetasa, ferredoxín-glutamato sintasa y NADH-glutamato sintasa), en cultivos sincrónicos de *C. reinhardtii* (Martínez-Rivas *et al.*, 1991).

En los cultivos sincrónicos de *M. braunii* se observa una inhibición marcada de la síntesis de proteínas con actividad OASTL por acción de la cicloheximida durante el período luminoso. Esto indicaría que la traducción de los distintos ARNm de las isoenzimas de *M. braunii* se bloquea en citoplasma por la acción del antibiótico. Sin embargo, la inhibición de la síntesis plastídica y mitocondrial con cloranfenicol, no bloquea de manera tan efectiva la aparición de proteínas con actividad OASTL, si bien su efecto es mayor si se añade 12 horas después de iniciarse el período luminoso. Estas observaciones nos permitirían sugerir que los transcritos tendrían un origen nuclear y que, por lo tanto, los genes que codifican las distintas isoformas se encontrarían localizados en el genoma nuclear del alga. Esto concuerda con las observaciones realizadas en plantas superiores donde se ha determinado que los genes que codifican para las isoenzimas con actividad OASTL citoplásmica, plastídica y mitocondrial, se encuentran localizados en el núcleo (Römer *et al.*, 1992; Saito *et al.*, 1992, 1993b, 1994; Hell *et al.*, 1993; Rolland *et al.*, 1993a; Youssefian *et al.*, 1993; Noji *et al.*, 1994).

El herbicida paraquat determina una disminución en la actividad OASTL en los cultivos sincrónicos de *M. braunii*. El modo de acción del paraquat se basa en la producción de H_2O_2 , superóxido, y otros radicales libres como producto de su reacción con el oxígeno en el cloroplasto durante el proceso de fotosíntesis (Calderbank, 1968; Dodge, 1971; Burke *et al.*, 1985). Por tanto, es probable que las isoenzimas OASTL puedan verse afectadas al reaccionar sus centros activos con las formas tóxicas del oxígeno.

V. CONCLUSIONES

1. Se ha estudiado el consumo de sulfato, marcado con S^{35} por células de *M. braunii*. Nuestros resultados indican que hay un proceso de transporte de sulfato, que depende de la luz y está mediado por una permeasa específica, que presenta una cinética de Michaelis, con único valor de K_m para sulfato de $5 \mu M$ y una velocidad máxima de $25 \text{ nmoles de sulfato/mg Chl.h}$, que se alcanza para una concentración de sulfato en el medio de cultivo entre $0,10$ y $0,15 \text{ mM}$. Aniones del tipo XO_4^{2-} inhiben competitivamente el transporte de sulfato al interior de las células de *M. braunii*, si bien sulfito y cromato resultaron ser los más eficaces al inhibir completamente el consumo de sulfato (1 mM) cuando su concentración en el medio fue de 3 mM .

2. Cuando las células de *M. braunii* se someten a un periodo previo de hambre de azufre, el consumo de sulfato aumenta en función del tiempo de carencia, hasta alcanzar valores 14 veces superiores. No se han podido establecer diferencias claras en los datos de velocidad, ya que es tal la afinidad por sulfato de las células con hambre, que hace que éstas se llenen inmediatamente de sulfato, al iniciar el experimento.

3. Tres isoenzimas, designadas A, B y C, de O-acetil-L-serina(tiol)liasa se han purificado a partir de un extracto crudo de *M. braunii*. La isoenzima B es la forma más abundante, con un 40% aproximadamente de la actividad total, mientras que las isoenzimas A y C suponen un 35% y 25% respectivamente. Las actividades específicas de las isoenzimas purificadas oscilan entre $33,3$ de la isoenzima B y $56,6 \mu\text{mol cisteina/mg proteína}$ correspondientes a la isoenzima C.

