

Grado registrado en el Ministerio de Educación y Ciencia  
n.º de expediente 56. del 8 del mes de Julio

Sevilla, 1 SET. 1995

*Recebo Raffello*

X/596

**LA GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA NO FOSFORILANTE DE LOS EUCARIOTAS FOTOSINTETICOS: DISTRIBUCION, REGULACION Y FUNCION FISIOLÓGICA**

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas por la Licenciada **María Isabel Mateos Matos**

*Isabel Mateos*

Sevilla, Julio de 1995

Director:

*Aurelio Serrano Delgado*

Dr. Aurelio Serrano Delgado  
Colaborador Científico del C.S.I.C.



Tutor:

*Miguel García Guerrero*

Prof. Miguel García Guerrero  
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

A mis padres

A Diego, a mis hermanos, que siempre me han ayudado, y a mi hijo que ha pasado conmigo la escritura de esta Tesis.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla e Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Al Director del centro, el Prof. Miguel García Guerrero y al Prof. Dr. Manuel Losada Villasante les agradezco su acogida durante estos años y el interés que han mostrado siempre por este trabajo, al resto de los miembros del Departamento su acogida siempre cordial y al Dr. Aurelio Serrano el haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Aurelio Serrano le agradezco especialmente su constante aportación de ideas así como su continuo estímulo y ayuda durante el desarrollo y la escritura de esta Tesis.

A todos mis compañeros de trabajo les agradezco muy especialmente todo lo que a lo largo de estos años han compartido conmigo.

Al Dr. Joaquín Rivas su ayuda en el trabajo y sobre todo su amistad.

A los Dres. y colaboradores del Departamento su acogida siempre cordial.

A Antonia, Pepa, Nela y Reyes les agradezco su trato afectuoso y su colaboración en los asuntos burocráticos.

A todos los profesores que durante mi carrera han despertado en mí el interés por las Ciencias.

A Diego su estímulo y su paciencia durante la escritura de la Tesis.

A mis hermanos Filli, Consolación y Domingo por su confianza y ayuda en los momentos difíciles.

Por último quiero agradecer muy especialmente a mis padres sus innumerables esfuerzos y su comprensión constante, que han permitido llevar a cabo mis estudios.

Este trabajo ha sido financiado mediante una Beca de Formación del Personal Investigador de El Monte Caja de Ahorros de Huelva y Sevilla. Mi agradecimiento a esta entidad por su ayuda económica y la confianza depositada en la realización de este trabajo.

## INDICE

### ABREVIATURAS

<b>I. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>II. MATERIALES Y METODOS</b>	
<b>II.A. Organismos y condiciones de cultivo</b>	
II.A.1. Organismos empleados.....	22
II.A.2. Condiciones de cultivo	
II.A.2.1. Condiciones estándar de cultivo.....	24
II.A.2.2. Condiciones especiales de cultivo.....	25
II.A.3. Recogida de células.....	26
<b>II.B. Preparación de extractos celulares.....</b>	<b>27</b>
II.B.1. Rotura celular por ultrasonidos.....	27
II.B.2. Otros métodos de rotura celular	
II.B.2.1. Rotura por congelación-descongelación.....	28
II.B.2.2. Rotura por congelación rápida con nitrógeno líquido.....	29
II.B.2.3. Obtención de cloroplastos de hojas de espinaca.....	29
<b>II.C. Ensayos de las actividades enzimáticas</b>	
II.C.1. Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad G3P DHasa no fosforilante.....	30
II.C.2. Ensayos <i>in vitro</i> de las actividades G3P DHasas fosforilantes.....	31
II.C.3. Determinación de la actividad de generación de protones por la G3P DHasa no fosforilante.....	31
<b>II.D. Métodos analíticos</b>	
II.D.1. Determinación de clorofila.....	34
II.D.2. Determinación de proteína.....	34
II.D.3. Determinación de carbohidratos.....	35
II.D.4. Determinación de peso seco.....	36
<b>II.E. Técnicas experimentales</b>	
II.E.1. Centrifugaciones.....	36
II.E.2. Cromatografía en columnas	
II.E.2.1. Cromatografía de intercambio iónico.....	37
II.E.2.2. Cromatografía hidrofóbica.....	38
II.E.2.3. Cromatografía en hidroxapatito.....	38

II.E.2.4. Cromatoenfoque. Determinación de puntos isoeléctricos.....	39
II.E.2.5. Cromatografía de filtración molecular. Determinación de la masa molecular.....	40
II.E.3. Electroforesis de proteínas	
II.E.3.1. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida conteniendo SDS.....	41
II.E.3.2. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes.....	43
II.E.3.3. Isoelectroenfoque. Determinación de puntos isoeléctricos.....	44
II.E.3.4. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.....	45
II.E.4. Determinación de absorbancias y espectros de absorción.....	46
II.E.5. Concentración de proteínas	
II.E.5.1. Ultrafiltración.....	46
II.E.6. Eliminación de sales y moléculas pequeñas.....	47
II.E.7. Medidas del pH.....	47
<b>II.F. Reactivos.....</b>	<b>47</b>
<b>III. RESULTADOS</b>	
<b>III.A. Distribución de las actividades G3P DHasas en diferentes organismos.....</b>	<b>50</b>
III.A.1. Niveles celulares de las actividades G3P DHasas en distintos microorganismos eucarióticos.....	50
III.A.2. Niveles celulares de las actividades G3P DHasas en distintos microorganismos procarióticos.....	53
III.A.3. Niveles celulares de las actividades G3P DHasas en tejidos de plantas superiores.....	55
<b>III.B. Localización intracelular de las G3P DHasas en distintos organismos fotosintéticos eucarióticos.....</b>	<b>56</b>
<b>III.C. Efecto de las condiciones de cultivo de microalgas eucarióticas sobre los niveles celulares de las actividades G3P DHasas</b>	
III.C.1. Evolución de las actividades G3P DHasas durante el desarrollo de cultivos en condiciones fotoautotróficas..	64

III.C.1.1. Efecto de inhibidores de síntesis de proteína y transporte fotosintético de electrones sobre el crecimiento y la evolución de las actividades G3P DHasas de cultivos fotoautotróficos.....	68
III.C.2. Evolución de las actividades G3P DHasas en cultivos de microalgas durante la transición oscuridad-luz...	71
III.C.2.1. Efecto de distintos inhibidores sobre el crecimiento y la evolución de las actividades G3P DHasas de los cultivos durante la transición oscuridad-luz.....	71
III.C.3. Evolución de las actividades G3P DHasas durante el desarrollo de cultivos mantenidos en condiciones mixotróficas y heterotróficas	
III.C.3.1. Efecto del acetato sobre el crecimiento y los niveles de las actividades G3P DHasas de cultivos de <i>C. reinhardtii</i> .....	77
III.C.3.2. Efecto de distintos azúcares sobre el crecimiento y los niveles de las actividades G3P DHasas de cultivos de <i>C. fusca</i> .....	82
III.C.4. Efecto de diferentes inhibidores sobre el crecimiento y la evolución de las actividades G3P DHasas de cultivos de <i>C. fusca</i> previamente desarrollados con D-glucosa.....	88
III.C.5. Efecto de la ausencia de fuente de carbono inorgánico sobre las actividades G3P DHasas de cultivos de <i>C. fusca</i> .....	94
III.C.6. Evolución de las actividades G3P DHasas durante el desarrollo de cultivos de <i>C. fusca</i> con D-glucosa como fuente exclusiva de carbono.....	96
III.C.7. Evolución de las actividades G3P DHasas durante el desarrollo de cultivos de <i>C. fusca</i> mantenidos en condiciones microaeróbicas.....	99
III.C.8. Contenido en carbohidratos de cultivos de <i>C. fusca</i> desarrollados fotoautotróficamente, con D-glucosa y en ausencia de CO <sub>2</sub> .....	102
<b>III.D. Purificación y caracterización de la G3P DHasa no fosforilante de <i>C. reinhardtii</i></b>	
III.D.1. Purificación del enzima.....	108

III.D.1.1. Precipitación con sulfato amónico.....	109
III.D.1.2. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa.....	110
III.D.1.3. Cromatografía hidrofóbica en Fenil Sepharose CL 4B.....	113
III.D.1.4. Cromatografía en hidroxapatito.....	113
III.D.2. Criterios de homogeneidad	
III.D.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida....	118
III.D.2.2. Isoelectroenfoque.....	118
III.D.3. Caracterización del enzima.....	118
III.D.3.1. Masas moleculares y punto isoeléctrico.....	120
III.D.3.2. Espectro de absorción. Caracterización de la posible banda de Racker.....	120
<b>III.E. Producción de protones in vitro por la G3P DHasa no fosforilante purificada de <i>C. reinhardtii</i></b>	
III.E.1. Caracterización de la liberación de protones coincidente con la actividad redox de la G3P DHasa no fosforilante.....	125
III.E.2. Transhidrogenación dependiente de ATP e ionización del agua mediante un sistema enzimático reconstituido conteniendo ambas G3P DHasas, fosforilante y no fosforilante.....	130
<b>IV. DISCUSION.....</b>	<b>136</b>
IV.1. Distribución y localización intracelular de las G3P DHasas en diferentes organismos fotosintéticos.....	137
IV.2. Regulación diferencial de las G3P DHasas de microalgas eucarióticas por efecto de las condiciones nutricionales.....	141
IV.3. Purificación y caracterización de la G3P DHasa no fosforilante del alga clorofícea <i>C. reinhardtii</i> .....	148
IV.4. Función fisiológica de la G3P DHasa no fosforilante en los organismos fotosintéticos eucarióticos.....	155
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>162</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>166</b>

## ABREVIATURAS

A	Absorbancia
ADP	Adenosina-difosfato
ALD	Aldolasa
ALDHs	Aldehído deshidrogenasas
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATP	Adenosina-trifosfato
ARN	Acido ribonucleico
bisacrilamida	N,N'-bis-metilén-acrilamida
BPGA	1,3-bisfosfo-D-glicerato
BSA	Seroalbúmina bovina
cm	Centímetro
CRPF	Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato
CAT	Ciclo de los Acidos Tricarboxílicos
cdNA	ADN complementario
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DEAE	Dietilaminoetil
DHasa	Deshidrogenasa
DTE	Ditioeritritol
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiaminotetraacético
Da	Dalton
D.T.	Desviación típica
$\Delta$ pH	Cambio (incremento o disminución) del pH
g	Gramo
<i>g</i>	Aceleración de la gravedad
Fd <sub>ox</sub>	Ferredoxina oxidada
Fd <sub>red</sub>	Ferredoxina reducida
G3P	D-Gliceraldehído-3-fosfato
G6P	Glucosa-6-fosfato
h	Hora
<i>p</i> -HMB	<i>p</i> -hidroximercuribenzoato
l	Litro
kDa	Kilodalton
$K_m$	Constante de Michaelis
M	Concentración molar (Moles/l)
$M_m$	Masa molecular
min	Minuto
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido
NEM	N-etil maleimida
~P	Fosfato energetizado
P <sub>i</sub>	Fosfato inorgánico
PCC	Colección de Cultivos del Instituto Pasteur
PGA	3-fosfo-D-glicerato
pI	Punto isoeléctrico
Pir	Piruvato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
p/v	Relación peso/volumen

rpm	Revoluciones por minuto
RPF	Ruta de las Pentosas Fosfato
SAG	Colección de Algas de la Universidad de Göttingen
SDS	Dodecil sulfato sódico
sp.	Especie
RuBP	Ribulosa-1,5-bisfosfato
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlen-diamina
Tricina	N-tris(hidroximetil)metilglicina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
UV	Luz ultravioleta
$V_o, V_e$ ó $V_t$	Volumen vacío, de elución o total
v/v	Relación volumen/volumen
W	Watio

## I. INTRODUCCION

## I. INTRODUCCION

La fotosíntesis es el proceso por el cual el reino vegetal transforma la energía luminosa procedente del sol en energía química. Este proceso resulta en la formación, a expensas de simples sustratos inorgánicos desprovistos de potencial químico útil (agua, dióxido de carbono, nitrato, sulfato), de las complejas moléculas orgánicas que constituyen la base de la vida (De la Rosa y col., 1989).

La fotosíntesis es llevada a cabo por los organismos fotosintéticos: plantas superiores, algas (eucarióticas y procarióticas) y bacterias fotosintéticas. Según el modo de fijación de CO<sub>2</sub> y su incorporación a compuestos hidrocarbonados en la fotosíntesis las plantas superiores se agrupan en tres grandes grupos: C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y crasuláceas (De la Rosa y col., 1989). Las algas, tanto unicelulares como pluricelulares, forman un grupo muy heterogéneo de organismos capaces de realizar fotosíntesis oxigénica que se distinguen de las plantas superiores por la ausencia de tejidos diferenciados. En base a la composición de pigmentos fotosintéticos, al tipo de material de reserva, y a la naturaleza y disposición de los flagelos presentes en las células móviles, las algas eucarióticas se han clasificado en tres grandes divisiones que a su vez se subdividen en doce clases distintas (Staehelin, 1986):

<u>Divisiones</u>	<u>Clases</u>
Clorofitas	Clorofíceas (algas verdes)
	Prasinofíceas (algas verdes)
	Euglenofíceas (euglenoides)
Rodofitas	Rodofíceas (algas rojas)
Cromofitas	Criptofíceas (criptomonadas)
	Dinofíceas (dinoflagelados)
	Crisofíceas (algas marrón-doradas)
	Xantofíceas (algas verde-amarillas)

Bacilariofíceas (diatomeas)

Feofíceas (algas pardas)

Haptofíceas

Eustigmatofíceas

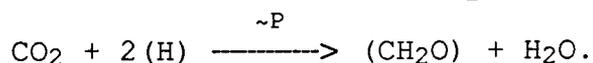
Representantes de las tres grandes divisiones han evolucionado de forma más o menos paralela desde las sencillas formas unicelulares hacia distintos modelos de organización multicelular, hasta alcanzarse en algunas de ellas (algas talofitas) un grado de desarrollo cercano al de las plantas superiores.

Las cianobacterias (algas verde-azuladas o cianofíceas) son procariotas fotosintéticos, capaces de llevar a cabo una fotosíntesis oxigénica, que se dividen en dos grandes grupos según sus características morfológicas: las especies unicelulares, englobadas en las Secciones I y II de la clasificación propuesta por Rippka (Rippka y col., 1988) según se reproduzcan por fisión binaria o por fisión múltiple, y las filamentosas, clasificadas en las Secciones III, IV y V. Las del grupo III no fijan dinitrógeno y sí lo hacen las pertenecientes a los otros dos, al haber diferenciado células especializadas llamadas heterocistos.

De entre los procesos fotosintéticos, la fijación del carbono atmosférico representa uno de los más importantes tanto cualitativa como cuantitativamente. La mayoría de los organismos fotosintéticos asimilan el  $\text{CO}_2$  mediante la ruta metabólica conocida como Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato (CRPF), o ciclo de Calvin. Aunque algunos organismos fotosintéticos han desarrollado rutas alternativas de fijación del  $\text{CO}_2$ , incluso en estos casos el CRPF sigue siendo operativo. A este respecto hay que señalar que los organismos fotosintéticos, incluidas también las bacterias fotosintéticas, no son los únicos capaces de fabricar carbohidratos a partir del  $\text{CO}_2$ ; no obstante, las pocas especies de bacterias

quimiolitotróficas que pueden asimilar  $\text{CO}_2$  sin requerimiento de energía luminosa constituyen más bien raros ejemplos, siendo su aportación al proceso global muy limitada.

En la década de los 50, los grupos de Calvin y Arnon en la Universidad de California (Calvin y Bassham, 1962; Losada y Arnon, 1964; Whatley y Losada, 1964; Arnon, 1977) desvelaron la ruta de fijación del carbono en fotosíntesis, así como los requerimientos en poder reductor (H) y energía de enlace fosfato ( $\sim\text{P}$ ) que el ciclo reductivo-asimilatorio de las pentosas fosfato precisa para superar las barreras energéticas de la transformación del  $\text{CO}_2$  en carbohidrato:



El ciclo está integrado por tres fases: I) fase carboxilativa, en la que una molécula de  $\text{CO}_2$  se incorpora, junto con una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ , a la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), produciendo dos fragmentos de 3-fosfoglicerato (PGA); II) fase reductiva, en la que el grupo carboxilo del PGA se reduce al nivel de aldehído por el NADPH, formando D-gliceraldehído-3-fosfato (G3P); y III) fase regenerativa, en la que parte de las moléculas de triosa-fosfato resultantes de la fase anterior se reajustan para reconstruir la molécula de RuBP aceptora del  $\text{CO}_2$  (De la Rosa y col., 1989).

La operatividad de la fase reductiva del CRPF está determinada por la actividad de la G3P deshidrogenasa (G3P DHasa) fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  (EC. 1.2.1.13), enzima clave en la fase reductiva que cataliza de forma reversible la reducción del 1,3-bisfosfo-D-glicerato (BPGA) a G3P por el NADPH generado fotosintéticamente según la siguiente ecuación:



La G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  es un enzima cloroplástico que ha sido identificado, purificado y caracterizado en una gran variedad de plantas superiores (Slaughter y Davies, 1968; Preiss y Kosuge, 1970; Yonushot y col., 1970; Pupillo y Picardi, 1973; Ferri y col., 1978; Cerff, 1978; Cerff y Chambers, 1979; Cerff, 1982a y b; Ferri y col., 1987; Brikmann y col., 1989) y sus características físico-químicas y cinéticas han sido ampliamente estudiadas. De mucha menos información se dispone en los casos del correspondiente enzima que participa en el CRPF en otros organismos, a saber, de la G3P DHasa dependiente de  $\text{NADP}^+$  de microalgas eucarióticas (Pupillo, 1972; Vacchi y col., 1973; Grissom y Kahn, 1975; Ahrenhöfer, 1979; O'Brien y col., 1979; Heide y Theiss, 1984), de la G3P DHasa de cianobacterias y cianelos, funcional tanto con  $\text{NADP}^+$  como con  $\text{NAD}^+$  (Hood y Carr, 1969; Udvardy y col., 1982; Serrano y Löffelhardt, 1994), y de la G3P DHasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  de bacterias fotosintéticas (Chen y col., 1991).

Las G3P DHasas fosforilantes dependientes de  $\text{NADP}^+$  purificadas de plantas superiores y microalgas (clorofíceas y euglenofíceas), son proteínas tetraméricas, sin grupo prostético definido, de masa molecular ( $M_m$ ) entre 140 y 160 kDa y con grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad enzimática. El carácter hidrofóbico de estos enzimas hace que puedan formar agregados, lo cual hizo que durante un tiempo se creyera en la relevancia fisiológica de una forma de 600 kDa ( $150 \times 4$ ) que exhibe una marcada actividad con NADH, mientras que la forma de baja  $M_m$  (150) es activa predominantemente con NADPH. De hecho, en presencia de reactivos de grupos sulfhidrilo (p.e. DTT) o de concentraciones fisiológicas de  $\text{NADP}^+$  se produce la conversión de los agregados a la forma de baja  $M_m$  (Latzko y Kelly, 1979; O'Brien y col., 1979).

En la "familia" de enzimas con actividad G3P DHasa, la G3P DHasa cloroplástica es excepcional, ya que está formada por dos tipos de subunidades, en contraste con las restantes DHasas que son enzimas homotetraméricas. Tanto la de plantas como la de microalgas eucarióticas (clorofíceas y euglenofíceas), está compuesta por dos subunidades distintas denominadas A y B, de  $M_m$  diferente (subunidad A, 36-38 kDa; subunidad B, 39-43 kDa), que en función de cómo se asocien para formar el tetramero activo definen dos isoenzimas:  $A_2B_2$  (heterotetramero) y  $A_4$  (homotetramero). La subunidad A contiene el sitio catalítico, mientras que la B, de fuerte carácter hidrofóbico, tiene una función estructural y es la responsable de la tendencia del enzima a formar agregados (Cerff, 1979). De hecho, se ha demostrado a partir de las secuencias de los genes correspondientes que la subunidad B de la G3P DHasa cloroplástica de guisante es 92% homóloga a la proteína estructural  $\beta$ -tubulina (Cerff y col., 1986).

Existen bastantes datos de genética molecular sobre las G3P DHasas fosforilantes dependientes de  $NADP^+$ , aunque prácticamente todos ellos han sido obtenidos en plantas superiores (Rossman y col., 1975; Harris y Waters, 1976; Hensel y col., 1989; Liaud y col., 1990; Kersanach y col., 1994). En todos los casos hasta ahora estudiados el enzima está codificado por genes nucleares. Los genes designados *GapA* y *GapB* codifican respectivamente las subunidades A y B del enzima cloroplástico. En plantas superiores el nivel de transcripción del *GapA* está controlado por la luz, de forma que la transición oscuridad-luz incrementa hasta 50 veces el nivel del ARN mensajero correspondiente (Shih y Goodman, 1988).

En distintos tejidos de plantas se han descrito además otras dos G3P DHasas que aun siendo enzimas localizados en el citosol catalizan reacciones diferentes. Una de ellas, la G3P DHasa fosforilante que utiliza  $NAD^+$  como cofactor

(EC 1.2.1.12), participa en glicolisis/gluconeogénesis catalizando la oxidación reversible del G3P a BPGA dependiente de  $P_i$ :

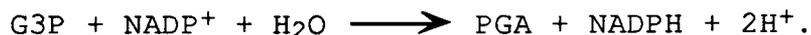


La G3P DHasa fosforilante glicolítica se encuentra presente en el citosol de todos los organismos, tanto eucariotas (animales y vegetales) como procariotas (Fothergill-Gilmore y Michels, 1993). Este enzima, al igual que la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$ , ha sido muy estudiado en organismos fotosintéticos y se ha aislado de un gran número de plantas (McGowan y Gibbs, 1978; Speranza y Gozzer, 1978), donde juega un papel fundamental en la regulación de la ruta glicolítica/gluconeogénica al ser un enzima alostérico.

El enzima glicolítico de plantas es muy similar a su homólogo de organismos no fotosintéticos, resultando ser una proteína homotetramérica de  $M_m$  entre 140 y 160 kDa y con grupos sulfhidrilo en el sitio activo. Las G3P DHasas glicolíticas de plantas están codificadas por una familia de genes nucleares muy similares (aproximadamente 90% de identidad en sus secuencias de nucleótidos) llamados *GapC1*, *GapC2* y *GapC3* (Russell y Sachs, 1989). Las dos G3P DHasas fosforilantes de organismos fotosintéticos, cloroplástica y citosólica, no presentan inmunoreactividad cruzada y sus composiciones de aminoácidos y pépticos trípticos indican diferencias estructurales significativas entre ambos enzimas que han sido confirmados por estudios de genética molecular (Martínez y col., 1989; Fothergill-Gilmore y Michels, 1993).

Desde los trabajos pioneros de Arnon a mediados de los años 50 (Arnon y col., 1954) se sabe que los organismos fotosintéticos eucarióticos contienen además en su citosol una G3P DHasa no fosforilante específica para el  $\text{NADP}^+$ , también denominada G3P: $\text{NADP}^+$  óxido-reductasa (EC 1.2.1.9),

que cataliza a valores de pH fisiológicos la oxidación virtualmente irreversible, directa e independiente de fosfato del G3P a 3-fosfo-D-glicerato (PGA) por el NADP<sup>+</sup> (Kelly y Gibbs, 1973; Iglesias y col., 1987; Iglesias y Losada, 1988)



En contraste con las dos G3P DHasas fosforilantes antes descritas, también presentes en estos organismos y que han sido estudiadas extensivamente, la información disponible sobre el enzima no fosforilante es relativamente escasa. La presencia de este enzima fué puesta por primera vez de manifiesto en tejidos fotosintéticos de plantas superiores por el grupo de Arnon (Arnon y col., 1954). A partir de entonces se han publicado trabajos referentes a la localización y función del enzima en plantas superiores, de las que se ha purificado parcial o totalmente (Rosemberg y Arnon, 1955; Kelly y Gibbs, 1973; Pupillo y Faggiani, 1979). Más recientemente nuestro grupo ha purificado y estudiado más ampliamente el enzima de hojas de espinaca (Iglesias y Losada, 1988) y por primera vez el de microalgas, en concreto del alga clorofícea *Chlamydomonas reinhardtii* (Iglesias y col., 1987). En algunas bacterias no fotosintéticas y en tejidos no fotosintéticos de plantas se ha descrito también una G3P DHasa no fosforilante (Jacob y D'Auzac, 1972; Kelly y Gibbs, 1973; Hensel y col., 1987; Danson, 1988), por lo que se ha propuesto una posible función para este enzima en tejidos gluconeogénicos de plantas alternativa a la fotosintética. La G3P DHasa no fosforilante de la arqueobacteria termofílica *Thermoproteus tenax*, el enzima predominante en células cultivadas heterotróficamente, es sin embargo dependiente de NAD<sup>+</sup> (Hensel y col., 1987). Este enzima podría estar implicado en una ruta alternativa Entner-Doudoroff no fosforilante descubierta en algunas arqueobacterias (Danson, 1988). A este respecto hay que señalar que recientemente se ha

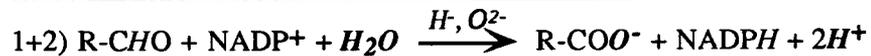
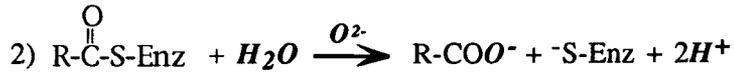
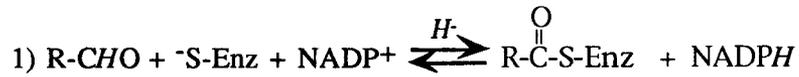
purificado y caracterizado una G3P DHasa no fosforilante dependiente de ferredoxina ( $M_m$  de la subunidad, 63 kDa) en la arqueobacteria *Pyrococcus furiosus* y se ha propuesto su participación en glicolisis en este organismo (Mukund y Adams, 1995). Sin embargo, debido a los datos contradictorios acerca de la presencia generalizada de la G3P DHasa no fosforilante en organismos fotosintéticos (Kelly y Gibbs, 1973), en esta Tesis se ha llevado a cabo el primer estudio detallado sobre la distribución comparativa de las tres actividades G3P DHasas en distintos organismos tanto procariotas como eucariotas (Apdo. III.A).

Aunque se ha sugerido que la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa está implicada, en colaboración con su homóloga cloroplástica y con el translocador triosa-fosfato/3-fosfoglicerato, en la exportación indirecta del poder reductor desde el estroma al citosol (Bamberger y col., 1975; Flügge y Heldt, 1981; Iglesias y col., 1987), su papel fisiológico real está aún por esclarecer de forma definitiva. A este respecto, hemos propuesto recientemente que este enzima puede participar también en la exportación de protones desde el cloroplasto al citosol (Iglesias y col., 1987; Iglesias y Losada, 1988). Llegados a este punto hay que hacer notar que incluso características relevantes de la reacción catalizada por la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa no están correctamente recogidas en la literatura. Así, según la última edición (1992) de las Recomendaciones sobre Nomenclatura de Enzimas de la IUPAC-IUBMB (Nomenclature Committee of IUBMB, 1992), este enzima catalizaría la reacción:



Sin embargo, recientemente se ha propuesto un mecanismo molecular en el que participaría un residuo esencial de cisteína del enzima y conllevaría la liberación

al medio de dos protones en la reacción (Iglesias y col., 1987, Iglesias y Losada, 1988; Losada y col., 1990):



De acuerdo con esta ecuación, un ión hidruro ( $\text{H}^-$ ) es transferido desde el G3P al  $\text{NADP}^+$ , y dos protones de una molécula de agua son finalmente liberados al medio durante el ciclo catalítico -el cual implica la transferencia de un anión óxido ( $\text{O}^{2-}$ ) del agua- mediante la hidrólisis de un intermediario tioéster hasta el producto último PGA.

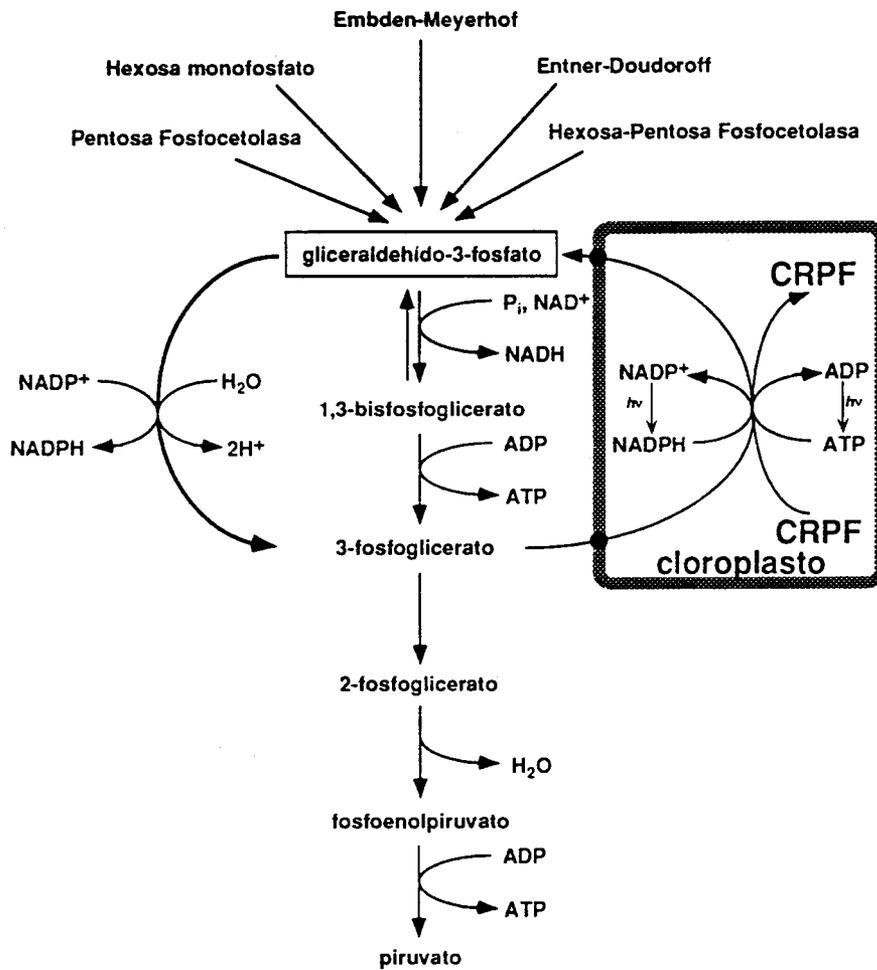
Los estudios de la estructura y caracterización genética de la G3P DHasa no fosforilante son muy recientes. Durante la redacción de esta Tesis, se ha publicado la clonación y caracterización de los cDNAs que codifican la subunidad de 50 kDa de la G3P DHasa no fosforilante de guisante y de maíz (Habenicht y col., 1994). La secuencia de aminoácidos no presenta analogía con las de las G3P DHasas fosforilantes como cabía esperar de la marcada diferencia entre las  $M_m$ s de sus correspondientes subunidades, presentando por el contrario aproximadamente un 30% de identidad con las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) de eubacterias, eucariotas y plantas (Habenicht y col., 1994). La región central de la secuencia de todas las aldehído deshidrogenasas estudiadas y la G3P DHasa no fosforilante comprende unos 60 aminoácidos y contiene tres residuos invariables situados probablemente en el sitio activo: un residuo de Cys en posición 298 y dos restos de Gly en las posiciones 249 y 295. Habenicht y col. (1994) sugieren designar la G3P DHasa no fosforilante, considerado un miembro más de la superfamilia de las ALDHs, y su

correspondiente gen, como GAPN y *GapN* respectivamente. Muy recientemente se ha clonado y secuenciado un gen que codifica una G3P DHasa no fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  de la bacteria *Streptococcus mutans* que carece de las actividades G6P DHasa y 6-fosfogluconato DHasa (Boyd y col., 1995). El gen que codifica este enzima presenta un 50% de identidad en su secuencia de aminoácidos con los genes correspondientes a las G3P DHasas no fosforilantes de guisante y maíz (Habenicht y col., 1994). Este es el único caso hasta ahora conocido de una G3P DHasa no fosforilante procariótica dependiente de  $\text{NADP}^+$  cuya función podría ser el sustituir a los enzimas de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato ausentes en este microorganismo. Aunque el tamaño de las subunidades de la G3P DHasa no fosforilante de *S. mutans* es al igual que la del enzima de eucariotas fotosintéticos de 50 kDa, el enzima nativo no parece ser un homotetrámero ya que la  $M_m$  en condiciones no desnaturizantes es de 350 kDa (Boyd y col., 1995). El que la G3P DHasa no fosforilante de organismos fotosintéticos pueda ser un miembro del grupo de las ALDHs está respaldado también por los trabajos de estereoespecificidad llevados a cabo recientemente con el enzima de espinaca, que presenta estereoespecificidad tipo A respecto del H que se incorpora al  $\text{NADP}^+$  en su forma reducida (Michels y col., 1994). Esta estereoespecificidad es opuesta a la encontrada en las G3P DHasas fosforilantes que son de tipo B (Levy y Betts, 1989) e idéntica a las de las ALDHs, que son de tipo A (Harper Jones y col., 1987). Se ha establecido que todas las DHasas relacionadas evolutivamente retienen la estereoespecificidad (Garavito y col., 1977), lo que apoyaría el que la G3P DHasa no fosforilante forme parte del grupo de las ALDHs.

Aunque el papel fisiológico real de la G3P DHasa no fosforilante no está totalmente aclarado, su participación en las rutas metabólicas de degradación de carbohidratos es una posibilidad cada vez más aceptada. El G3P producido en

la fotosíntesis o por diferentes rutas metabólicas de degradación de carbohidratos puede seguir en el citoplasma la ruta glicolítica hasta piruvato (Esquema 1). La transformación del G3P a BPGA en esta ruta degradativa puede producirse por la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$ , en un proceso reversible dependiente de  $\text{P}_i$  en el que se produce  $\text{NADH}$ , y la posterior transformación del BPGA en PGA por la PGA quinasa acoplada a la formación de ATP. Sin embargo en los organismos fotosintéticos eucarióticos la transformación del G3P en PGA podría realizarse también mediante el enzima G3P DHasa no fosforilante que, sin el requerimiento de  $\text{P}_i$  y en un proceso irreversible, catalizaria la oxidación del G3P liberándose en el proceso dos protones (procedentes en último término del agua) al medio citosólico (véase Esquema 1). Este ramal no fosforilante de la glicolisis podría competir con ventaja dada la mayor afinidad de la G3P DHasa no fosforilante por el G3P ( $K_{ms}$  20-40  $\mu\text{M}$  para la no fosforilante y 200-400  $\mu\text{M}$  para la fosforilante), limitando así la síntesis de ATP por el sistema G3P DHasa fosforilante/PGA quinasa. La reacción de la G3P DHasa no fosforilante, es en este sentido energéticamente exergónica e independiente de la carga energética nuclear y sería relevante como un medio de generar la cantidad de  $\text{NADPH}$  necesaria para el eficiente funcionamiento de las reacciones biosintéticas típicas de los tejidos fotosintéticos. Por otro lado, la actividad de la DHasa no fosforilante se inhibe por la presencia de  $\text{P}_i$ , que es sustrato para la reacción de la G3P DHasa fosforilante. En condiciones de intensa fotosíntesis la concentración de triosa fosfato es alta y la de  $\text{P}_i$  baja (Servaites y col., 1983). La actividad de la DHasa no fosforilante estaría claramente favorecida en estas condiciones y controlada por los cambios en la concentración de  $\text{NADPH}$ .

Recientemente Duff y col. (1989) han mostrado que suspensiones de células vegetales cultivadas en condiciones



El gliceraldehido-3-fosfato como encrucijada metabólica común a diversas rutas del metabolismo intermediario y fotosintético del carbono

# ESQUEMA 1

de deficiencia en fosfato presentan una marcada inhibición de varios enzimas glicolíticos, entre ellos la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$ , simultáneamente con un aumento en los niveles de actividad de la G3P DHasa no fosforilante y de quinasas glicolíticas dependientes de pirofosfato. Estos autores sugieren que en situaciones de "hambre" de fosfato se activaría un mecanismo coordinado de inducción enzimática que haría funcional una ruta glicolítica alternativa de bajo consumo de fosfato, mediado por la DHasa no fosforilante. Estos resultados son contradictorios, sin embargo, con estudios posteriores realizados en plantas intactas (Rychter y Randall, 1994), en las cuales la situación de deficiencia en fosfato produce la inhibición de las actividades enzimáticas dependientes de ATP de la glicolisis y la acumulación de formas no fosforiladas de hexosas en las vacuolas.

Los procesos metabólicos que tienen lugar en el citoplasma necesitan del poder reductor que se genera fotosintéticamente en los cloroplastos, los cuales se encuentran rodeados de una doble membrana impermeable a los metabolitos que constituyen los productos de la fase luminosa de la fotosíntesis (Robinson y Stocking, 1968). Aunque no está aún claro cual es el proceso que interviene en la exportación del poder reductor del cloroplasto al citoplasma, se ha propuesto que debe exportarse al citosol de forma indirecta con el concurso de proteínas integrales en la membrana interna del cloroplasto (Flügge y Heldt, 1984). En efecto, la mayor parte del carbono fijado en la fotosíntesis es exportado al citosol en forma de triosa-fosfato (G3P y dihidroxiacetona-fosfato) con el concurso del translocador triosa-fosfato/fosfato, una proteína integral de membrana que constituye más del 50% de la proteína de la membrana interna del cloroplasto (Flügge y Heldt, 1984). Ya que los nucleótidos fosfato no pueden atravesar la membrana del cloroplasto se ha propuesto la participación de la G3P DHasa no fosforilante junto con el

traslocador triosa fosfato/3-fosfoglicerato en un sistema de exportación indirecta de poder reductor del estroma del cloroplasto al citosol (Bamberger y col., 1975; Iglesias y col., 1987; Losada y col., 1990; esta Tesis). Nuestro grupo ha propuesto que este enzima junto con la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  cloroplástica participaría en cooperación con el translocador de triosas fosfato, en el transporte, a expensas de la energía del ATP, no sólo de iones hidruro sino también de protones y PGA del estroma al citosol (Losada y col., 1990; Losada, 1992 a; esta Tesis). De esta forma se mantendrían los altos niveles citosólicos de NADPH y el gradiente de pH de casi dos unidades existente entre el estroma cloroplástico y el citosol en condiciones de fotosíntesis activa.

Los estudios sobre las G3P DHasas de organismos fotosintéticos se han llevado a cabo, principalmente, en plantas superiores. La distribución y localización del enzima no fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  y por tanto su función no quedaban sin embargo bien establecidas en la bibliografía (Fuller y Gibbs, 1959; Kelly y Gibbs, 1973). Por ello uno de los objetivos de este trabajo ha sido realizar un estudio comparativo detallado de la distribución de las tres G3P DHasas en distintos grupos de organismos con especial énfasis en las microalgas, dado que la información disponible sobre las DHasas de estos organismos es muy escasa.

Los estudios de tipo fisiológico presentados en esta Tesis se han basado en la determinación de los niveles de actividad específica en cultivos de diversas microalgas sometidos a distintas condiciones nutricionales aprovechando que son organismos muy versátiles metabólicamente capaces de desarrollarse en diversas condiciones de cultivo (luz/oscuridad, autotrofia/fotomixotrofia/heterotrofia). La actividad de la G3P DHasa cloroplástica de plantas está regulada por

diversos factores en respuesta a la iluminación (forma activa en la luz e inactiva en la oscuridad). Ziegler y Ziegler (1965) pusieron de manifiesto los cambios de actividad del enzima en relación con el grado de iluminación de preparaciones de cloroplastos de espinacas. Otros autores han mostrado de igual forma la activación del enzima procedente de plantas superiores en la luz y su inactivación en la oscuridad (Hudock y Fuller, 1965). Sin embargo, existe cierta controversia al respecto ya que recientemente se han obtenido evidencias de que la activación por luz de la G3P DHasa cloroplástica no ocurre en microalgas eucarióticas ni en cianobacterias (Takeda y col., 1994). Los trabajos realizados en plantas muestran que los cambios en los niveles de actividad de los enzimas del ciclo de Calvin que tienen lugar en periodos de tiempo relativamente cortos (en cuestión de minutos, p.e. 15-30 min) son consecuencia de procesos de activación por luz y modulación por metabolitos mientras que aquellos cambios en los niveles de actividad que tienen lugar a tiempos más largos (varias horas) son consecuencia de una variación en la cantidad de enzima debida a la regulación de la síntesis de proteína. Para los enzimas del ciclo de Calvin, a excepción de la subunidad grande de la RuBP carboxilasa, la síntesis de proteína está bajo control nuclear (Halliwell, 1984). A este respecto hay que señalar que en microalgas no se han realizado estudios detallados sobre los efectos de las condiciones nutricionales sobre la actividad enzimática de la G3P DHasa cloroplástica. Por otra parte los datos sobre la incidencia de la luz y el cambio a la oscuridad sobre la actividad fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$ , son extremadamente escasos en la bibliografía y ello es consecuencia de los pocos estudios encaminados a elucidar la funcionalidad de la ruta glicolítica en la luz (Fothergill-Gilmore y Michels, 1993). La información sobre los cambios en los niveles de actividad de la G3P DHasa no fosforilante es muy limitada y no se dispone de datos debido a los pocos estudios realizados sobre este enzima.

Fuller y Gibbs (1959) ya señalaron que la actividad de la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  disminuía en ciertas algas cultivadas heterotróficamente. Este comportamiento de la actividad enzimática se observó también con otros enzimas cloroplásticos: carboxidismutasa y fructosa-1,6-bifosfatasa alcalina (Smillie y Fuller, 1960). Estos autores observaron además la disminución de la actividad enzimática en cultivos anaeróbicos.

El metabolismo dependiente de luz de compuestos orgánicos por microalgas ha sido estudiado intensivamente sólo en un número limitado de especies. La ruta metabólica implicada en el fotometabolismo de diferentes compuestos orgánicos difiere de acuerdo con la naturaleza química del compuesto y del organismo en cuestión. Sin embargo, algunos aspectos son comunes a todos los sustratos y todas las microalgas: el fotometabolismo requiere energía luminosa en forma de ATP, y la presencia de  $\text{CO}_2$  puede producir una competencia por el ATP y el NADPH entre la fotometabolización del compuesto orgánico y la fijación fotosintética de  $\text{CO}_2$  (Wiessner, 1979). Las principales rutas fotometabólicas en diferentes organismos pueden ser descritas estudiando el metabolismo del acetato y de la glucosa. El acetato puede ser asimilado en la luz por un amplio grupo de algas eucarióticas (p.e., *C. reinhardtii*). Algunas son fototrófos obligados siendo incapaces de crecer en la oscuridad, otros pueden llevar a cabo un crecimiento heterotrófico. Siguiendo la asimilación del acetato, éste puede ser incorporado principalmente en lípidos o entrar como carbohidratos y proteínas. En el último caso, el metabolismo del acetato en la luz depende estrictamente de la fotofosforilación cíclica ya que su fotoasimilación no se afecta por la presencia de DCMU. La incorporación del esqueleto carbonado del acetato como constituyente de la célula tiene lugar con la participación del ciclo de los ácidos tricarbónicos, el ciclo del glioxilato y la

gluconeogénesis a hexosas fosfato a partir de fosfoenolpiruvato. El fotometabolismo del acetato puede afectar los niveles de enzimas implicadas en el metabolismo del carbono. Por ejemplo, un enzima clave de la ruta del glioxilato, la isocitrato liasa, está sujeta a represión catabólica y aparece con muy baja actividad en algas cultivadas autotróficamente, pero la actividad enzimática aumenta significativamente por la presencia de acetato (John y col., 1970). Por el contrario, en *Chlamydomonas stellata* y *Chlamydomonas mundana* el crecimiento en acetato dependiente de luz reduce marcadamente la actividad del enzima del ciclo de Calvin ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (Wiessner y French, 1970).

La glucosa y otras hexosas pueden ser fotometabolizadas por algas de los géneros *Chlorella*, *Ankistrodesmus* y *Scenedesmus* bajo condiciones aeróbicas ó anaeróbicas (Bishop, 1961). En *Chlorella vulgaris* bajo condiciones aeróbicas, como en otras muchas algas verdes, la asimilación de glucosa observada en la luz es sólo ligeramente superior a la determinada en la oscuridad. El activo metabolismo de la glucosa en la oscuridad muestra la capacidad de la fosforilación oxidativa para suministrar ATP a todas las reacciones que requieren energía en la asimilación de la glucosa. La secuencia enzimática implicada en el metabolismo de la glucosa supone la participación de la ruta Embden-Meyerhof y la ruta oxidativa de las pentosas fosfato. En condiciones de anaerobiosis la asimilación de la glucosa en la oscuridad produce principalmente oligosacaridos y polisacáridos. Por otra parte en base a resultados de requerimientos cuánticos, estudios de inhibidores y de mutantes con alteraciones en uno u otro fotosistema, se ha establecido una participación de la fotofosforilación ciclica en el fotometabolismo anaeróbico de la glucosa en algas (Wiessner, 1979). De hecho, la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub> se reduce drásticamente por la asimilación de la

glucosa por microalgas y se ha sugerido que ello es consecuencia de la competencia por el ATP (Bishop, 1961). Estos datos nos han llevado a realizar un estudio detallado de la evolución de las actividades de las tres G3P DHasas durante el desarrollo de cultivos de diversas microalgas unicelulares, principalmente de las clorofíceas *C. reinhardtii* y *Chlorella fusca*, en respuesta a diferentes condiciones nutricionales incluyendo la presencia de las fuentes de carbono orgánico asimilables acetato y glucosa, habiéndose demostrado por vez primera la existencia en clorofíceas de una regulación diferencial de las dos G3P DHasas dependientes de  $\text{NADP}^+$  por las condiciones nutricionales del medio (véase Apdo. III.C).

En resumen, uno de los objetivos alcanzados por esta Tesis Doctoral ha sido la verificación de la presencia constante y exclusiva de la G3P DHasa no fosforilante en organismos fotosintéticos eucarióticos, representantes de prácticamente todos los grandes grupos taxonómicos de microalgas y de plantas superiores (véase Apdo. III.A), habiéndose demostrado además la existencia de una regulación diferencial de las tres G3P DHasas por las condiciones nutricionales (véase Apdo. III.C). Se muestra el primer estudio comparativo del efecto de la glucosa y otros azúcares metabolizables sobre los niveles celulares de las tres actividades G3P DHasas presentes en microalgas clorofíceas. Se describe además un método alternativo al descrito por Iglesias y col. (1987) para la purificación de la G3P DHasa no fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  de la microalga *C. reinhardtii*, lo que ha permitido obtener las preparaciones purificadas del enzima necesarias para llevar a cabo estudios *in vitro* sobre su función. Se presentan las primeras medidas de la acidificación concomitante con la reacción de deshidrogenación catalizada por la G3P: $\text{NADP}^+$  óxido-reductasa y la caracterización de esta actividad de generación de protones (Apdo. III.E). Se describe finalmente un sistema reconstituído formado por enzimas

solubles (PGA quinasa, G3P DHasa fosforilante glicolítica y G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa) que puede resultar muy útil como sistema modelo en Bioenergética y que es capaz de generar protones, detectables en medios no tamponados, a expensas de la energía del ATP (véase Apdo. III.E).

Parte de los resultados presentados en esta Tesis han sido comunicados a Congresos de carácter nacional (Congreso Nacional de Bioquímica, Alicante, 1989; Congreso Nacional de Bioquímica, Oviedo, 1990) e internacional (III Congreso Luso-Español de Bioquímica, Santiago de Compostela, 1988; Advanced Course TRENDS IN PHOTOSYNTHESIS RESEARCH, Palma de Mallorca, 1990; IV Portuguese-Spanish Biochemistry Congress, Povia de Varzim, Portugal, 1991), o han sido publicados en los siguientes artículos en revistas internacionales:

A. Serrano, M.I. Mateos and M. Losada (1991) Differential regulation by trophic conditions of phosphorylating and non-phosphorylating NADP<sup>+</sup>-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in *Chlorella fusca*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **180(3)**, 1077-1083.

M.I. Mateos and A. Serrano (1992) Occurrence of phosphorylating and non-phosphorylating NADP<sup>+</sup>-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in photosynthetic organisms. *Plant Science* **84**, 163-170.

A. Serrano, M.I. Mateos and M. Losada (1993) ATP-driven transhydrogenation and ionization of water in a reconstituted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (phosphorylating and non-phosphorylating) model system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **197(3)**, 1348-1356.

## II. MATERIALES Y METODOS

## II. MATERIALES Y METODOS

### II.A. Organismos y condiciones de cultivo

#### II.A.1. Organismos empleados

Los organismos empleados en este trabajo han sido los siguientes:

-Algas eucarióticas unicelulares: las clorofíceas *C. reinhardtii* 6145c (obtenida del Dr. R. Sager, Hutner College, New York, EE.UU.), *C. fusca* SAG 211-15, *Monoraphidium braunii* SAG 202-7c (de la Colección de Cultivos de Algas de la Universidad de Göttingen, R.F.A.), *Scenedesmus obliquus* SAG 276-3a (Göttingen), *Chlorella protothecoides* SAG 211-10a, *Chlorella variegata* ATCC 30409 (de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD, EE.UU.); la euglenofícea *Euglena gracilis* SAG 1224-5/15 (Göttingen); las bacilariofíceas (diatomeas) *Phaeodactylum tricornutum* SAG 1090-1a (Göttingen), *Navicula pelliculosa* SAG 1050-3 (Göttingen); la rodofícea *Porphyridium purpureum* SAG 1380-1a (Göttingen); la crisofícea *Ochromonas danica* SAG 933-7 (Göttingen); la criptofícea *Cryptomonas ovata* SAG 979-3 (Göttingen), y el alga xantofícea *Bumilleriopsis filiformis* SAG 809-2 (Göttingen).

-Cianobacterias (algas verde-azuladas): las estirpes unicelulares no fijadoras de nitrógeno *Synechocystis* sp. PCC 6803 (de la Colección de Cultivos del Instituto Pasteur, Paris, Francia), *Synechococcus* sp. (antes *Anacystis nidulans*) SAG L-1402-1 (Göttingen), la filamentosa no fijadora de dinitrógeno: *Spirulina platensis* SAG 85-79 (Göttingen); y las cianobacterias filamentosas fijadoras de dinitrógeno: *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Anabaena* sp. ATCC 33047 (Rockville), *Nostoc pruniforme* SAG 61-79 (Göttingen),

*Calothrix* sp. PCC 7601, *Scytonema* sp. PCC 7110 y *Fischerella* sp. PCC 7414 (Paris).

-El protista fotosintético (endocianoma) *Cyanophora paradoxa* LB555 UTEX (obtenido del Dr. W. Löffelhardt, Institut für Allgemein Biochemie und Ludwig-Boltzmann Forschungsstelle für Biochemie, Universität Wien, Austria).

-Microorganismos no fotosintéticos: las bacterias *Escherichia coli* K-12, *Azotobacter chroococum* ATCC 4412, y los hongos *Sacharomyces cerevisiae* sp. S288C y *Phycomyces blakesleeanus* sp. NRRL 1555 (cedidos por el Departamento de Genética y Biotecnología de la Universidad de Sevilla); los protozoos ciliados *Tetrahymena pyriformis* ATCC 30005 y *Paramecium tetraurelia* ATCC 30567, y la bacteria *Rhizobium fredii* sp. 1782-2010 (cedidos por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla); y la arqueobacteria halofílica *Haloferax mediterranei* (antes *Halobacterium* sp. ATCC 33500, cedida por el Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Universidad de Sevilla).

-Plantas superiores: las semillas de cebada (*Hordeum vulgare* L., var. Hassan), maíz (*Zea mays* L., var. Caldera 535), girasol (*Helianthus annuus* L., var. Sunweed SW101), y las plantas crasuláceas *Kalanchoë blossfeldiana* v. Poelln y *Sedum arenarium* Brot., fueron cedidas por el Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Sevilla. Las plantas de espinaca (*Spinacea oleracea* L.) fueron adquiridas en una granja y las hojas de *Lolium multiflorum* Lam. (ray grass) fueron recolectadas en parcelas localizadas al aire libre en el Instituto de Agrobiología y Recursos Naturales (CSIC) de Sevilla.

## II.A.2. Condiciones de cultivo

### II.A.2.1. Condiciones estándar de cultivo

Los cultivos de suspensiones de microalgas se desarrollaron en condiciones de esterilidad en medios líquidos utilizando para los estudios fisiológicos frascos de Roux de vidrio de 1 l, conteniendo 750 ml de cultivo, y botellones de vidrio de 10 ó 20 l de capacidad, en este caso para obtener el material biológico de partida necesario para las purificaciones de proteínas. En este último caso se omitieron las condiciones de esterilidad, si bien el inóculo era estéril, sin que se observaran problemas de contaminación.

Las microalgas clorofíceas (*C. reinhardtii*, *C. variegata*, *C. fusca*, *C. protothecoides*, *M. braunii* y *S. obliquus*), y el alga xantofícea *B. filiformis*, se cultivaron en sus correspondientes medios minerales mínimos (Sueoka y col., 1967; Sandmann y col., 1983) a 25 °C. La euglenofícea *E. gracilis* se cultivó a la misma temperatura en el medio mineral descrito por Böger y San Pietro (1967). El alga rodofícea *P. purpureum* se cultivó a 27 °C en un medio marino sintético (Sandmann y col., 1983). Las microalgas flageladas *O. dánica* (crisofícea), *C. ovata* (criptofícea) y las diatomeas *P. tricornutum* y *N. pelliculosa* (bacilariofíceas) se cultivaron a 25 °C en los correspondientes medios líquidos (Hutner y col., 1967; Schlösser y col., 1982; SERI, 1986).

Las cianobacterias *Synechococcus* sp., *A. variabilis*, *N. pruniforme*, *S. platensis*, *Synechocystis* sp., *Calothrix* sp., *Scytonema* sp. y *Fischerella* sp., se cultivaron en el medio mineral de Arnon o en medio BG11 (Rippka, 1988) a 30 °C, excepto *Synechococcus* sp. y *Fischerella* sp. que se mantuvieron a 40 °C. La

cianobacteria marina *Anabaena* sp. ATCC 33047 se cultivó a 40 °C en un medio mineral modificado del descrito por Provasoli (Gotto y col., 1979).

Los cultivos se mantenían en sus respectivos medios líquidos con iluminación fluorescente continua (25 W m<sup>-2</sup>) y el medio se burbujeó con aire suplementado con 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>.

Los cultivos del endocianoma *C. paradoxa* se mantuvieron a 25 °C en un medio mineral líquido (Bothe y Floener, 1978) en matraces Erlenmeyer, bajo luz fluorescente continua y agitación constante durante todo el desarrollo de los cultivos.

La semillas de cebada, maíz y girasol germinaron y se cultivaron en recipientes plásticos con vermiculita en una habitación acondicionada a 25 °C bajo luz fluorescente continua (25 W m<sup>-2</sup>). Las plántulas, las cuales se recolectaron con una altura de entre 10 y 15 cm, se regaban diariamente con la disolución de nutrientes minerales de Hewitt (Hoagland y Snyder, 1933).

#### II.A.2.2. Condiciones especiales de cultivo

Para estudiar el efecto de la oscuridad sobre los niveles celulares de las actividades enzimáticas, el recipiente conteniendo la suspensión celular de microalgas se envolvía con papel de aluminio hasta obtener una oscuridad absoluta en el interior. Las condiciones de gaseo y temperatura no se alteraban.

Los cultivos sin fuente de carbono inorgánico se obtenían burbujeándolos con aire del que se eliminaba el CO<sub>2</sub> haciéndolo pasar previamente por una suspensión de agua de barita (Ba(OH)<sub>2</sub>, 0,2 M).

Las condiciones de cultivo en anaerobiosis (microanaerobiosis, en el caso de cultivos iluminados) se consiguieron burbujeando los cultivos con N<sub>2</sub>.

Para estudiar el efecto de las condiciones fotomixotróficas y heterotróficas sobre el crecimiento y los niveles celulares de las actividades enzimáticas de microalgas, la fuente de carbono orgánico se añadía al medio de cultivo autoclavado como una disolución concentrada, estéril por filtración, del compuesto carbonado. En el caso de *C. reinhardtii* la fuente de carbono orgánico fué acetato sódico (50 mM en el medio de cultivo); en el caso de *C. fusca* se utilizaron diversos azúcares, todos los cuales se añadieron al medio de cultivo a una concentración final del 5% (p/v). La adición de otros compuestos tales como inhibidores o antibióticos se llevó a cabo también en condiciones de esterilidad usando disoluciones concentradas previamente esterilizadas por filtración.

En los experimentos en que era necesario algún cambio en la composición del medio durante el desarrollo de los cultivos, éstos se centrifugaban a 30 °C (12000 x g, 10 min) y las células se lavaban y resuspendían finalmente en condiciones de esterilidad en el medio modificado.

### II.A.3. Recogida de células

Para las determinaciones de los niveles de las actividades enzimáticas llevadas a cabo en los estudios fisiológicos se tomaban, en condiciones de esterilidad, muestras de volúmenes adecuados de cultivos de microalgas y otros microorganismos eucarióticos, y se recogían las células por centrifugación a 4 °C (12000 x g, 10 min).

Para recoger células de grandes volúmenes de cultivo de microalgas, destinadas a purificaciones enzimáticas, se empleaba un sistema de centrifugación en flujo continuo Szent-Gyorgyi-Blum (Sorvall, EE.UU.). El rendimiento medio de los cultivos de *C. reinhardtii* fué de aproximadamente 2 g de peso fresco por litro de medio de cultivo tras cuatro días de crecimiento.

Las bacterias (cianobacterias, bacterias no fotosintéticas) se recogieron por centrifugación a 15000 x g durante 10 min a 4 °C.

## **II.B. Preparación de extractos celulares**

Las muestras de cultivos celulares en diferentes estadios de crecimiento y desarrollados en diversas condiciones nutricionales se recogieron por centrifugación a 4 °C (12000 x g, 10 min), se lavaron dos veces con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) conteniendo EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM (tampón de lavado), y las células se resuspendían finalmente en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) conteniendo EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 2 mM y ácido ε-aminocaproico 5 mM (tampón de rotura), a razón de 2 ml de tampón por 40 ml de volumen de medio recogido en cada caso.

### **II.B.1. Rotura celular por ultrasonidos**

Los extractos celulares de los microorganismos empleados en este trabajo, tanto procariotas como eucariotas, se obtenían habitualmente mediante rotura celular por tratamiento con ultrasonidos. La suspensión celular en tampón de rotura se sometía a tratamiento con ultrasonidos, usando un sonicador Branson modelo B-12, durante tres periodos de 30 segundos alternando con otros tantos de igual duración en los que se

interrumpía el tratamiento, a fin de evitar subidas excesivas de temperatura. Durante todo el proceso, el recipiente conteniendo la suspensión celular se mantenía sumergido en un baño de agua con hielo a 0 °C. La frecuencia de la oscilación fué de 20 kHz y la potencia aproximadamente 80 W. Tras el tratamiento con ultrasonidos, la suspensión celular se centrifugaba a 40000 x g durante 20 min a 4 °C . El sobrenadante de esta segunda centrifugación constituía el extracto crudo.

## II.B.2. Otros métodos de rotura celular

### II.B.2.1. Rotura por congelación-descongelación

En algunos casos las suspensiones celulares de microalgas eucarióticas, tras la recogida y lavado con tampón como se describió anteriormente, se rompieron por congelación a -80 °C y posterior descongelación a temperatura ambiente.

Tras el lavado, el material celular se recogía por centrifugación a 5000 x g durante 15 min a temperatura ambiente y se almacenaba a -80 °C durante 24 h en pequeñas porciones, para favorecer una rápida congelación. La masa celular se resuspendía luego en tampón de rotura (2 ml de tampón por g de peso fresco de células) y se dejaba descongelar a temperatura ambiente con agitación suave. La suspensión obtenida se centrifugaba a 40000 x g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante de esta centrifugación relativamente libre de pigmentos constituyó el extracto crudo. Este método de rotura fué el usado habitualmente para las purificaciones enzimáticas. En los experimentos sobre localización celular de las G3P DHasas, el precipitado obtenido por centrifugación a alta velocidad, que contenía casi todos los pigmentos fotosintéticos, se

resuspendió en igual volumen de tampón, se sometió a tratamiento con ultrasonidos como se indica en el Apdo. II.B.1 y se centrifugó nuevamente a alta velocidad.

#### II.B.2.2. Rotura por congelación rápida con nitrógeno líquido

Los tejidos vegetales y, en algunas ocasiones, las células de microalgas eucarióticas se rompieron por congelación rápida con nitrógeno líquido. El material celular libre de medio de cultivo, procedente de cultivos líquidos de microalgas o en su caso las hojas o raíces de plantas superiores, previamente troceadas, se disponían en un mortero de porcelana preenfriado en un baño de hielo, se añadía nitrógeno líquido y se maceraba con fuerza para romper el material celular. La operación se repetía varias veces hasta conseguir un polvo fino al que se añadía tampón de rotura (2 ml por gramo). La suspensión obtenida se mantenía en un baño de hielo durante 15 min con lo que se completaba la extracción del material soluble. Las preparaciones de hojas y raíces de plantas superiores se filtraban a través de organdi de nylon. Las preparaciones así obtenidas se centrifugaban a 15000 x g durante 20 min a 4 °C, y el sobrenadante se consideraba como el extracto crudo.

#### II.B.2.3. Obtención de cloroplastos de hojas de espinaca

El método usado para la obtención de extractos de hojas de espinaca (*S. oleracea*) es el descrito por Kuwabara y Murata (1982).

Las hojas de espinaca se trituraron durante 20 s mediante una batidora Waring 31BL67, con tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 7,4). El homogenado se filtró a

través de organdi de nylon y se centrifugó a 15000 x g durante 20 min a 4 °C, recogiendo un primer extracto libre de material cloroplástico. El precipitado se resuspendió en el tampón anterior suplementado con 0,3 M sacarosa y 0,05 M NaCl. Tras centrifugar a 20000 x g durante 25 min a 4 °C se recogió un nuevo sobrenadante que contenía el material cloroplástico.

## **II.C. Ensayos de las actividades enzimáticas**

### **II.C.1. Ensayo *in vitro* de la actividad G3P DHasa no fosforilante**

La actividad G3P DHasa no fosforilante dependiente de NADP<sup>+</sup> fué determinada espectrofotométricamente a 30 °C midiendo la producción de NADPH a 340 nm (Iglesias y col., 1987). La mezcla de ensayo contenía tampón Tricina-NaOH 50 mM (pH 8,5), 0,4 mM NADP<sup>+</sup>, 1 mM G3P y una cantidad adecuada de preparación enzimática en un volumen total de 1 ml.

El D-G3P se obtuvo por hidrólisis ácida a partir de la sal disódica del D-gliceraldehído-3-fosfato dietilacetal siguiendo las indicaciones del fabricante (Sigma Química, 1990).

Alternativamente, la actividad enzimática fué determinada mediante generación de G3P *in situ* a partir de D-fructosa-1,6-bisfosfato mediante el enzima aldolasa. En este caso la mezcla de ensayo contenía, en lugar de G3P, 2 mM de D-fructosa-1,6-bisfosfato y 2 U de aldolasa (EC 4.1.2.13, una preparación comercial de enzima de músculo de conejo, 11 U/mg de proteína).

### II.C.2. Ensayos *in vitro* de las actividades G3P DHasas fosforilantes

Las actividades G3P DHasa fosforilantes, dependientes de NADP<sup>+</sup> o de NAD<sup>+</sup>, se determinaron usando el mismo medio de reacción antes descrito para el enzima no fosforilante conteniendo 0,4 mM del piridín nucleótido correspondiente, pero suplementado en este caso con 10 mM Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>.

La actividad de la G3P DHasa fosforilante dependiente de NADP<sup>+</sup> fué ocasionalmente determinada mediante la reacción inversa (biosintética) o de formación de BPGA a partir de G3P, midiendo espectrofotométricamente la oxidación de NADPH a 340 nm (Iglesias y col., 1987). La mezcla de reacción contenía tampón Tricina-NaOH 50 mM (pH 7,5), 2 mM ATP, 4 mM PGA, 0,2 mM NADPH, 2 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 U de PGA quinasa de levadura, y una cantidad adecuada de preparación enzimática hasta un volumen final de 1 ml. La actividad G3P DHasa dependiente de NAD<sup>+</sup> se determinó de igual forma pero sustituyendo el nucleótido usado como sustrato.

Una unidad de enzima se definió como la cantidad que cataliza la formación de 1  $\mu$ mol de piridín nucleótido reducido por min en las condiciones específicas de la reacción.

En todas las determinaciones se realizaban medidas de control en ausencia del correspondiente sustrato (G3P ó BPGA) y la preparación enzimática.

### II.C.3. Determinación de la actividad de generación de protones por la G3P DHasa no fosforilante

Los cambios de pH en el medio durante el transcurso de la reacción redox catalizada por la G3P

DHasa no fosforilante purificada de *C. reinhardtii* se midieron utilizando un microelectrodo combinado de pH de alta impedancia Ingold, modelo LoT-405-M5, conectado a un pHmetro digital Beckman 4500. La reacción se llevó a cabo a 30 °C con agitación magnética continua en mezclas de reacción no tamponadas de 4 ml que contenían: 100 mM NaCl, 2,5 mM NADP<sup>+</sup>, 1,5 mM G3P, y una cantidad adecuada de enzima añadida en un volumen aproximado de 5  $\mu$ l. Se empleó cloruro sódico para conseguir la fuerza iónica adecuada y estabilizar la respuesta del electrodo. Como sustrato del enzima se usaron preparaciones recientes de G3P, obtenidas por hidrólisis ácida del dietilacetil. Salvo que se indique otra cosa el medio de ensayo se llevó, antes de la adición de los sustratos, hasta un valor de pH entre 8,0 y 9,0 -el rango de pH óptimo para la actividad deshidrogenasa del enzima (Iglesias y col., 1987)- mediante la adición de 2  $\mu$ l de una disolución 4 M de NaOH. Tras la estabilización del pH, la reacción se iniciaba por la adición del enzima. Los cambios de pH del medio durante el curso de la reacción se recogieron mediante un registrador Knauer. Los rápidos cambios de pH observados inmediatamente después de la adición del enzima o de los reactivos eran artefactos debidos a las pequeñas diferencias de pH entre la mezcla de ensayo no tamponada y las preparaciones de enzima o del reactivo correspondiente. La producción de protones en el transcurso de la reacción de deshidrogenación se expresaba en  $\Delta$ pH/h por mg de proteína de la misma forma que se ha descrito en el método electrométrico de determinación de la actividad colinesterasa (Whittaker, 1984). Típicamente se obtuvieron velocidades en el rango 800-1000  $\Delta$ pH/h por mg de proteína para las preparaciones purificadas de enzima en las condiciones anteriormente descritas. La adición de los reactivos a la mezcla de ensayo se llevó a cabo con jeringas de precisión Hamilton en un volumen máximo de 10  $\mu$ l.

El mismo sistema de medida se usó cuando se llevó a cabo la reacción reductiva inversa, es decir, la reducción dependiente de ATP del PGA a G3P por el NADH, catalizada por la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  (una preparación comercial de G3P DHasa de músculo de conejo, 120 U/mg de proteína, Sigma Chem. Co.). El BPGA fué generado *in situ* por fosforilación del PGA con la correspondiente quinasa (EC 2.7.2.3; una preparación comercial de PGA quinasa de levadura, 2000 U/mg de proteína, Sigma Chem. Co.). En este caso la mezcla de ensayo, de 4 ml, contenía 100 mM NaCl, 5 mM PGA, 1,5 mM ATP, 0,25 mM  $\text{MgSO}_4$  y 2,5 mM NADH. El pH inicial se ajustó entre 8 y 9 como se indicó anteriormente, se añadió un exceso (15 U) de PGA quinasa y tras la estabilización de la señal la reacción se iniciaba por adición de la G3P DHasa (4 U).

Cuando las reacciones catalizadas por las G3P DHasas, fosforilante y no fosforilante, se acoplaron usando el G3P generado *in situ* como sustrato intermediario, el medio de ensayo fué el mismo que el empleado para el enzima fosforilante, pero en este caso se añadió, una vez ajustado el pH, 2,5 mM de  $\text{NADP}^+$  y una cantidad adecuada de G3P: $\text{NADP}^+$  óxido-reductasa (40-60 mU). Tras la estabilización de la señal, la reacción acoplada se inició por la adición de una cantidad exceso de G3P DHasa fosforilante (4-5 U, aproximadamente 100 veces más que enzima no fosforilante). Debido a las cantidades relativas de los enzimas, la reacción catalizada por la G3P: $\text{NADP}^+$  óxido-reductasa se puede considerar como el "cuello de botella" del proceso global que lleva a cabo el sistema reconstituído completo (PGA quinasa, G3P DHasa fosforilante y G3P: $\text{NADP}^+$  óxido-reductasa).

## II.D. Métodos analíticos

### II.D.1. Determinación de clorofila

El contenido celular en clorofila de los cultivos de microalgas se determinó espectrofotométricamente en extractos de células obtenidos con metanol, según una modificación del método descrito por Mackinney (1941).

La suspensión celular (0,5 a 1,0 ml) se centrifugó 2 min a 12000 x g en una centrifuga Eppendorf y el sedimento se resuspendió en 1 ml de metanol absoluto. Tras agitar vigorosamente durante 1 min y calentar en baño de agua durante 2 min, la preparación se centrifugó de nuevo 2 min a 12000 x g, determinándose la concentración de clorofila en el sobrenadante a partir de su absorbancia a 665 nm. El coeficiente de extinción empleado es  $13,43 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### II.D.2. Determinación de proteína

El contenido de proteína de los cultivos de microalgas se determinó directamente a partir de células enteras siguiendo la modificación de Markwell del método de Lowry (Markwell y col., 1987), apropiada para preparaciones que contienen membranas y empleando seroalbúmina bovina (BSA) como patrón.

En los procesos de purificación enzimática y cuando se trabajó con extractos crudos libres de células, la proteína se determinó siguiendo el método de Lowry con las modificaciones de Bailey (1967).

Para preparaciones enzimáticas de mayor pureza o en los casos en los que el método anterior no se podía usar por interferencia con el tampón de la muestra, la proteína se determinó según el método de Bradford

(1976), usando el reactivo para proteínas de Bio-Rad (Richmond, EE. UU.) y siguiendo el procedimiento de "microensayo" (1-20  $\mu\text{g}$  proteína/ml) recomendado por dicha firma comercial (Bio-Rad Protein Assay, 1979). Las rectas de calibrado se obtuvieron para cada serie de ensayos utilizando ovoalbúmina como patrón.

El contenido en proteína de fracciones eluidas de columnas cromatográficas de preparaciones purificadas se estimó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia en el ultravioleta a 280 y 260 nm (Layne, 1957).

#### II.D.3. Determinación de carbohidratos

El contenido en carbohidratos se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Dubois y col., (1956), modificado por Kochert (1978), en extractos celulares de *C. fusca* obtenidos por tratamiento con ultrasonidos. El contenido celular de carbohidratos totales (incluyendo almidón) se determinó en los extractos sin centrifugar. Se consideró que el sobrenadante de la centrifugación a alta velocidad (40000 x *g*, 20 min) contenía únicamente los azúcares reductores (mono y oligosacáridos), ya que los polisacáridos se encuentran en forma de material particulado, y se utilizó por tanto para la determinación de estos azúcares.

A 100  $\mu\text{l}$  de extracto celular se añadía agua destilada hasta 1 ml y se adicionaban 25  $\mu\text{l}$  de reactivo del Fenol (preparado disolviendo 8,1 g de fenol en agua destilada hasta un volumen de 10 ml). Tras agitar, se añadía 2,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Las muestras homogeneizadas se dejaban 30 min a temperatura ambiente para favorecer la formación del complejo coloreado y se midió la absorbancia a 485 nm frente a un blanco tratado de la misma forma pero sin extracto.

El contenido en carbohidratos de las muestras analizadas se calculó por referencia a una recta de calibrado usando glucosa como sustancia patrón y se expresó como mg por ml de extracto celular obtenido en cada caso.

#### II.D.4. Determinación de peso seco

Para determinar el peso seco del material celular de cultivos de microalgas, se filtraban 50 ml del cultivo a través de un filtro Whatman GF/C previamente pesado y se lavaban las células adsorbidas al filtro haciendo pasar por el mismo 50-100 ml de agua destilada. A continuación, los filtros se secaban incubando en estufa a 80 °C durante 24 h. Tras dejarlos 30-60 min a temperatura ambiente, los filtros con el material celular desecado se pesaban en una balanza de precisión. El peso seco de las células se determinó por diferencia respecto al peso de los filtros sin material celular.

### II.E. Técnicas experimentales

#### II.E.1. Centrifugaciones

Para la recogida de células, obtención de extractos celulares y en los diferentes pasos de purificación, se emplearon centrifugas refrigeradas Sorvall (EE.UU.) modelo RC2-B, equipadas con rotores SE-12, SS-34 y GSA. Habitualmente la temperatura de centrifugación era 4 °C.

Las centrifugaciones a baja velocidad se realizaron a temperatura ambiente en centrifugas de mesa Sorvall Superspeed Centrifuge SS-3 Automatic.

Para la recogida de células de suspensiones celulares y preparaciones de volumen igual o inferior a 1,5 ml, se empleaba una centrifuga Eppendorf (RFA) modelo 5414, capaz de alcanzar 12000 rpm (10000 x g).

La recogida de grandes volúmenes de células (mayores de 20 l) se llevaba a cabo por centrifugación en flujo continuo, empleando un sistema Szent-Gyorgyi-Blum adaptado a una centrifuga Sorvall modelo RC2-B.

## II.E.2. Cromatografía en columnas

### II.E.2.1. Cromatografía de intercambio iónico

Se empleó como matriz DEAE-celulosa microgranular DE-52 (Whatman, Gran Bretaña) equilibrada inicialmente con tampón concentrado (0,5 M Tris HCl, pH 7,5) y reequilibrada posteriormente en la columna con el tampón adecuado. Se utilizaron columnas de vidrio de 2,6 cm de diametro, empaquetadas hasta 12 cm de altura en una primera cromatografía preparativa y en un segundo paso cromatográfico con un lecho de 1,8 cm de diametro y 7,5 cm de altura. Antes de empaquetar las columnas, los gases disueltos en las suspensiones de DEAE-celulosa se eliminaron por succión mediante una bomba de alto vacio Millipore modelo XX 5522050 (EE.UU.).

Las muestras y el solvente se aplicaban a las columnas regulando el flujo por medio de bombas peristálticas LKB tipo Perpex 10200 (Suecia) de cabezas reductoras intercambiables o con bombas peristálticas de flujo regulable Pharmacia Fine Chemicals modelo P-1 (Suecia).

Los eluidos de las columnas se recogieron automaticamente en fracciones de volúmenes determinados

utilizando colectores automáticos LKB modelo Ultrorac 7000 o Pharmacia Fine Chemicals modelo Frac-100.

Para reutilizar el lecho cromatográfico se lavaba en la columna con 5 volúmenes de lecho de una disolución 2,5 M NaCl en tampón Tris HCl 50 mM (pH 7,5), y se reequilibraba con 7 volúmenes de lecho del tampón correspondiente sin NaCl.

#### II.E.2.2. Cromatografía hidrofóbica

Se empleó como matriz Fenil Sepharose CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) equilibrada inicialmente con tampón Tris HCl 50 mM (pH 7,5) y reequilibrada en la columna con el mismo tampón suplementado con sulfato amónico hasta el 5% de saturación. Para la cromatografía se utilizó una columna calibrada de vidrio borosilicato K16/20 (Pharmacia, Suecia) conteniendo un lecho de gel de 1,6 cm de diámetro y 7,5 cm de altura. Las muestras y el eluyente se aplicaron directamente sobre el lecho de gel a un flujo constante con una bomba peristáltica Pharmacia modelo P-1, y el eluato se recogió en fracciones mediante un colector automático como se describió en el apartado anterior.

Para su reutilización el lecho de gel se regeneraba en la misma columna mediante lavados con 5 volúmenes de lecho de una disolución acuosa de etilenglicol al 70% (v/v). Antes de su uso los geles se equilibraban con 7 volúmenes de lecho del tampón cromatográfico correspondiente.

#### II.E.2.3. Cromatografía en hidroxapatito

Se utilizaba una matriz de hidroxapatito (fosfato cálcico cristalino,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (Calbiochem, La

Jolle, Ca, EE.UU.). Al material seco se le añadía agua (4 ml/g) y se hidrataba durante 12 horas. La suspensión se decantaba y el material húmedo se equilibraba en tampón fosfato sódico 10 mM (pH 6,8). Para la cromatografía se utilizó una columna de vidrio de 1 cm de diámetro y 5 cm de altura con un lecho de 3 cm de altura. Las muestras y el eluyente se aplicaron a la columna con una bomba peristáltica y el eluato se recogió de forma automática como se indicó en el apartado anterior.

Para regenerar el gel, se lavaba en la columna con 5 volúmenes de lecho de tampón fosfato sódico 100 mM (pH 6,8) y se reequilibraba al mismo pH con tampón fosfato 10 mM.

#### II.E.2.4. Cromatoenfoque. Determinación de puntos isoeléctricos

El cromatoenfoque en columna, técnica cromatográfica basada en la separación de las proteínas de acuerdo a sus puntos isoeléctricos (pI), se empleó por su gran poder de resolución como técnica analítica siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmacia, 1980). Se utilizó una matriz de la resina de intercambio aniónico Polybuffer Exchanger PBE 94 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) empaquetada en una columna calibrada de vidrio borosilicato (Pharmacia C 10/20) para dar un lecho de 1 cm de diámetro por 18 cm de altura. A fin de proteger la superficie del lecho de PBE 94, se añadió una pequeña capa de Sephadex G-25 Fine (0,5-1,0 cm de altura) sobre el cual se colocó un adaptador AC10. La columna se equilibró con tampón Tris-HCl 25 mM (pH 9,0) el valor más alcalino de la zona de pH en la que se llevó a cabo el cromatoenfoque. Después de aplicar la muestra de enzima purificada, resuspendida en un pequeño volumen de tampón de equilibrado (<5 ml), el cromatoenfoque se

desarrolló a 4 °C mediante el lavado de la columna con 10 volúmenes de lecho de tampón de elución (Polybuffer 74/Polybuffer 96, 70/30 (v/v), diluido 10 veces con agua y ajustado con HCl al valor de pH final o más ácido, en este caso 4,5, del rango de pH deseado). El tampón de elución contenía, además, 1 mM de EDTA y 10 mM de 2-mercaptoetanol. Se recogieron fracciones de 1 ml a una velocidad de 12 ml/h.

Todos los tampones utilizados fueron cuidadosamente degasificados a temperatura ambiente antes de su uso. El pH de las fracciones se determinó a 20 °C usando un electrodo combinado semimicro de pH conectado a un pHmetro Radiometer (Copenhague, Dinamarca). El valor de pH de la fracción con actividad enzimática máxima (fracción pico) se consideró como correspondiente al pI del enzima.

#### II.E.2.5. Cromatografía de filtración molecular. Determinación de la masa molecular

La masa molecular de la G3P DHasa no fosforilante nativa purificada de *C. reinhardtii* se estimó por cromatografía de filtración molecular en una columna de Sephacryl S-300 SF (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suecia) de 1,6 cm de diámetro y 40 cm de altura. Como referencia se usaron los valores de las siguientes proteínas de masas moleculares conocidas: ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), aldolasa (158 kDa), seroalbúmina bovina (67 kDa) y ovoalbúmina (43 kDa), quimotripsinógeno (25 kDa) y mioglobina (16,9 kDa). La cromatografía se desarrolló a 4 °C. La columna se equilibró con tampón Tris-HCl (pH 7,5) suplementado con 0,1 M NaCl. Se aplicaron 0,5 ml de las preparaciones enzimáticas y la elución se realizó con un flujo de 7 ml/h, recogiendo fracciones de 0,5 ml.

El volumen vacío ( $V_0$ ) del lecho cromatográfico se estimó como el volumen de elución de una muestra conteniendo azul dextrano al 1% (p/v) y el volumen total ( $V_t$ ) como el de una muestra de ferricianuro potásico al 0,02% (p/v), ambas disoluciones en tampón de equilibrado. La masa molecular ( $M_m$ ) de la G3P DHasa no fosforilante en condiciones nativas se determinó a partir de su volumen de elución ( $V_e$ ) y de los  $V_e$ s de proteínas patrones siguiendo el método de Andrews (1965), representando el logaritmo de la  $M_m$  en función de la  $K_{AV}$  ( $V_e - V_0 / V_t - V_0$ ).

### II.E.3. Electroforesis de proteínas

#### II.E.3.1. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida conteniendo SDS

Las separaciones analíticas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realizaron en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico (SDS) según el procedimiento descrito por Weber y Osborn (1975). Se usaron geles al 12% (p/v) (gel de corrida) y al 4% (p/v) (gel de empaquetamiento) de acrilamida utilizando un aparato Protean II Slab Cell de Bio-Rad (Richmond, CA, EE.UU.).

Para preparar los geles al 12% (p/v), se mezclaban 4 ml de una disolución acuosa de acrilamida al 70% (p/v) y bis-acrilamida al 30% (p/v) con 2,5 ml de tampón Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 0,1 ml de solución de SDS al 10% (p/v), 5  $\mu$ l de TEMED, 3,35 ml de agua destilada y 50  $\mu$ l de una disolución acuosa de persulfato amónico recién preparado al 10% (p/v). Para geles a otras concentraciones de acrilamida se modificaba el volumen de la solución de acrilamida/bis-acrilamida y se modificaba el volumen de agua destilada hasta el volumen final.

Los gases disueltos en la mezcla se eliminaban mediante vacío antes de la polimerización, que se realizaba a temperatura ambiente entre dos placas de vidrio de 20 x 20 cm dispuestas paralelamente dejando un espacio de 1 mm entre ellas y montadas según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad, Richmond, CA, EE.UU.). Las placas se llenaban hasta unos 16 cm del extremo inferior, cubriéndose el menisco con una capa de 0,5 a 1 cm de agua destilada. Una vez polimerizado, el gel se recubría con una pequeña capa (1-2 cm de altura) de gel de empaquetamiento que contenía 4% (p/v) de acrilamida y en el que se había sustituido el tampón Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) por Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8).

Las proteínas utilizadas como patrones para determinar la  $M_m$  de la subunidad de la G3P DHasa no fosforilante purificada procedían de un kit de marcadores (Bio Rad, Richmond, CA, EE.UU.), y se trataron de igual forma que la proteína en estudio. Las proteínas patrones y los valores considerados como sus  $M_m$ s fueron: fosforilasa B (97,4 kDa), seroalbúmina bovina (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica bovina (31 kDa), inhibidor de la tripsina (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa).

Cada muestra (20  $\mu$ l) se mezcló con 8  $\mu$ l de una solución que contenía Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8), SDS al 2% (p/v), 2-mercaptoetanol al 10% (v/v), azul de bromocresol al 0,01% (p/v) y glicerol al 10% (v/v); tras lo cual se calentaron a 100 °C durante 5 min. Se aplicaron muestras de 20  $\mu$ l por pocillo y la electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente. El voltaje inicial era de 50 V. Una vez que el frente había recorrido el gel de empaquetamiento, el voltaje se aumentaba hasta 200 V y se mantenía así durante media hora. Como tampón de electrodo se empleó Tris (15 g/l)-glicina (72 g/l), pH 8,3, conteniendo SDS al 0,3% (p/v).

La  $M_m$  de la subunidad del enzima estudiada se obtuvo por interpolación usando como referencia las  $M_m$ s de proteínas patrones y sus movilidades electroforéticas relativas respecto del frente de electroforesis ( $R_f$ ).