4. La isoenzima A ($M_r = 49,500$ Da) es algo más pequeña que las isoenzimas B y C, que presentan 54,000 Da aproximadamente. La K_m para O-acetil-L-serina es de 2,4 mM para las tres isoenzimas, mientras que para sulfuro es de 0,23; 0,31; y 0,08 mM respectivamente. En todos los casos, la actividad máxima se alcanza a 60 °C, decayendo rápidamente la actividad cuando se rebasa la temperatura indicada. Las tres isoenzimas presentan dos valores de energía de activación, lo que implicaría un mecanismo de reacción con dos pasos cinéticos. Los estudios de pH revelan que la actividad OASTL puede medirse sin interferencias entre 7,0 y 7,5.

5. Las tres isoenzimas muestran inhibición por el sustrato de la reacción, O-acetil-L-serina, a concentraciones superiores a 12 mM. La L-metionina inhibe a las tres isoenzimas de forma competitiva con respecto a la O-acetil-L-serina sulfhidrilasa, si bien dicha inhibición afecta tanto al valor de K_m , como a la velocidad máxima. Los valores de K_i obtenidos son 1,44; 1,53; y 1,95 mM respectivamente. Entre los distintos compuestos estudiados hemos observado que el DTE, tiocianato, maleato y aminooxiacetato, inhiben significativamente la actividad de las tres isoenzimas, a partir de 5 mM. La hidroxilamina (5 mM) inhibe selectivamente la actividad de las isoenzimas A y B, mientras que no afecta a la C.

6. A medida que avanza el crecimiento celular la actividad correspondiente a la isoenzima A decrece algo, mientras que aumenta significativamente el valor de las otras dos isoenzimas. Por otra parte, la carencia de azufre en el medio de cultivo, cuando todos los demás nutrientes están presentes, provoca en *M. braunii* un aumento de la actividad OASTL. Nuestros estudios indican que las isoenzimas B y C alcanzan niveles intracelulares hasta 6 veces superiores a los normales, con el transcurso del tiempo en células carentes de azufre, mientras que la actividad de la isoenzima C es la

que menos se afecta por la carencia de este nutriente. Estos datos indican que se produce una inducción de la actividad OASTL en *M. braunii* cuando disminuye el nivel intracelular de metabolitos azufrados. Dicha inducción cesa inmediatamente cuando se repone una fuente de azufre para las células, ya sea sulfato, sulfito, L-cisteína, L-metionina, o glutatión.

7. La inducción de la actividad OASTL provocada por la carencia de una fuente de azufre en el medio de cultivo, requiere una fuente asimilable de carbono, ya sea CO₂ en presencia de luz, o glucosa o acetato, aunque las células estén en oscuridad. Por su parte dicha inducción requiere síntesis *de novo* de proteína, ya que se ve significativamente afectada por la presencia de antibióticos en el medio de cultivo.

8. Particularmente interesantes han sido los estudios de evolución de la actividad OASTL en cultivos sincrónicos de *M. braunii*, donde se observa un aumento progresivo de la actividad OASTL durante el periodo luminoso, para mantenerse estable durante la oscuridad. La cicloheximida, pero no el cloranfenicol, inhibe completamente dicho aumento. Por su parte, el herbicida paraquat presenta una inhibición significativa, pero no completa sobre el aumento de la actividad OASTL durante el periodo luminoso.

BIBLIOGRAFIA

- Ames GF-L** (1986) Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Annu Rev Biochem* 55:397-425
- Ames GF-L, Nikaido N, Groarke J, Petihory J.** (1989) Reconstitution of periplasmic transport in inside-out membrane vesicles: energization by ATP. *J Biol Chem* 264:3998-4002
- Arz HE, Gisselmann G, Schiffmann S, Schwenn, JD** (1994) A cDNA for adenylyl sulphate (APS)-kinase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* 1218:447-452
- Ascaño A, Nicholas DJD** (1977). Purification and properties of O-acetyl-L-serine sulphhydrylase from wheat leaves. *Phytochemistry* 16:889-893
- Barroso, C, Vega, JM, Gotor, C** (1995) A new member of the cytosolic O-acetyl-L-serine(thiol)lyase family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 363:1-5.
- Becker MA, Kredich NM, Tomkins GM** (1969) The purification and characterization of O-acetylserine sulphhydrylase-A from *Salmonella Typhimurium* *J Biol Chem* 244:2418-2427
- Bergmann L, Schwenn JD, Urlaub H** (1980) Adenosine triphosphate sulfurylase and O-acetyl-serine sulphhydrylase in photoheterotrophically cultured tobacco cells. *Z. Naturforsch* 35:952-957
- Bertagnolli BL, Wedding RT** (1977) Purification and initial kinetic characterization of different forms of O-acetylserine sulphhydrylase from seedlings of two species of *Phaseolus*. *Plant Physiol* 60:115-121
- Biedlingmaier S, Schmidt A** (1983) Alkylsulfonic acids and some S-containing detergents as sulfur sources for growth of *Chlorella fusca*. *Arch Microbiol* 136:124-130