### II.E.3.2. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes

Las separaciones analíticas en geles de poliacrilamida se realizaron en condiciones no desnaturizantes mediante electroforesis en placa usando un gradiente lineal de acrilamida entre el 6 y el 20% (p/v) (gel de corrida), con un gel de empaquetamiento del 4% (p/v) de acrilamida, según el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970). Se utilizó un aparato Mini-Protean II de Bio-Rad (Richmond, CA, EE.UU.).

Las disoluciones de acrilamida se degasificaron mediante vacío antes de su polimerización. El grosor de los geles utilizados fué de 0,75 mm. Una vez aplicadas, las muestras (aproximadamente 20  $\mu$ l por pocillo), conteniendo glicerol al 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0,01% (p/v) como marcador del frente de electroforesis, se sometieron a una diferencia de potencial eléctrico de 200 V hasta que el colorante alcanzó el extremo inferior de la placa (unos 50 min). El tampón de electrodo usado fue Tris 25 mM/glicina 192 mM (pH 8,3). El proceso de electroforesis se llevó a cabo a 4 °C.

Las proteínas utilizadas como patrones para determinar la  $M_m$  nativa de la G3P DHasa no fosforilante purificada procedían de un kit de marcadores, y se trataron de igual forma que la proteína en estudio. Las proteínas patrones y los valores considerados para sus

$M_m$ s fueron: ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), aldolasa (158 kDa), fosforilasa B (97,4 kDa), seroalbúmina bovina (67 kDa) y ovoalbúmina (43 kDa).

Para la determinación de las  $M_m$ s se representó en ordenadas el logaritmo de las masas moleculares de las proteínas patrones y en abcisas la movilidad electroforética relativa de cada proteína respecto del frente de electroforesis ( $R_f$ ), obteniéndose así una recta de calibrado.

### II.E.3.3. Isoelectroenfoque. Determinación de puntos isoeléctricos

Los isoelectroenfoques en geles de poliacrilamida se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Roberson y col. (1987), usando geles al 3% (p/v) de acrilamida en un aparato Mini Protean II de Bio-Rad (Richmond, CA, EE.UU.).

Para preparar los geles se mezclaban 2 ml de una solución de acrilamida al 30% (p/v) y bis-acrilamida al 1% (p/v) con 0,6 ml de una solución de anfolitos (Pharmalyte 3-10, rango de pH 3-10, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), 2,4 ml de glicerol al 50% (v/v), 50  $\mu$ l de solución reciente de persulfato amónico al 10% (p/v), 20  $\mu$ l de TEMED y 7 ml de agua destilada. Una vez eliminados los gases disueltos, se dejaba polimerizar la mezcla a temperatura ambiente entre dos placas de vidrio de 8 x 7 cm dispuestas dejando un espacio de 1,5 mm entre ellas y montadas según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad, Ricxhmon, CA, EE.UU.).

Las proteínas utilizadas como patrones de punto isoelectrico ( $pI$ ) fueron las siguientes: aminoglucosidasa ( $pI$  3,75), inhibidor de la tripsina ( $pI$  4,55), lactoglobulina A ( $pI$  5,20), anhidrasa

carbónica bovina (pI 5,85), mioglobina (pI 6,80), láctico deshidrogenasa (pI 8,30), y tripsinógeno (pI 9,30).

Todas las muestras, 16  $\mu\text{g}$  de proteína, se mezclaron con volúmenes iguales de una solución de glicerol al 60% (v/v) y anfolitos del rango de pH indicado al 4% (v/v). Se aplicaron muestras de 20-50  $\mu\text{l}$  por pocillo y la electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente. El voltaje empleado fué de 200 V y se mantuvo así durante 1 h 30 min. Como tampones de electrodos se emplearon una solución acuosa de 25 mM de NaOH para el cátodo y una solución acuosa 20 mM de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  para el ánodo.

Para la determinación del pI de la proteína en estudio, se representaban en ordenadas las distancias de cada proteína respecto del frente del indicador rojo de metilo y en abcisas los pIs de las proteínas patrones, obteniéndose así una recta de calibrado.

#### II.E.3.4. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se localizaron tiñéndolas por inmersión de los geles en una solución de azul de Coomassie (Brilliant Blue R) al 0,25% (p/v) en 10% (v/v) de ácido acético y 45% (v/v) de metanol en agua. Tras una hora de tinción a temperatura ambiente, los geles se lavaron repetidas veces en una solución de metanol al 5% (v/v) y ácido acético al 7,5% (v/v) en agua, tras lo cual las proteínas se visualizaron como bandas de color azul. Los geles una vez teñidos se conservaban en una solución acuosa de ácido acético al 7,5% (v/v).

#### II.E.4. Determinación de absorbancias y espectros de absorción

Las determinaciones colorimétricas y las cinéticas enzimáticas se realizaron utilizando cubetas de 1 cm de paso de luz en espectrofotómetros Pye-Unicam (Gran Bretaña) modelos SP8-100 ó SP8-150, dotados de salida digital y registrador incorporado. El espectro de absorción de la G3P DHasa no fosforilante purificada se llevó a cabo, usando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz en un espectrofotómetro de diodos HEWLETT PACKARD modelo 8452A (EE.UU.).

#### II.E.5. Concentración de proteínas

##### II.E.5.1. Ultrafiltración

Para la concentración de las disoluciones diluidas de proteína obtenidas en el último paso de purificación se empleó la ultrafiltración.

La concentración de proteínas se realizó a 4 °C en una célula de ultrafiltración con agitación Amicon (Danvers, MA, EE.UU.) modelo 52 o modelo 8010, de 50 ml ó 10 ml de capacidad, respectivamente, empleando membranas de baja adsorción inespecífica Diaflo tipo YM-10 o YM-30 (Danvers, MA, EE.UU.), que retienen compuestos de  $M_m$  superior a 10 y 30 kDa, respectivamente. Para forzar el paso del líquido a través de la membrana, se aplicaba nitrógeno a una presión de 0,3-0,5 Kg/cm<sup>2</sup>.

Alternativamente, y para volúmenes de muestra muy pequeños (menores de 1 ml), se utilizaron los dispositivos Centricon (Amicon, Danvar, MA, EE.UU.). provistos de membranas YM-10, que se centrifugaban en

rotos SS-34 a 5000 rpm durante 20-30 min con el fin de forzar el paso de líquido por la membrana.

#### II.E.6. Eliminación de sales y moléculas pequeñas

Las sales se eliminaron de las preparaciones enzimáticas por diálisis utilizando tripas de celulosa regenerada Visking (Serva, RFA) de diámetro de poro medio de 24 Amstrongs y un límite de exclusión tal que impedía el paso a macromoléculas de masa superior a 8 kDa. Las membranas se lavaban exhaustivamente con agua destilada antes de su uso.

#### II.E.7. Medidas del pH

El pH de las disoluciones se determinaba con pH-metros Radiometer modelo PHM82 (Dinamarca) o Methrom Herisau modelo 654 (RFA), provistos de escala digital.

#### II.F. Reactivos

Las sales utilizadas en grandes cantidades para la preparación de medios de cultivo y tampones, así como los ácidos acético y clorhídrico eran de grado "para análisis" y fueron suministrados por Panreac (España).

Las sales de cationes metálicos usadas en la preparación de los medios de cultivo fueron adquiridas a Merck (R.F.A.), así como algunos líquidos como etanol, metanol, etilenglicol, 2-mercaptoetanol.

El NAD(P)<sup>+</sup>, NAD(P)H, D-G3P, D-3-fosfoglicerato, G3P dietilacetal, ATP, fructosa-1,6-bisfosfato, aldolasa, EDTA, BSA, 2-mercaptoetanol, cicloheximida, lincomicina, N-etil maleimida (NEM), p-hidroxi-mercuribenzoato (p-HMB), azúcares y análogos no

metabolizables de azúcares, Tris, Tricina, Mops y los inhibidores de proteasas PMSF, benzamidina y ácido  $\epsilon$ -caproico fueron suministrados por Sigma Chem. Co. (San Luis, MO, EE.UU.).

Bio-Rad (EE.UU.) suministró los reactivos utilizados en electroforesis, como acrilamida, bis-acrilamida, SDS, TEMED, persulfato amónico y las muestras de proteínas patrones de  $M_m$  y pI.

Las matrices cromatográficas DEAE-celulosa, Fenil Sepharose CL-4B e hidroxapatito fueron adquiridas, respectivamente, a Whatman (Gran Bretaña), Pharmacia (Suecia) y Calbiochem (EE.UU.) y las membranas de diálisis a Serva (RFA).

El anhídrido carbónico usado como fuente de carbono inorgánico para el crecimiento de las algas y los otros gases fueron suministrados por la Sociedad Española del Oxígeno (SEO, España). El nitrógeno líquido empleado en la rotura de células fué también suministrado por la SEO.

El agua destilada se obtuvo mediante un destilador de vidrio DRA (España); en los casos que se requería una mayor pureza se utilizaba agua ultrapura obtenida por ósmosis inversa mediante un sistema Milli-Q 2 (Millipore S.A., Molsheim, Francia).

### III. RESULTADOS

### III. RESULTADOS

#### III.A. Distribución de las actividades G3P DHasas en diferentes organismos

Hemos estudiado la presencia de las actividades enzimáticas de las tres G3P DHasas en una serie de organismos seleccionados que pertenecen a grupos taxonómicos bien diferenciados: a) microalgas eucarióticas representantes de los diversos grupos en que se clasifican estos organismos (clorofíceas, euglenofíceas, rodofíceas, criptofíceas, crisofíceas, xantofíceas y bacilariofíceas o diatomeas), y que presentan además grandes diferencias en su estructura celular y composición de pigmentos fotosintéticos (Staehelein, 1986); b) el protista fotoautotrófico *C. paradoxa*, organismo unicelular considerado como el resultado de una asociación simbiótica estable (endocianosis) entre un endosimbionte de tipo cianobacteriano llamado cianelo, que realiza fotosíntesis oxigénica, y un protozoo flagelado (Bothe y Floener, 1978); c) microorganismos eucarióticos no fotosintéticos (hongos y protozoos); d) diversas cianobacterias, con claras diferencias tanto estructurales como fisiológicas y representativas de los distintos grupos taxonómicos en los que se clasifican estos procariotas fotosintéticos (Rippka y col., 1988); e) microorganismos procarióticos no fotosintéticos (eubacterias y arqueobacterias), y f) plantas superiores.

##### III.A.1. Niveles celulares de las actividades G3P DHasas en distintos microorganismos eucarióticos

La Tabla 1 muestra la distribución de las actividades de las tres G3P DHasas, determinadas en extractos celulares (fracción de proteínas solubles) de

**Tabla 1.** Niveles celulares de las G3P DHasas en diferentes microorganismos eucarióticos.

Organismos	Actividad específica (mU/mg de proteína) <sup>a</sup>		
	NADP <sup>+</sup> dependiente no fosforilante	NADP <sup>+</sup> dependiente fosforilante	NAD <sup>+</sup> dependiente fosforilante
<b>MICROALGAS EUCARIOTICAS</b>			
<b>Clorofíceas (algas verdes)</b>			
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8 ± 2	25 ± 3	145 ± 5
<i>Chlorella fusca</i>	9 ± 2	26 ± 2	150 ± 3
<i>Chorella protothecoides</i>	8 ± 2	31 ± 2	ND <sup>b</sup>
<i>Chorella variegata</i>	7 ± 1	24 ± 2	98 ± 5
<i>Monoraphidium braunii</i>	6 ± 1	32 ± 3	120 ± 6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	7 ± 1	28 ± 3	111 ± 4
<b>Euglenofíceas (euglenoides)</b>			
<i>Euglena gracilis</i>	8 ± 2	34 ± 3	131 ± 5
<b>Rodofíceas (algas rojas)</b>			
<i>Porphyridium purpureum</i>	4 ± 1	20 ± 2	105 ± 6
<b>Criptofíceas (criptomonadáceas)</b>			
<i>Cryptomonas ovata</i>	3 ± 1	15 ± 2	89 ± 8
<b>Crisofíceas (algas pardo-doradas)</b>			
<i>Ochromonas danica</i>	6 ± 1	98 ± 4	161 ± 10
<b>Xantofíceas (algas verde-amarillas)</b>			
<i>Bumilleriopsis filiformis</i>	7 ± 1	25 ± 2	ND
<b>Bacilariofíceas (diatomeas)</b>			
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	5 ± 2	44 ± 4	130 ± 4
<i>Navicula pelliculosa</i>	6 ± 2	40 ± 4	ND
<b>ENDOCIANOMAS (sincianosis)</b>			
<i>Cyanophora paradoxa</i>	11 ± 3	115 ± 5	550 ± 17
<b>MICROORGANISMOS NO FOTOSINTETICOS</b>			
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	0 <sup>c</sup>	0	32 ± 4
<i>Paramecium tetraurelia</i>	0	0	35 ± 3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	0	98 ± 6
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	0	0	28 ± 2

<sup>a</sup> Los extractos celulares se obtuvieron por sonicación excepto en el caso del endocianoma cuyo extracto celular se obtuvo por congelación-descongelación. Los datos corresponden a valores medios ± D.T. de tres determinaciones independientes de la actividad correspondiente de producción de NAD(P)H dependiente de G3P.

<sup>b</sup> ND, no determinado.

<sup>c</sup> Actividad inapreciable (por debajo del límite de detección, <0,1 mU/mg de proteína).

diferentes microorganismos eucarióticos. Las tres actividades enzimáticas se encuentran presentes en todas las microalgas estudiadas y muestran niveles semejantes en todas ellas aún perteneciendo a grupos taxonómicos bien diferenciados.

Las tres G3P DHasas son también detectadas en el flagelado fotoautotrófico *C. paradoxa*, cuyos cianelos se consideran representantes de una línea evolutiva diferente de los cloroplastos (Wasmann y col., 1987).

En organismos eucarióticos no fotosintéticos (protozoos, levaduras y el hongo filamentoso *Phycomyces blakesleeanus*) no se detectaron ninguna de las dos actividades G3P DHasas dependientes de  $\text{NADP}^+$ . Por el contrario, la actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  se encontraba presente en todos los organismos estudiados.

Estos datos muestran que la presencia simultánea de las dos actividades G3P DHasa dependientes de  $\text{NADP}^+$ , fosforilante y no fosforilante, es una característica común a todos los microorganismos eucarióticos fotosintéticos estudiados, ya sean microalgas o el protista *C. paradoxa*, que se considera un "fósil evolutivo" similar al precursor ancestral de los actuales eucariotas fotosintéticos (Janssen y col., 1978). Como era de esperar del papel claramente fotosintético atribuido a la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$ , este enzima no se detectó en ninguno de los organismos no fotosintéticos estudiados. Aunque existían en la literatura datos contradictorios sobre la presencia de la G3P DHasa no fosforilante en microalgas (Smillie y Fuller, 1960; Kelly y Gibbs, 1973; Vacchi y col., 1973), nuestros resultados muestran claramente su presencia generalizada en este heterogéneo grupo de organismos, y su ausencia en eucariotas no fotosintéticos, incluidos tejidos de animales (p.e., músculo esquelético y tejido hepático

de ratón) (datos no presentados). Por el contrario, la actividad G3P DHasa dependiente de  $\text{NAD}^+$ , se encontraba presente en todos los organismos eucarióticos estudiados, como era de esperar de su función bien establecida en glicolisis/gluconeogénesis.

### III.A.2. Niveles celulares de las actividades G3P DHasas en distintos microorganismos procarióticos

Las cianobacterias o algas verde-azuladas constituyen un amplio grupo de procariotas fotosintéticos que presentan entre sí grandes diferencias estructurales y fisiológicas (Rippka y col., 1988). La Tabla 2 muestra los niveles celulares de las tres actividades G3P DHasas en la fracción de proteínas solubles de cianobacterias representativas de diferentes grupos taxonómicos. Las actividades G3P DHasas fosforilantes dependientes de  $\text{NADP}^+$  y de  $\text{NAD}^+$  están presentes en todas las estirpes de cianobacterias estudiadas, tanto en las unicelulares (p.e. *Synechocystis* sp.) como en las filamentosas con heterocistos (p.e. *Fischerella* sp. y diversas especies de *Anabaena* marinas y dulceacuícolas), no detectándose, sin embargo, en ninguna de ellas la actividad G3P DHasa no fosforilante.

La Tabla 2 recoge, además, los niveles celulares de las actividades de las tres G3P DHasas en extractos obtenidos de varios organismos procarióticos no fotosintéticos (tres eubacterias y una arqueobacteria halofílica). En estos organismos no se detectaron las actividades G3P DHasas dependientes de  $\text{NADP}^+$ , aunque sí niveles apreciables de la G3P DHasa glicolítica dependiente de  $\text{NAD}^+$  (los niveles de este enzima oscilan entre 50-100 mU/mg de proteína). Esta actividad enzimática parece ser la única que está presente en bacterias verdes-sulfurosas (*Chromatium*) y púrpuras (*Rhodopseudomonas*) (Smiller y Fuller, 1960).

**Tabla 2.** Niveles celulares de las G3P DHasas en diferentes microorganismos procarióticos.

Organismos	Actividad específica (mU/mg de proteína) <sup>a</sup>		
	NADP <sup>+</sup> dependiente no fosforilante	NADP <sup>+</sup> dependiente fosforilante	NAD <sup>+</sup> dependiente fosforilante
<b>CIANOBACTERIAS (algas verde-azuladas)</b>			
<b>CROOCOCALES</b>			
(Estirpes unicelulares)			
<i>Synechococcus</i> sp. SAG L-1402-1	0 <sup>b</sup>	43 ± 3	ND <sup>c</sup>
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	0	36 ± 3	54 ± 6
<b>NOSTOCALES</b>			
Estirpes filamentosas			
<i>Spirulina platensis</i>	0	42 ± 2	61 ± 4
Estirpes filamentosas, fijadoras de dinitrógeno			
<i>Anabaena variabilis</i>	0	30 ± 2	34 ± 5
<i>Anabaena</i> sp. ATCC 33047	0	28 ± 2	ND
<i>Calothrix</i> sp. PCC 7601	0	34 ± 3	ND
<i>Nostoc pruniforme</i>	0	36 ± 3	ND
<i>Scytonema</i> sp. PCC 7110	0	29 ± 2	ND
<b>STIGONEMATALES</b>			
(Estirpes filamentosas, con ramificaciones, fijadoras de dinitrógeno)			
<i>Fischerella</i> sp. PCC 7414	0	31 ± 2	33 ± 2
<b>MICROORGANISMOS NO FOTOSINTETICOS</b>			
<i>Azotobacter chroococum</i>	0	0	20 ± 2
<i>Escherichia coli</i>	0	0	98 ± 7
<i>Haloferax mediterranei</i>	0	0	150 ± 9
<i>Rhizobium fredii</i>	0	0	75 ± 5

<sup>a</sup> Los extractos celulares se obtuvieron por sonicación de células de cultivos en fase exponencial de crecimiento. Los datos corresponden a valores medios ± D.T. de tres determinaciones independientes de la correspondiente actividad de producción de NAD(P)H dependiente de G3P. En el caso de la halobacteria *H. mediterranei* los ensayos se llevaron a cabo en presencia de 3 M NaCl.

<sup>b</sup> Actividad inapreciable (por debajo del límite de detección, <0,1 mU/mg de proteína).

<sup>c</sup> ND, no determinado.

La G3P DHasa no fosforilante parece, por tanto, un enzima exclusivo de aquellos microorganismos fotosintéticos que poseen orgánulos -ya sean cloroplastos, rodoplastos o cianelos- y no a la actividad fotosintética *per se*, ya que no se detectó en ninguno de los procariotas fotosintéticos estudiados. La actividad fosforilante dependiente de NADP<sup>+</sup> aparece, en cambio, vinculada claramente a la fotosíntesis y se encuentra presente tanto en los eucariotas como en los procariotas fotosintéticos. Finalmente, la actividad glicolítica dependiente de NAD<sup>+</sup> se encuentra presente en todos los organismos estudiados, sean fotosintéticos o heterotróficos.

### III.A.3. Niveles celulares de las actividades G3P DHasas en tejidos de plantas superiores.

Como se describió en la Introducción, la mayor parte de los estudios realizados sobre las G3P DHasas dependientes de NADP<sup>+</sup> se han llevado a cabo en plantas superiores. Sin embargo, mientras que el enzima fosforilante ha sido estudiado extensivamente tanto en plantas C3 como en plantas C4 (Pupillo y Faggiani, 1979; Brinkmann y col., 1987; Cerff, 1982 a, b), el enzima no fosforilante se ha estudiado muy poco y únicamente en plantas C3 (Rosemberg y Arnon, 1955; Pupillo y Faggiani, 1979; Iglesias y Losada, 1988).

Hemos estudiado, por tanto, las actividades G3P DHasas en extractos de tejidos de varias plantas superiores, representativas de los tres grandes grupos de vegetales caracterizados por sus diferentes metabolismos fotosintéticos del carbono, a saber, plantas C3, C4 y crasuláceas (Halliwell, 1984). En todos los casos se ha estudiado la distribución de las actividades tanto en raíces (tejidos no fotosintéticos)

como en las hojas (tejidos fotosintéticos). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

La actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  se detectó, como era de esperar, en los tejidos fotosintéticos (hojas), y no en los extractos de raíces. Sin embargo, la actividad G3P DHasa no fosforilante, estaba presente en ambos tejidos, aunque los niveles fueron en raíces más bajos (aproximadamente 30%) que en tejidos fotosintéticos. La actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$ , presentaba niveles semejantes en los extractos de hojas y raíces de todas las plantas estudiadas.

Los datos muestran una distribución diferencial de las dos G3P DHasa dependientes de  $\text{NADP}^+$  en plantas. La actividad fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  se encuentra presente sólo en tejidos fotosintéticos, mientras que el enzima no fosforilante, al igual que el enzima fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$ , es detectado tanto en las hojas como en las raíces.

### **III.B. Localización intracelular de las G3P DHasas en distintos organismos fotosintéticos eucarióticos**

Los estudios recogidos en la bibliografía sobre la localización intracelular de las dos G3P DHasas fosforilantes dependientes de  $\text{NADP}^+$  y de  $\text{NAD}^+$ , realizados en plantas superiores únicamente, indican que el enzima fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$ , implicado en la asimilación fotosintética del  $\text{CO}_2$ , debe ser cloroplástico (Latzko y Kelly, 1979; Cerff, 1982 a) mientras que el enzima fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$ , que participa en las rutas glicolítica y gluconeogénica, está localizado en el citosol (Cerff, 1982 a). Los escasos datos sobre la localización celular de la G3P DHasa no fosforilante, obtenidos en

**Tabla 3.** Niveles celulares de las G3P DHasas en diferentes tejidos de plantas superiores.

Planta	Actividad específica (mU/mg de proteína) <sup>a</sup>		
	NADP <sup>+</sup> dependiente no fosforilante	NADP <sup>+</sup> dependiente fosforilante	NAD <sup>+</sup> dependiente fosforilante
<b>Plantas C3</b>			
<i>Helianthus annuus</i>			
Hojas	12 ± 2	31 ± 2	64 ± 4
Raíces	5 ± 1	0 <sup>b</sup>	50 ± 3
<i>Hordeum vulgare</i>			
Hojas	14 ± 2	23 ± 2	49 ± 3
Raíces	5 ± 1	0	40 ± 3
<i>Lolium multiflorum</i>			
Hojas	13 ± 2	41 ± 3	50 ± 4
<i>Spinacea oleracea</i>			
Hojas	11 ± 1	35 ± 3	74 ± 5
<b>Plantas C4</b>			
<i>Zea mays</i>			
Hojas	15 ± 2	27 ± 3	53 ± 4
Raíces	6 ± 1	0	50 ± 3
<b>Plantas crasuláceas</b>			
<i>Kalanchöe blossfeldiana</i>			
Hojas	10 ± 1	30 ± 2	29 ± 3
<i>Sedum arenarium</i>			
Hojas	7 ± 1	22 ± 3	34 ± 5

<sup>a</sup> Los extractos celulares se obtuvieron por congelación de los tejidos con nitrógeno líquido, pulverización en mortero y resuspensión en tampón como se describe en el Apartado II.B.2.2. Los datos corresponden a valores medios ± D.T. de tres determinaciones independientes. Las actividades fosforilantes se determinaron usando el ensayo inverso (oxidación de NAD(P)H).

<sup>b</sup> Actividad inapreciable (por debajo del límite de detección, <0,1 mU/mg de proteína).

plantas superiores, sugieren que dicho enzima debe ser citosólico (Kelly y Gibbs, 1973; Pupillo y Faggiani, 1979).

La ausencia de datos sobre la localización intracelular de las tres G3P DHasas en microalgas nos ha llevado a investigar esta cuestión. Usando distintos métodos de rotura celular, hemos confirmado la localización citoplasmática del enzima no fosforilante tanto en diversas microalgas unicelulares como en plantas.

Se determinaron los niveles celulares de las tres actividades G3P DHasas en extractos de diversas algas (las clorofíceas *C. reinhardtii* y *C. fusca* y la rodofíceas *P. purpureum*) obtenidos por distintos métodos de rotura celular: a) sonicación (rotura mecánica drástica), que produce la destrucción de todos los orgánulos celulares y b) por congelación-descongelación (condiciones de rotura más suaves), que mantiene un grado de integridad de los cloroplastos suficiente como para evitar una pérdida significativa de enzimas estromáticos. Los datos se muestran en las Tablas 4, 5 y 6, respectivamente. Empleando la sonicación como método de rotura, la práctica totalidad de las tres actividades G3P DHasas quedaba en el sobrenadante (fracción de proteínas solubles) de los extractos celulares tras centrifugar a alta velocidad. Sin embargo, cuando las células se rompían por congelación-descongelación, las actividades G3P DHasas fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  y no fosforilante se encontraban presentes únicamente en el sobrenadante claro obtenido tras centrifugar el extracto, mientras que la casi totalidad (>95%) de la actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  se recogía en el precipitado que contenía prácticamente todos los pigmentos fotosintéticos.

**Tabla 4.** Localización de las actividades G3P DHasas en extractos de *C. reinhardtii* obtenidos por medio de distintos métodos de rotura celular.

	Actividad específica (mU/mg de proteína) <sup>a</sup>		
	NADP <sup>+</sup> dependiente no fosforilante	NADP <sup>+</sup> dependiente fosforilante	NAD <sup>+</sup> dependiente fosforilante
<b>Sonicación</b>			
Sobrenadante	28 <sup>b</sup>	219	284
Precipitado	0 <sup>c</sup>	0	0
<b>Congelación-descongelación</b>			
Sobrenadante	46	26	205
Precipitado	0	342	0

<sup>a</sup> Tras la rotura celular y centrifugación como se describe en el Apartado II.B, el precipitado se resuspendió en igual volumen de tampón de rotura.

<sup>b</sup> Los extractos celulares se obtuvieron de células de cultivos en fase lineal de crecimiento.

<sup>c</sup> Actividad inapreciable (por debajo del límite de detección, <0,1 mU/mg de proteína).

**Tabla 5.** Localización de las actividades G3P DHasas en extractos de *C. fusca* obtenidos por medio de distintos métodos de rotura celular.

	Actividad específica (mU/mg de proteína) <sup>a</sup>		
	NADP <sup>+</sup> dependiente no fosforilante	NADP <sup>+</sup> dependiente fosforilante	NAD <sup>+</sup> dependiente fosforilante
<b>Sonicación</b>			
Sobrenadante	16	17	158
Precipitado	0 <sup>b</sup>	0	0
<b>Congelación-descongelación</b>			
Sobrenadante	31	2	166
Precipitado	0	22	0

<sup>a</sup> Los extractos celulares se obtuvieron de células de cultivos en fase lineal de crecimiento. Tras centrifugación como se describe en Materiales y Métodos, el precipitado se resuspendió en igual volumen de tampón de rotura.

<sup>b</sup> Actividad inapreciable (por debajo del límite de detección, <0,1 mU/mg de proteína).

**Tabla 6.** Localización de las actividades G3P DHasas en extractos de *P. purpureum* obtenidos por medio de distintos métodos de rotura celular.

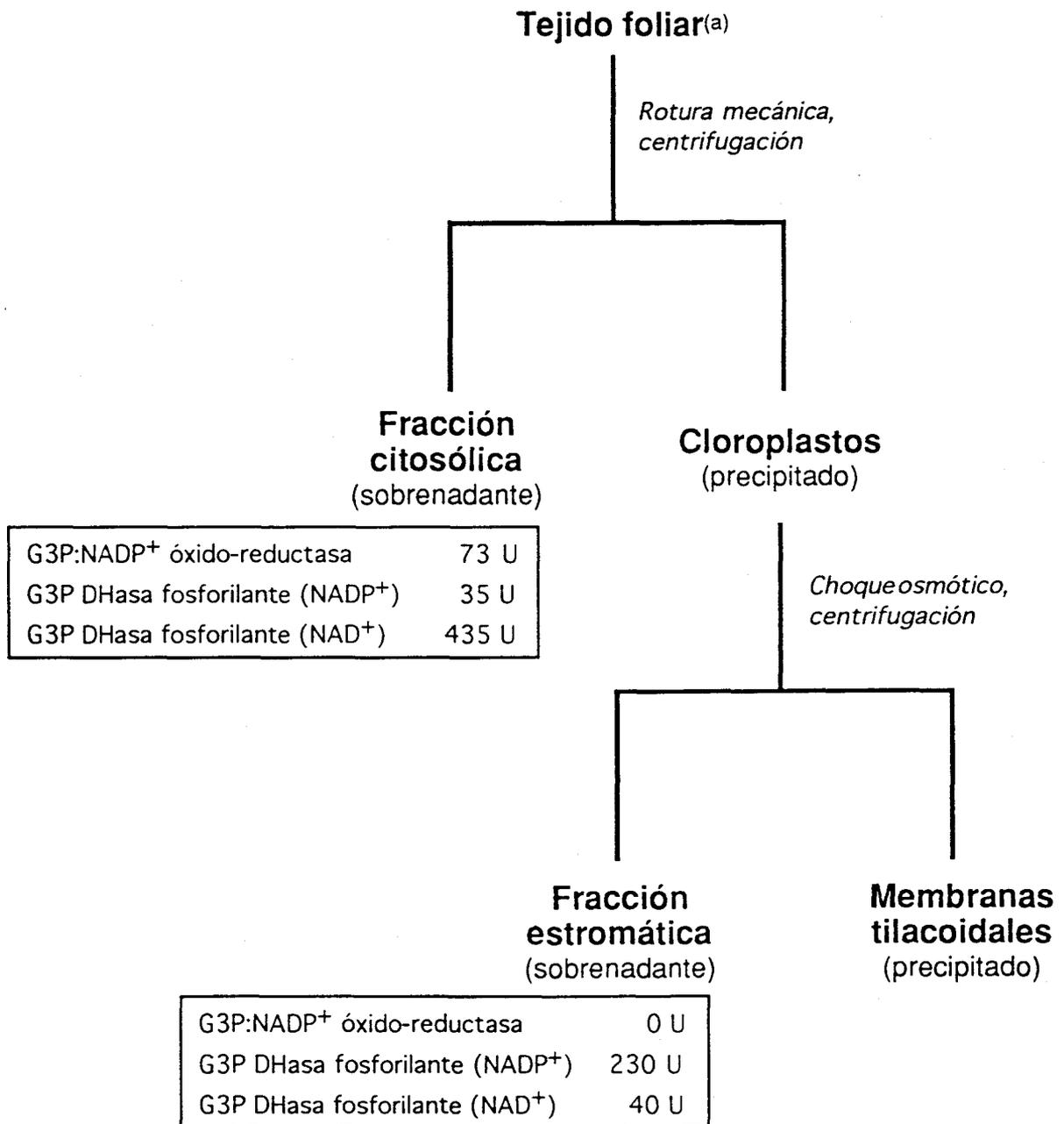
	Actividad específica (mU/mg de proteína) <sup>a</sup>		
	NADP <sup>+</sup> dependiente no fosforilante	NADP <sup>+</sup> dependiente fosforilante	NAD <sup>+</sup> dependiente fosforilante
<b>Sonicación</b>			
Sobrenadante	12	100	85
Precipitado	0 <sup>b</sup>	0	0
<b>Congelación-descongelación</b>			
Sobrenadante	19	8	79
Precipitado	0	143	0

<sup>a</sup> Los extractos celulares se obtuvieron de células de cultivos en fase lineal de crecimiento. Tras centrifugación como se describe en Materiales y Métodos, el precipitado se resuspendió en igual volumen de tampón de rotura.

<sup>b</sup> Actividad inapreciable (por debajo del límite de detección, <0,1 mU/mg de proteína).

Se han determinado igualmente los niveles de actividad de las tres G3P DHasas en la fracción de proteínas solubles obtenida de hojas de espinaca por el método de preparación de cloroplastos de Kuwabara y Murata (1982) en el que se lleva a cabo una primera rotura mecánica suave, que produce la rotura de la membrana celular pero no de los cloroplastos, seguida de la lisis de estos orgánulos por choque osmótico. Los datos de distribución de las actividades en las sucesivas fracciones así obtenidas se muestran en el Esquema 2. La rotura mecánica suave del tejido foliar de espinacas muestra claramente que en la fracción de proteínas solubles correspondiente al citosol se localizan la actividad G3P DHasa no fosforilante y la casi totalidad (>90%) de la actividad fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$ , mientras que la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  se encuentra en su mayor parte (>80%) en la fracción estromática resultante de la rotura por choque osmótico de los cloroplastos.

En resumen, tanto en las microalgas estudiadas como en el tejido fotosintético de espinaca la actividad G3P DHasa no fosforilante muestra una distribución paralela a la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$ , un típico enzima citosólico que cataliza una reacción clave en glicolisis/gluconeogénesis.



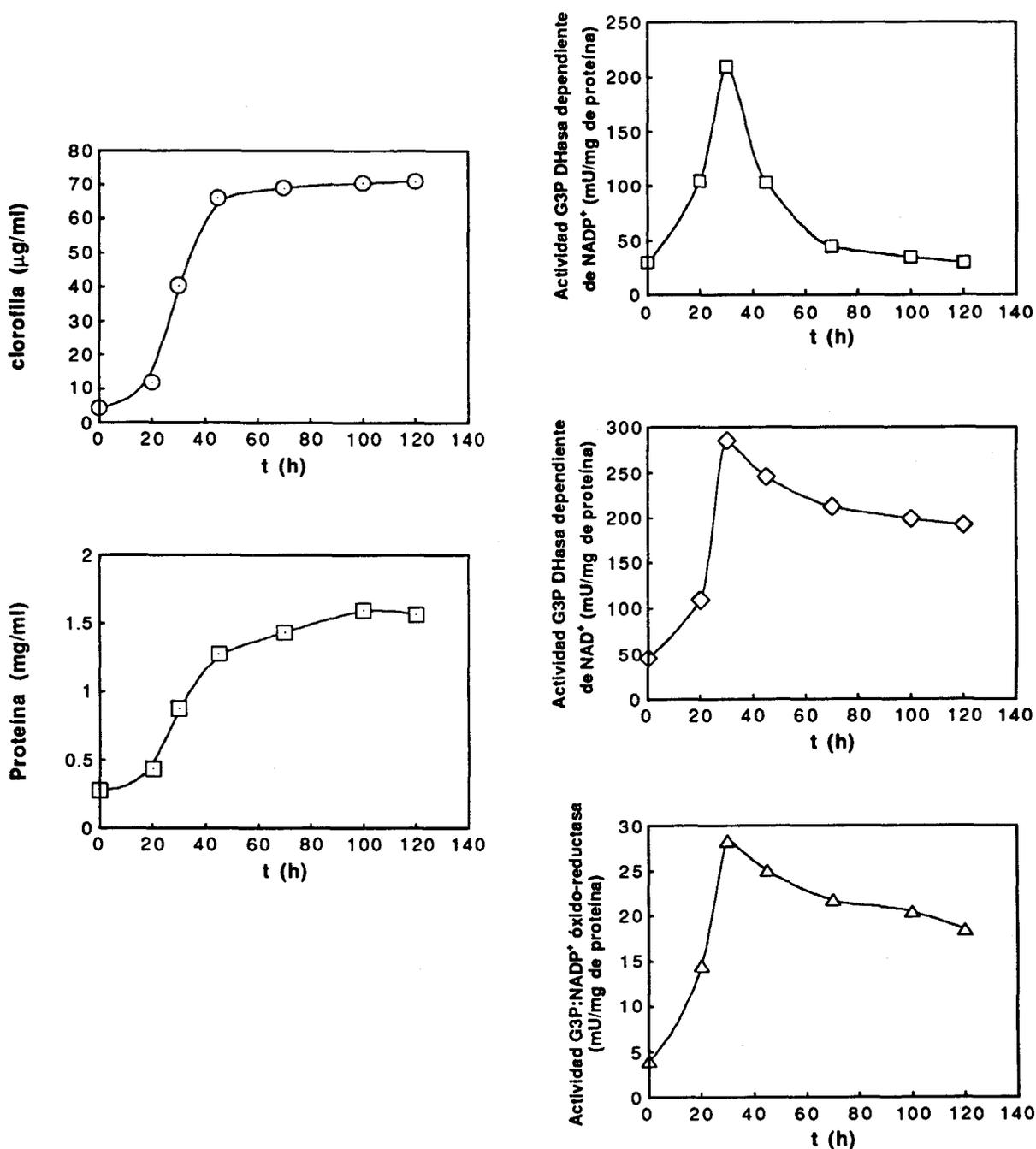
(a) Los datos se refieren a extractos obtenidos a partir de 500 g (peso fresco) de hojas. Las actividades enzimáticas se expresan en unidades totales determinadas en cada fracción.

## ESQUEMA 2

### III.C. Efecto de las condiciones de cultivo de microalgas eucarióticas sobre los niveles celulares de las actividades G3P DHasas

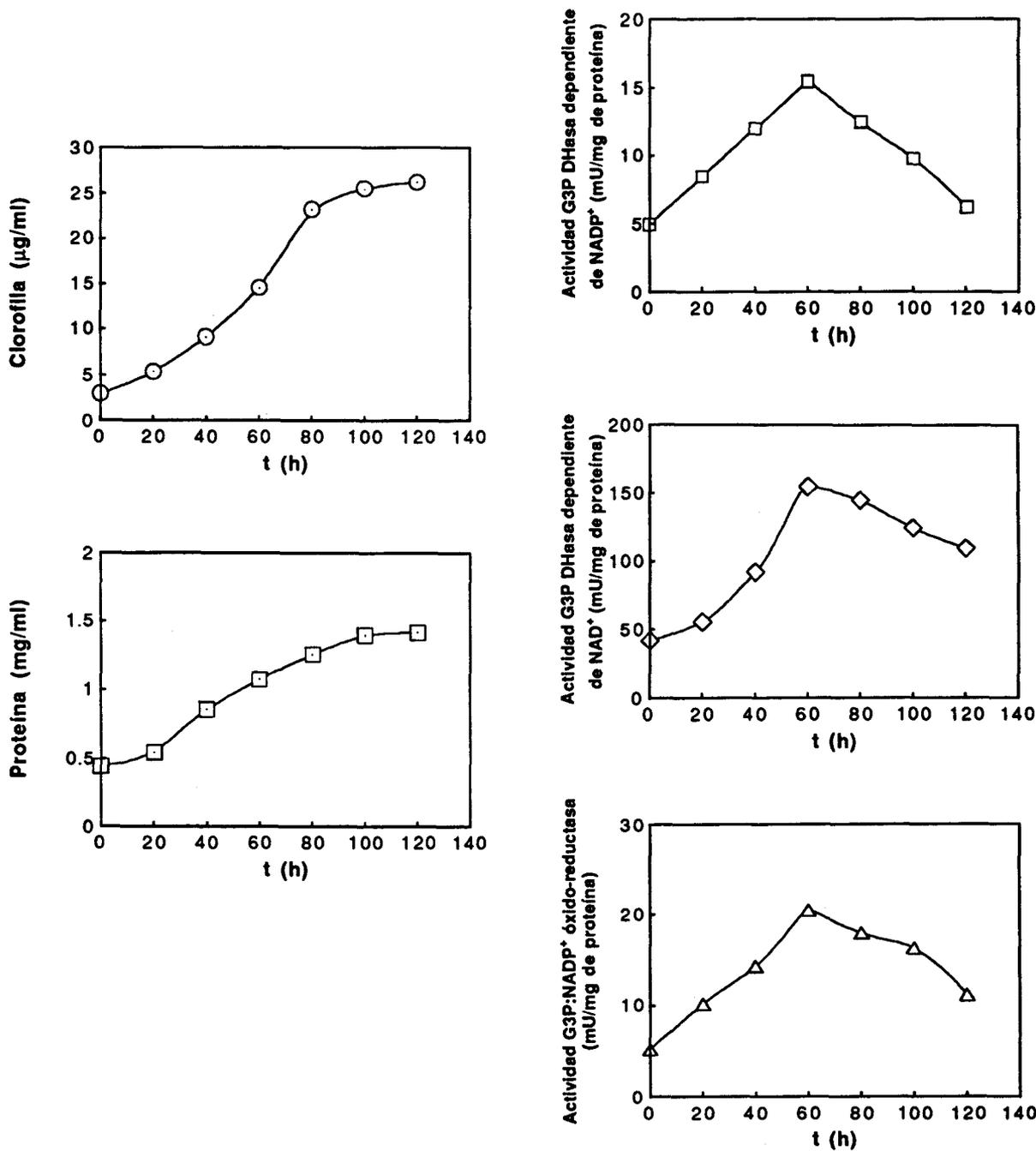
#### III.C.1. Evolución de las actividades G3P DHasas durante el desarrollo de cultivos en condiciones fotoautotróficas

La Figura 1 muestra el crecimiento celular de cultivos fotoautotófricos del alga clorofícea *C. reinhardtii*, estimado mediante la medida de clorofila y la proteína total y las variaciones de las actividades específicas de las tres G3P DHasas durante el periodo de desarrollo del cultivo. El crecimiento de los cultivos y los niveles de actividad del alga clorofícea *C. fusca* y del alga rodofícea *P. purpureum* se muestran en las Figuras 2 y 3, respectivamente. La evolución de las tres actividades enzimáticas siguieron pautas semejantes en las tres microalgas estudiadas. Se observa un incremento inicial de los niveles de las actividades que alcanzan un máximo que coincide con el final de la fase de crecimiento exponencial del cultivo, y una bajada posterior, que se muestra más rápida en el enzima fosforilante, que viene a coincidir con la fase estacionaria del mismo. Los intervalos de tiempo implicados en las variaciones de las actividades enzimáticas fueron relativamente largos; lo que sugería que se trata más bien de procesos de síntesis-degradación de proteínas que de procesos de activación-deactivación.



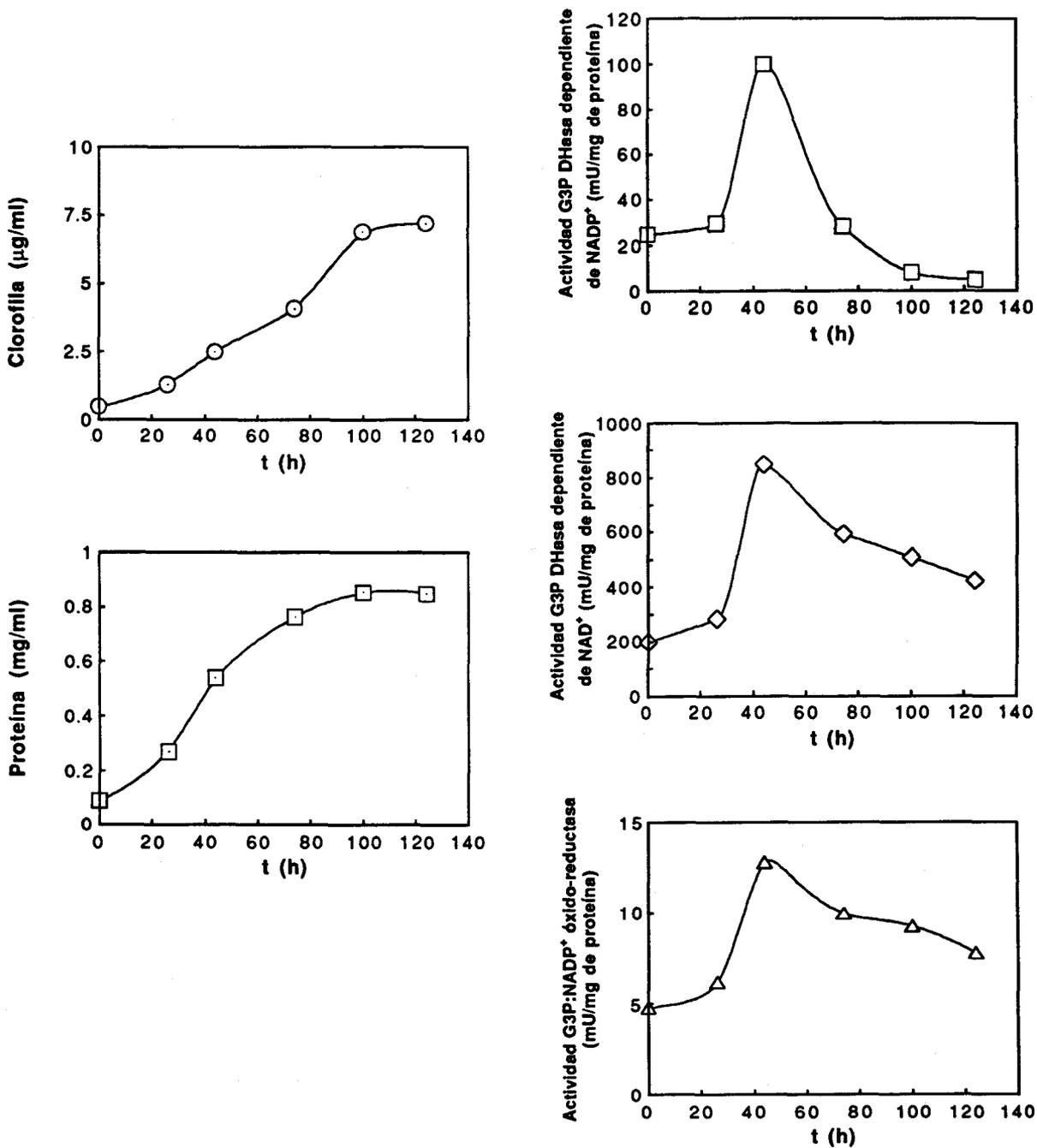
**Figura 1.** Crecimiento y evolución de los niveles de actividad específica de las tres G3P DHasas de cultivos de *C. reinhardtii* desarrollados en condiciones fotoautotróficas.

Los niveles de clorofila y de proteína se determinaron en alícuotas de los cultivos tal como se describe en los apartados II.D.1 y II.D.2, respectivamente. Las actividades enzimáticas se determinaron en extractos crudos (fracción de proteína soluble) utilizando el sistema de ensayo acoplado, según se describe en el apartado II.C. Los datos corresponden a un experimento típico representativo de tres experimentos independientes, al igual que las restantes figuras de este tipo.



**Figura 2.** Crecimiento y evolución de los niveles de actividad específica de las tres G3P DHasas de cultivos de *C. fusca* desarrollados en condiciones fotoautotróficas.

Los datos corresponden a un experimento típico. Las condiciones experimentales son las descritas en la Figura 1.



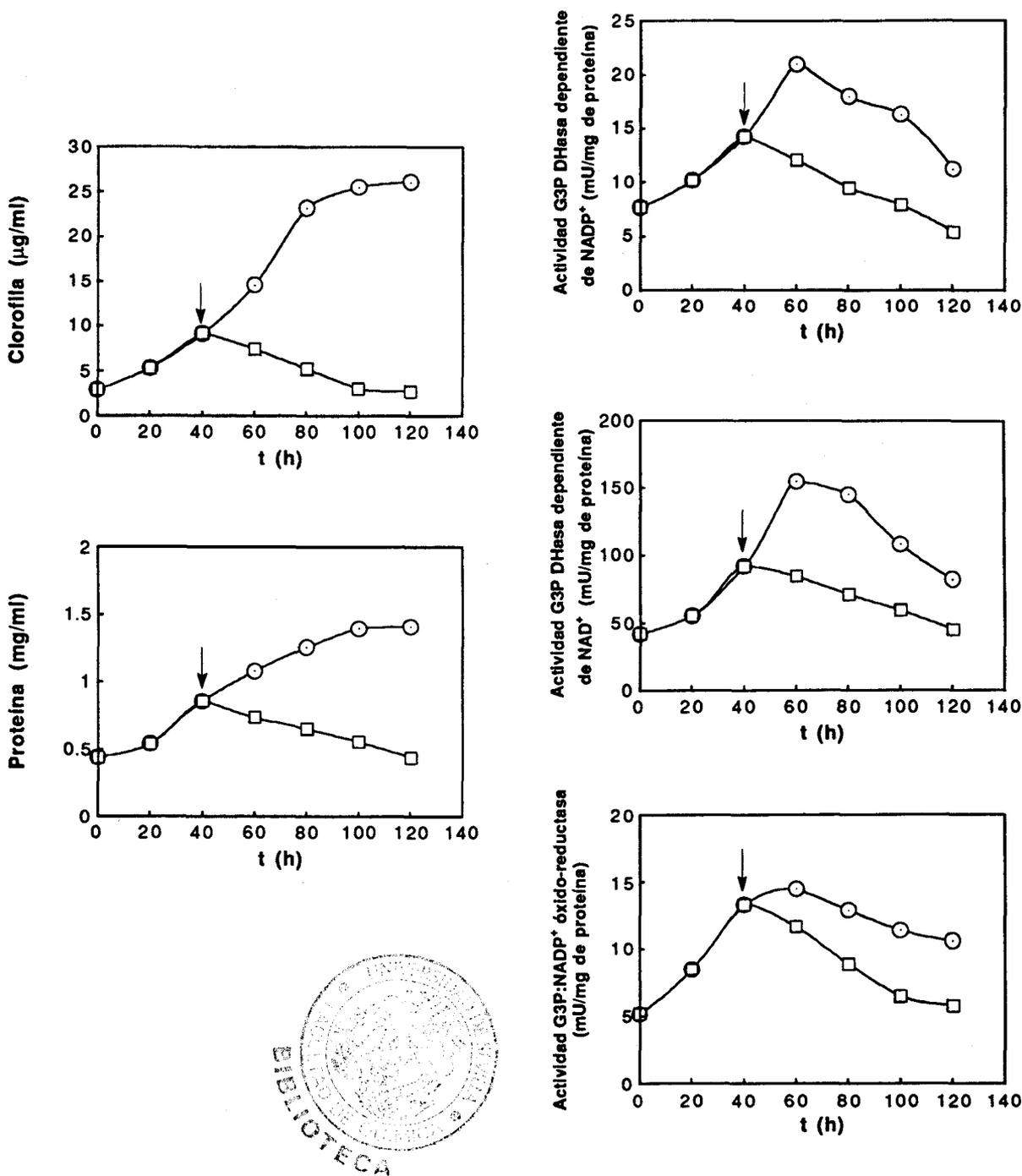
**Figura 3.** Crecimiento y evolución de los niveles de actividad específica de las tres G3P DHAsas de cultivos fotoautotróficos del alga roja *P. purpureum*.

Los datos corresponden a un experimento representativo. Las condiciones experimentales son las señaladas en la Figura 1.

### III.C.1.1. Efecto de inhibidores de síntesis de proteína y transporte fotosintético de electrones sobre el crecimiento y la evolución de las actividades G3P DHasas de cultivos fotoautotróficos

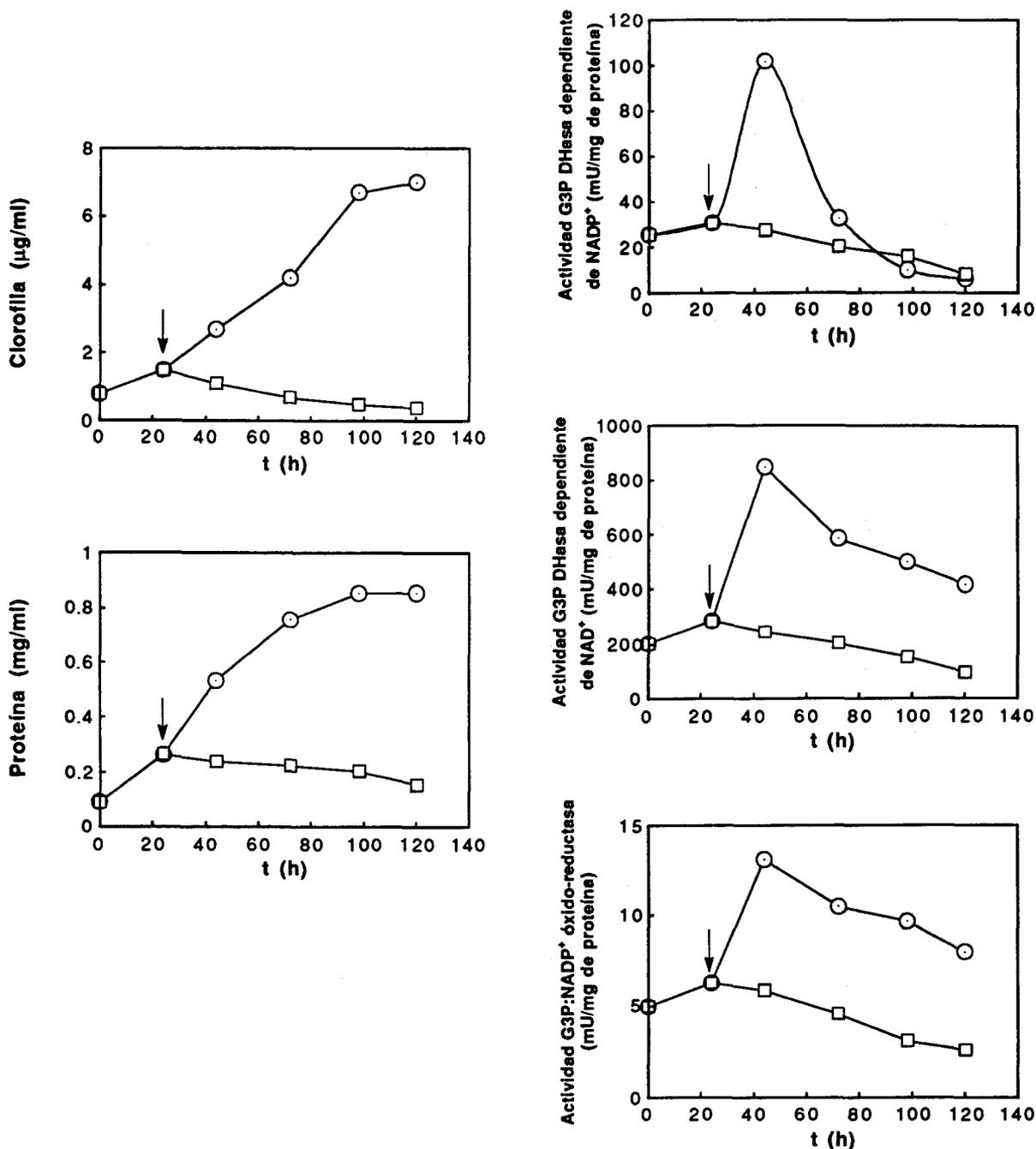
El cloranfenicol, inhibidor de síntesis de proteínas sintetizadas en ribosomas 70S de organismos procarióticos y cloroplastos (Smillie y col., 1971), no ejerce un efecto claro sobre el crecimiento ni sobre las actividades en el rango de concentraciones estudiado, 20-150  $\mu\text{M}$  ya que a concentraciones superiores tiene un efecto tóxico no específico sobre las microalgas (Loiseaux, 1976). Este antibiótico disminuía solo ligeramente el crecimiento y los niveles de actividad frente a los cultivos que se desarrollaron sin el inhibidor y su efecto dependía del estadio de crecimiento en el que se añadía: para cultivos tratados en la primera etapa de crecimiento (pre-exponencial) el efecto era algo más acusado que para aquellos que se dejaban evolucionar hasta una etapa posterior (exponencial) (datos no mostrados). Por el contrario, la presencia de cicloheximida, un inhibidor específico de síntesis de proteínas a nivel del ribosoma 80S de organismos eucarióticos (Smillie y col., 1971), ejercía a bajas concentraciones en el medio un efecto inhibitor claro y repetitivo sobre el crecimiento y el incremento de los niveles de actividad de las tres G3P DHasas durante el desarrollo de los cultivos. Las Figuras 4 y 5 muestran que la adición de cicloheximida (2  $\mu\text{g/ml}$ ) durante el periodo de crecimiento exponencial, producía una inhibición del crecimiento y afectaba claramente a la evolución de los niveles celulares de las actividades estudiadas en cultivos iluminados de *C. fusca* y de *P. purpureum*.

Estudiamos también el efecto que ejercía el DCMU, inhibidor del flujo fotosintético de electrones entre los fotosistemas II y I (Shochat y col., 1982), sobre el crecimiento y la evolución de las actividades



**Figura 4.** Crecimiento y evolución de las actividades específicas de las G3P DHasas de cultivos de *C. fusca* tratados con cicloheximida en la luz.

La grafica recoge el desarrollo del cultivo de *C. fusca* que fué tratado, a partir del momento indicado por la flecha, con cicloheximida 2  $\mu\text{g/ml}$  (□) y del correspondiente cultivo control (O). La adición del inhibidor se realizó en condiciones de esterilidad como se describe en el apartado II.A.2.2.



**Figura 5.** Crecimiento y evolución de las actividades específicas de las G3P DHAsas de cultivos de *P. purpureum* tratados con cicloheximida en la luz.

La Figura presenta el efecto de la cicloheximida 2  $\mu\text{g/ml}$ , (□), añadida en el momento señalado por la flecha, sobre un cultivo de *P. purpureum* desarrollado en la luz junto a otro que se dejó evolucionar en ausencia del inhibidor (O). La adición del inhibidor se realizó según se indica en el apartado II.A.2.2.

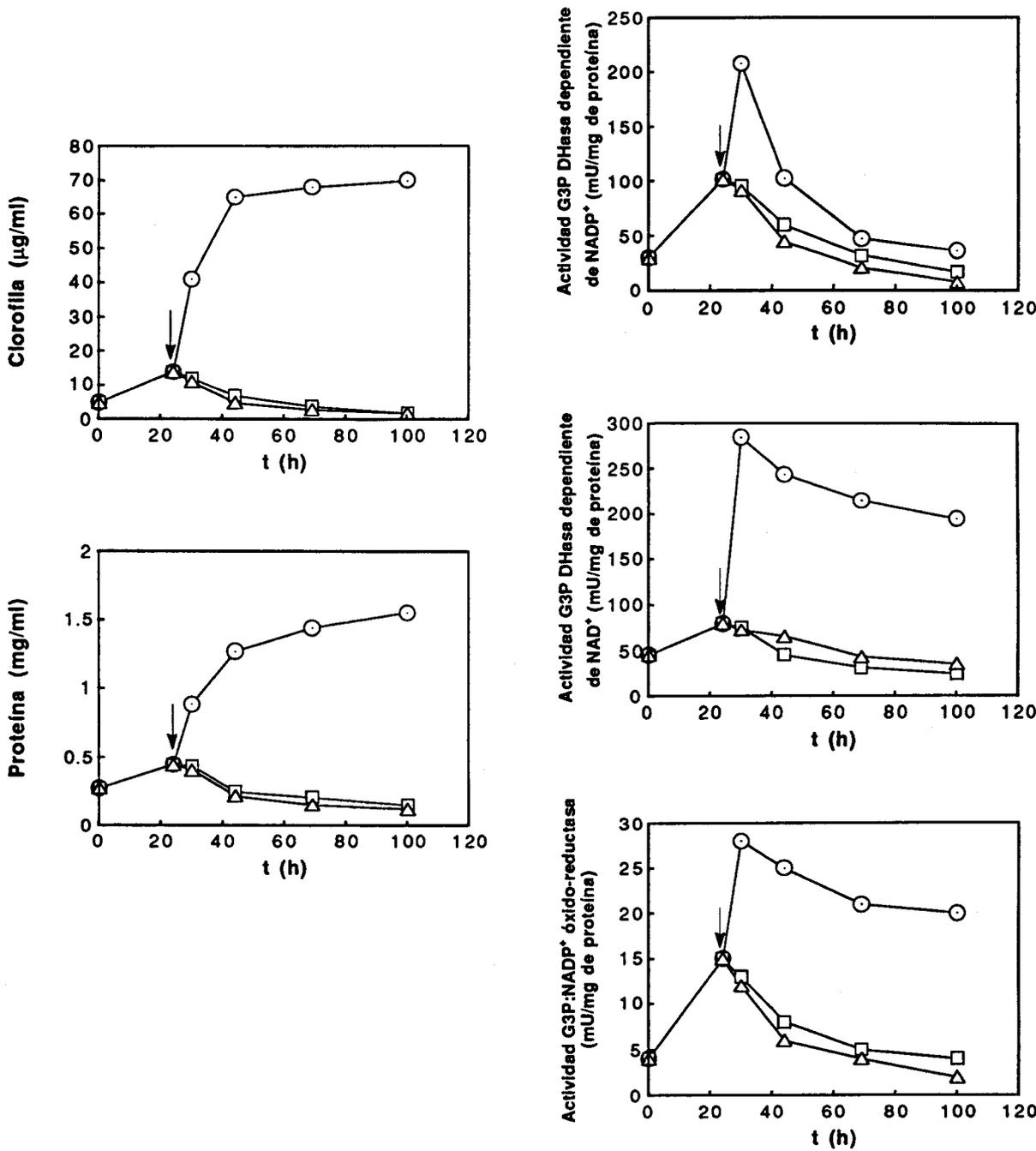
enzimáticas en cultivos iluminados de *C. reinhardtii*. La Figura 6 recoge el marcado efecto inhibitorio producido tanto por el DCMU (30  $\mu\text{M}$ ) como por la cicloheximida (2  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre el crecimiento y las actividades específicas de las tres G3P DHasas.

### III.C.2. Evolución de las actividades G3P DHasas en cultivos de microalgas durante la transición oscuridad-luz

La Figura 7 muestra el desarrollo de un cultivo del alga clorofícea *C. reinhardtii* mantenido en la oscuridad, su crecimiento posterior al exponerlo a la luz y la evolución de las tres actividades G3P DHasas. También se presenta el desarrollo de un cultivo paralelo desarrollado desde el primer momento en la luz. El crecimiento de los cultivos de *C. fusca* y *P. purpureum* y la evolución de las actividades específicas de los tres enzimas durante la transición oscuridad-luz se recogen en las Figuras 8 y 9 respectivamente. Durante el periodo de oscuridad no se produce crecimiento de los cultivos y los niveles de las tres G3P DHasas se mantienen bajos y prácticamente constantes. Al pasar los cultivos a la luz el crecimiento se inicia, y se produce un claro aumento de los niveles de actividad específica de estos enzimas, mostrando evoluciones semejantes a las de los cultivos mantenidos desde el primer momento en la luz pero desplazadas en el tiempo.

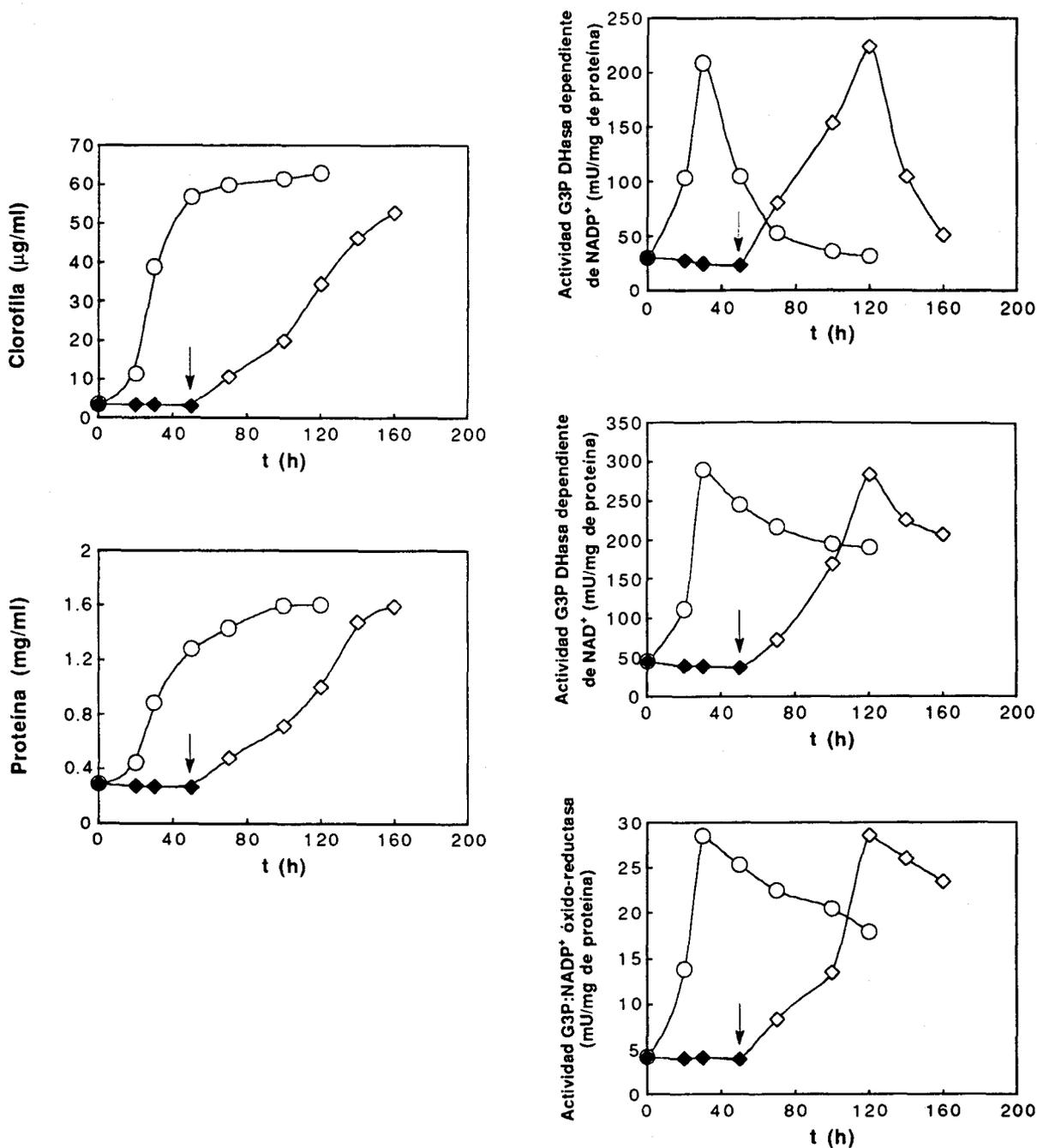
#### III.C.2.1. Efecto de distintos inhibidores sobre el crecimiento y la evolución de las actividades G3P DHasas de los cultivos durante la transición oscuridad-luz

En la Figura 10 se presenta el crecimiento y la evolución de las actividades de las tres G3P DHasas de



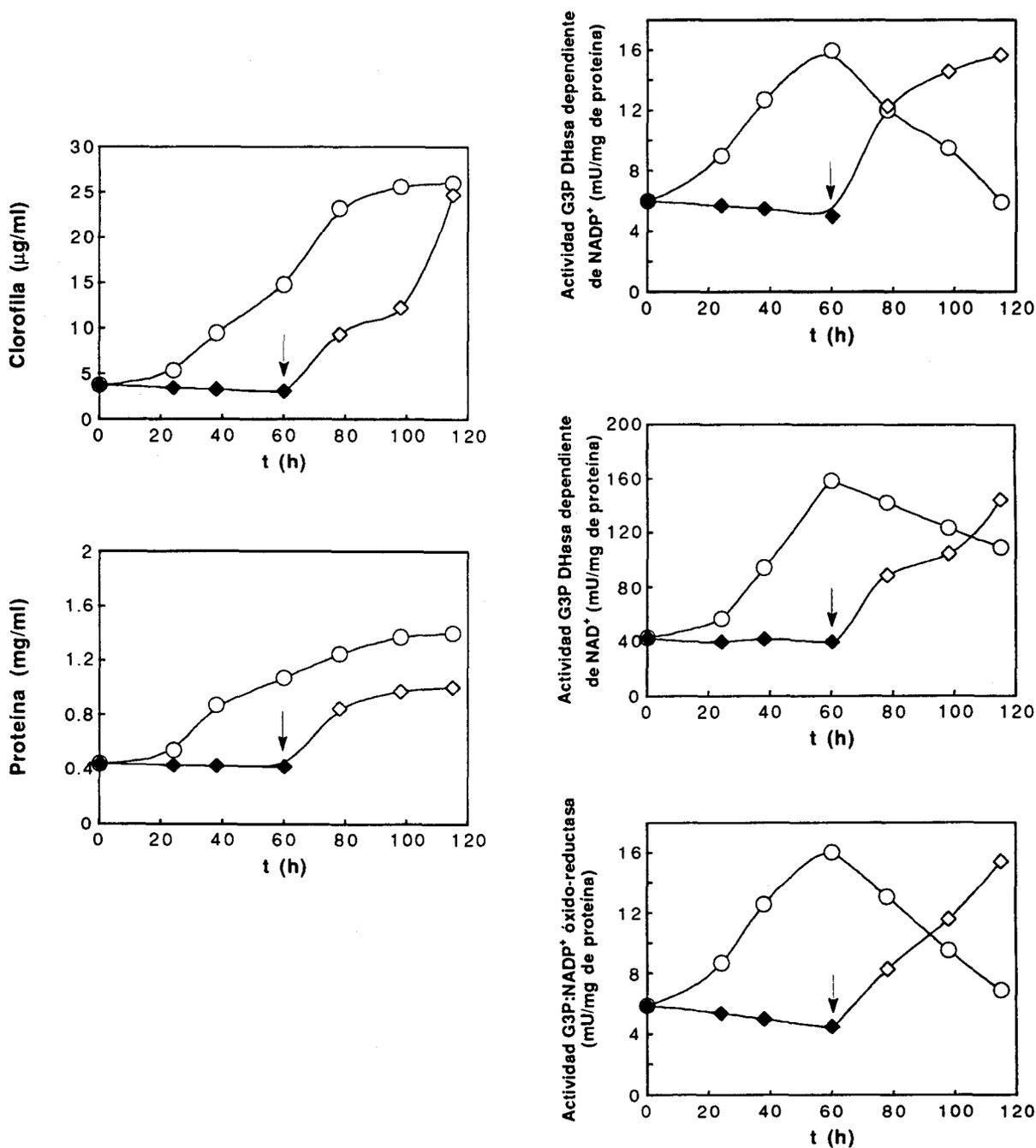
**Figura 6.** Efecto de la cicloheximida y el DCMU sobre el crecimiento y la evolución de las actividades específicas de las G3P DHases de cultivos fotoautotróficos de *C. reinhardtii*.

Los datos corresponden a cultivos de *C. reinhardtii* desarrollados en condiciones fotoautotóxicas que se trataron, a partir del momento indicado por la flecha, con cicloheximida 2 µg/ml (□) y con DCMU 30 µM (Δ), así como al correspondiente cultivo control (O). La adición de los inhibidores se llevó a cabo como se indica en el apartado II.A.2.2.



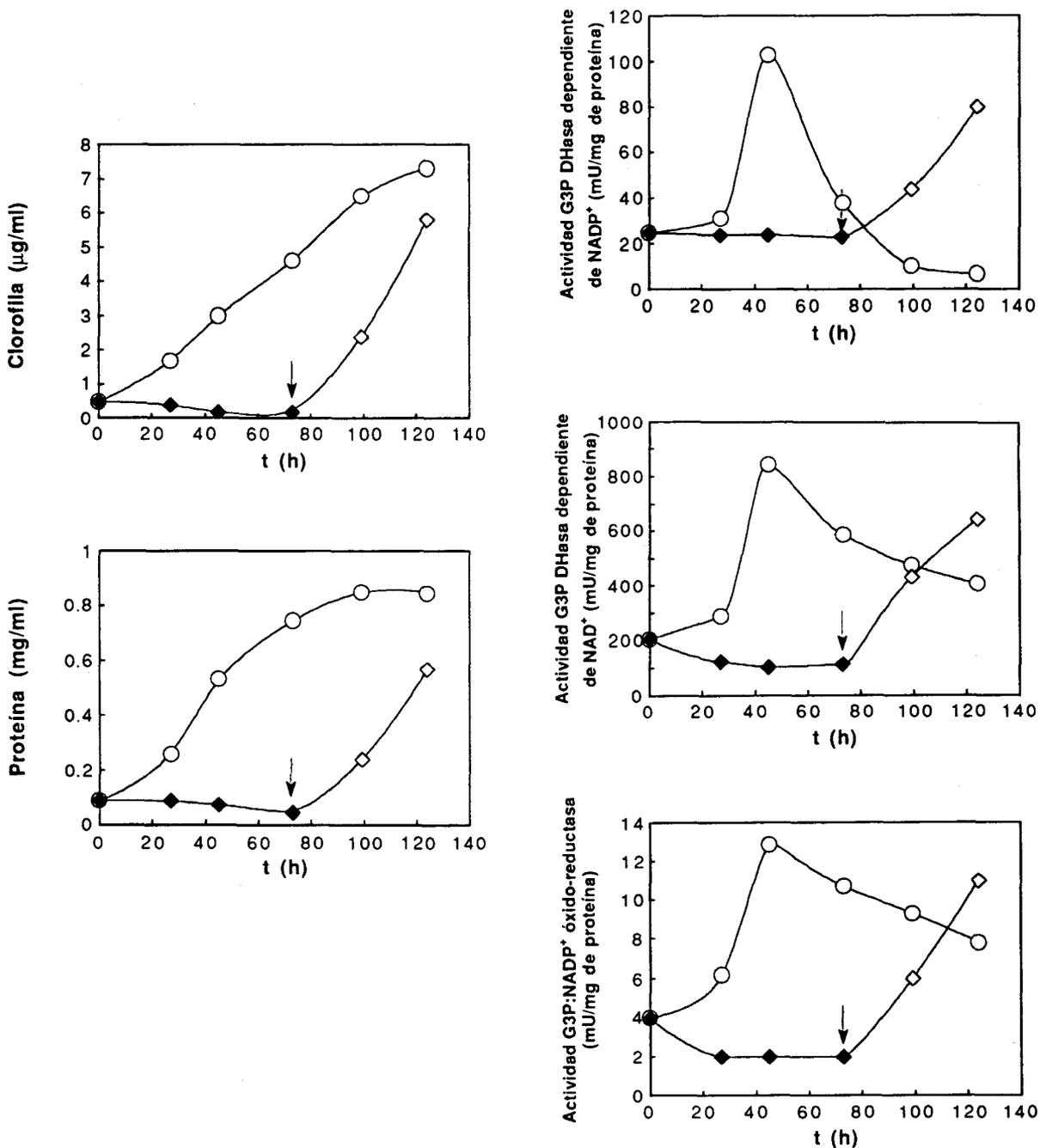
**Figura 7.** Crecimiento y cambios en las actividades G3P DHasas de un cultivo de *C. reinhardtii* mantenido durante un periodo de tiempo en la oscuridad y desarrollado posteriormente en la luz.

La Figura presenta la evolución de un cultivo en condiciones fotoautotróficas (O) junto a otro que se ha mantenido durante el periodo indicado en la oscuridad (◆) y que a partir del momento indicado por la flecha se desarrolló bajo iluminación (◇). Las diversas condiciones de cultivo se describen en el apartado II.A.2.2.



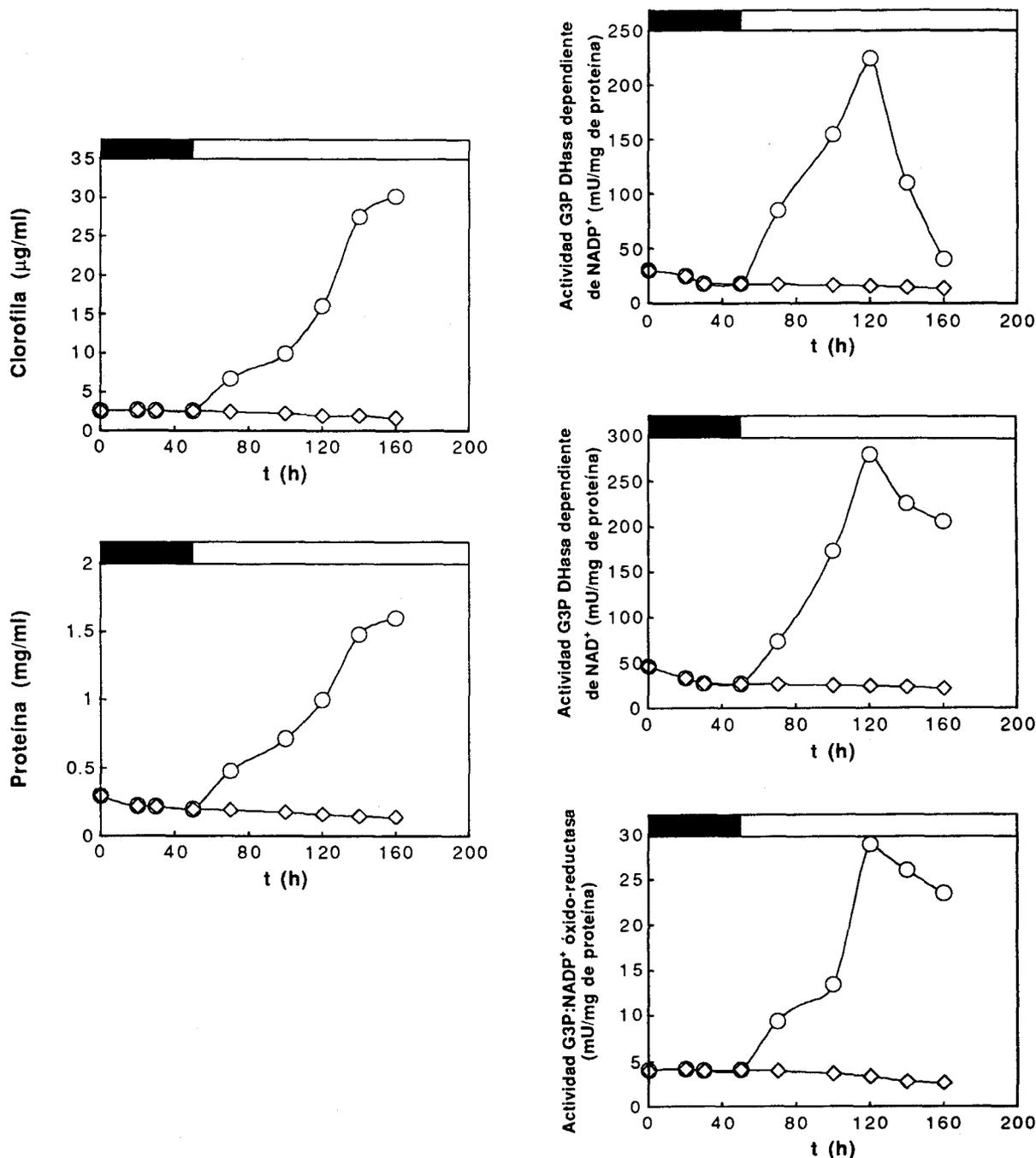
**Figura 8.** Crecimiento y cambios en las actividades G3P DHasas de un cultivo de *C. fusca* mantenido durante un periodo de tiempo en la oscuridad y posteriormente desarrollado en la luz.

La Figura presenta el desarrollo de un cultivo de *C. fusca* mantenido durante un periodo de tiempo en oscuridad (◆) y expuesto posteriormente, a partir del momento indicado por la flecha, a la luz (◇). Otro cultivo desarrollado en condiciones fotoautotróficas se usó como control (O). Las condiciones experimentales de oscuridad se señalan en el apartado II.A.2.2.



**Figura 9.** Crecimiento y cambios en las actividades G3P DHAsas de un cultivo de *P. purpureum* mantenido durante un periodo de tiempo en la oscuridad y posteriormente desarrollado bajo iluminación.

La Figura presenta el desarrollo de un cultivo del alga roja que se mantuvo en la oscuridad (◆) y posteriormente, en el momento indicado por la flecha, se llevó a la luz (◇), junto a otro que se dejó evolucionar en todo momento en la luz (O). Las condiciones experimentales del cultivo en la oscuridad se señalan en el apartado II.A.2.2.



**Figura 10.** Crecimiento y cambios en las actividades G3P DHAsas de un cultivo fotoautotrófico de *C. reinhardtii* tratado con cicloheximida tras un periodo de tiempo en la oscuridad.

La Figura presenta el desarrollo de un cultivo de *C. reinhardtii* (◇) que tras un periodo en la oscuridad se colocó bajo iluminación en el momento señalado en la banda superior de las gráficas y simultáneamente se añadió cicloheximida 2 µg/ml; otro cultivo (O), usado como control, se desarrolló en paralelo en ausencia del inhibidor. El mantenimiento en la oscuridad y la adición del inhibidor a los cultivos se llevaron a cabo como se describe en el apartado II.A.2.2.

cultivos del alga *C. reinhardtii* mantenidos durante un periodo de tiempo en la oscuridad y posteriormente expuestos a la luz en presencia o ausencia de cicloheximida (2  $\mu\text{g/ml}$ ).

La Figura 11 muestra el desarrollo de cultivos de *C. fusca* mantenidos en la oscuridad y la respuesta de los mismos al exponerlos a la luz en presencia de cicloheximida (2  $\mu\text{g/ml}$ ) o DCMU (30  $\mu\text{M}$ ) o mantenidos sin ninguno de los inhibidores.