- Biedlingmaier S, Schmidt A** (1986) Characterization of the non-constitutive ethanosulfonate uptake in *Chlorella fusca*. *Biochim Biophys Acta* 861: 95-104.
- Biedlingmaier S, Schmidt A** (1989). Sulfate transport in normal and S-deprived *Chlorella fusca*. *Z Naturforsch* 44c:495-503
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Brander KA, Owttrim GW, Brunold C** (1995) Isolation of a cDNA encoding a putative chloroplast isoform of O-acetylserine(thiol)lyase from maize. *Plant Physiol* 108: 1748-1753.
- Breton A, Surdin-Kerjan Y** (1977) Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: biochemical and genetic study. *J Bacteriol* 132:224-232
- Brunold C, Schmidt A** (1978) Regulation of sulfate assimilation in plants. 7. Cysteine inactivation of adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase in *Lemna minor* L. *Plant Physiol* 62:342-347
- Brunold C** (1990) Reduction of sulfate to sulfide. En: Rennenberg H, Brunold C, De Kok LJ, Stulen I (eds). Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants. SPB Academic Publishing. Holanda pp 13-31
- Brunold C, Zryd JP, Lavanchy P** (1981) Regulation of enzymes of assimilatory sulfate reduction in aerated cell suspension cultures of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Sci Lett* 21: 167-174
- Burke JJ, Gamble PE, Hatfield J, Quisenberry JE** (1985) Plant morphological and biochemical responses to field water deficits. I. Responses of glutathione reductase activity and paraquat sensitivity. *Plant Physiol* 79:415-419

-
- Burns D, Yanofsky C** (1989) Nucleotide sequence of the *Neurospora crassa* trp-3 gene encoding tryptophane synthetase and comparison of the trp-3 polypeptide with its homologs in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264, 3840-3848
- Byrne CR, Monroe RS, Ward KA, Kredich NM** (1988) DNA sequences of the *cysK* regions of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* and linkage of the *cysK* regions to *ptsH*. *J Bacteriol* 170:3150-3157
- Calderbank A** (1968) Bipyridylum herbicides. *Adv Pest Control Res* 8: 127-235
- Cooper AJL** (1983) Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Ann Rev Biochem* 52:187-222
- Cram WJ** (1990) Uptake and transport of sulfate. En: Rennenberg H, Brunold C, De Kok LJ, Stulen I (eds). Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants, SPB Academic Publishing. Holanda. pp 3-11
- Datko AH, Mudd SH** (1984) Sulfate uptake and its regulation in *Lemna paucicostata* Hegelm. 6746. *Plant Physiol* 75:466-473
- Dodge AD** (1971) Mode of action of pyridyle-based herbicides, paraquat and diquat. *Endevour* 30: 130-135
- Droux M, Martin J, Sajus P, Douce R** (1992) Purification and characterization of O-acetylserine (thiol) lyase from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* 295:379-390
- Ferro-Luzzi Ames G, Joshi AK** (1990) Energy coupling in bacterial periplasmic permeases. *J Bacteriol* 172: 4133-4137.
- Gaitonde MK** (1967) A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring aminoacids. *Biochem J* 104:627-633