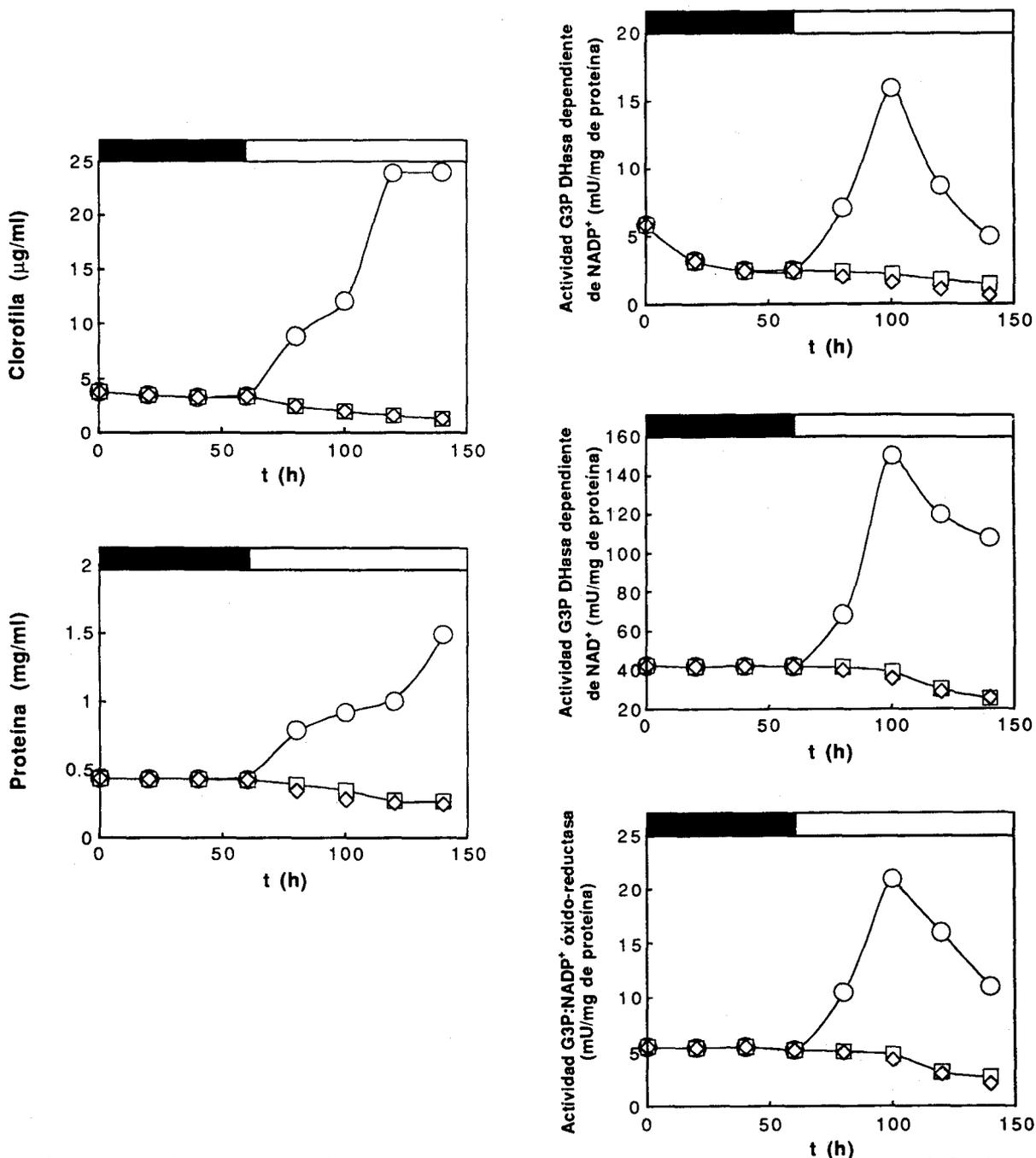
En la oscuridad los cultivos mantienen niveles bajos y prácticamente constantes de las actividades; estos niveles aumentan durante el desarrollo de los cultivos que se dejan evolucionar en la luz, y continúan bajos y constantes en presencia de cicloheximida o DCMU en el medio tras el periodo de oscuridad.

### III.C.3. Evolución de las actividades G3P DHasas durante el desarrollo de cultivos mantenidos en condiciones mixotróficas y heterotróficas

#### III.C.3.1. Efecto del acetato sobre el crecimiento y los niveles de las actividades G3P DHasas de cultivos de *C. reinhardtii*

Los estudios de Sager and Granick (1953) sobre la utilización de compuestos orgánicos por *C. reinhardtii* como fuente de carbono alternativa, mostraron que sólo el acetato sódico permitía el desarrollo de los cultivos incluso en la oscuridad.

Hemos estudiado el desarrollo de cultivos del alga *C. reinhardtii* en la luz en presencia de distintas concentraciones de acetato sódico en el rango de concentraciones 5-100 mM. Cuando la concentración de

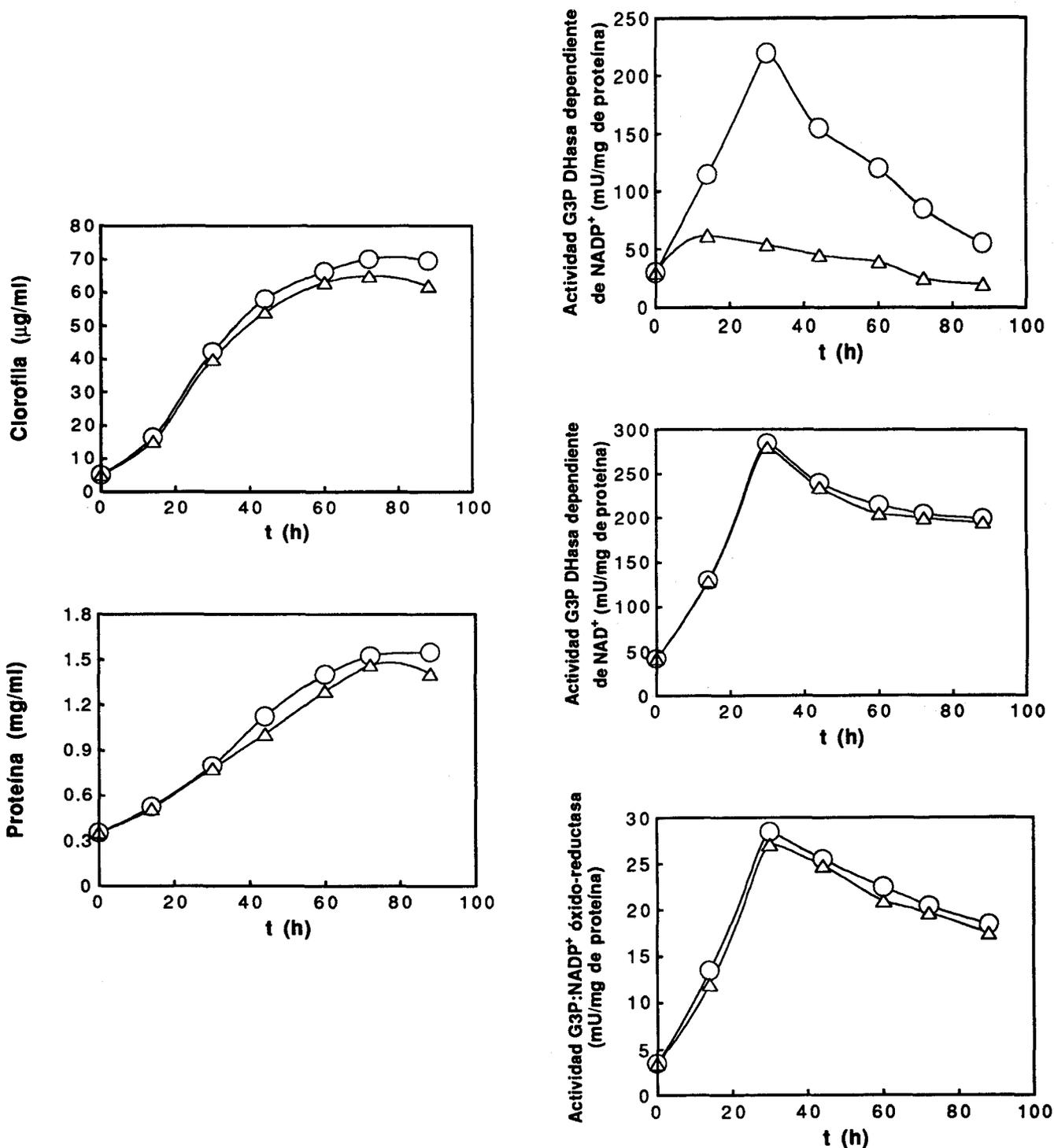


**Figura 11.** Crecimiento y cambios de las actividades G3P DHasas de cultivos de *C. fusca* tratados con cicloheximida o con DCMU tras un periodo de desarrollo en la oscuridad.

La Figura presenta el desarrollo de cultivos de *C. fusca* que tras un periodo en la oscuridad, indicado por la banda negra de la parte superior de las gráficas, se colocaron bajo iluminación y simultáneamente se trataron bien con cicloheximida 2 µg/ml (□) o con DCMU 30 µM (◇); un cultivo control tras el periodo de oscuridad se dejó evolucionar en la luz en ausencia de los citados inhibidores (O). Las condiciones experimentales se indican en el apartado II.A.2.2.

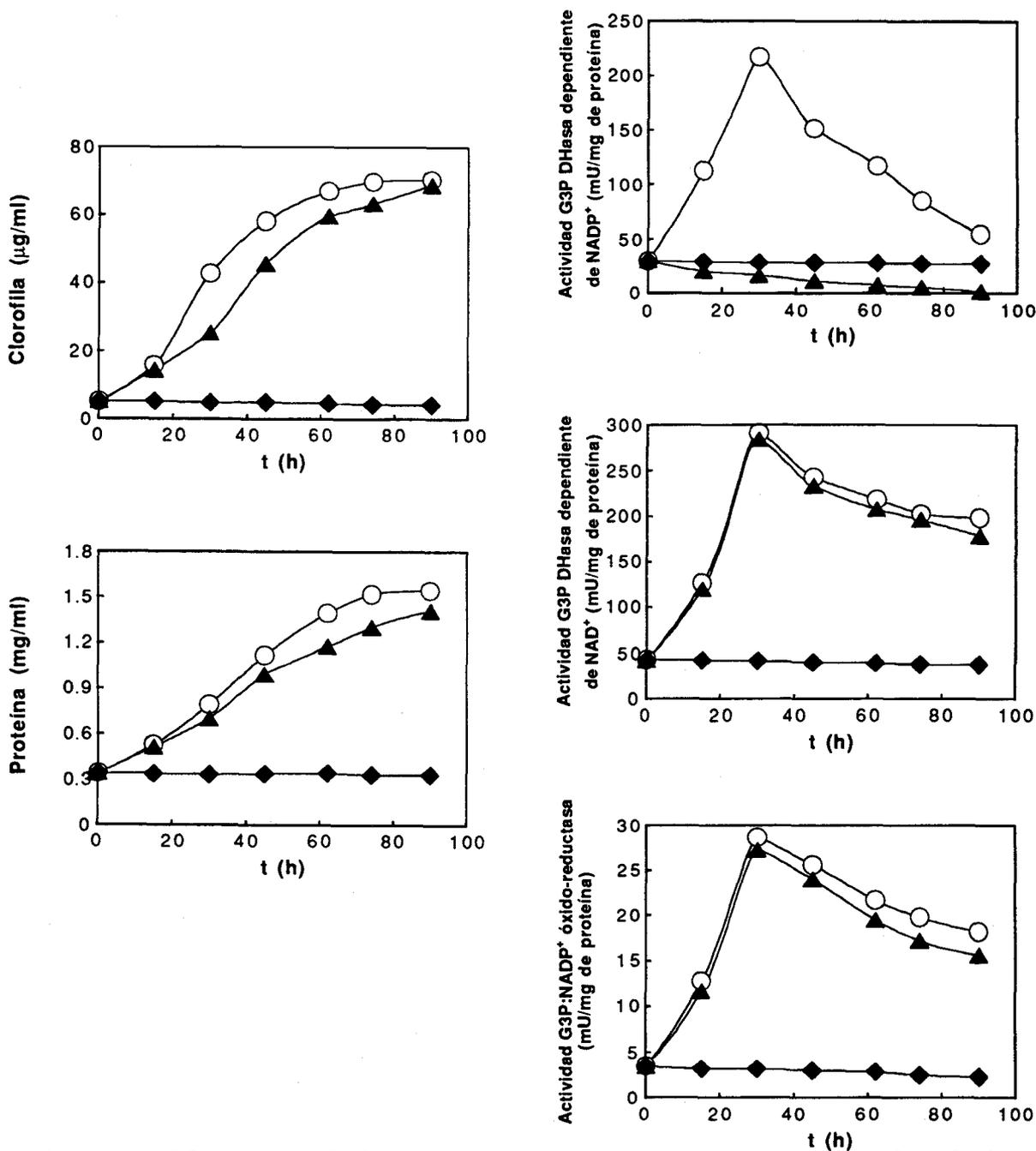
acetato empleada era de 50 mM el crecimiento no se veía afectado significativamente respecto al observado en condiciones fotoautotróficas aunque se producía una drástica caída de la actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$ . En cambio las actividades G3P DHasas no fosforilante y fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  parecían prácticamente inalteradas por la presencia en el medio del compuesto carbonado (Figura 12).

La Figura 13 muestra el crecimiento y los niveles de las actividades específicas de las tres G3P DHasas de cultivos de *C. reinhardtii* mantenidos en la luz, en la oscuridad en presencia de acetato 50 mM en el medio y en la oscuridad en ausencia del compuesto carbonado. Los cultivos mantenidos en la oscuridad en presencia de acetato siguen una evolución semejante en el crecimiento y el desarrollo de las actividades enzimáticas a los cultivos mantenidos en la luz. La presencia de acetato permite el crecimiento heterotrófico de los cultivos en la oscuridad y en estas condiciones se observan cambios en los niveles de actividad de las G3P DHasas no fosforilante y fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  similares a los observados en condiciones fotoautotróficas (aumento hasta un valor máximo y posterior disminución en la fase estacionaria). Por el contrario, durante el desarrollo del cultivo en presencia de acetato en la oscuridad la actividad de la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  llega a alcanzar valores próximos a cero, sugiriendo una posible represión de este enzima por efecto de la fuente de carbono orgánico. Los cultivos que se dejan evolucionar en la oscuridad sin el compuesto carbonado y no presentan por tanto un crecimiento apreciable, poseen niveles bajos y constantes de las tres actividades.



**Figura 12.** Efecto de la presencia de acetato sódico sobre el crecimiento y los niveles celulares de las actividades G3P DHasas de cultivos de *C. reinhardtii* desarrollados en la luz.

La Figura presenta la evolución de un cultivo fotoautotrófico de *C. reinhardtii* (O) junto a otro cultivo desarrollado en la luz en presencia de la fuente de carbono orgánico acetato sódico 50 mM (Δ). La adición del compuesto carbonado se realizó en condiciones de esterilidad como se indica en el apartado II.A.2.2.



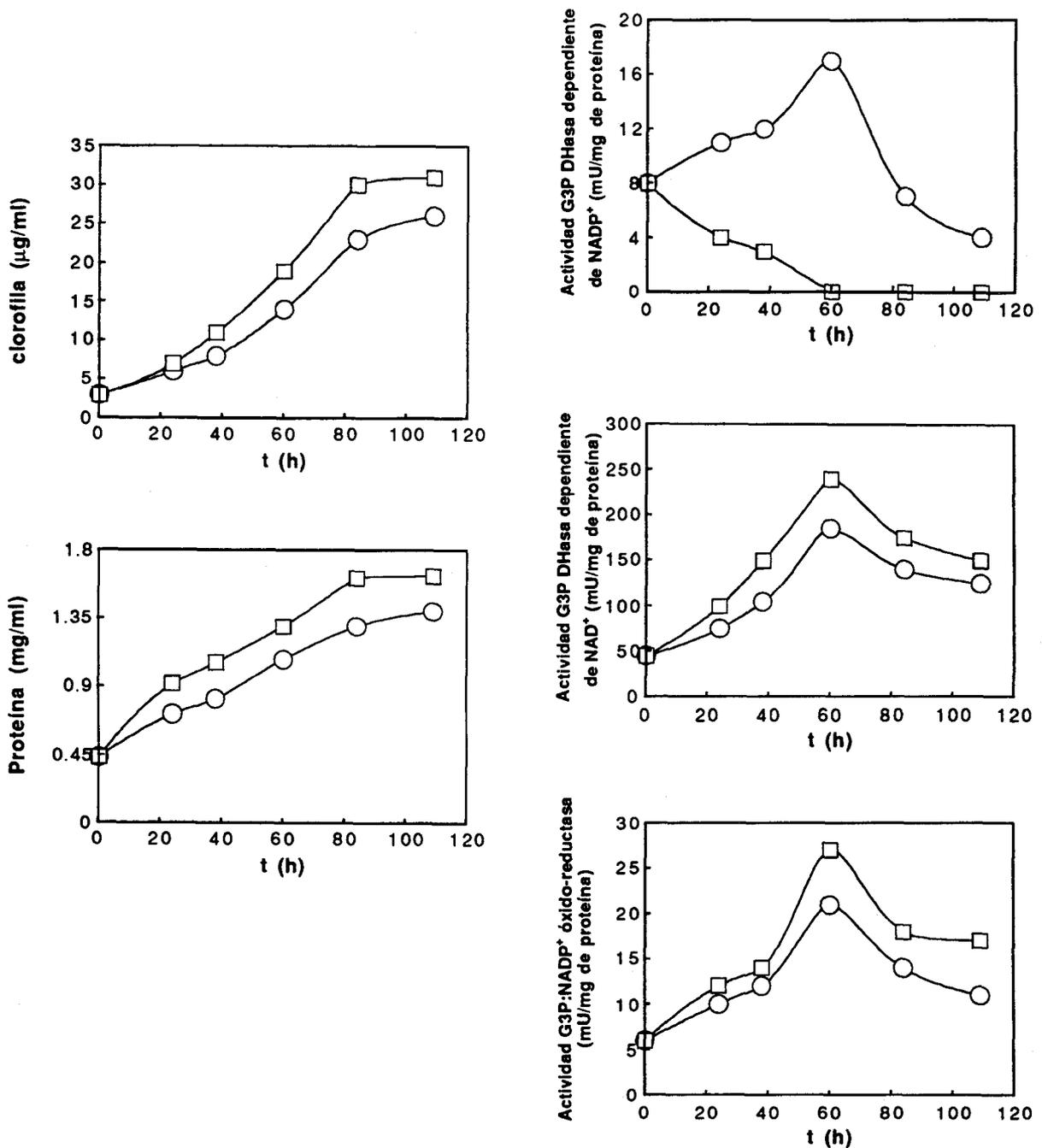
**Figura 13.** Crecimiento y cambios en las actividades G3P DHases de cultivos de *C. reinhardtii* desarrollados en la oscuridad en presencia de acetato.

La Figura presenta el crecimiento y la evolución de las actividades específicas de las G3P DHases de un cultivo de *C. reinhardtii* desarrollado en la oscuridad en presencia de acetato sódico 50 mM (▲), de otro que se dejó evolucionar en la oscuridad sin el compuesto orgánico (◆), y el de un cultivo control desarrollado en condiciones fotoautotróficas (O). La adición de acetato y el mantenimiento de los cultivos en la oscuridad se llevó a cabo como se describe en el apartado II.A.2.2.

III.C.3.2. Efecto de distintos azúcares sobre el crecimiento y los niveles de las actividades G3P DHasas de cultivos de *C. fusca*

Aunque el alga clorofícea *C. fusca* no puede usar acetato sódico como fuente de carbono, es capaz de usar eficientemente al igual que algunas otras microalgas eucarióticas el azúcar D-glucosa (Bishop, 1961; Wiessner, 1979). Hemos estudiado el desarrollo de cultivos iluminados del alga *C. fusca* en presencia de distintas concentraciones de D-glucosa, obteniéndose un crecimiento óptimo para una concentración del 0,5% (p/v) del azúcar en el medio de cultivo. En la Figura 14 se compara el crecimiento y la evolución de las actividades específicas de las tres G3P DHasas de cultivos de *C. fusca* desarrollados fotomixotróficamente con de D-glucosa y fotoautotróficamente sin el azúcar. Aunque la presencia del azúcar producía tanto un mayor crecimiento como un incremento en los niveles de las actividades G3P DHasa no fosforilante y fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$ , en estas condiciones los niveles de actividad fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$ , un típico enzima cloroplástico, bajaron hasta valores prácticamente indetectables.

El efecto descrito sobre el crecimiento y la evolución de las actividades G3P DHasas se observó también en cultivos de *C. fusca* en presencia de otros azúcares metabolizables en el medio de cultivo: aldohexosas (D-galactosa, D-manosa), cetohehexosas (D-fructosa), aldopentosas (D-ribosa) y el disacárido sacarosa. Por el contrario análogos de azúcares no metabolizables, como la L-glucosa o 3-O-metil-D-glucosa no afectaban significativamente al crecimiento ni a los niveles de las actividades (Tabla 7). Por otro lado, se observaba una inhibición parcial en el crecimiento y una disminución de las tres actividades G3P DHasas en presencia de 2-deoxi-D-glucosa, lo que se puede atribuir al efecto tóxico producido por este análogo de



**Figura 14.** Crecimiento y cambios de los niveles de actividad de las G3P DHasas de un cultivo de *C. fusca* desarrollado en la luz en presencia de D-glucosa.

La Figura muestra el desarrollo de un cultivo iluminado de *C. fusca* en presencia de D-glucosa 0,5 % (p/v) como fuente adicional de carbono (□), junto a otro que se dejó evolucionar en condiciones de fotoautotrofia (O). El azúcar se añadió al medio de cultivo en condiciones de esterilidad como se indica en el apartado II.A.2.2.

**Tabla 7.** Efecto de diferentes azúcares sobre los niveles celulares de las tres G3P DHasas en cultivos iluminados de *C. fusca*.

Azúcar	Actividad específica (mU/mg de proteína) <sup>a</sup>		
	NADP <sup>+</sup> dependiente no fosforilante	NADP <sup>+</sup> dependiente fosforilante	NAD <sup>+</sup> dependiente fosforilante
Ninguno	12 ± 1	19 ± 1	170 ± 5
D-Glucosa (27 mM)	16 ± 1	0 <sup>b</sup>	241 ± 4
D-Galactosa (27 mM)	17 ± 2	0	233 ± 6
D-Fructosa (27 mM)	16 ± 1	0	244 ± 4
D-Ribosa (33 mM)	16 ± 6	0	240 ± 4
Sacarosa (15 mM)	16 ± 1	0	246 ± 2
L-Glucosa (27 mM)	12 ± 1	18 ± 1	168 ± 6
3-O-metil-D-glucosa (27.5 mM)	13 ± 2	19 ± 2	165 ± 4
2-Deoxi-D-glucosa (30 mM)	11 ± 1	7 ± 1	130 ± 8

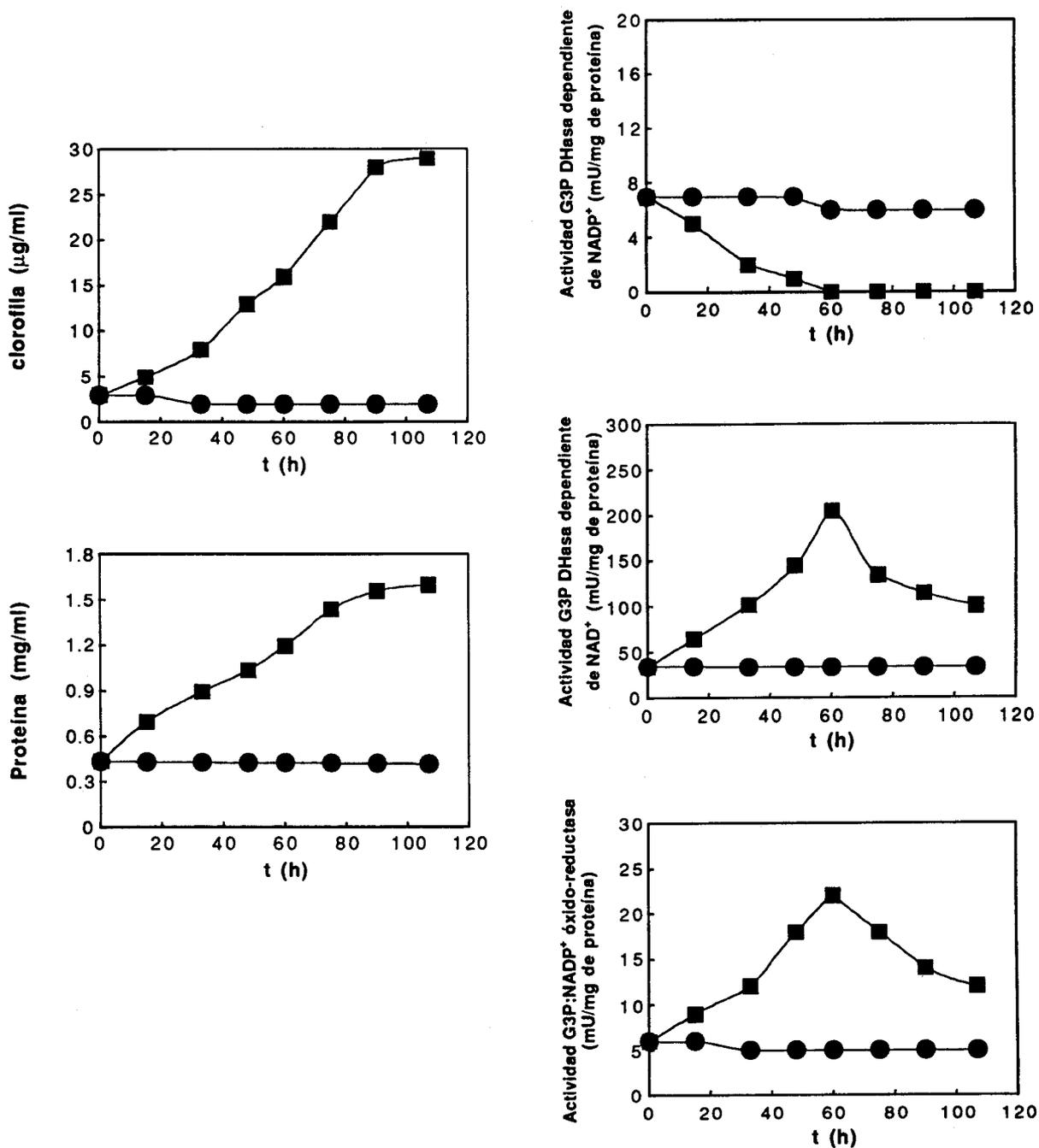
<sup>a</sup> Los datos corresponden a valores medios ± D.T. de tres determinaciones independientes llevadas a cabo al final de la fase exponencial de crecimiento (aprox. 60 h). Las concentraciones de azúcares eran en todos los casos equivalentes al 0,5% (p/v).

<sup>b</sup> Actividad inapreciable (por debajo del límite de detección, <0,1 mU/mg de proteína).

azúcar en el metabolismo fotosintético de las microalgas (Yadav y Mohanty, 1984).

La Figura 15 compara el crecimiento y la evolución de las actividades específicas de las tres G3P DHasas de un cultivo de *C. fusca* desarrollado heterotroficamente en la oscuridad en presencia de D-glucosa y de otro mantenido en la oscuridad en ausencia de fuente de carbono orgánico. Los cultivos desarrollados en la oscuridad sin el azúcar mantienen bajos y prácticamente constantes los niveles de clorofila y de proteína; esto es, no hay crecimiento. Además, los niveles de las tres actividades G3P DHasas se mantienen bajos y constantes. En cambio la presencia del azúcar permite un crecimiento óptimo, similar al típico de cultivos desarrollados en la luz, produce, además, durante el desarrollo de los cultivos en la oscuridad, una evolución de los niveles celulares de las actividades G3P DHasas no fosforilante y fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  similar a la observada en los cultivos iluminados, frente a aquellos que evolucionan sin el azúcar que mantienen bajos los niveles de ambas actividades enzimáticas. En cambio, la actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$ , al igual que lo observado en cultivos iluminados, baja hasta valores no detectables en presencia de D-glucosa.

Resultados similares en lo referente al crecimiento y las actividades específicas de las G3P DHasas se observaron también en cultivos mantenidos en la oscuridad en presencia de otros azúcares metabolizables (Tabla 8). Sin embargo, la estimulación producida por estos compuestos en los niveles de las G3P DHasas no fosforilante y fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  respecto a cultivos sin fuente de carbono orgánico, era en este caso claramente mayor (3-5 veces, ver Tabla 8), que la observada en cultivos iluminados (1,5 veces, ver Tabla 7). Los efectos mencionados no se observaron en presencia de azúcares no metabolizables



**Figura 15.** Crecimiento y cambios de los niveles de actividad de las G3P DHasas de un cultivo de *C. fusca* desarrollado en la oscuridad en presencia de D-glucosa.

La Figura presenta el crecimiento y los niveles de actividad G3P DHase de un cultivo de *C. fusca* desarrollado en presencia de 0,5 % (p/v) de D-glucosa añadida en la oscuridad (■), junto a otro mantenido en la oscuridad sin el azúcar (●). Las condiciones experimentales se indican en el apartado II.A.2.2.

**Tabla 8.** Efecto de diferentes azúcares sobre los niveles celulares de las tres G3P DHasas en cultivos de *C. fusca* mantenidos en la oscuridad.

Azúcar	Actividad específica (mU/mg de proteína) <sup>a</sup>		
	NADP <sup>+</sup> dependiente no fosforilante	NADP <sup>+</sup> dependiente fosforilante	NAD <sup>+</sup> dependiente fosforilante
Ninguno	4 ± 1	5 ± 1	43 ± 4
D-Glucosa (27 mM)	12 ± 2	0 <sup>b</sup>	190 ± 5
D-Galactosa (27 mM)	13 ± 1	0	210 ± 6
D-Fructosa (27 mM)	11 ± 2	0	151 ± 4
D-Ribosa (33 mM)	12 ± 2	0	189 ± 5
Sacarosa (15 mM)	13 ± 1	0	210 ± 5
L-Glucosa (27 mM)	4 ± 1	5 ± 1	50 ± 4
3-O-metil-D-glucosa (27.5 mM)	5 ± 2	4 ± 1	46 ± 3
2-Deoxi-D-glucosa (30 mM)	6 ± 1	5 ± 2	92 ± 5

<sup>a</sup> Los datos corresponden a valores medios ± D.T. de tres determinaciones independientes llevadas a cabo al final de la fase exponencial de crecimiento (aprox. 60 h). Las concentraciones de azúcares eran en todos los casos equivalentes al 0,5% (p/v).

<sup>b</sup> Actividad inapreciable (por debajo del límite de detección, <0,1 mU/mg de proteína).

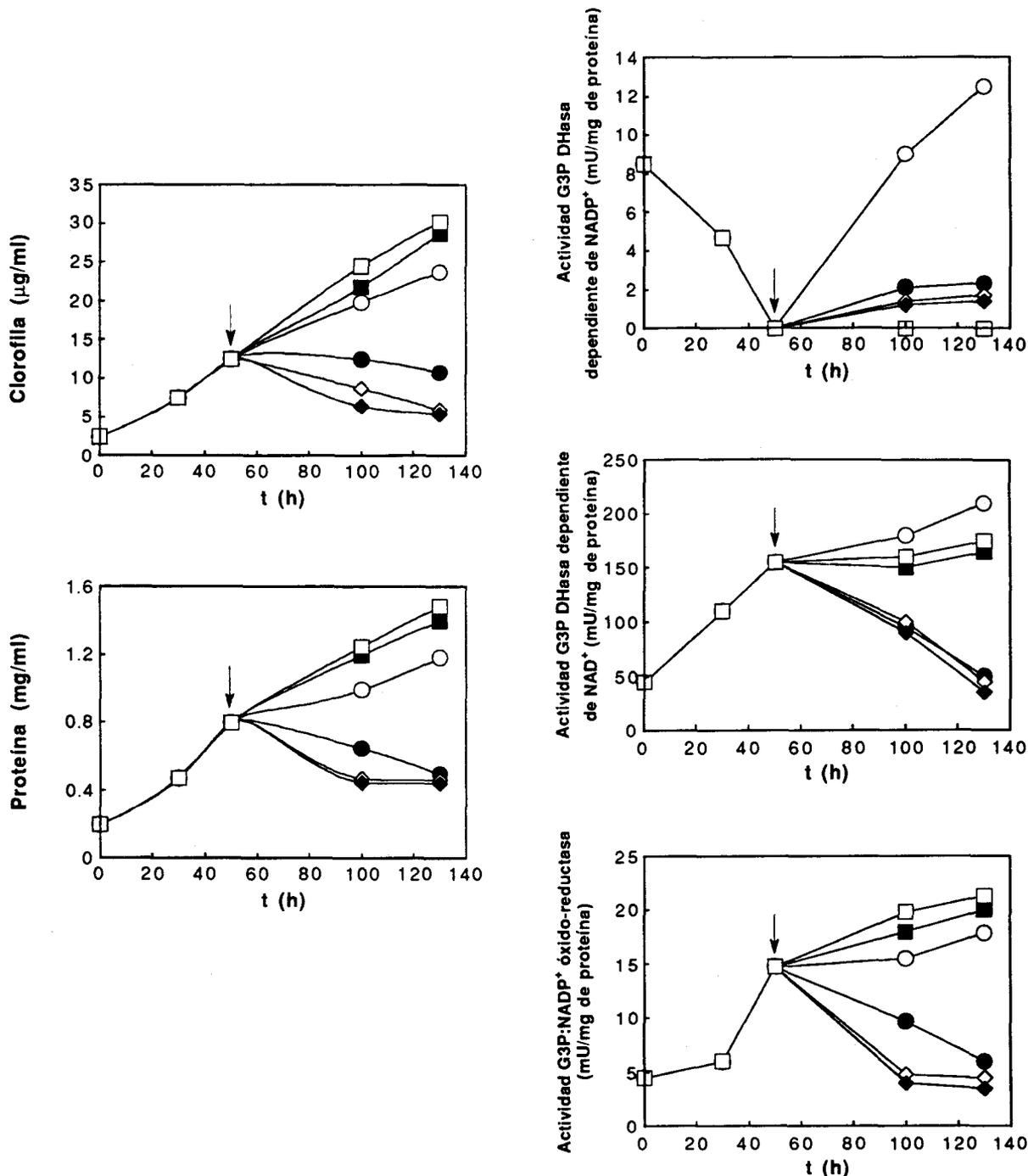
(L-glucosa, 3-O-metil-D-glucosa, 2-deoxi-D-glucosa)  
(ver Tabla 8).

III.C.4. Efecto de diferentes inhibidores sobre el crecimiento y la evolución de las actividades G3P DHasas de cultivos de *C. fusca* previamente desarrollados con D-glucosa

Estudiamos el efecto causado por la eliminación del azúcar sobre el crecimiento y las actividades G3P DHasas en cultivos previamente mantenidos en presencia de D-glucosa en la luz y el desarrollo posterior de los mismos al someterlos a diferentes condiciones nutricionales e inhibidores. Los cultivos se desarrollaron en la luz en presencia del azúcar hasta que la actividad del enzima G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  alcanzaba niveles indetectables. Tras eliminar entonces el azúcar de los cultivos mediante lavados con medio fresco (ver apartado II.A.2.2), a dos de ellos se le añadía de nuevo glucosa, otros dos cultivos se desarrollaron sin el azúcar, y a otros dos se les añadía cicloheximida (2  $\mu\text{g/ml}$ ), dejándolos, para cada condición, uno en la luz y el otro en la oscuridad (Figura 16).

Tras la eliminación de la D-glucosa, los cultivos desarrollados en presencia del azúcar tanto en la luz (fotomixotrofía) como en la oscuridad (heterotrofía) presentan un crecimiento óptimo, superior incluso al del cultivo que se dejó evolucionar fotoautotróficamente. No se observó crecimiento, en cambio, en aquellos cultivos mantenidos en la oscuridad sin el azúcar o en presencia de cicloheximida (Figura 16).

Tras la eliminación del azúcar las actividades G3P DHasas no fosforilante y fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  siguen pautas semejantes. Los niveles de estos dos

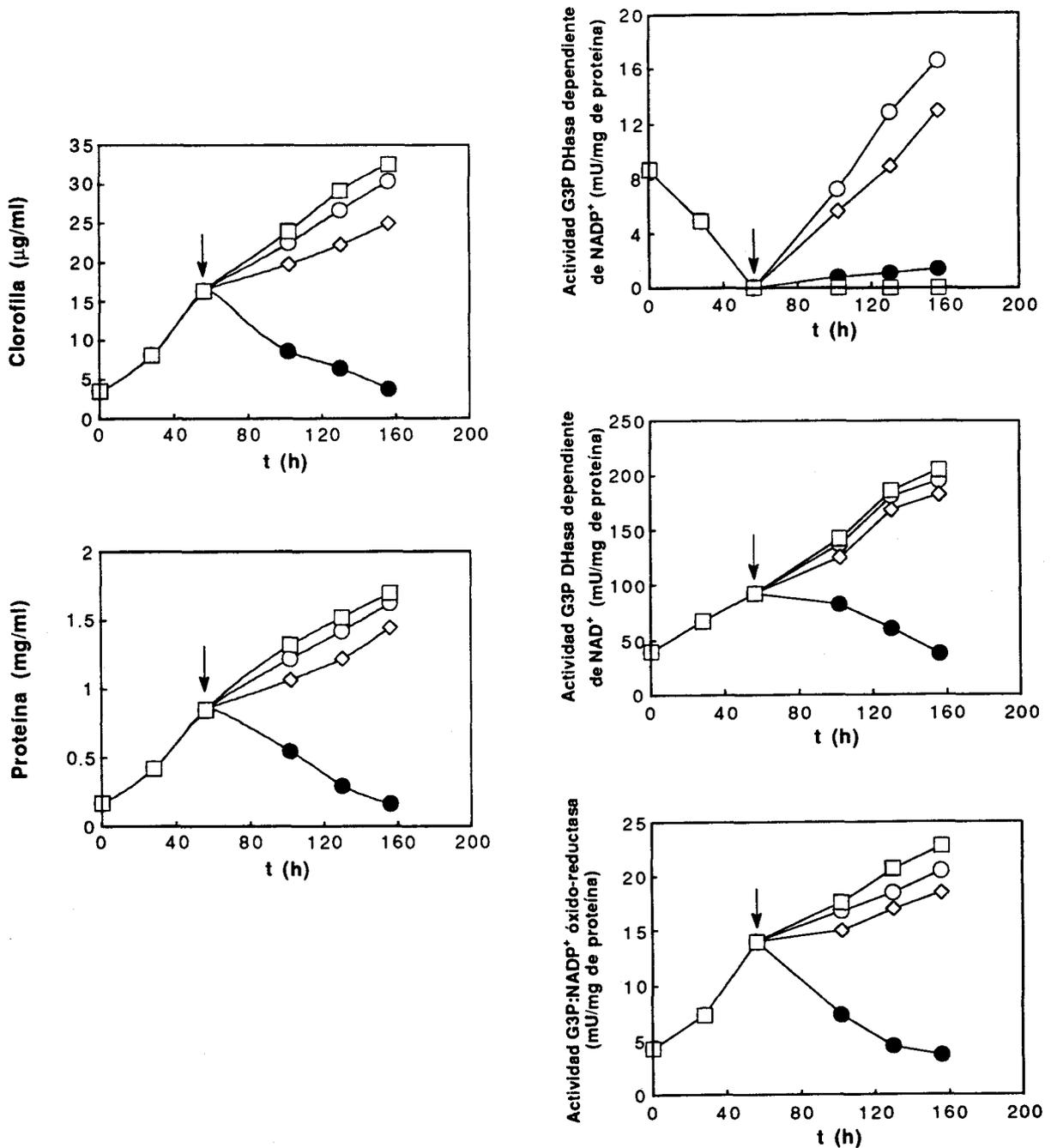


**Figura 16.** Crecimiento y cambios en los niveles de las actividades G3P DHases de cultivos de *C. fusca* sometidos a diferentes condiciones tras un periodo de tratamiento con D-glucosa.

A tiempo cero se añadió el azúcar (0,5 %, p/v) a cultivos iluminados. En el instante indicado por la flecha, el azúcar se eliminó lavando las células, las cuales se resuspendieron finalmente en medio mineral fresco, manteniendo unos cultivos bajo iluminación (símbolos huecos) y pasando otros a la oscuridad (símbolos cerrados) con las siguientes adiciones: ninguna (O, ●); glucosa (□, ■); cicloheximida 2 µg/ml (◇, ◆).

enzimas aumentan en los cultivos desarrollados en la luz o en la oscuridad con el azúcar, o si el cultivo se desarrolla fotoautotróficamente. Por el contrario en aquellos cultivos que se dejaban evolucionar en la oscuridad o en presencia de cicloheximida, circunstancias en las que no se observa crecimiento, los niveles de actividad de ambas enzimas bajaban hasta llegar a niveles basales (Figura 16). En los cultivos desarrollados en presencia de glucosa la actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  alcanzaba niveles indetectables que se mantenían en aquellos cultivos posteriormente mantenidos con el azúcar. Por el contrario, en los cultivos que tras la eliminación del azúcar se desarrollaron fotoautotróficamente el nivel de esta actividad incrementa progresivamente hasta alcanzar valores similares a los típicos de cultivos fotoautotróficos. La marcada inhibición que la cicloheximida -inhibidor de síntesis de proteína en ribosomas eucarióticos 80S- provoca sobre este proceso (ver Figura 16) y el periodo de tiempo en que tiene lugar (del orden de horas) indican claramente que se trata de una síntesis *de novo* de proteínas más que de una activación del enzima. Hay que hacer notar que tras la eliminación del azúcar se detectaron niveles basales de actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  en los cultivos mantenidos en la oscuridad en ausencia de glucosa (véase Figura 16) siendo estos valores muy bajos en comparación con los alcanzados por los cultivos iluminados. La luz no parece por tanto un factor indispensable para la síntesis del enzima, sino que es más bien la presencia del azúcar la que la reprime totalmente.

Hemos estudiado también el efecto de la lincomicina, inhibidor de síntesis de proteína por ribosomas 70S (Chueca y col., 1984), sobre el crecimiento y la evolución de los niveles de actividad específica de las tres G3P DHasas en cultivos previamente desarrollados con D-glucosa (Figura 17).

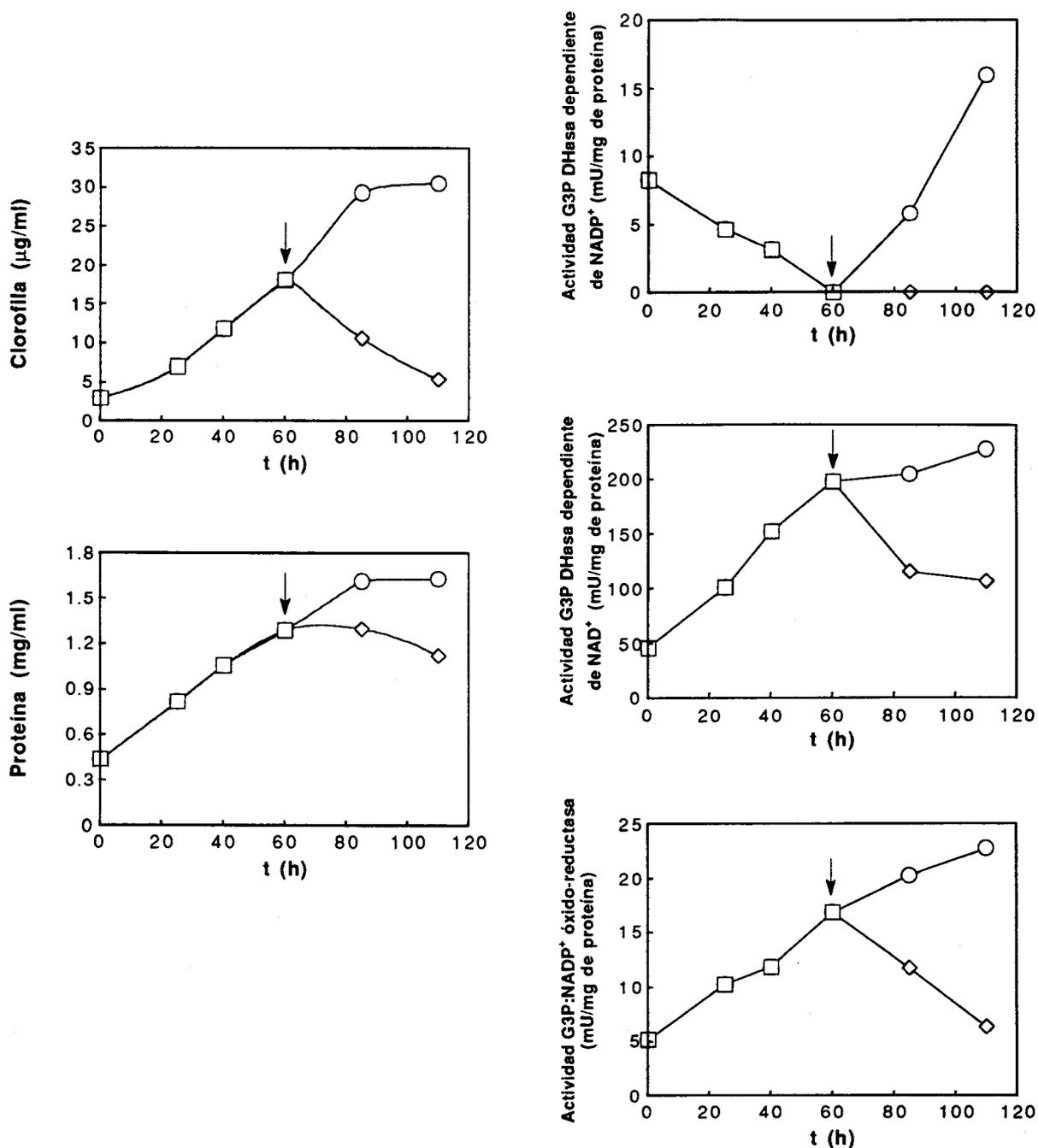


**Figura 17.** Crecimiento y cambios en los niveles de las actividades G3P DHAsas de cultivos de *C. fusca* tratados con lincomicina tras un periodo de desarrollo en la luz en presencia de D-glucosa.

A tiempo cero se añadió el azúcar (0,5 %, p/v) a cultivos iluminados. En el instante indicado por la flecha, el azúcar se eliminó lavando las células, las cuales se resuspendieron finalmente en medio mineral fresco y se mantuvieron en las siguientes condiciones: en la luz sin azúcar (O), en la oscuridad (●), en la luz con azúcar (□) y en la luz con lincomicina 200 µg/ml (◇). El mantenimiento del cultivo en la oscuridad y la adición del inhibidor se realizaron según se describe en el apartado II.A.2.2.

La presencia de lincomicina (200  $\mu\text{g/ml}$ ) tras la eliminación del azúcar en el medio de cultivo, provocaba sólo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de los cultivos iluminados y las actividades G3P DHasas no fosforilante y fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  presentaban actividades específicas sólo algo inferiores por la presencia de este inhibidor en el medio. La actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$ , que se viene a cero por la presencia de D-glucosa, se recuperaba tras la eliminación del azúcar hasta alcanzar los niveles habituales a pesar del tratamiento del cultivo con lincomicina. Estos resultados confirman que este proceso es debido a síntesis de novo de proteína codificada por el genoma nuclear.

Se ha estudiado asimismo el efecto del inhibidor del flujo lineal de electrones fotosintético DCMU sobre el crecimiento y la evolución de las tres actividades G3P DHasas de cultivos previamente tratados con D-glucosa (Figura 18). La adición de DCMU (30  $\mu\text{M}$ ) al medio de cultivo, originaba la inhibición total e inmediata del crecimiento de los mismos. Los niveles de actividades específicas de las dos G3P DHasas no fosforilante y fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$ , disminuyen por la presencia del inhibidor hasta niveles basales. Por otro lado, la actividad del enzima fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$ , previamente reducida hasta niveles indetectables por la presencia de D-glucosa, no se recuperaba en presencia de DCMU (Figura 18) indicando que este proceso es en última instancia dependiente del poder reductor promovido por el flujo de electrones fotosintético.



**Figura 18.** Crecimiento y cambios en los niveles de las actividades G3P DHases de cultivos de *C. fusca* desarrollados con D-glucosa y tratados posteriormente con DCMU tras eliminar el azúcar.

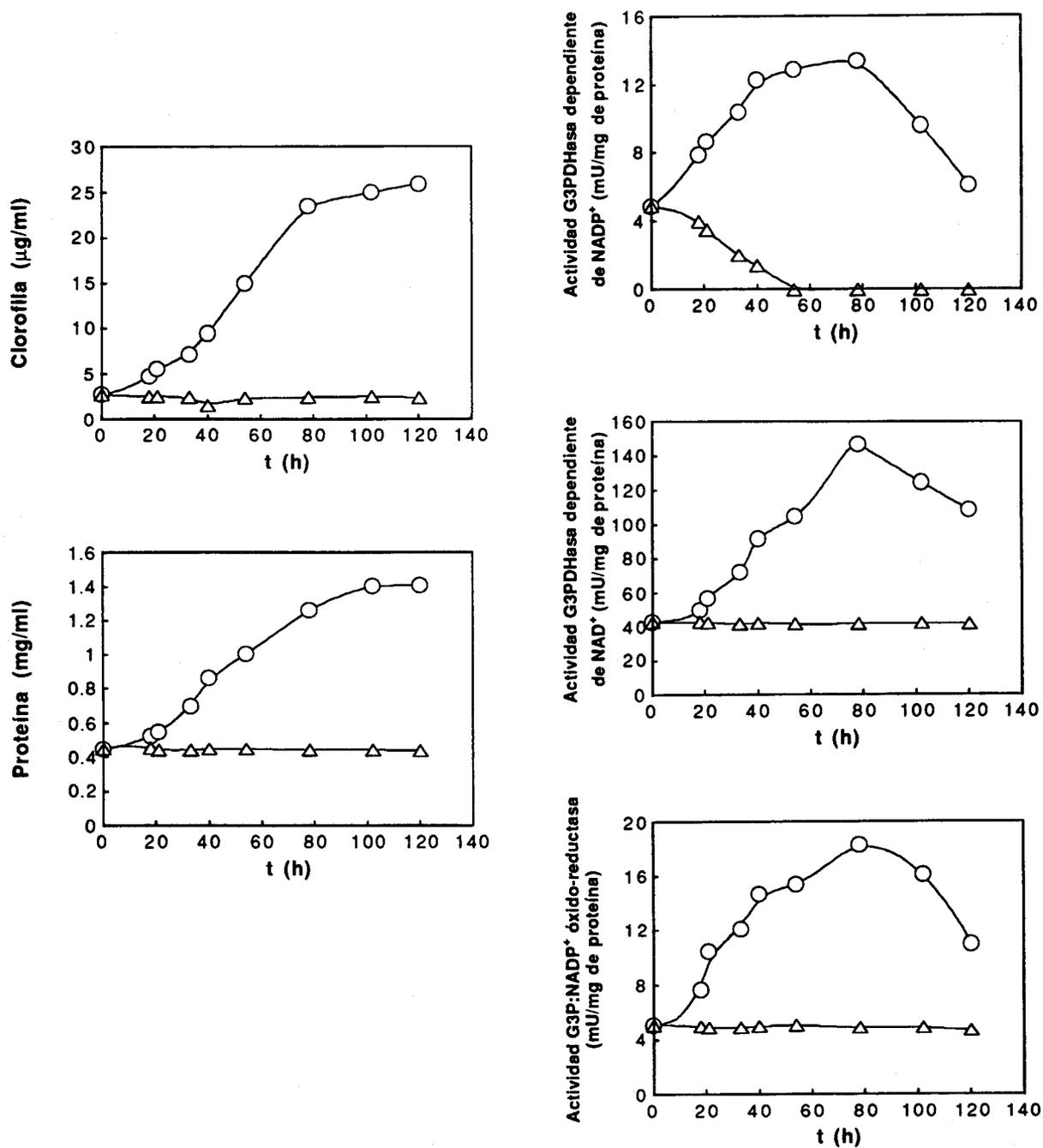
A tiempo cero se añadió el azúcar (0,5 %, p/v) a cultivos iluminados. En el instante indicado por la flecha, el azúcar se eliminó lavando las células, las cuales se resuspendieron finalmente en medio mineral fresco y se mantuvieron en las siguientes condiciones: en la luz (O) o en presencia de DCMU 30  $\mu\text{M}$  (◊). La adición del inhibidor se llevó a cabo como se indica en el apartado II.A.2.2.

### III.C.5. Efecto de la ausencia de fuente de carbono inorgánico sobre las actividades G3P DHasas de cultivos de *C. fusca*

Se ha estudiado el desarrollo y los cambios en las tres actividades G3P DHasas de cultivos de *C. fusca* en ausencia de fuente de carbono inorgánico, y por tanto en condiciones de "hambre" de carbono, eliminando el CO<sub>2</sub> de la mezcla gaseosa con la que se burbujeaban los cultivos haciéndola pasar previamente por agua de barita.

La Figura 19 presenta la evolución de las actividades específicas de cultivos iluminados mantenidos en ausencia de fuente de carbono o desarrollados fotoautotróficamente en presencia de CO<sub>2</sub>. La ausencia total de crecimiento de los cultivos mantenidos sin fuente de carbono era patente por los niveles bajos y constantes de clorofila y proteína, mientras que las actividades G3P DHasa no fosforilante y fosforilante dependiente de NAD<sup>+</sup> mostraban valores constantes aunque basales a lo largo del tiempo de cultivo. En cambio la actividad fosforilante dependiente de NADP<sup>+</sup> disminuía hasta valores indetectables en ausencia de fuente de carbono (véase Figura 19), presentando, por tanto, un comportamiento muy similar al que había sido observado por la presencia de azúcares metabolizables en el medio de cultivo.

Los cultivos de *C. fusca* en "hambre" de carbono, obtenidos por ausencia de fuente de carbono inorgánico durante el tiempo necesario para alcanzar niveles indetectables de la actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de NADP<sup>+</sup>, no mostraban diferencias significativas respecto de aquellos desarrollados en condiciones fotoheterotróficas (en presencia de glucosa) y también con niveles indetectables de esta actividad enzimática (véase Apdo. III.C.4) en su



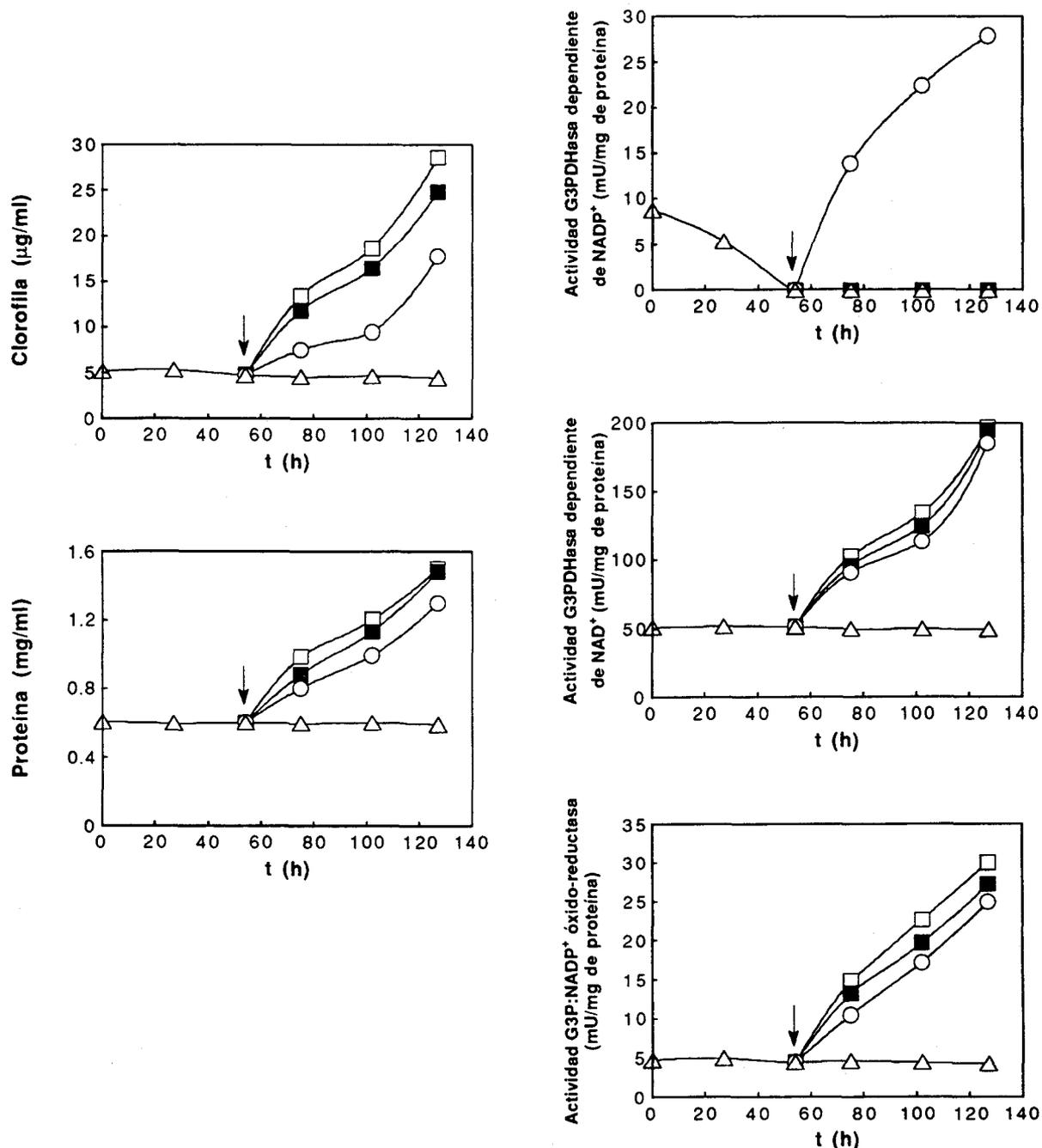
**Figura 19.** Efecto de la ausencia de fuente de carbono inorgánico sobre el crecimiento y las actividades G3P DHasas de cultivos de *C. fusca*.

La Figura muestra el desarrollo de un cultivo de *C. fusca* mantenido sin fuente de carbono inorgánico (CO<sub>2</sub>) mediante burbujeo con aire pasado con agua de barita (Δ) junto a otro que se dejó evolucionar normalmente en condiciones fotoautotróficas (O).

respuesta a distintas condiciones nutricionales posteriores (fotoautotrofía, (foto)heterotrofía) (Figura 20).

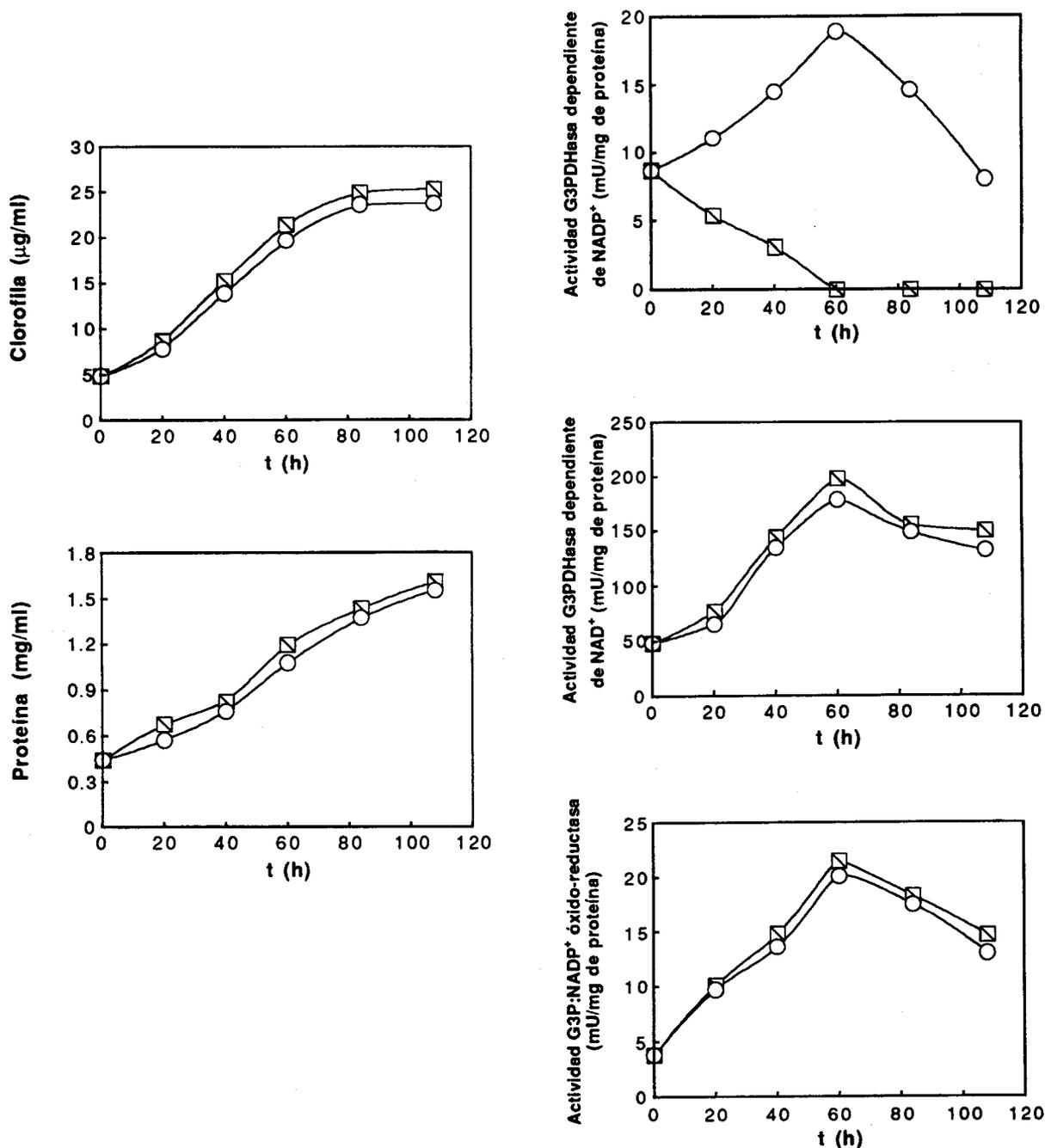
### III.C.6. Evolución de las actividades G3P DHasas durante el desarrollo de cultivos de *C. fusca* con D-glucosa como fuente exclusiva de carbono

La Figura 21 muestra el crecimiento y la evolución de las actividades G3P DHasas de cultivos de *C. fusca* mantenidos en la luz en presencia de D-glucosa como única fuente de carbono (burbujeados con aire sin CO<sub>2</sub>), comparándolas con las de cultivos que se han dejado evolucionar en condiciones fotoautotróficas. La presencia del compuesto orgánico como fuente exclusiva de carbono provocaba un ligero aumento en el crecimiento, así como valores algo mayores de las actividades específicas correspondientes a las G3P DHasas no fosforilante y fosforilante dependiente de NAD<sup>+</sup>, mientras que la actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de NADP<sup>+</sup> desciende hasta niveles indetectables en el cultivo desarrollado en presencia del azúcar. Resultados muy similares se obtuvieron con cultivos desarrollados en la oscuridad con D-glucosa en ausencia de fuente de carbono inorgánico (datos no mostrados). En conjunto estos datos sugieren que los cultivos de *C. fusca* pueden desarrollarse a expensas de glucosa en ausencia total de fijación de CO<sub>2</sub> con tasas similares a los cultivos fotoheterotróficos convencionales. Por otra parte la ausencia o presencia de CO<sub>2</sub> no parece tener un efecto significativo sobre los cambios de las actividades G3P DHasas ocasionados por la presencia del azúcar (véase Apdo III.C.3.2).



**Figura 20.** Crecimiento y cambios en los niveles de las actividades G3P DHasas de cultivos de *C. fusca* sometidos a diferentes condiciones nutricionales tras un periodo de tiempo de iluminación en ausencia de CO<sub>2</sub>.

Tras un periodo de iluminación en ausencia de fuente de carbono inorgánico (Δ), en el instante indicado por la flecha las células se lavaron y se resuspendieron en medio fresco, manteniéndose cultivos en las siguientes condiciones: con D-glucosa (0,5 %, p/v) y aporte de CO<sub>2</sub> en la luz (□), suministrando ambas fuentes de carbono pero en la oscuridad (■), con CO<sub>2</sub> como fuente exclusiva de carbono en la luz (○), y sin carbono inorgánico en la luz (Δ).



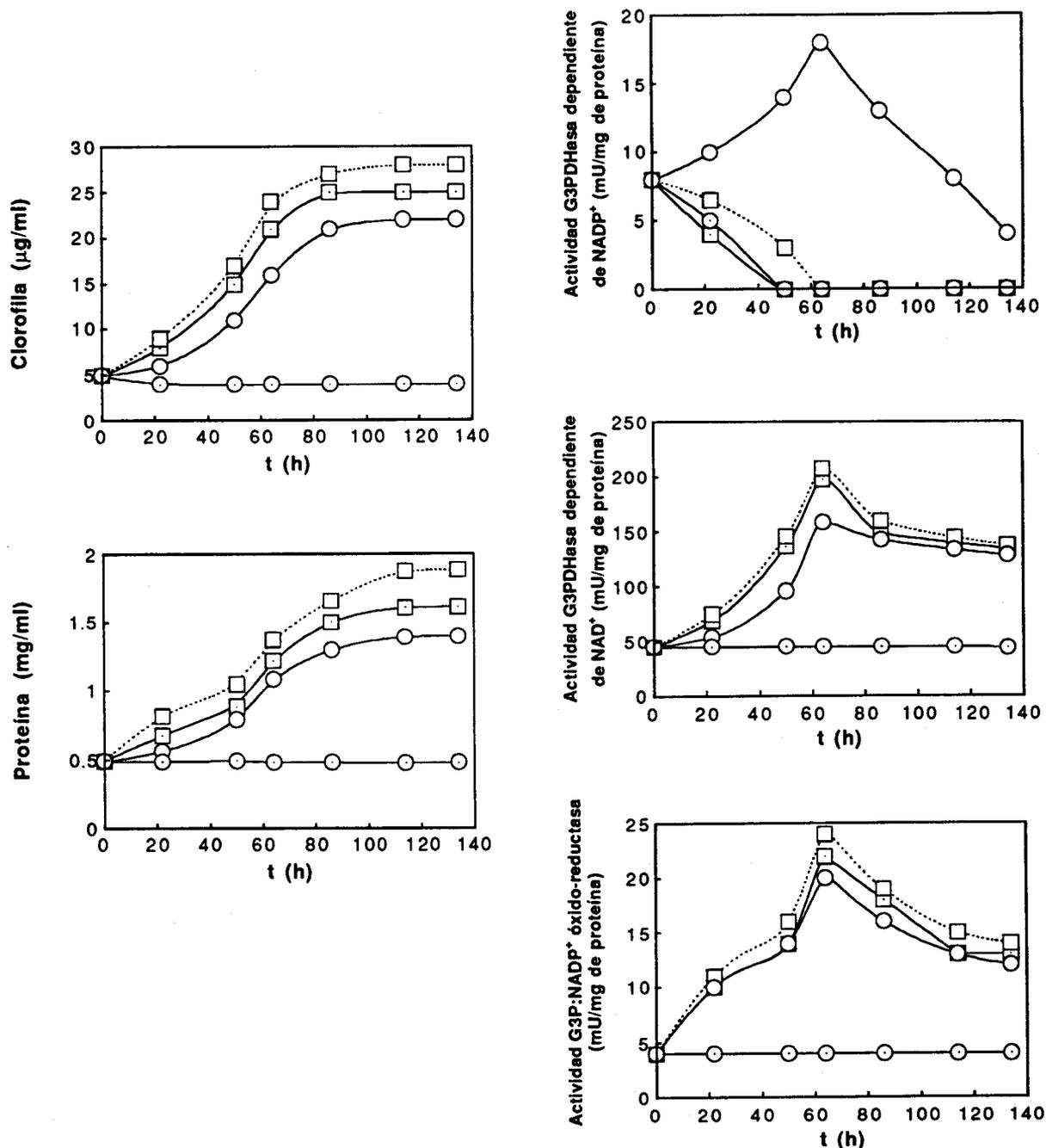
**Figura 21.** Crecimiento y cambios en los niveles de las actividades G3P DHasas de un cultivo de *C. fusca* desarrollado en la luz con D-glucosa como única fuente de carbono.

La Figura presenta el crecimiento y la evolución de las actividades específicas de las tres G3P DHasas de un cultivo de *C. fusca* mantenido en la luz en presencia de D-glucosa 0,5 % (p/v) como única fuente de carbono (gaseado con aire pasado por agua de barita) (◻), junto a otro usado como control que se dejó evolucionar paralelamente en condiciones fotoautotróficas (O).

### III.C.7. Evolución de las actividades G3P DHasas durante el desarrollo de cultivos de *C. fusca* mantenidos en condiciones microaeróbicas

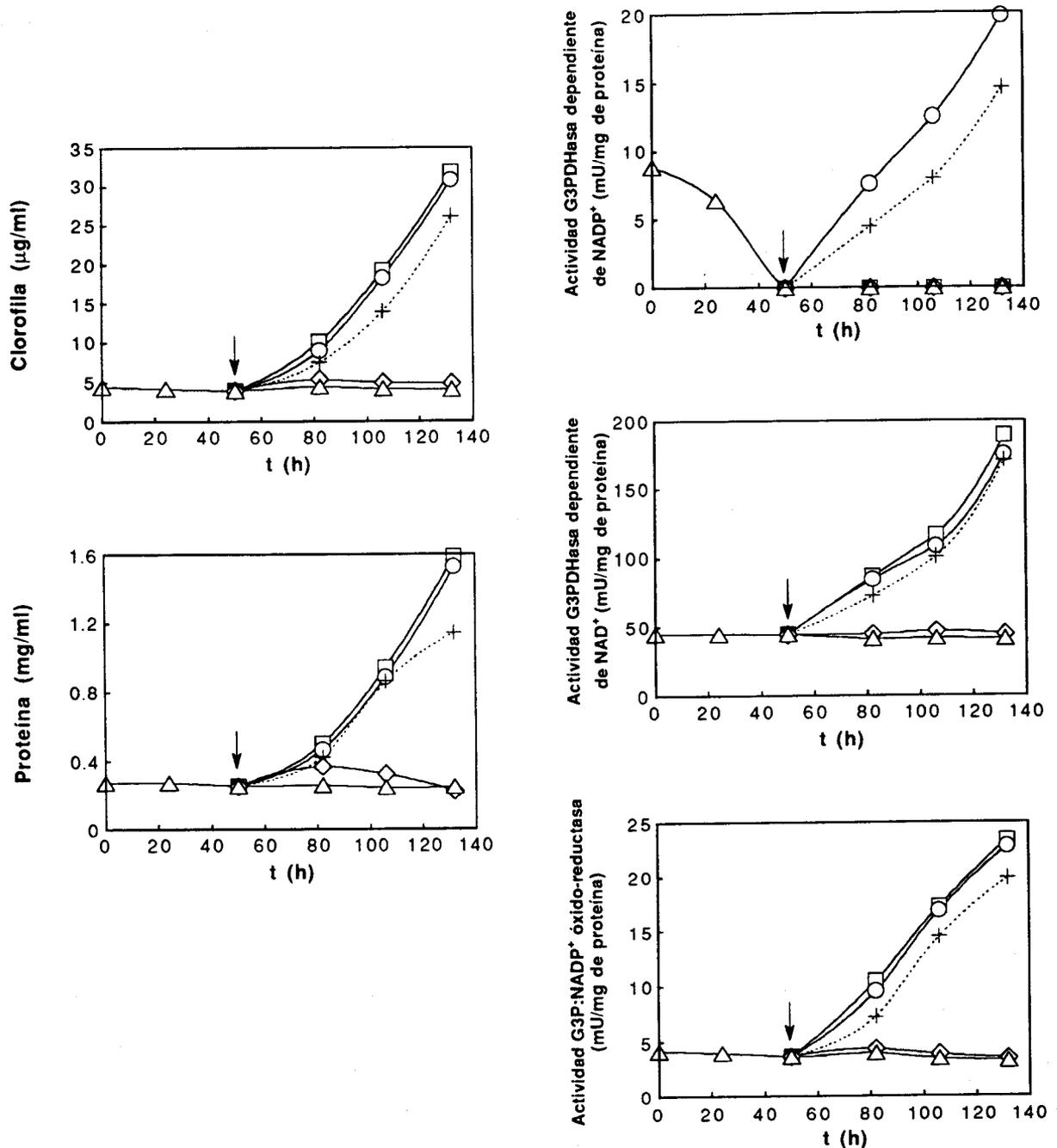
La presencia de oxígeno molecular en la mezcla gaseosa con la que se burbujeaban los cultivos podía tener algún efecto sobre el crecimiento y los cambios de las actividades enzimáticas de los cultivos de *C. fusca* desarrollados en distintas condiciones nutricionales, bien sea por la actividad respiratoria del alga o por la capacidad del oxígeno de formar especies químicas derivadas altamente reactivas ( $O_2\cdot^-$ ,  $H_2O_2$ , oxígeno triplete) capaces de inhibir reacciones enzimáticas. Es sabido que el oxígeno molecular puede actuar como aceptor final de la cadena fotosintética de transporte de electrones (flujo pseudocíclico) en especial cuando se produce una acumulación de poder asimilatorio (p.e. si el  $CO_2$  es limitante) generando derivados activos del oxígeno (Arnon, 1977). Se decidió, por tanto, emplear  $N_2$  en lugar de aire para burbujear cultivos mantenidos en distintas condiciones nutricionales.

Como se muestra en la Figura 22, la drástica disminución hasta niveles indetectables de la actividad G3P DHasa dependiente de  $NADP^+$  que tiene lugar en ausencia de fuente de carbono inorgánico se observaba igualmente en cultivos gaseados con  $N_2$  (condiciones microaeróbicas), sugiriendo la no participación del  $O_2$  y sus derivados activados en el proceso y descartando una posible inactivación enzimática *in vivo* producida por dichas especies químicas. Por otra parte, el mayor nivel de crecimiento alcanzado por los cultivos desarrollados con glucosa en condiciones aeróbicas sugieren que una cierta actividad respiratoria puede tener lugar en especial durante la fase estacionaria. La Figura 23 muestra que los cambios en los niveles de las tres actividades G3P DHasas producidos por el desarrollo en condiciones microaeróbicas y posterior



**Figura 22.** Crecimiento y cambios en los niveles de las actividades G3P DHAsas de cultivos de *C. fusca* desarrollados en la luz en condiciones microaeróbicas con y sin fuente de carbono orgánico.

La Figura presenta el crecimiento y los niveles de actividad específica de las tres G3P DHAsas durante el desarrollo de cultivos de *C. fusca* mantenidos bajo iluminación: en condiciones microaeróbicas (gaseado con N<sub>2</sub>) (O), con D-glucosa 0,5 % (p/v) como única fuente de carbono (gaseado con N<sub>2</sub>) (□), con azúcar y CO<sub>2</sub> en aire (·-□-·), y fotoautotóricamente con 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> en aire (O).



**Figura 23.** Crecimiento y cambios en los niveles de las actividades G3P DHases de cultivos de *C. fusca* sometidos a diferentes condiciones tras un periodo de desarrollo en la luz en condiciones microaeróbicas.

Las células se mantuvieron bajo iluminación y gaseo con N<sub>2</sub> hasta el momento indicado por la flecha, en el que se lavaron, se resuspendieron en el mismo volumen de medio mineral fresco y se distribuyeron en cultivos iluminados en las siguientes condiciones: con D-glucosa 0,5 % (p/v) como única fuente de carbono (gaseado con N<sub>2</sub>) (□), con aporte de CO<sub>2</sub> en aire (○), con lincomicina 200 µg/ml y CO<sub>2</sub> en aire (+), con cicloheximida 2 µg/ml y CO<sub>2</sub> en aire (◇), y un control gaseado con N<sub>2</sub> (△).

cambio a otras condiciones nutricionales, deben ser debidos, al igual que los ocasionados por la presencia de compuestos de carbono orgánico asimilables (véase Apdo. III.C.4), a procesos de degradación/síntesis de novo de proteínas en ribosomas 80S, ya que se inhiben por cicloheximida y no por lincomicina.

III.C.8. Contenido en carbohidratos de cultivos de *C. fusca* desarrollados fotoautotróficamente, con D-glucosa y en ausencia de CO<sub>2</sub>

Los cultivos de ciertas especies del género *Chlorella* (p.e. *C. pyrenoidosa* y *C. fusca*) desarrollados en presencia de D-glucosa tanto en la luz como en la oscuridad, presentan una morfología diferente a los desarrollados en ausencia del azúcar como se constata por las observaciones microscópicas (Rodríguez-López, 1965), y hemos confirmado en los experimentos que aquí se presentan. De un lado, las células tienen un tamaño considerablemente mayor; de otro, se produce una mayor cantidad de material celular por unidad de volumen del cultivo, lo que se atribuye a la acumulación de polisacáridos de reserva, especialmente almidón. La Tabla 9 muestra los datos de peso seco por ml de cultivo para cultivos desarrollados en ausencia o presencia de D-glucosa, tanto en la luz como en la oscuridad. La presencia de D-glucosa en el medio produce un aumento de aproximadamente el doble del material celular en los cultivos desarrollados en la luz, mientras que las tasas de crecimiento son muy similares (véase Apdo. III.C.3.2). El aumento del material celular en la oscuridad es, sin embargo, aproximadamente diez veces mayor para los cultivos desarrollados con el azúcar que el de aquellos mantenidos sin fuente de carbono orgánico, que no muestran un crecimiento apreciable. Estos datos concuerdan con el hecho de que la presencia de D-glucosa estimula la producción de polisacáridos de

**Tabla 9.** Determinación del material celular expresado como peso seco de cultivos de *C. fusca* mantenidos en distintas condiciones.

Condiciones de crecimiento	Peso seco (mg/ml) <sup>a</sup>	
	49 h de cultivo (fase exponencial)	75 h de cultivo (fase estacionaria)
Luz	7,4 (+) <sup>b</sup>	11,8 (+)
Luz, D-Glucosa <sup>c</sup>	13,9 (+)	20,5 (+)
Oscuridad	0,7 (-)	1,3 (-)
Oscuridad, D-Glucosa	9,3 (+)	14,5 (+)

<sup>a</sup> El material celular, procedente de 25 ml de cultivo si éste se desarrollaba en la luz o en presencia de D-glucosa y de 50 ml si éste evolucionaba sin azúcar en la oscuridad, se trató como se describe en el Apartado II.D.4.

<sup>b</sup> (+), crecimiento; (-), sin crecimiento apreciable.

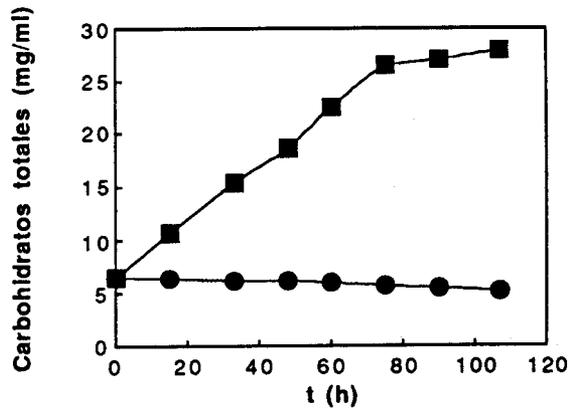
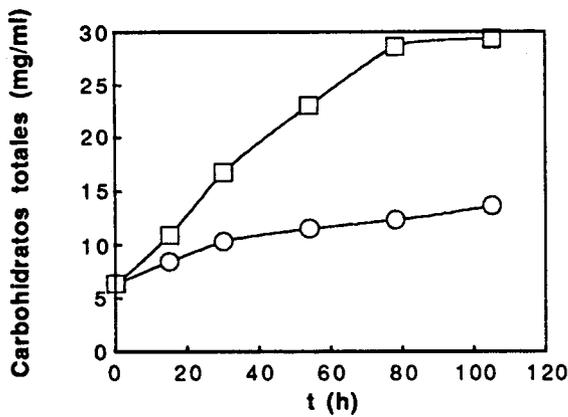
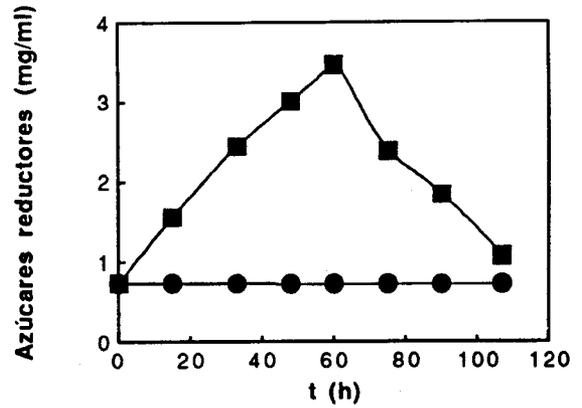
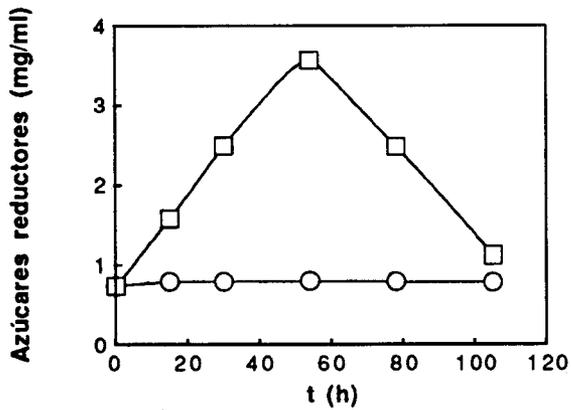
<sup>c</sup> El medio de cultivo contenía una concentración 27 mM de azúcar.

reserva por estas microalgas, lo que queda reflejado en el incremento del material celular de los cultivos desarrollados con el azúcar, tanto en la luz como en la oscuridad, respecto del cultivo desarrollado fotoautotróficamente (véase Tabla 9).

Hemos cuantificado el contenido celular de azúcares reductores y carbohidratos totales (principalmente polisacáridos tipo almidón) durante el crecimiento de cultivos de *C. fusca* desarrollados tanto en la luz como en la oscuridad y en presencia o ausencia de D-glucosa (Figura 24). Los azúcares reductores (mono y oligosacáridos), se determinaron en el sobrenadante de los extractos celulares tras centrifugación diferencial. Sus niveles se mantienen prácticamente constantes en ausencia de azúcares exógenos pero aumentan durante el desarrollo de los cultivos en presencia de D-glucosa, tanto en la luz como en la oscuridad, hasta alcanzar valores máximos en la fase de mayor actividad metabólica del cultivo (final de la fase exponencial de crecimiento), disminuyendo posteriormente cuando se entraba en la fase estacionaria. Hay que hacer notar el claro paralelismo observado entre los niveles celulares de azúcares reductores y los valores de actividades específicas de las dos G3P DHasas citosólicas, presumiblemente implicadas en las rutas de degradación/biosíntesis de estos compuestos (glicolisis, etc.) en los cultivos de *C. fusca* desarrollados en presencia de una fuente de carbono orgánico exógena. Los cultivos mantenidos en ausencia del azúcar presentaban tanto en la luz como en la oscuridad niveles más bajos y prácticamente constantes de azúcares reductores durante todo el desarrollo del cultivo. El contenido en carbohidratos totales presentes en extractos celulares no sometidos a centrifugación diferencial -constituído en su mayor parte por los polisacáridos de reserva (almidón) almacenados por el alga- se determinó también en estos

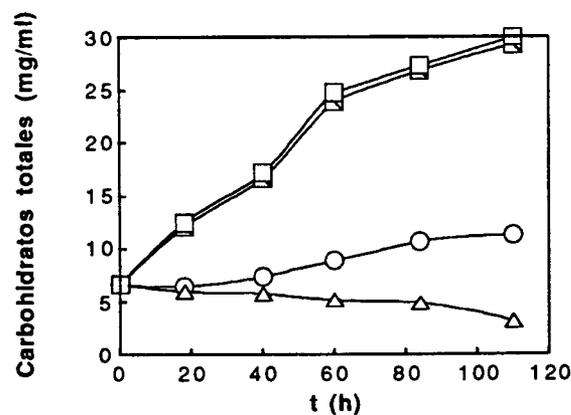
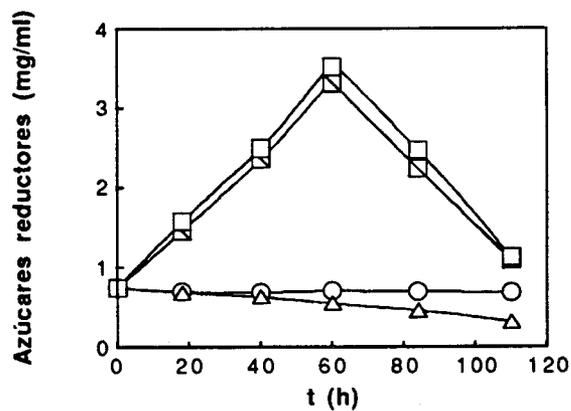
cultivos (figura 24). En presencia de D-glucosa muestran, tanto en la luz como en la oscuridad, una clara acumulación de carbohidratos de reserva a lo largo del desarrollo del cultivo (Wiessner, 1979). Para aquellos cultivos que se desarrollan en la luz, en ausencia del azúcar se produce también un aumento del contenido de carbohidratos, aunque claramente menor que el observado con glucosa exógena, probablemente por la acumulación de carbohidratos fotosintetizados. En cambio, en los cultivos mantenidos sin azúcar en la oscuridad, que no muestran crecimiento apreciable, no se observaron cambios claros, si acaso una ligera disminución en la cantidad de carbohidratos totales tras aproximadamente unas 80 h en estas condiciones.