- Giovanelli J** (1990) Regulatory aspects of cysteine and methionine biosynthesis. En: Rennenberg H, Brunold C, De Kok LJ, Stulen I (eds) Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants. pp. 33-48. SPB Academic Publishing. The Hague. Holanda
- Green LS, Grossman AR** (1988) Changes in sulfate transport characteristics and protein composition of *Anacystis nidulans* R2 during sulfur deprivation. *J Bacteriol* 170:583-587
- Hawkesford MJ, Davidian JC, Gignon C.** (1993) Sulphate/proton cotransport in plasma-membrane vesicles isolated from roots of *Brassica napus* L.: increased transport in membranes isolated from sulphur-starved plants. *Planta* 190:297-304
- Hell R, Bork C, Bogdanova N, Frolov I, Hauschild R** (1994) Isolation and characterization of two cDNAs encoding for compartment specific isoforms of O-acetylserine (thiol) lyase from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 351:257-262
- Hell R, Schuster G, Gruissem W** (1993) An O-acetylserine(thiol)lyase cDNA from spinach. *Plant Physiol* 102:1057-1058
- Hensel G, Trüper HG** (1983) O-acetylserine sulfhydrylase and S-sulfocysteine synthase activities. *Arch Microbiol* 134:227-232
- Herrin DL, Michaels AS, Paul A-L** (1986) Regulation of genes encoding the large subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase and the photosystem II polypeptides D-1 and D-2 during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* 103: 1837-1845.
- Hodson RC, Schiff JA, Scarsella AJ** (1968) Studies of sulfate utilization by algae. 7. In vivo metabolism of thiosulfate by *Chlorella*. *Plant Physiol* 43:570-577
- Ikegami F, Itagaki S, Murakoshi I** (1993) Purification and characterization of two forms of cysteine synthase from *Allium tuberosum*. *Phytochemistry* 32:31-34

- Ikegami F, Kaneko M, Lambein F, Kuo Y, Murakoshi (1987)**
Difference between uracylalanine synthases and cysteine synthases in *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 26:2699-2704
- Ikegami F, Kaneko M, Kamiyama H, Murakoshi I (1988a).**
Purification and characterization of cysteine synthases from *Citrullus vulgaris*. *Phytochemistry* 27, 697-701
- Ikegami F, Kaneko M, Kobori M, Murakoshi I (1988b).** Purification and characterization of cysteine synthase from *Brassica juncea*. *Phytochemistry* 27, 3379-3383
- Janick PA, Siegel LM (1982)** Electron paramagnetic resonance and optical spectroscopic evidence for interaction between siroheme and Fe₄S₄ prosthetic groups in *Escherichia coli* sulfite reductase hemoprotein subunit. *Biochemistry* 21: 3538-3547
- Jeanjean R, Broda E (1977)** Dependence of sulphate uptake by *Anacystis nidulans* on energy, on osmotic shock and on sulfate starvation. *Arch Microbiol* 114:19-23
- Jones-Mortimer MC (1968)** Positive control of sulfate reduction in *Escherichia coli*: the nature of the pleiotropic cysteineless mutant of *E. coli* K12. *Biochem J* 110: 589-595
- Kessler E, Langner W, Ludewig I, Wiechmann H (1963)** Bildung von -sekundar-carotiniiden bei stickstoffmangel und hydrogenase-aktivitat als taxonomische markmale in der gattung *Chlorella*. En; Studies on microalgae and photosynthetic bacteria. pp 7-20. University of Tokyo Press. Tokyo
- Kielland-Brandt MC, Holmberg S, Petersen JGL, Nilson-Tillgren T (1984)** *Barlsberg Res Commun* 49: 567-575.
- Kirk MM, Kirk DL (1985)** Translational regulation of protein synthesis in response to light at a critical stage of *Volvox* development. *Cell* 41: 419-428