Se han determinado también los niveles de azúcares reductores y carbohidratos totales en cultivos de *C. fusca* desarrollados en ausencia de CO<sub>2</sub> (Figura 25). En presencia de D-glucosa como fuente exclusiva de carbono los niveles de carbohidratos totales y de azúcares reductores son muy semejantes a los de cultivos desarrollados con CO<sub>2</sub> en presencia del azúcar. En ausencia de CO<sub>2</sub> ("hambre" de carbono) tiene lugar una disminución del contenido tanto de azúcares reductores como de polisacáridos, que deben ser consumidos por el alga en esta situación de estrés nutricional. Por otra parte, los niveles de carbohidratos totales y azúcares reductores también se mantienen similares a los de los cultivos fotoheterotróficos en aquellos cultivos desarrollados heterotróficamente en la oscuridad con D-glucosa como fuente exclusiva de carbono (datos no mostrados).



**Figura 24.** Contenido celular de azúcares reductores (mono y oligosacáridos) y de carbohidratos totales en extractos celulares de *C. fusca* obtenidos durante el desarrollo de cultivos en distintas condiciones nutricionales.

(O), condiciones fotoautotróficas; (□), en la luz en presencia de D-glucosa 0,5% (p/v) (fotoheterotrofia); (■) en la oscuridad en presencia de D-glucosa (heterotrofia); (●) en la oscuridad en ausencia del azúcar.



**Figura 25.** Comparación del contenido celular de azúcares reductores (mono y oligosacáridos) y de carbohidratos totales en extractos celulares de *C. fusca* obtenidos de cultivos desarrollados en la luz en distintas condiciones nutricionales y de otro mantenido en "hambre" de carbono.

(O), condiciones fotoautotróficas; (□), en la luz en presencia de D-glucosa 0,5% (p/v) (fotomixotrofia/fotoheterotrofia); (□), en presencia de D-glucosa como única fuente de carbono (mezcla gaseosa pasada por agua de barita) (fotoheterotrofia), (Δ), en ausencia de fuente de carbono ("hambre" de carbono).

### III.D. Purificación y caracterización de la G3P DHasa no fosforilante de *C reinhardtii*

#### III.D.1. Purificación del enzima

El método de purificación que describimos para la G3P DHasa no fosforilante del alga clorofícea *C. reinhardtii*, se presenta como un método de purificación del enzima alternativo al descrito por Iglesias y col. (1987) y está basado en la utilización de cuatro etapas de purificación sucesivas: precipitación con sulfato amónico al 40%, cromatografía de intercambio aniónico en DEAE celulosa DE-52, cromatografía hidrofóbica en Fenil Sepharose CL 4B y cromatografía de adsorción en hidroxapatito.

Debido a la marcada inestabilidad del enzima en solución los tampones en los que se llevaba a cabo todo el proceso debían contener varios agentes protectores. Los tampones utilizados a lo largo de la purificación han sido bien Tris HCl 10 ó 50 mM y de diferentes pHs según el proceso cromatográfico, o tampón fosfato sódico (pH 6,8) de distintas concentraciones para la cromatografía en hidroxapatito. En todo caso los tampones se suplementaron con el quelante de metales EDTA (0,1 mM) y el agente protector de grupos sulfhidrilos 2-mercaptoetanol (10 mM). Ya que la presencia de glicerol, tenía un efecto protector adicional, probablemente por reducir la actividad del agua y reproducir así las condiciones del "entorno natural" de las proteínas se utilizó a concentración 10% (v/v) como aditivo en los tampones de todos los pasos cromatográficos excepto en la cromatografía hidrofóbica, por la interacción no deseable de este compuesto orgánico con la matriz cromatográfica (Scopes, 1982). En la obtención del extracto crudo, punto de partida de la purificación, se comprobó que suplementar el tampón inmediatamente antes de la rotura

celular con los inhibidores de proteasas PMSF (Gold, 1967), ácido  $\epsilon$ -aminocaproico y benzamidina a concentraciones finales en el rango 2-5 mM contribuía decididamente a obtener una alta recuperación de la actividad durante los dos primeros pasos del proceso.

El método escogido para la obtención de los extractos crudos fué la congelación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y posterior descongelación a temperatura ambiente de la masa de células obtenida tras centrifugación de los cultivos (véase Apdo. II.B.2.1). La masa celular congelada (habitualmente 40-60 g de peso fresco) se resuspendía a razón de 2 ml de tampón por g de peso fresco y se mantenía en agitación suave hasta su descongelación total. Se produce así una rotura celular relativamente suave, de forma que los orgánulos mantienen un cierto grado de integridad, con lo que el extracto crudo resultaba en una preparación proteica más clara y relativamente más libre de pigmentos y proteínas de membrana que la obtenida al usar un método de rotura mecánica más drástica (p.e., sonicación). Hay que hacer notar que los otros métodos ensayados para la obtención de extractos (sonicación, congelación con  $\text{N}_2$  líquido) dieron como resultado una recuperación menor de actividad enzimática.

Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura comprendida entre  $0^{\circ}$  y  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### III.D.1.1. Precipitación con sulfato amónico

El primer paso en la purificación de la G3P DHasa no fosforilante consistía en un tratamiento del extracto crudo obtenido por congelación-descongelación con sulfato amónico al 40% (p/v) de saturación, según se indica en el apartado II.B.2.1. Aunque para la purificación del enzima de plantas (Pupillo y Fagiani, 1979; Iglesias y Losada, 1988) e incluso de C.

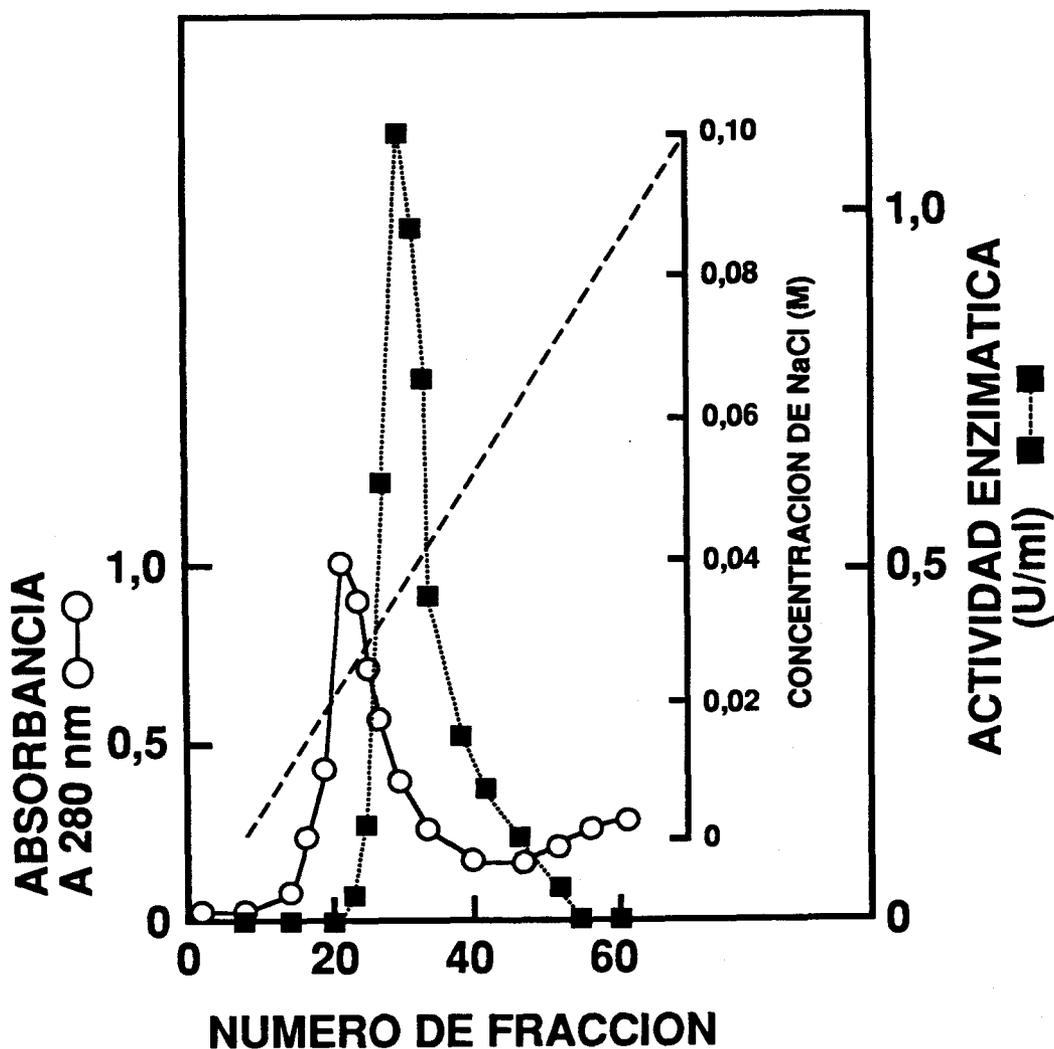
*reinhardtii* (Iglesias y col., 1987) se ha usado una precipitación fraccionada con sulfato amónico entre el 40-80%, dado que la actividad enzimática se inhibía significativamente por altas concentraciones de esta sal hemos optado por reducir al mínimo este tratamiento.

Inmediatamente después de su obtención, al extracto crudo libre de células se le añadía, lentamente y con agitación suave, glicerol (hasta el 10%, v/v). A continuación, se le añadía del mismo modo sulfato amónico sólido hasta el 40% de saturación y se incubaba en agitación durante 20 min. La suspensión se centrifugó finalmente a 40000 x g durante 20 min, obteniéndose un sobrenadante transparente amarillento y un precipitado verdoso que se descartaba. El sobrenadante se dializó frente a 5 l de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,5) conteniendo 0,1 mM EDTA y 2 mM 2-mercaptoetanol (tampón estándar) suplementado con glicerol (10%, v/v). La diálisis se mantuvo durante 12 horas, con cambios de tampón cada 6 horas. Seguidamente el dializado se centrifugó a 40000 x g durante 20 min para eliminar las proteínas desnaturalizadas.

#### III.D.1.2. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa

Como paso previo a la cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-celulosa (DE-52, Whatman), la preparación de proteínas dializada obtenida en el paso anterior (70-75 ml) se aplicó a una columna del mismo material (2,6 x 12 cm) formada a partir de unos 20 g de adsorbente y equilibrada con tampón estándar, con el fin de eliminar la mayor parte de las proteínas pigmentadas (complejos clorofila-proteína) presentes en la preparación. En efecto, cuando la preparación se aplicó sobre el lecho a un flujo de 20 ml/h, prácticamente toda la actividad G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-

reductasa eluyó en el volumen vacío de la columna, quedando, sin embargo, retenidas gran cantidad de proteínas pigmentadas tras el lavado con tampón estándar suplementado con glicerol. Las fracciones con actividad se reunieron y dializaron durante 18 horas frente a 5 l de tampón estándar suplementado con glicerol. A continuación se procedió a realizar la cromatografía de intercambio aniónico sobre DEAE-celulosa de la preparación. Se empleó en este caso un lecho de DEAE celulosa DE-52 (1,8 x 7,5 cm), formado a partir de 6 g de peso seco de adsorbente equilibrado con tampón estándar y empaquetado en una columna de vidrio a un flujo de 25 ml/h. El dializado se aplicó sobre el lecho a un flujo de 20 ml/h, tras lo cual la columna se lavó exhaustivamente con unos 5 volúmenes de lecho de tampón estándar suplementado con glicerol hasta que las fracciones eluidas carecían de absorbancia a 280 nm. Los lavados sucesivos no eliminaron cantidades apreciables de proteína. Aproximadamente el 5% de la actividad óxido-reductasa aplicada eluyó durante la introducción de la muestra y los lavados posteriores junto con otras proteínas que constituían aproximadamente el 60% de la proteína total. El material proteico retenido en la columna se eluyó a continuación con un gradiente lineal de NaCl (0-0,1 M, 200 ml de volumen total) en tampón estándar suplementado con glicerol a un flujo de 13 ml/h. La actividad G3P DHasa no fosforilante eluyó como un único pico, ligeramente retrasado respecto al de la mayoría de las proteínas, a una concentración de NaCl de 25-30 mM (Figura 26). Las fracciones con actividad se reunieron y se utilizaron directamente para el siguiente paso de la purificación. Tras la cromatografía de intercambio iónico se recuperaba entre el 75 y el 80% de la actividad obtenida tras el tratamiento con sulfato amónico con una purificación de 7 a 10 veces (Tabla 10).



**Figura 26.** Perfil de elución con un gradiente lineal de fuerza iónica del material proteico y la actividad G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa de *C. reinhardtii* durante la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa de la fracción de proteína soluble obtenida tras el tratamiento con sulfato de amonio.

Las condiciones de la cromatografía se indican en el apartado III.D.1.2. Se aplicó a la columna una preparación enzimática conteniendo 17 U de actividad óxido-reductasa. Volumen de fracción: 3 ml.

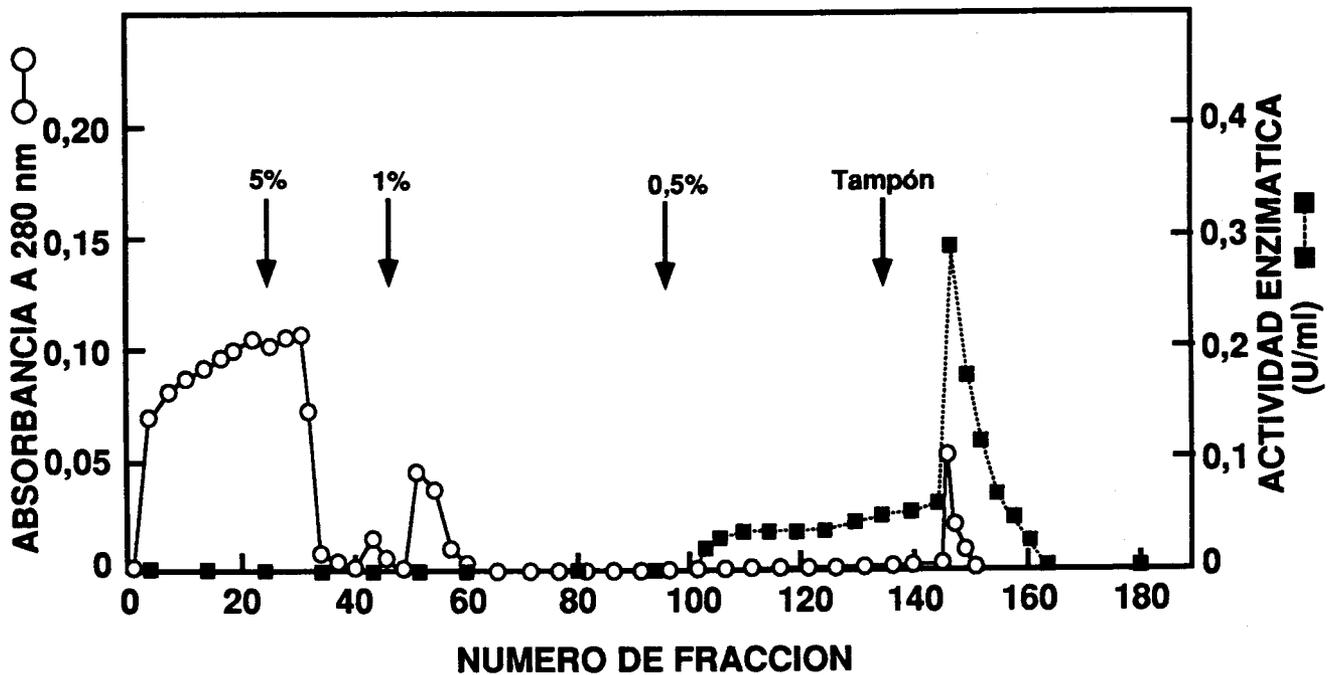
#### III.D.1.3. Cromatografía hidrofóbica en Fenil Sepharose

Se empleó una columna empaquetada con Fenil Sepharose CL 4B (1,6 x 7,5 cm) equilibrada con tampón Tris HCl 50 mM (pH 7,5) suplementado con 0,1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol y sulfato amónico al 5% (p/v). A la preparación enzimática obtenida en el paso anterior se le añadió sulfato amónico hasta el 5% de saturación y se aplicó sobre el lecho a un flujo de 13 ml/h. La columna se lavó sucesivamente con varios volúmenes de lecho de tampón conteniendo concentraciones decrecientes de sulfato amónico: al 5, 1 y 0,5% (p/v). Estos lavados eliminaban gran cantidad de proteínas, estimadas por la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas de la columna. En estas condiciones, la actividad G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa quedaba, sin embargo, retenida en el lecho. Un lavado final con tampón estándar permitió la elución de la actividad (Figura 27). Las fracciones con mayor actividad enzimática se reunieron y se emplearon en el siguiente paso de purificación. Tras la cromatografía hidrofóbica se recuperaba entre el 80 y el 90% de la actividad aplicada con una purificación de unas 15 veces (Tabla 10).

#### III.D.1.4. Cromatografía en hidroxapatito

Se utilizó una columna de hidroxapatito (1,0 x 3,0 cm) formada a partir de 2 g de peso seco de adsorbente equilibrado con tampón fosfato sódico 10 mM (pH 6,8) suplementado con EDTA, 2-mercaptoetanol y glicerol.

La preparación enzimática resultante del paso cromatografico anterior se diluyó hasta el doble de volumen con el mencionado tampón fosfato y se aplicó a la columna a un flujo de 5 ml/h quedando la actividad óxido-reductasa retenida en la misma. La columna se



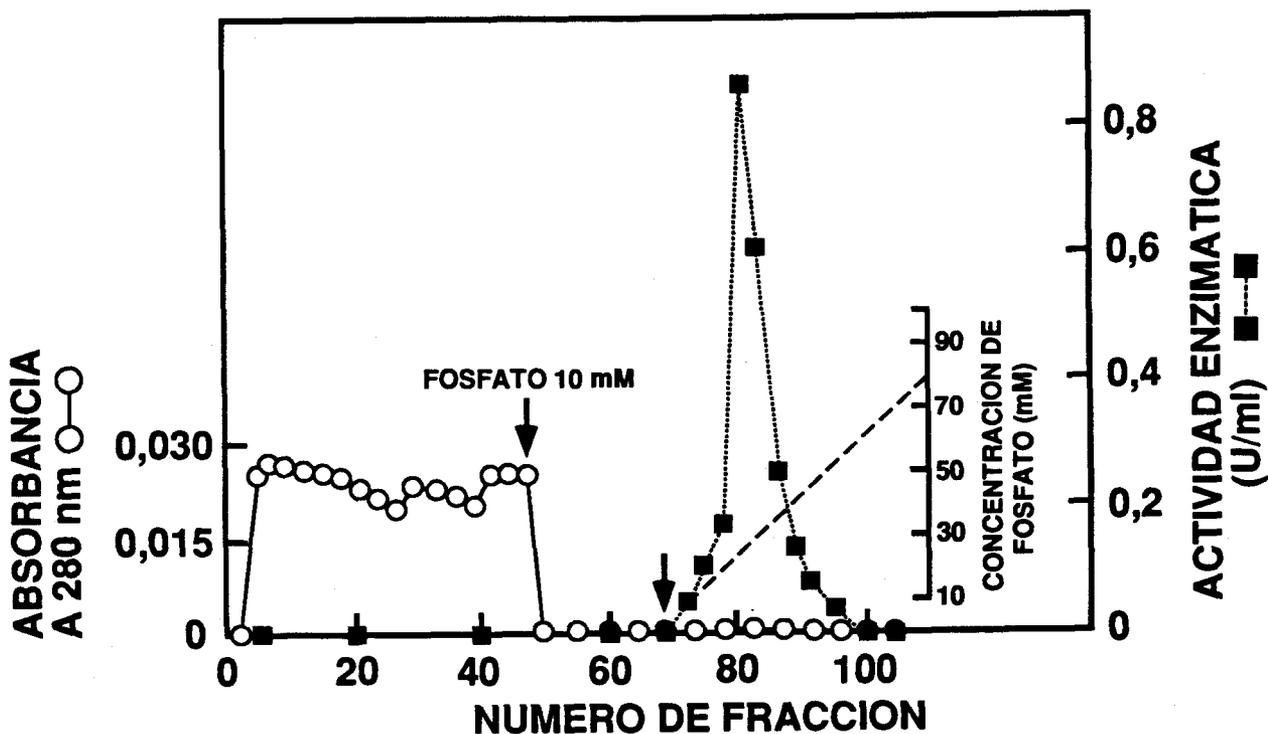
**Figura 27.** Perfil de elución mediante sucesivos lavados con eluyentes de fuerza iónica decreciente durante la cromatografía hidrofóbica en Fenil Sepharose CL 4B de la actividad G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa de *C. reinhardtii* contenida en la preparación previamente purificada por cromatografía de intercambio iónico.

Las condiciones empleadas en esta cromatografía se describen en el apartado III.D.1.3. Se aplicó una preparación procedente de la cromatografía en DEAE-celulosa que contenía 16 U de actividad. Volumen de fracción: 2 ml.

lavó a continuación con varios volúmenes de lecho de tampón fosfato hasta que la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas de la columna era indetectable. La actividad se eluyó finalmente mediante un gradiente lineal de fosfato sódico (10-100 mM, 60 ml de volumen total) en el tampón de equilibrado. La actividad óxido-reductasa eluyó como un único pico simétrico a una concentración de fosfato sódico de 30 mM (Figura 28). Tras este paso se recuperaba entre el 40 y 50% de la actividad aplicada con una purificación de unas 7 veces (Tabla 10).

Un proceso de purificación típico de la G3P:DHasa no fosforilante de *C. reinhardtii* se resume en la Tabla 10. La recuperación final fué en este caso del 27% de la actividad enzimática de partida, siendo la purificación total de unas 1.380 veces. La actividad específica de la preparación final obtenida fué de 29 U/mg de proteína, un valor significativamente mayor que el descrito por otros autores (8-9 U/mg de proteína) para el enzima, purificado por otros métodos tanto de plantas (Iglesias y Losada, 1988) como de la misma *C. reinhardtii* (Iglesias y col., 1987) hasta homogeneidad electroforética.

La preparación proteica así obtenida se encontraba bastante diluida. Sin embargo al someter dicha preparación a un proceso de concentración, por ultrafiltración o dialisis, se producía una pérdida considerable y de carácter irreversible de actividad (hasta un 65%), obteniéndose una preparación concentrada pero con una actividad específica muy inferior a la del enzima diluida.



**Figura 28.** Perfil de elución mediante un gradiente lineal de concentración creciente de fosfato de la actividad G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa de *C. reinhardtii* durante la cromatografía en hidroxapatito.

Las condiciones de esta cromatografía se describen en el apartado III.D.1.4. El eluato procedente de la cromatografía en Fenil Sepharose CL 4B conteniendo 14 U de actividad enzimática se aplicó a una columna de hidroxapatito de donde el enzima se eluyó mediante un gradiente lineal de fosfato.

**Tabla 10.** Purificación de la G3P DHasa no fosforilante del alga unicelular *C. reinhardtii*

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg de proteína)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	978,7	21,0	0,021	1	100
Fraccionamiento con sulfato de amonio	392,0	16,9	0,043	2	80
Cromatografía en DEAE-celulosa	55,5	15,9	0,286	14	75
Cromatografía en Fenil Sepharose CL 4B	3,3	14,3	4,3	205	68
Cromatografía en hidroxipatito	0,2	5,8	29,0	1380	27

### III.D.2. Criterios de homogeneidad.

#### III.D.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La pureza de la preparación enzimática final se comprobó mediante electroforesis analítica en geles de poliacrilamida, llevada a cabo según se indica en los apartados II.E.3.1 y II.E.3.2. En todo caso se observaba una única banda de proteína tras la tinción de los geles.

Tras la tinción del gel de electroforesis aparecía una única banda en condiciones desnaturalizantes correspondiente a una proteína de masa molecular  $52 \pm 2$  kDa (Figura 29), dato que coincide con el valor estimado para la subunidad de la G3P DHasa no fosforilante purificada de otras fuentes, tanto de plantas (Pupillo y Faggiani, 1979; Iglesias y Losada, 1988) como de la misma *C. reinhardtii* purificada por el método de Iglesias y col. (1987).

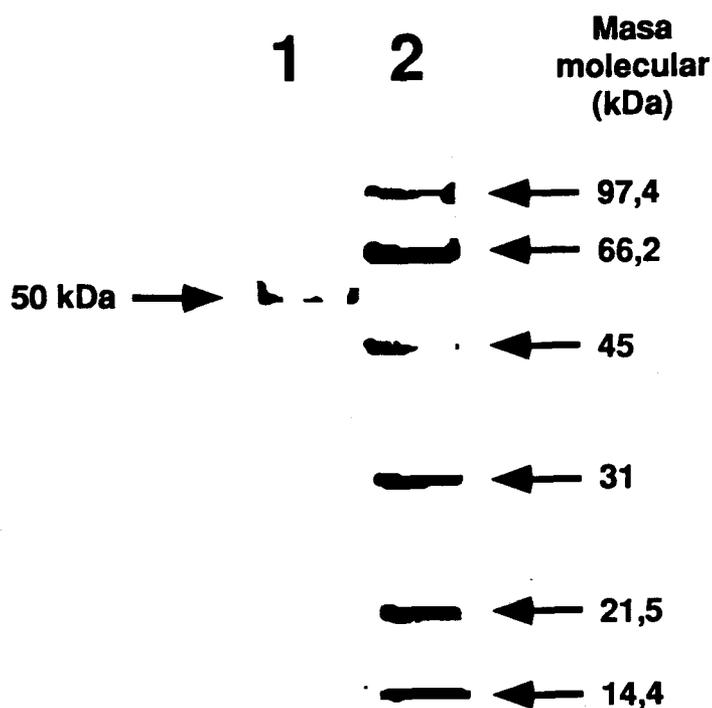
#### III.D.2.2. Isoelectroenfoque

La pureza de la preparación se comprobó además realizando un isoelectroenfoque de una muestra de la misma según se describe en el apartado II.E.3.3.

En el gel aparecía una única banda de proteína de pI 6,9, aproximadamente (véase Apdo. III.D.3.1).

### III.D.3. Caracterización del enzima

Debido a la mayor actividad específica (2-3 veces mayor) de las preparaciones de G3P DHasa no fosforilante purificadas según el método antes descrito en relación con la reseñada por Iglesias y col.



**Figura 29.** Determinación de la masa molecular de la subunidad de la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa de *C. reinhardtii* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

Las condiciones de la electroforesis son las descritas en el apartado II.E.3.2. Calle 1, enzima purificada (5 µg); calle 2, marcadores de masa molecular.

(1987) utilizando otro método de purificación, se decidió caracterizar el enzima con el fin de comprobar si una posible alteración en sus propiedades físico-químicas pudiera explicar estas diferencias.

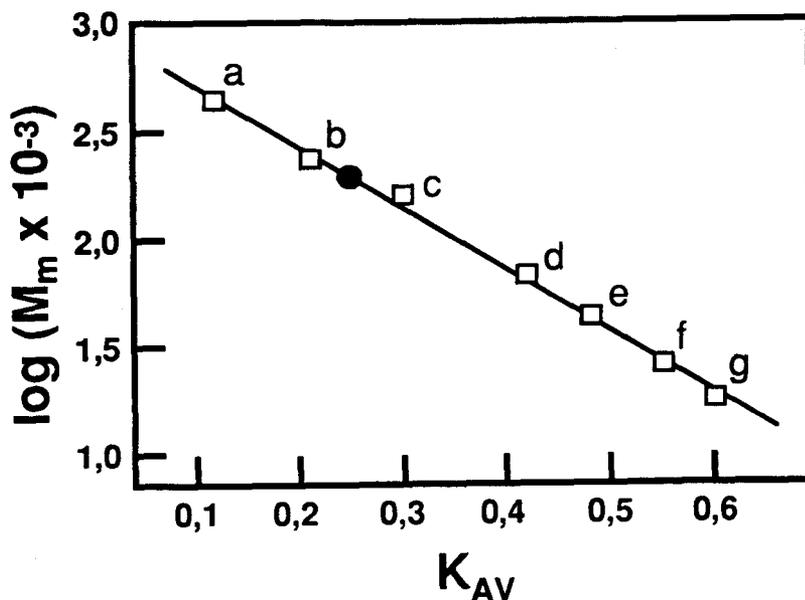
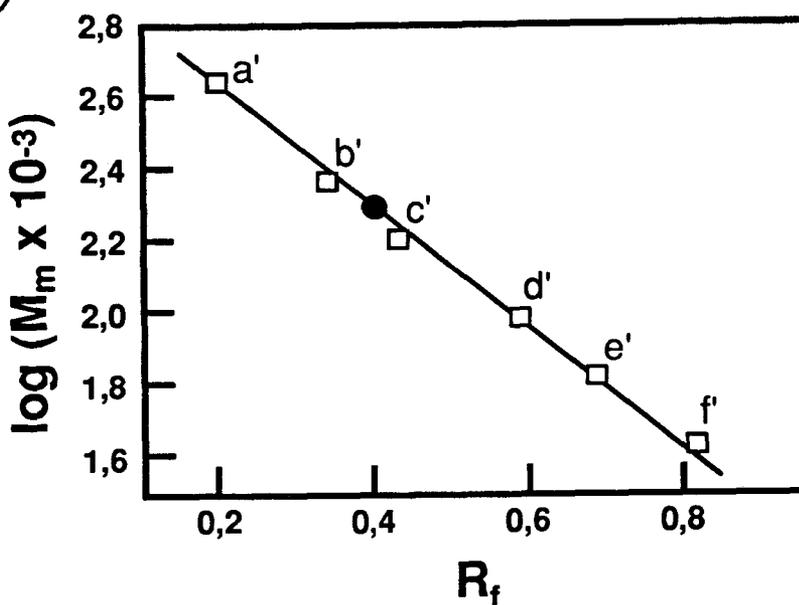
#### III.D.3.1. Masas moleculares y punto isoeléctrico

Como se indicó anteriormente, la  $M_m$  de la subunidad (aprox. 50 kDa) determinada por electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (Figura 29) coincide con la de la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa de *C. reinhardtii* determinada por Iglesias y col. (1987). Por otra parte, la misma situación ocurría con la  $M_m$  del enzima nativo (aprox. 200 kDa), estimada tanto por filtración molecular en Sephacryl S-300 SF (194±4 kDa, extrapolado a partir de la representación de las  $K_{AV}$  de proteínas marcadoras) (Figura 30A) como por electroforesis nativa en gradiente de acrilamida (196±5 kDa, extrapolado a partir de las movilidades relativas de proteínas patrones) (Figura 30B).

El  $pI$  de la G3P DHasa no fosforilante de *C. reinhardtii* purificada por el método antes descrito se determinó tanto por isoelectroenfoque ( $pI$ , 6,9) como por cromatoenfoque ( $pI$ , 6,85) (Figura 31). En ambos casos coincidía perfectamente con el valor de 6,9 reseñado por Iglesias y col. (1987).

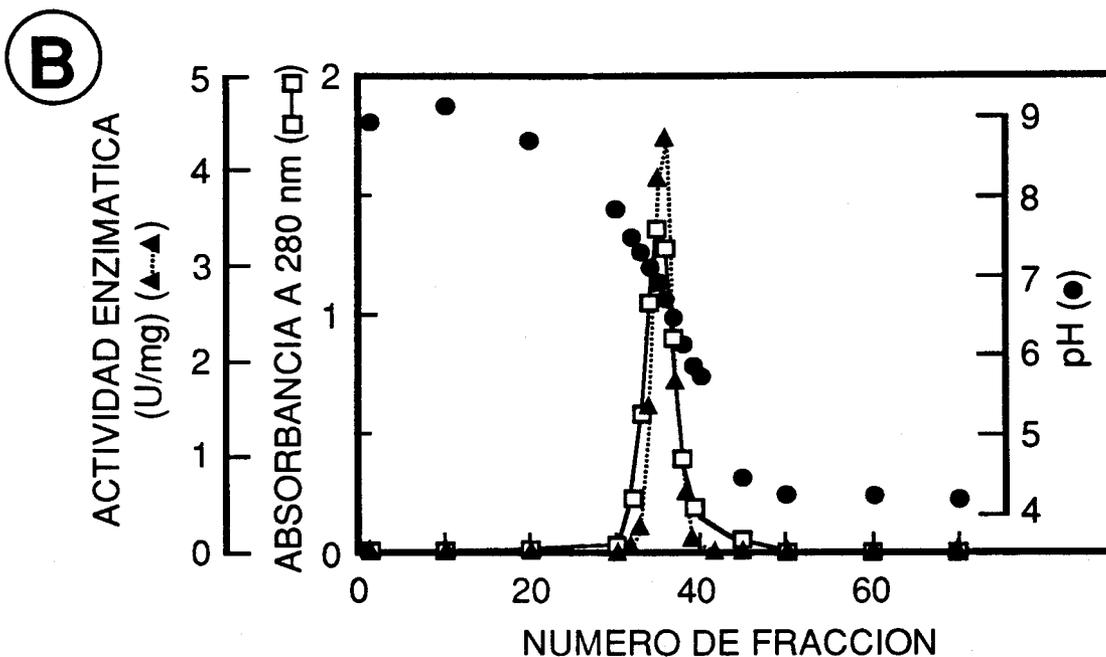
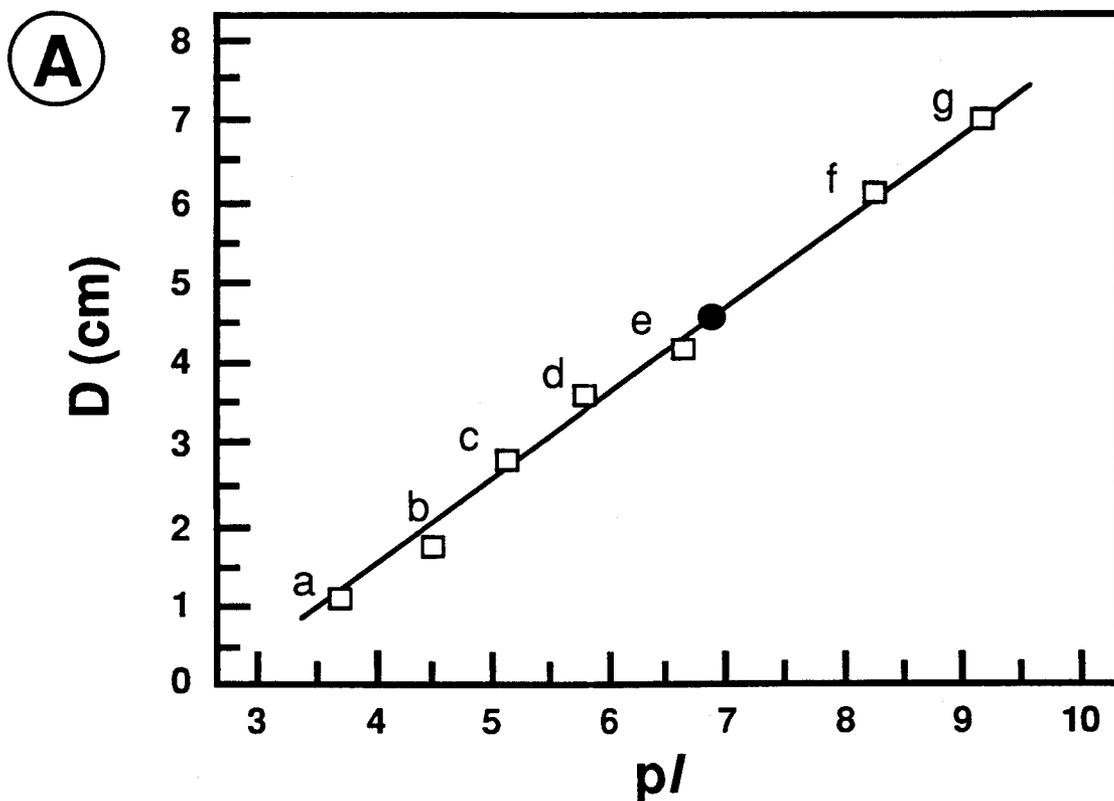
#### III.D.3.2. Espectro de absorción. Caracterización de una posible banda de Racker

El análisis del espectro de absorción en la zona ultravioleta-visible de la G3P DHasa no fosforilante purificada de *C. reinhardtii* proporcionó una serie de datos interesantes. De hecho el espectro de este enzima no se ha publicado, tan solo una breve reseña indicaba

**A****B**

**Figura 30.** Determinación de la masa molecular de la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa nativa purificada de *C. reinhardtii*.

**A**, filtración molecular en Sephacryl S-300 SF según se describe en el apartado II.E.2.5; las proteínas marcadoras de masa molecular fueron: a, ferritina; b, catalasa; c, aldolasa; d, seroalbúmina; e, ovoalbúmina; f, quimotripsinógeno; y g, mioglobina. **B**, electroforesis nativa en gradiente de acrilamida según se describe en el apartado II.E.3.2; las proteínas marcadoras de masa molecular fueron: a', ferritina; b', catalasa; c', aldolasa; d', fosforilasa B; e', seroalbúmina; y f', ovoalbúmina. (□), Proteínas marcadoras; (●), G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa purificada.

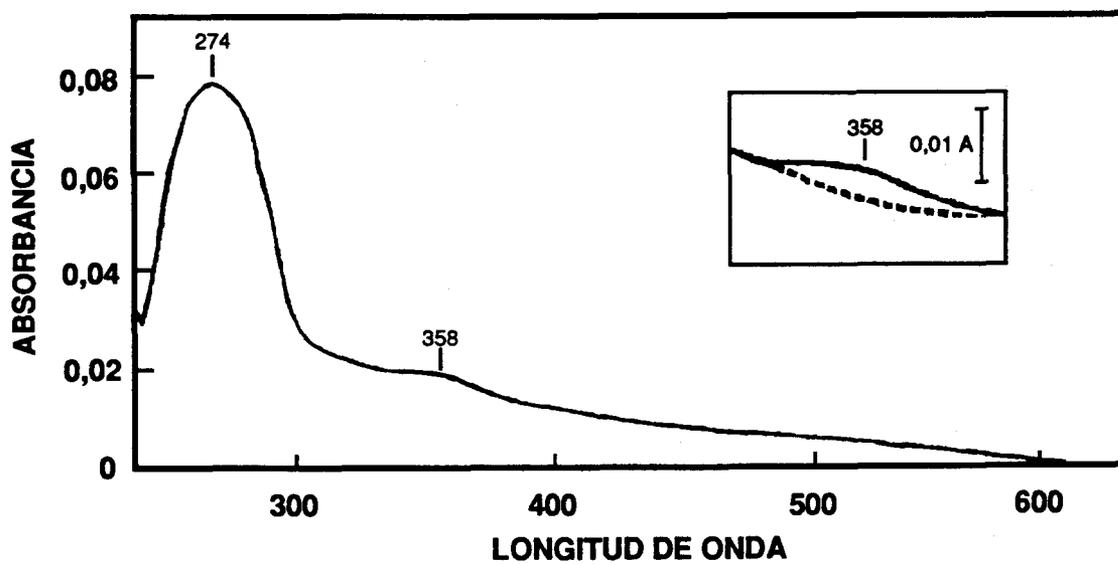


**Figura 31. Determinación del pI de la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa de *C. reinhardtii* mediante isoelectroenfoque (A) y cromatoenfoque (B).**

Las condiciones experimentales del isoelectroenfoque se detallan en el apartado II.E.3.3. Los patrones utilizados (□) fueron: a, aminoglucosidasa (pI 3,75); b, inhibidor tripsina (pI 4,55); c, lactoglobulina A (pI 5,20); d, anhidrasa carbónica bovina (pI 5,85); e, mioglobina de caballo (pI 6,80); f, láctico deshidrogenasa (pI 8,30); y g, tripsinógeno (pI 9,30). Las condiciones experimentales del cromatoenfoque se detallan en el apartado II.E.2.4.

la ausencia de picos característicos (Iglesias y col., 1987). Las preparaciones de enzima purificado mostraban un espectro de absorción caracterizado por una única clara banda de absorción en la zona del ultravioleta, la típica banda de absorción de las proteínas debida a la presencia de aminoácidos aromáticos, con un máximo a 274 nm (Figura 32). No obstante, también se observaba un hombro, o banda ancha, en la zona azul-violeta del espectro, centrado a 358 nm. Este hombro desaparecía con la adición del reactivo de grupos sulfhidrilos NEM (véase inserto en la Figura 32). No hay reseñas previas sobre la presencia de hombros en la zona de 300-400 nm del espectro de la G3P DHasa no fosforilante. Su localización en la zona del azul-violeta y su sensibilidad a reactivos de grupos -SH apuntan hacia la posibilidad de que, como se discute más adelante, corresponda a una banda de transferencia de cargas, similar a la bien conocida banda de Racker de la G3P DHasa fosforilante glicolítica (Racker y Krimsky, 1952; Racker, 1965) debida a la interacción del grupo -SH de la cisteína del sitio activo y  $\text{NAD}^+$  unido no covalentemente a la proteína. El análisis de la banda de la zona ultravioleta, más ancha de lo habitual en proteínas sin cofactores nucleotídicos, ha proporcionado información relevante a este respecto. Así la relación de absorbancias  $A_{280}/A_{260}$  estaba en el rango 1,05-1,10 en el espectro de las distintas preparaciones de la G3P DHasa no fosforilante purificada de *C. reinhardtii*. Este valor es claramente menor que el de proteínas típicas como la seroalbúmina ( $A_{280}/A_{260}=1,7$ ) o la inmunoglobulina G ( $A_{280}/A_{260}=1,9$ ), que carecen de cofactor nucleotídico (Morton, 1975), y es muy similar al obtenido para preparaciones purificadas de la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  y otras ALDHs que tienen unido como cofactor este piridín nucleótido, formando la denominada holoenzima (Murdock y Koeppe, 1964; Trentham, 1968; Trentham, 1971; Van Ophem y col., 1993).