- Klonus D, Hofgen R, Willmitzer L, Riesmeier JW** (1994) Isolation and characterization of two cDNA clones encoding ATP-sulfurylase from potato by a complementation of a yeast mutant. *Plant J* 6: 105-112
- Klonus D, Riesmeier JW, Willmitzer L** (1995) A cDNA clone for a ATP-sulfurylase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 197: 653-654
- Krauss F, Schmidt A** (1987) Sulphur sources for growth of *Chorella fusca* and their influence on key enzymes of sulphur metabolism. *J Gen Microbiol* 133:1209-1219
- Kredich NM** (1971) Regulation of L-cysteine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. I. Effect of growth on varying sulfur sources and O-acetyl-L-serine on gene expression. *J Biol Chem* 246:3474-3484
- Kredich NM** (1987). Biosynthesis of cysteine. En: Neidhardt FC, Ingraham KB, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (eds.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. p. 419-429. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA
- Kredich NM, Tomkins GM** (1966) The enzymic synthesis of L-cysteine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 241:4955-4965
- Kredich NM, Becker MA, Tomkins GM** (1969) Purification and characterization of cysteine synthase, a bifunctional protein complex from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 244:2428-2439
- Kuske CR, Ticknor LO, Guzmán E, Gurley LR, Valdez JG, Thompson ME, Jackson PJ** (1994) Purification and characterization of O-acetylserine sulfhydrylase isoenzymes from *Datura innoxia*. *J Biol Chem* 269(8):6223-6232
- Lass B, Ullrich-Eberius CI** (1984) Evidence for proton/sulfate co-transport and its kinetics in *Lemna gibba* G1. *Planta* 161:53-60

- Laudenbach DE, Grossman AR** (1991) Characterization and mutagenesis of sulfur-regulated genes in a cyanobacterium: evidence for function in sulfate transport. *J Bacteriol* 173:2739-2750
- León J, Romero LC, Galván F** (1988) Intracellular levels and regulation of O-acetyl-L-serine sulfhydrylase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Plant Physiol* 132:618-622
- León J** (1990) Purificación, regulación e inmovilización de la O-acetil-L-serina sulfhidrilasa del alga eucariótica *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. Sevilla
- Leustek T** (1996) Molecular genetics of sulfate assimilation in plants. *Physiol Plant* 97: 411-419
- Leustek T, Murillo M, Cervantes M** (1994) Cloning of cDNA encoding ATP sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* by functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol* 105:897-902
- Levy S, Danchin A** (1988) Phylogeny of metabolic pathways: O-acetylserine sulphydrylase A is homologous to the tryptophan synthase beta subunit. *Mol Microbiol* 2:777-783
- Leyh TS** (1993) The physical biochemistry and molecular genetics of sulfate activation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 28: 515-542
- Li J, Saidha T, Schiff JA** (1991) Purification and properties of two forms of ATP sulfurylase from *Euglena*. *Biochim Biophys Acta* 1078:68-76
- Lunn JE, Droux M, Martin J, Douce R** (1990) Localization of ATP sulfurylase and O-acetylserine(thiol)lyase in spinach leaves. *Plant Physiol* 94:1345-1352
- Marker AFH** (1972) The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwat Biol* 2:361-385

-
- Martínez-Rivas JM, Vega JM, Márquez A** (1991) Differential regulation of the nitrate-reducing and ammonium-assimilatory systems in synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEMS Microbiol Lett* 78: 85-88
- Masada M, Fukushima K, Tamura G** (1975) Cysteine synthase from rape leaves. *J Biochem* 77: 1107-1115
- Miller BE, Kredich NM** (1987) Purification of the *cysB* protein from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 262: 6006-6009
- Murakoshi I, Ikegami F, Kaneko M** (1985) Purification and properties of cysteine synthase from *Spinacia oleracea*. *Phytochemistry* 24: 1907-1911
- Murakoshi I, Kaneko M, Koide C, Ikegami F** (1986) Enzymatic synthesis of the neuroexcitatory amino acid quisqualic acid by cysteine synthase. *Phytochemistry* 25: 2759-2763
- Murillo M, Leustek T** (1995) ATP-sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* and *Escherichia coli* are functionally equivalent but structurally and kinetically divergent: nucleotide sequence of two ATP-sulfurylase cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Arch Biochem Biophys* 323: 195-204
- Nieto-Sotelo J, Ho T-HD** (1986) Effect of heat shock on the metabolism of glutathione in maize roots. *Plant Physiol* 82: 1031-1035
- Nissen P, Nissen O** (1983) Validity of the multiphasic concept of ion absorption in plants. *Physiol Plant* 57:47-56
- Noji M, Murakoshi I, Saito K** (1994) Molecular cloning of a cysteine synthase cDNA from *Citrullus vulgaris* (watermelon) by genetic complementation in an *Escherichia coli* Cys⁻ auxotroph. *Mol Gen Genet* 244:57-66

- Ostrowski J, Kredich NM** (1990) In vitro interactions of CysB protein with the *cysJH* promoter of *Salmonella typhimurium*: inhibitory effects of sulfide. *J Bacteriol* 172:779-785
- Parsot C** (1986) Evolution of biosynthetic pathways: a common ancestor for threonine synthase, threonine dehydratase and D-serine dehydratase. *EMBO J* 5: 3013-3019
- Passera C, Ghisi R** (1982) ATP-sulfurylase and O-acetylserine sulfhydrylase in isolated mesophyll protoplasts and bundle sheath strands of S-deprived maize leaves. *J Exp Botany* 33: 432-438
- Pérez-Castiñeira JR, Prieto JL, Vega JM** (1992) Sulfate uptake in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phyton* 32:91-94
- Pérez-Castiñeira JR, Prieto JL, González-Arroyo J, Vega JM** (1997) Kinetic properties of sulfate uptake in two different eukaryotic microalgae. *J Plant Physiol* (en prensa)
- Prieto JL, Pérez-Castiñeira JR, Vega JM** (1997) Identificación y caracterización de tres isoenzimas con actividad O-acetil-L-serina(thiol)liasa en *Chlamydomonas reinhardtii*. En: "Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: De la Fisiología a la Biología Molecular. J.M. Vega, P.J. Aparicio, F. Castillo, J.M. Maldonado (eds.). Servicio de Publicaciones. Universidad de Sevilla. (En prensa).
- Rideal EK, Roberts R** (1951) The photochemistry of native proteins. *Proc R Soc Lond Ser A* 205:391-408
- Rolland N, Droux M, Douce R** (1992) Subcellular distribution of O-acetylserine(thiol)lyase in cauliflower (*Brassica oleracea* L.) inflorescence. *Plant Physiol* 98:927-935
- Rolland N, Droux M, Lebrun M, Douce R** (1993a) O-acetylserine(thiol)lyase from spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaf: cDNA cloning, characterization, and overexpression in *Escherichia coli* of the chloroplast isoform. *Arch Biochem Biophys* 300:213-222

- Rolland N, Job D, Douce R** (1993b) Common sequence motifs coding for higher-plant and prokaryotic O-acetylserine (thiol)-lyases: bacterial origin of a chloroplast transit peptide? *Biochem J* 293:829-833
- Rolland N, Ruffet M-L, Job D, Douce R, Droux M** (1996) Spinach chloroplast O-acetylserine exhibits two catalytically non-equivalent pyridoxal-5'-phosphate-containing active sites. *Eur J Biochem* 236: 272-282
- Römer S, d'Harlingue A, Camara B, Schantz R, Kuntz M** (1992) Cysteine synthase from *Capsicum annuum* chromoplasts. Characterization and cDNA cloning of an up-regulated enzyme during fruit. *J Biol Chem* 267:17966-70
- Roomans GM, Kuypers GAY, Theuvenet APR, Bost-Pauwels GWFH** (1979) Kinetics of sulfate uptake by yeast. *Biochim Biophys Acta* 551:197-206
- Ruffet ML, Lebrun M, Droux M, Douce R** (1995) Subcellular distribution of serine acetyltransferase from *Pisum sativum* and characterization of an *Arabidopsis thaliana* putative cytosolic isoform. *Eur J Biochem* 227:500-509
- Saito K, Miura N, Yamazaki M, Hirano H, Murakoshi I** (1992) Molecular cloning and bacterial expression of a cDNA encoding a plant cysteine synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8078-8082
- Saito K, Kurosawa M, Murakoshi I** (1993a) Determination of a functional lysine residue of a plant cysteine synthase by site-directed mutagenesis, and the molecular evolutionary implications. *FEBS Lett* 328:111-114
- Saito K, Tatsuguchi K, Murakoshi I, Hirano H** (1993b) cDNA cloning and expression of cysteine synthase B localized in chloroplast of *Spinacia oleracea*. *FEBS Lett* 324:247-252

- Saito K, Tatsuguchi K, Takagi Y, Murakoshi I** (1994) Isolation and characterization of cDNA that encodes a putative mitochondrion-localizing isoform of cysteine synthase (O-acetylserine(thiol)-lyase) from *Spinacia oleracea*. *J Biol Chem* 269:28187-28192
- Sanders D** (1990) Kinetic modeling of plant and fungal membrane transport systems. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 77-107
- Schiffmann S, Schwenn JD** (1994) APS-sulfotransferase activity is identical to higher plant APS-kinase (EC 2.7.1.25). *FEBS Lett* 355:229-232
- Schiltz E, Schmidt W** (1981) Sequence of *Escherichia coli* D-serine dehydratase. Location of the pyridoxal-phosphate binding site. *FEBS Lett* 134: 57-62
- Schmidt A** (1973) Sulfate reduction in a cell-free system of *Chlorella*. The ferredoxin-dependent reduction of a protein-bound intermediate by a thiosulfonate reductase. *Arch Microbiol* 93: 29-52
- Schmidt A** (1990) 21. Sulphur metabolism. D. Cysteine synthase. En: Dey PM, Harborne JB (eds) *Methods in plant biochemistry*. Vol 3. Enzymes of primary metabolism. pp. 349-354. Academic Press. Londres. Reino Unido
- Schmidt A, Erdle I, Köst H-P** (1982) Changes of C-phycoyanin in *Synechococcus 6301* in relation to growth on various sulfur compounds. *Z Naturforsch* 37c:870-876
- Schmidt A, Jäger K** (1992) Open questions about sulfur metabolism in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43:325-349
- Schnackerz KD, Cook PF** (1995) Resolution of pyridoxal-5'-phosphate from O-acetylserine sulfhydrylase from *Salmonella typhimurium* and reconstitution of apoenzyme with factor and cofactor analogues as a probe of the cofactor binding site. *Arch Biochem Biophys* 324: 71-77

-
- Schwenn JD** (1994) Photosynthetic sulphate reduction. *Z Naturforsch* 49c:531-539
- Siegel LM** (1965) A direct microdetermination for sulfide. *Anal Biochem* 11:126-132
- Siegel LM** (1975) Biochemistry of the sulfur cycle. En: Greenberg DM (ed) Metabolism of sulfur compounds. Vol VII pp. 217-286. Academic Press New York, USA
- Sirko A, Hryniewicz M, Hulanicka D, Böck A** (1990) Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: Nucleotide sequence and expression of the *cysTWAM* gene cluster. *J Bacteriol* 172: 3351-3357
- Smith IK** (1972) Studies of L-cysteine biosynthetic enzymes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 50: 477-479
- Smith IK** (1976) Characterization of sulfate transport in cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 58:358-362
- Smith IK** (1980) Regulation of sulphate assimilation in tobacco cells. Effect of nitrogen and sulphur nutrition on sulphate permease and O-acetylserine sulphhydrolase. *Plant Physiol* 66:877-883
- Tai C-H, Nalabolu SR, Jacobson TM, Minter DE, Cook PF** (1993) Kinetic mechanisms of the A and B isoenzymes of O-acetylserine sulphhydrolase from *Salmonella typhimurium* LT-2 using the natural and alternative reactants. *Biochemistry* 32:6433-42
- Thomas D, Barbey R, Henry D, Surdin-Kerjan Y** (1992) Physiological analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in sulphate assimilation. *J Gen Microbiol* 138:2021-2028
- Toguri T, Muto S, Mihara S, Miyachi S** (1989) Synthesis and degradation of carbonic anhydrase in a synchronized culture of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol* 30: 533-539
- Utkilen HC, Heldal M, Knutsen G** (1976) Characterization of sulphate uptake in *Anacystis nidulans*. *Physiol Plant* 38:217-220

-
- Vallée M, Jeanjean R** (1968) Le système de transport de SO_4^{2-} chez *Chlorella pyrenoidosa* et sa régulation. II. Recherches sur la régulation de l'entrée. *Biochim Biophys Acta* 150: 607-617
- von Arb C** (1990). Sulphur metabolism. C. Sulphite reductase. En: Dey PM, Harborne JB (eds) *Methods in plant biochemistry*. Vol 3. Enzymes of primary metabolism. pp. 345-348. Academic Press. Londres. Reino Unido
- von Arb C, Brunold C** (1985) Ferredoxin-sulfite reductase and ferredoxin-nitrite reductase activities in leaves of *Pisum sativum*: changes during ontogeny and in vitro regulation by sulfide. *Physiol Plant* 64:290-294
- Wyss H -R, Brunold C** (1979) Regulation of adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase activity by H_2S and cyst(e)ine in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 147: 37-42
- Yanofsky C, Platt T, Crawford IP, Nichols BP, Christie GE, Horowitz H, van Cleemput W, Wu AM** (1981) The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 9: 6647-6668
- Yildiz FH, Davies JP, Grossman AR** (1994) Characterization of sulfate transport in *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur-limited and sulfur-sufficient growth. *Plant Physiol* 104:981-987
- Youssefian S, Nakamura M, Sano H** (1993) Tobacco plants transformed with the O-acetylserine(thiol)lyase gene of wheat are resistant to toxic levels of hydrogen sulphide gas. *Plant J* 4:759-769

ADENDA

Ensayo de consumo de sulfato por células de *Monoraphidium braunii*.

Para los estudios de consumo de sulfato se siguió el protocolo descrito previamente por Pérez-Castiñeira *et al.* (1992). Las células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento se recogieron por centrifugación a 5.000 x g durante 5 min, se lavaron dos veces con medio sin azufre y se resuspendieron en el mismo medio de manera que la concentración final de clorofila fuera de aproximadamente 20 µg /ml. La suspensión celular se situó en un baño termostatzado a 25 °C, con iluminación continua de luz blanca (30 W/m²), y los experimentos se iniciaron mediante adición de sulfato marcado con ³⁵S. La cantidad de radiactividad utilizada en los experimentos fue de 0,05 µCi /ml (sulfato total 0,3 mM). En los estudios cinéticos, la cantidad de sulfato en los cultivos fue variable, mientras que la radiactividad se mantuvo siempre por debajo de 0,5 µCi /ml. Cada 2-3 min se tomaron muestras de 0,5 ml de cultivo y se añadieron a tubos de microcentrifuga que contenían 0,5 ml de medio de cultivo sin azufre, para centrifugar rápidamente a 15.000 x g durante 30 s. Se descartaron los sobrenadantes, y los precipitados celulares se lavaron con 0,5 ml de medio de cultivo carente de azufre, centrifugándose en las mismas condiciones. Los precipitados finales se disolvieron en líquido de centelleo (Beckman "Ready Protein") y la radiactividad acumulada se contó en un aparato Beckman LS-6000IC.

FE DE ERRATAS

Página 64 Donde dice: "...isoenzimas OASTL_A (fracciones 50-75) y OASTL_B (fracciones 90-150)."
Debe decir: "...isoenzimas OASTL_B (fracciones 50-75) y OASTL_A (fracciones 90-150)."

Páginas 102 y 103 Donde dice: "OASTL_C "
Debe decir: "OASTL_A "

Página 129 Donde dice: "...muestran un único valor de Km 1 mM..."
Debe decir: "...muestran un único valor de Km de 5 µM..."

Página 138 Donde dice: "...muestran una relación OASTL₂₋₃/OASTL_A de 1,68..."
Debe decir: "...muestran una relación OASTL_{B-C}/OASTL_A de 1,68..."

Página 142 Donde dice: "...mientras que la actividad de la isoenzima OASTL_C..."
Debe decir: "...mientras que la actividad de la isoenzima OASTL_A..."

JORGE QUILBERTO GONZALEZ ARROYO

METABOLISMO DEL AZUFRE EN EL ALGA

EUCARIOTICA *Monosiphidium brunii*. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA OASTL.

APTO, mencioi CUM LAUDE

3

NOVIEMBRE

97

Si Veed.
~~Manuendo~~
V. del presidente

Si Veed.
Luis R.
Si Secretario.
[Signature]

Si Veed.
C. [Signature]
Si Secretario.
Jorge L. Arroyo