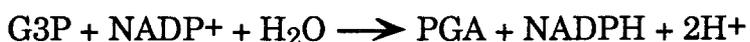
**Figura 32.** Espectro de absorción de la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa purificada de *C. reinhardtii*.

La preparación contenía 2,9 U de una preparación de enzima purificado hasta homogeneidad electroforética en 1 ml de tampón estándar. El recuadro muestra la desaparición del hombro a 360 nm (supuesta banda de Racker) tras incubación de la preparación enzimática con 0,2 mM NEM.

III.E. Producción de protones in vitro por la G3P DHasa no fosforilante purificada de *C. reinhardtii*

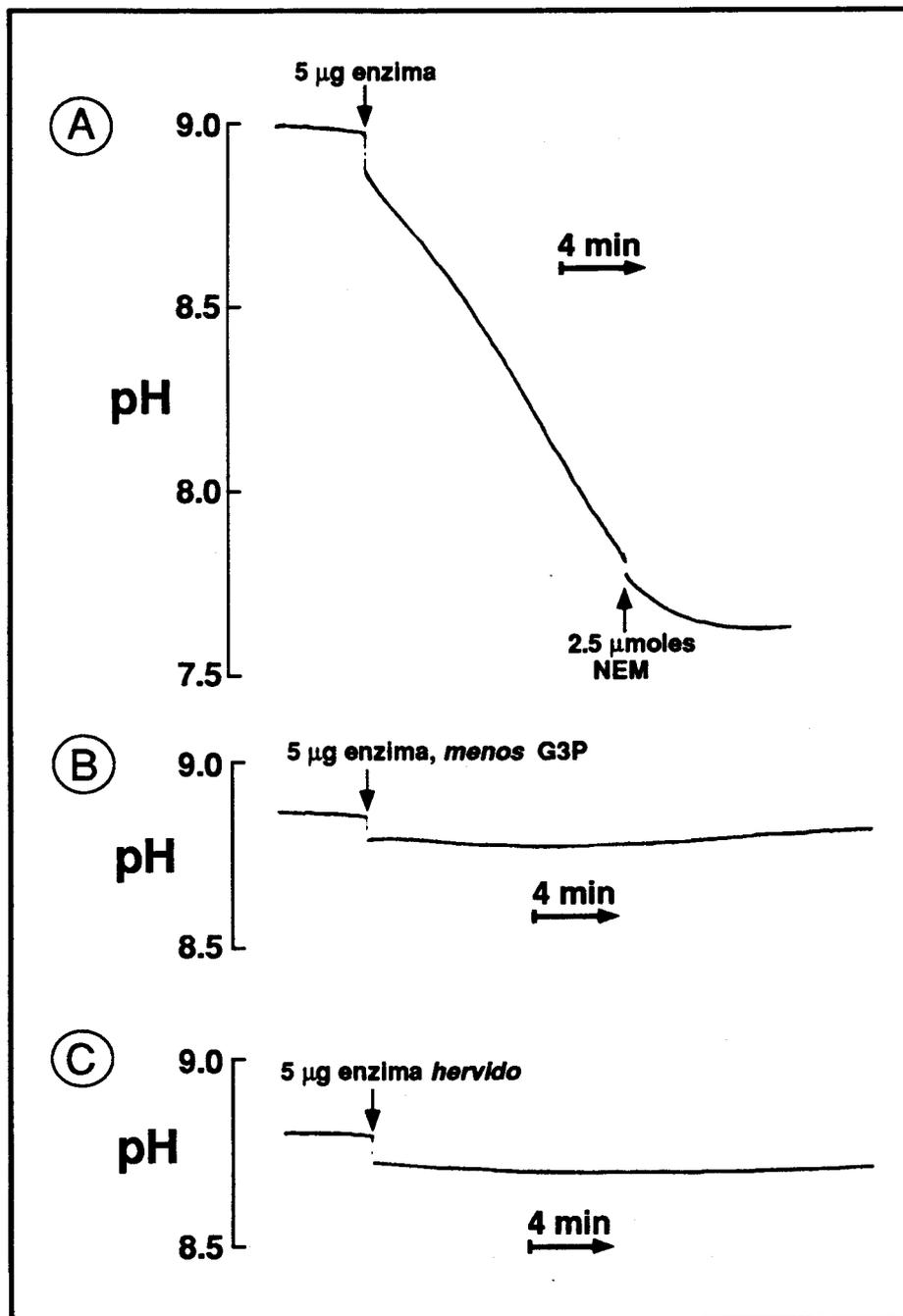
III.E.1. Caracterización de la liberación de protones coincidente con la actividad redox de la G3P DHasa no fosforilante

Los métodos electrométricos se han usado para estimar la actividad catalítica de algunos enzimas hidrolíticos mediante la determinación de los cambios en el pH (concentración de iones hidrógeno o protones) producidos como consecuencia de la reacción. Así, la actividad acetilcolinesterasa ha sido ensayada midiendo la cantidad de ácido acético generado en la reacción que cataliza (Muñoz-Delgado y col., 1983; Whittaker, 1984). De forma análoga, una liberación de protones debería producirse durante la reacción catalizada por la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa, uno de cuyos productos es el ácido 3-fosfo-D-glicérico, que es así mismo un ácido carboxílico:



Los estudios previos realizados sobre este enzima sugieren un mecanismo en el que un residuo de cisteína, esencial para la actividad de la proteína, participa en la formación de un intermediario tioéster, que finalmente se hidroliza liberando protones (Iglesias y col., 1987; Iglesias y Losada, 1988; Losada y col., 1990). Como se muestra en la Figura 33, un cambio muy evidente del pH del medio hacia valores más ácidos tiene lugar en el curso de la reacción catalizada por la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa purificada del alga verde *C. reinhardtii* en medio no tamponado. El carácter enzimático de esta liberación de protones está claramente indicado por su estricta dependencia respecto de los sustratos del enzima, tanto del G3P como del NADP<sup>+</sup>, y por la incapacidad del enzima

térmicamente desnaturalizado (5 min, 100 °C) de originar dicho proceso (Figura 33B y 33C). La disminución del pH del medio está, por tanto, específicamente asociada con la actividad redox del enzima. En efecto, no se observaba ningún cambio de pH con  $\text{NAD}^+$  en lugar de  $\text{NADP}^+$  o si se usaba como sustrato el isómero L no biológico del G3P. Por otra parte, la presencia de L-G3P causaba una fuerte inhibición de la generación de protones, lo que también está de acuerdo con el carácter enzimático del proceso al ser este compuesto un potente inhibidor de la actividad redox de la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa (Kelly y Gibbs, 1973, Iglesias y col., 1987). Los valores de pH finalmente obtenidos no fueron nunca menores que 6,0-6,5, aún en presencia de un exceso de ambos sustratos (aprox. 100 veces los valores de  $K_m$ ), probablemente porque a estos valores de pH relativamente ácidos el enzima deja de catalizar la reacción, al estar muy por debajo de su pH óptimo (entre 8,5 y 9,0 para la actividad redox del enzima). Además, a valores de pH más ácidos pueden tener lugar cambios conformacionales que conlleven la desnaturalización, y por tanto la inactivación irreversible, de la proteína. Hay que señalar a este respecto que el pH del medio de ensayo afectaba al valor inicial de la tasa de liberación de protones. Ya que se obtuvieron tasas iniciales máximas cuando el pH inicial se encontraba entre 8 y 9, los ensayos se llevaron a cabo habitualmente en este rango de pH. Este valor, muy similar al pH óptimo de la actividad G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa usando el ensayo espectrofotométrico estándar (Iglesias y col., 1987), está también a favor del carácter enzimático de la acidificación y de su estrecha conexión con la reacción de deshidrogenación. Hay que hacer notar que la composición del medio usado en el ensayo electrométrico es muy similar a la del ensayo espectrofotométrico (véase Apdo. II.C.1), siendo la principal diferencia que el primero no incluye tampón de pH.

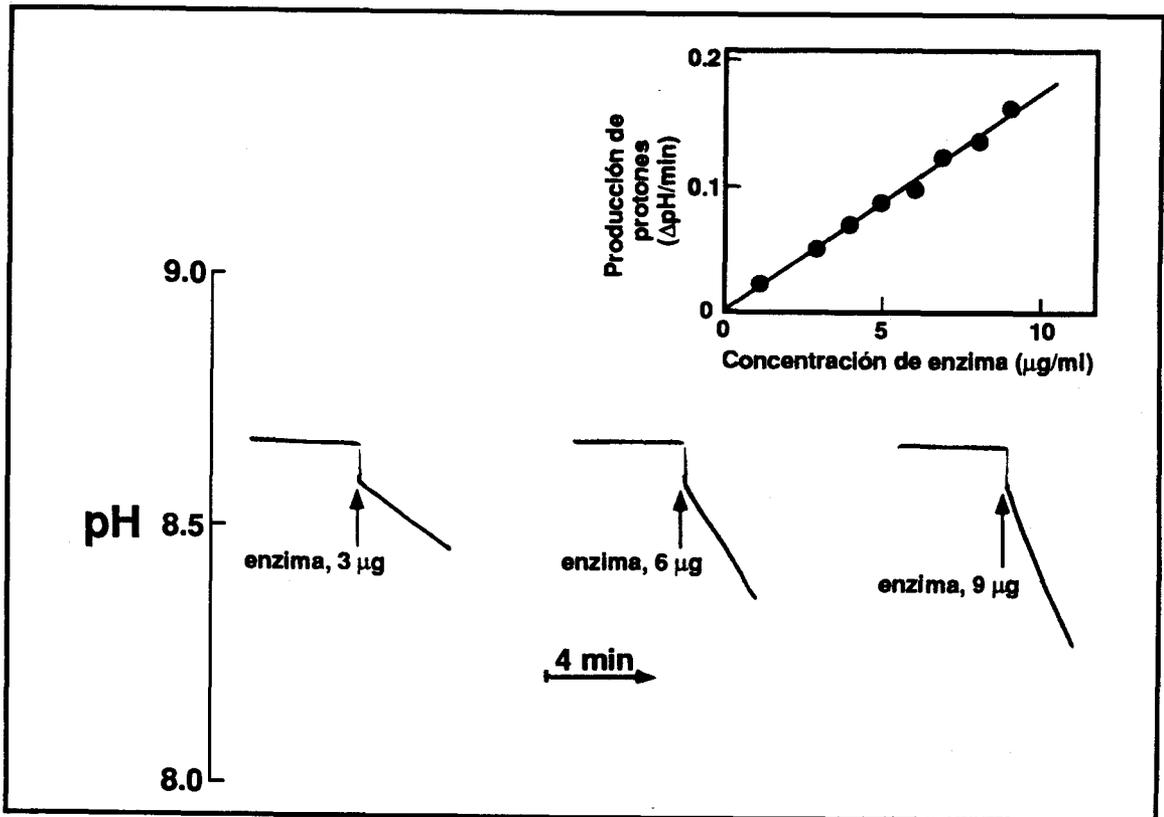


**Figura 33.** Registro del cambio de pH producido en el transcurso de la reacción de oxidación del G3P a PGA por  $\text{NADP}^+$  catalizada por la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa purificada de *C. reinhardtii*.

A, mezcla de reacción completa; B, en ausencia de G3P; C, mezcla de reacción con enzima desnaturalizado térmicamente. En el primer registro se recoge también el efecto inhibitorio de la adición del reactivo de grupos sulfhidrilo NEM.

Como se muestra también en la Figura 33A, la acidificación del medio se inhibía completamente por los reactivos de grupos sulfhidrilo (p.e., NEM y *p*-HMB), los cuales son potentes inhibidores de la reacción de deshidrogenación (Iglesias y col., 1987, Iglesias y Losada, 1988). De hecho, cuatro grupos SH, uno por subunidad, son esenciales para la actividad de la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa y se ha sugerido su participación en la formación secuencial de los intermediarios tiohemiacetal y tioéster en el transcurso del mecanismo catalítico del enzima (Iglesias y Losada, 1988, Corbier y col., 1992).

Se ha investigado también el efecto de la concentración de NADP<sup>+</sup> y G3P sobre la velocidad inicial de generación de protones. De las representaciones de dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk se obtuvieron los valores de 15 y 70  $\mu\text{M}$  para las constantes de Michaelis ( $K_m$ ) aparentes de los sustratos NADP<sup>+</sup> y G3P, respectivamente. Estos valores son muy similares a los obtenidos para el ensayo espectrofotométrico (Iglesias y col., 1987, Iglesias y Losada, 1988). Por otra parte, la proporcionalidad directa existente entre la cantidad de enzima (G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa) en el ensayo y la velocidad inicial del proceso estudiado (producción de protones, en este caso), es una característica común a todas las reacciones enzimáticas que se refleja en la relación lineal mostrada en la Figura 34. En conjunto, todos los resultados presentados corroboran el carácter genuinamente enzimático de la acidificación observada durante la oxidación del G3P a PGA por la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa de *C. reinhardtii*.



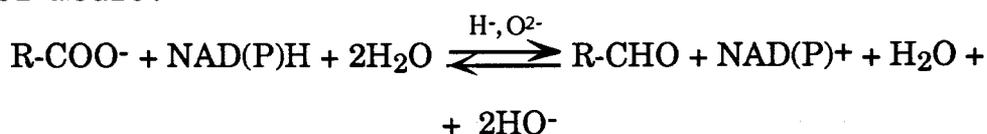
**Figura 34.** Relación entre el cambio de pH y la concentración de G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa.

El gráfico adjunto presenta la relación lineal existente entre la velocidad inicial de producción de protones y la concentración de enzima purificada empleada en el ensayo.

III.E.2. Transhidrogenación dependiente de ATP e ionización del agua mediante un sistema enzimático reconstituido conteniendo ambas G3P DHasas, fosforilante y no fosforilante

Se ha ideado un sistema reconstituido formado por enzimas solubles (PGA quinasa, G3P DHasa fosforilante dependiente de NAD<sup>+</sup> y G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa) en el cual, aprovechando la diferente especificidad por el piridín-nucleótido de las dos G3P DHasas utilizadas, tres reacciones acopladas promueven, usando como intermediario el par redox G3P/PGA, la transhidrogenación desde el NADH al NADP<sup>+</sup> y la ionización del agua a expensas de la energía del ATP. Como se discutirá más adelante este sistema puede ser de utilidad como sistema modelo en Bioenergética.

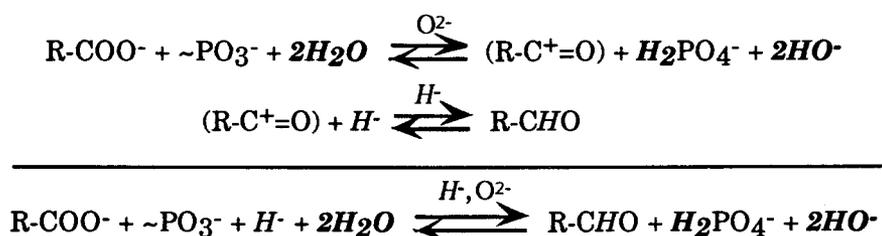
Como se ha expuesto anteriormente, las G3P DHasas fosforilantes pueden promover con el concurso de la PGA quinasa la reacción inversa, o anabólica, de reducción del PGA a G3P. Desde el punto de vista de la energética bioquímica, la reducción del PGA a G3P ( $E'_{\text{O}}$ , pH 7, -0.54 V) por el NAD(P)H, que en consecuencia se oxida a NAD(P)<sup>+</sup> ( $E'_{\text{O}}$ , pH 7, -0.32 V), es una reacción endergónica ( $\Delta G'_{\text{O}}$ , pH 7, +0.44 eV molec<sup>-1</sup>) que implica la transferencia de 2e y la remoción de un anión óxido (O<sup>2-</sup>) del grupo carboxilato del PGA por los dos protones del agua, con la consiguiente alcalinización del medio:



Tanto en la fotosíntesis como en la gluconeogénesis esta reacción redox está acoplada a la hidrólisis del ATP (ADP~PO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a ADP y ortofosfato (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>), una reacción exergónica ( $\Delta G'_{\text{O}}$ , pH 7, -0.33 eV molec<sup>-1</sup>):

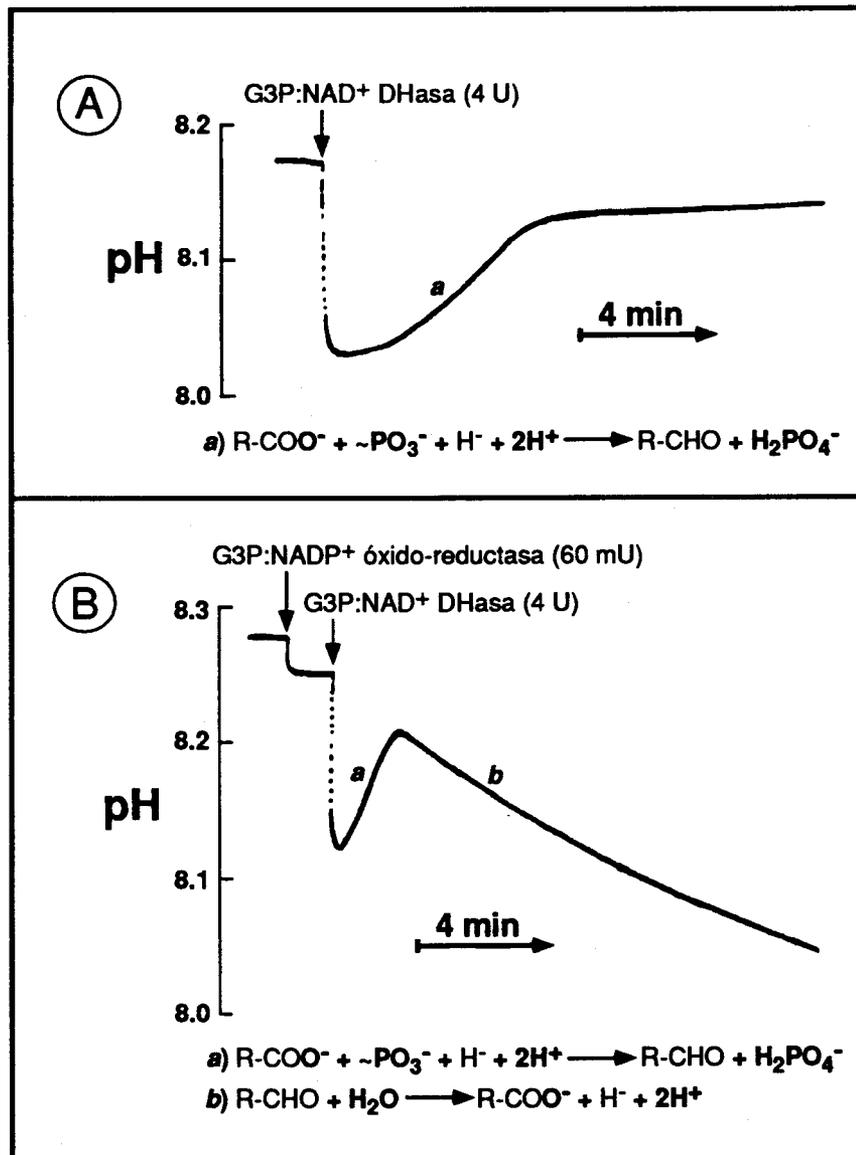


Por tanto, las reacciones catalizadas por la PGA quinasa y la G3P DHasa fosforilante son en conjunto ligeramente endergónicas ( $\Delta G'_{0, \text{pH } 7}$ ,  $+0.11 \text{ eV molec}^{-1}$ ). Hasta ahora muchos bioenergetistas no habían tenido en cuenta el hecho de que el paso clave en el sistema acoplado PGA quinasa/G3P DHasa es la transferencia de un anión óxido desde el PGA ( $\text{R-COO}^-$ ) al grupo metafosfato ( $\sim\text{PO}_3^-$ ) del ATP. El anión carboxilato es entonces energetizado por eliminación de un  $\text{O}^{2-}$  a catión acilio ( $\text{R-C}^+=\text{O}$ ), el cual se mantendría en estado energetizado como tioéster mediante su unión con el residuo cisteína del sitio activo de la G3P DHasa (Harris y Waters, 1976), mientras que el grupo metafosfato tras aceptar un  $\text{O}^{2-}$  se desenergetizaría a la forma desprotonada del ortofosfato que, al ser una base fuerte, aceptaría a su vez protones del agua alcalinizando así el medio. El catión acilio del tioéster sería finalmente reducido por el ión hidruro del NAD(P)H via un intermediario tiohemiacetal hasta formar el grupo aldehído ( $\text{R-CHO}$ ) del G3P:



Hay que hacer notar que el ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) es la forma hidratada del metafosfato ( $\sim\text{PO}_3^-$ ) y que los valores de  $\text{pK}_a$  del ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) son 2,1, 7,2 y 12,7, mientras que los del ácido metafosfórico son 4,1 y 6,9 cuando está anclado en el ADP, el  $\text{pK}_a$  del cual también desciende, como consecuencia de esta unión, hasta aproximadamente tres unidades de pH por debajo de 7.

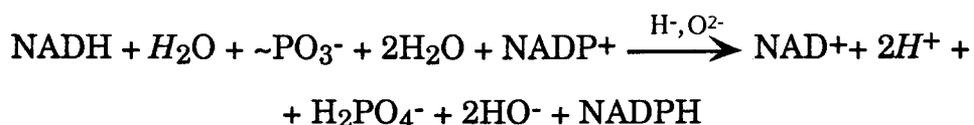
La Figura 35A muestra que, a diferencia de la oxidación del G3P a PGA catalizada por la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa, la reducción dependiente de ATP del PGA a G3P catalizada por las enzimas PGA quinasa y G3P:NAD<sup>+</sup>

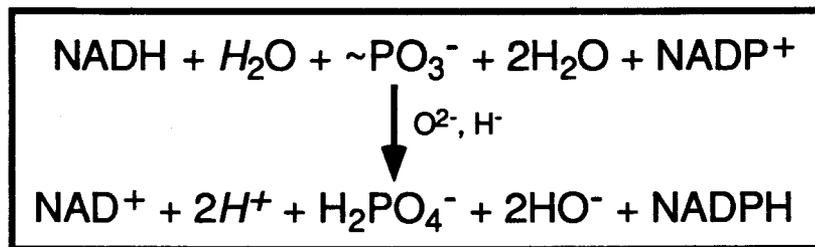
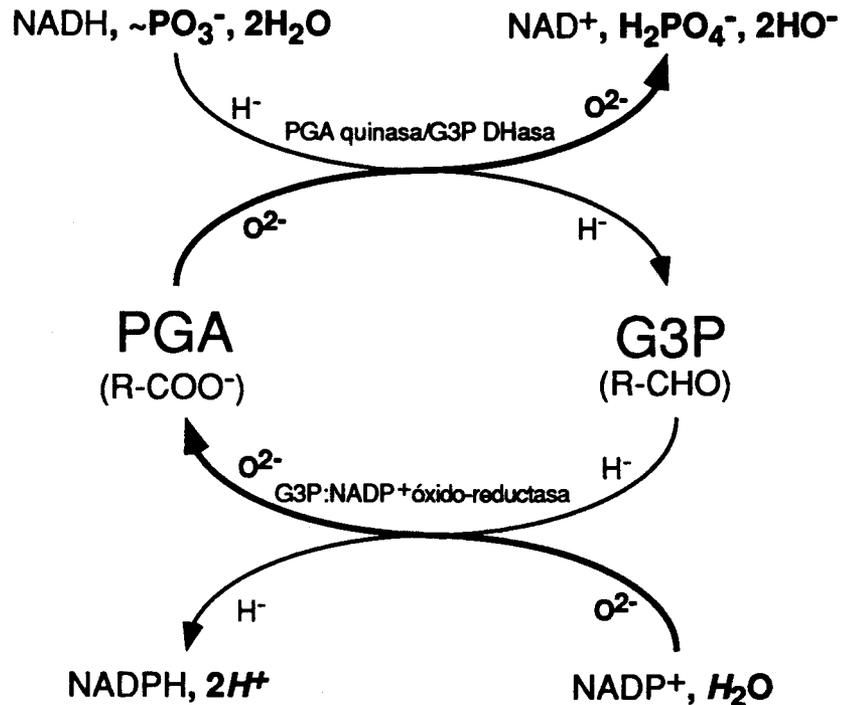


**Figura 35.** Cambios de pH producidos durante el funcionamiento de sistemas enzimáticos reconstituidos compuestos por la PGA quinasa y las G3P deshidrogenasas (fosforilante y no fosforilante).

A, PGA quinasa y G3P DHase dependiente de NAD<sup>+</sup>. B, como en A, pero en presencia de G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa. (a) Alcalinización del medio simultánea con la reducción dependiente de ATP por NADH del PGA a G3P; (b) posterior acidificación del medio producida por la oxidación por NADP<sup>+</sup> del G3P a PGA.

DHase fosforilante está realmente acompañada por una alcalinización del medio. Mediante el empleo de NADH como donador de iones hidruro y de NADP<sup>+</sup> como aceptor final ha sido posible acoplar, en un sistema modelo formado por tres enzimas solubles -a saber: la PGA quinasa, la G3P DHase fosforilante dependiente de NAD<sup>+</sup> y la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa- la reducción dependiente de ATP del PGA a G3P con la oxidación dependiente de agua del G3P a PGA (véase Apdo. III.E.1). Hay que hacer notar que ello ha sido en gran medida posible gracias a la diferente y absoluta especificidad de las dos G3P DHases utilizadas por el coenzima dinucleotídico (por NAD<sup>+</sup> el enzima fosforilante y por NADP<sup>+</sup> el no fosforilante). La Figura 35B muestra que cuando se usa el sistema reconstituido completo el registro del pH muestra dos fases claramente definidas con cambios de pH en sentidos opuestos: inicialmente tiene lugar una alcalinización transitoria, que correspondería a la reducción por NADH dependiente de ATP del PGA a G3P, que es seguida por una clara acidificación como consecuencia del desarrollo de la segunda parte del proceso (oxidación del G3P a PGA por el NADP<sup>+</sup>). El desfase temporal observado entre ambas etapas del proceso es una característica común a los sistemas de enzimas acoplados (Tipton, 1992) y es consecuencia del tiempo empleado para generar la cantidad de intermediario G3P necesaria para que el enzima que cataliza la segunda etapa (la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa en este caso) pueda funcionar con eficacia. El proceso global de transhidrogenación está resumido en el esquema de la Figura 36. Se puede considerar, por tanto, que la energía química del ATP se emplea en este sistema para llevar a cabo una transhidrogenación simultánea con la ionización del agua, acompañada por la consiguiente liberación de protones, de acuerdo con la siguiente ecuación:





**Figura 36.** Transducción de la energía química del ATP en energía ácido-base mediante el par aldehído-carboxilato G3P/PGA.

El PGA es reducido primero por el NADH a G3P en una reacción dependiente de ATP catalizada secuencialmente por la PGA quinasa y la G3P DHasa fosforilante. Seguidamente el G3P es oxidado por el NADP<sup>+</sup> a PGA en una reacción independiente de fosfato catalizada por la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa. El proceso es en conjunto una transhidrogenación acompañada de una ionización endergónica del agua a expensas de la hidrólisis del ATP (ADP~PO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en ADP y ortofosfato (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>).

#### IV. DISCUSSION

#### IV. DISCUSION

Las dos G3P DHasas presentes en los organismos fotosintéticos eucarióticos han sido ampliamente estudiadas y sus respectivas funciones bien establecidas (Cerff, 1978; Cerff, 1982 a y b; Brikmann y col., 1989). En cambio la información sobre la G3P DHasa no fosforilante (distribución, localización, función,..) es escasa. Desde que este enzima fué descrito por el grupo de Arnon (Arnon y col., 1954) los estudios referentes a la localización y función de la G3P DHasa no fosforilante se han centrado exclusivamente en plantas superiores de las que se ha purificado total o parcialmente (Rosemberg y Arnon, 1955; Kelly y Gibbs, 1973; Pupillo y Faggiani, 1979). Los estudios previos sobre caracterización de las G3P DHasas fosforilantes se han llevado a cabo en plantas C3 y C4 (Cerff, 1978; Cerff, 1982 a y b; Brikman y col., 1987; Brikman y col., 1989) y los realizados sobre el enzima no fosforilante se han centrado en plantas C3 exclusivamente (Pupillo y Faggiani, 1979, Iglesias y Losada, 1988). Por otro lado los datos sobre los enzimas fosforilantes en microalgas son escasos (Pupillo, 1972; Vacchi y col., 1973; Grissom y Khan, 1975; O'Brien y col., 1979; Ahrenhöfer, 1979; Heide y Theis, 1984) y los existentes sobre la presencia del enzima no fosforilante en estos organismos son contradictorios (Vacchi y col., 1973). En esta Tesis se ha realizado un estudio completo sobre la distribución comparativa de las tres G3P DHasas en una gama de organismos tanto eucarióticos como procarióticos, fotosintéticos o no, poniendo especial énfasis sobre el enzima no fosforilante.

De otro lado, basándonos en la localización bien establecida de las dos G3P DHasas fosforilantes, cloroplástica y citosólica, hemos procedido a comprobar la localización citosólica del enzima no fosforilante en

distintos organismos fotosintéticos, tanto microalgas como plantas superiores.

Ya que los datos existentes sobre la regulación de las G3P DHasas fosforilantes de microalgas por distintas condiciones nutricionales son muy escasos y se limitan a breves comunicaciones (Latzko y Gibbs, 1979), hemos procedido a estudiar comparativamente sus respuestas y la de la G3P DHasa no fosforilante a diferentes condiciones nutricionales. Para ello hemos utilizado cultivos de varias microalgas que se pueden desarrollar tanto en condiciones fotoatotróficas como heterotróficas o fotomixotróficas.

Finalmente, hemos desarrollado un método de purificación de la G3P DHasa no fosforilante del alga clorofícea *C. reinhardtii* alternativo al publicado por Iglesias y col. (1987). La obtención por este método de preparaciones purificadas del enzima ha permitido profundizar en su caracterización y realizar experimentos *in vitro* sobre la actividad de generación de protones concomitante con su actividad óxido-reductasa.

#### **IV.1. Distribución y localización intracelular de las G3P DHasas en diferentes organismos fotosintéticos**

Los datos sobre distribución de las G3P DHasas recogidos en esta Tesis (Apdo. III.A) representan el primer estudio comparativo detallado sobre la presencia de las dos G3P DHasas dependientes de  $\text{NADP}^+$  en organismos fotosintéticos, desde cianobacterias (procariotas) a plantas superiores. Los datos existentes en la bibliografía muestran a la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  como un enzima típico de organismos fotosintéticos. Sin embargo los estudios sobre el mismo se han centrado en plantas superiores o exclusivamente en dos grupos de microalgas:

clorofíceas (Iglesias y col., 1987) y euglenofíceas (Vacchi y col., 1973; Theiss-Seuberling, 1984). De igual forma los niveles de actividad de la G3P DHasa no fosforilante en microalgas distintas a las clorofíceas no habían sido hasta ahora determinados y había dudas sobre su presencia en estos organismos (Kelly y Gibbs, 1973; Vacchi y col., 1973). En este sentido hemos puesto claramente de manifiesto la presencia del enzima en cultivos de la euglenofíceca *E. gracilis* en contraste con los resultados de Vacchi y col. (1973). Estos datos contradictorios son probablemente debidos a la presencia en el ensayo habitual de las G3P DHasas fosforilantes de L-G3P, un potente inhibidor de la actividad de la G3P DHasa no fosforilante que no afecta sin embargo a aquellas (Kelly y Gibbs, 1973). Nuestros resultados indican claramente la presencia de la G3P DHasa fosforilante dependiente de NADP<sup>+</sup> en todos los organismos fotosintéticos que realizan fotosíntesis oxigénica, tanto procariotas como eucariotas, así como en tejidos de plantas. Por el contrario, la G3P DHasa no fosforilante no se encuentra presente en procariotas fotosintéticos (cianobacterias y bacterias fotosintéticas) ni en organismos no fotosintéticos, mostrándose como un enzima típico de organismos fotosintéticos que poseen cloroplastos o cianelos. La presencia de la G3P DHasa no fosforilante en eucariotas fotosintéticos apoya y justifica la función atribuida al enzima en plantas como componente del sistema exportador de poder reductor, protones y fosfoglicerato desde el estroma del cloroplasto al citosol (Bamberger y col., 1975; Iglesias y col., 1987; Iglesias y losada, 1988; Losada y col., 1990). Por otra parte, la presencia de niveles significativos de la G3P DHasa no fosforilante en tejidos no fotosintéticos de plantas sugiere que este enzima puede tener otra función alternativa aún no establecida, no relacionada directamente con el metabolismo fotosintético del carbono. De hecho se ha descrito la presencia de la actividad G3P DHasa no fosforilante en el látex de *Hevea brasiliensis* (Jacob y D'Auzzac, 1972) y en tejidos

gluconeogénicos de plantas (Kelly y Gibbs, 1973). A este respecto hay que señalar la existencia de una G3P DHasa no fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  detectada en células de la arqueobacteria termófila *T. tenax* cultivadas heterotróficamente (Hensel y col., 1987). Este es el único caso conocido de una G3P DHasa no fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  en organismos no fotosintéticos, y parece ser un caso excepcional dentro de las arqueobacterias, dado que no ha sido encontrada esta actividad enzimática ni en arqueobacterias halofílicas (Danson, 1988; véase Tabla 2) ni en las termofílicas (Fabry y Hensel, 1987; Danson, 1988). Sin embargo muy recientemente se han caracterizado dos G3P DHasas no fosforilantes dependientes de  $\text{NADP}^+$  y de ferredoxina en la eubacteria *S. mutants* (Boyd y col., 1995) y la arqueobacteria *P. furiosus* (Mukund y Adams, 1995), respectivamente.

La localización de las dos G3P DHasas fosforilantes está perfectamente estudiada y recogida en la bibliografía (Preiss y Kosuge, 1970; Cerff, 1982 a y b; Ferri y col., 1987, Fothergill-Gilmore y Michels, 1993). La G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  es un enzima localizado en el estroma del cloroplasto mientras que el enzima dependiente de  $\text{NAD}^+$  es un enzima típicamente citosólico. La G3P DHasa no fosforilante ha sido descrita como citosólica en tejidos de plantas superiores (Kelly y Gibbs, 1973), pero su localización no está tan bien definida como en el caso de los otras dos G3P DHasas. Para comprobar la localización del enzima en microalgas eucarióticas (se han usado dos clorofíceas y una rodofíceas) hemos empleado diversos métodos de rotura celular que afectan en grado diferente a la integridad de los orgánulos celulares (Apdo. III.B). La sonicación, un método drástico que destruye todas las estructuras celulares, solubiliza igual de eficientemente las tres actividades G3P DHasas. En cambio, la rotura celular por congelación-descongelación -un método de rotura más suave que rompe la membrana celular pero mantiene un

cierto grado de integridad de los cloroplastos- solubiliza con eficiencia únicamente las actividades G3P DHasa no fosforilante y fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$ . Ya que la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  es un marcador citoplasmático, la presencia en este extracto de la actividad del enzima no fosforilante en las tres microalgas estudiadas confirma su localización citoplasmática en estos microorganismos. Por el contrario, la presencia de la actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$ , un típico marcador estromático, en el precipitado obtenido por centrifugación diferencial después de la rotura por congelación-descongelación y que contiene la mayoría de los pigmentos fotosintéticos, indica que efectivamente los cloroplastos mantuvieron un grado de integridad suficiente para evitar una pérdida significativa de enzimas estromáticos.

También se ha llevado a cabo el estudio de la localización celular de la G3P DHasa no fosforilante en plantas usando hojas de espinaca y el método de rotura descrito por Kubawara y Murata (1982) (Apdo. III.B). Las actividades fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  y no fosforilante se solubilizan de forma paralela tras una primera rotura mecánica suave, indicando una localización citosólica de ambas. El tratamiento posterior por choque osmótico produce la rotura de los cloroplastos y la solubilización concomitante de la actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  de la fracción estromática. Los resultados sobre localización celular de las G3P DHasas son por tanto muy similares a los obtenidos con microalgas.

#### IV.2. Regulación diferencial de las G3P DHasas de microalgas eucarióticas por efecto de las condiciones nutricionales

El desarrollo en la luz de los cultivos de las microalgas clorofíceas y rodofíceas estudiadas está acompañado de un aumento en los niveles de las tres actividades G3P DHasas hasta alcanzar un máximo hacia el final de la fase exponencial de crecimiento (Apdo. III.C.1). Los intervalos de tiempo necesarios para estas variaciones, relativamente largos (20-60 h), y la inhibición por cicloheximida o DCMU sugiere que se trata de procesos de síntesis *de novo* de proteínas codificadas por el genoma nuclear, dependientes en última instancia del poder reductor generado por el flujo fotosintético de electrones (Apdos. III.C.1.1). Por el contrario, cuando los cultivos de las microalgas estudiadas se dejan evolucionar en la oscuridad mantienen un nivel bajo y constante de las tres actividades G3P DHasas que le permiten mantener un metabolismo basal y sobrevivir durante un periodo relativamente largo para eventualmente reiniciar un metabolismo activo cuando se reestablezcan las condiciones de iluminación (Apdo. III.C.2). Incluso en estos cultivos que se han mantenido previamente en la oscuridad sin crecimiento apreciable un periodo de tiempo las tres G3P DHasas presentan un valor máximo que coincide con el final de la fase exponencial de crecimiento, lo que indica que se trata de enzimas directamente implicadas en el metabolismo central de biosíntesis/degradación de carbohidratos muy activo durante el crecimiento de estas microalgas.

La presencia de carbono orgánico en el medio de cultivo afecta de forma diferente a los niveles celulares de las tres G3P DHasas de microalgas. Los dos enzimas citosólicos siguen pautas paralelas en su evolución y bien distintas a las del enzima cloroplástico. Así, la presencia de acetato sódico en cultivos de *C. reinhardtii* provoca un descenso de

la actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  tanto en la luz como en la oscuridad sin afectar significativamente los niveles de las otras dos actividades enzimáticas (Apdo. III.C.3.1). Por otra parte, la presencia de D-glucosa en cultivos de *C. fusca* provoca, tanto en la luz como en la oscuridad, un aumento apreciable en los niveles de las actividades G3P DHasas no fosforilante y fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  pero los niveles de actividad del enzima fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  decrecen y se hacen en este caso indetectables tras aproximadamente 60 h de cultivo (Apdo. III.C.3.2). La presencia de otros azúcares metabolizables (D-galactosa, D-fructosa, D-manosa, D-ribosa y el disacárido sacarosa), produce en *C. fusca* el mismo efecto descrito para la glucosa. En cambio análogos de azúcares no metabolizables (L-glucosa o 3-O-metil-D-glucosa) no provocan cambios apreciables en ninguna de las G3P DHasas. La asimilación del azúcar es por tanto imprescindible para que ocurran estos cambios en los niveles de actividad de las G3P DHasas. La inhibición parcial de la actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  por acción de la 2-deoxi-D-glucosa, que además retrasa ligeramente el crecimiento de los cultivos, puede ser debido al efecto tóxico de este análogo de azúcar en el metabolismo fotosintético de microalgas (Yadav y Mohanty, 1984). La inhibición promovida por los azúcares de la actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  en *C. fusca* podría explicar la casi completa inhibición por glucosa de la fijación fotosintética de carbono descrita por Bishop (1961) en el alga verde *A. braunii*. De hecho, nuestros experimentos preliminares de medidas de la fijación fotosintética de  $\text{CO}_2$  marcado con  $^{14}\text{C}$  y desprendimiento de  $\text{O}_2$  dependiente de bicarbonato también mostraron que células de *C. fusca* cultivadas en presencia de glucosa presentaban inhibiciones significativas, aunque no totales (70-80% de inhibición), de estas actividades metabólicas (datos no mostrados).

La eliminación del azúcar de cultivos iluminados de *C. fusca* con niveles indetectables de actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  produce una recuperación de esta actividad hasta los niveles típicos de cultivos fotoautotróficos que no se produce por la presencia de cicloheximida o DCMU pero sí en presencia de lincomicina, indicando que estos cambios (inhibición/recuperación) son debidos a procesos de degradación/síntesis *de novo* de proteínas codificadas por el genoma nuclear (Apdo. III.C.4).

Ya que es bien conocido que la glucosa actúa como represor catabólico en sistemas de control por retroalimentación en bacterias y levaduras manteniendo muy bajos los niveles de ciertos enzimas de rutas metabólicas clave (Stryer, 1990), nuestros datos apuntan a un papel regulador similar para este azúcar en *C. fusca*, en este caso sobre la G3P DHasa implicada en la ruta reductiva de las pentosas fosfato. Dado que la señal para que se produzca la represión por catabolito la proporciona la elevación del nivel intracelular de algún producto catabólico de la ruta principal de asimilación del nutriente, el hecho de que los análogos de azúcares no metabolizables no ejerzan ningún efecto estaría de acuerdo con esta propuesta.

Las actividades G3P DHasa no fosforilante y fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  de cultivos de *C. fusca* desarrollados en presencia de azúcar tanto en la luz como en la oscuridad presentan niveles altos y cambios con el tiempo similares a los de cultivos fotoautotróficos que se inhiben por efecto de incubación con cicloheximida o DCMU, pero no por efecto de la lincomicina. Estos cambios son debidos, por tanto, a síntesis *de novo* de proteína en el citosol utilizando en su caso el poder asimilatorio generado en fotosíntesis (Apdo. III.C.4). *C. fusca* es capaz de crecer en condiciones fotomixotróficas y fotoheterotróficas en presencia de glucosa a velocidades semejantes a las condiciones fotoautotróficas. En estos casos los niveles

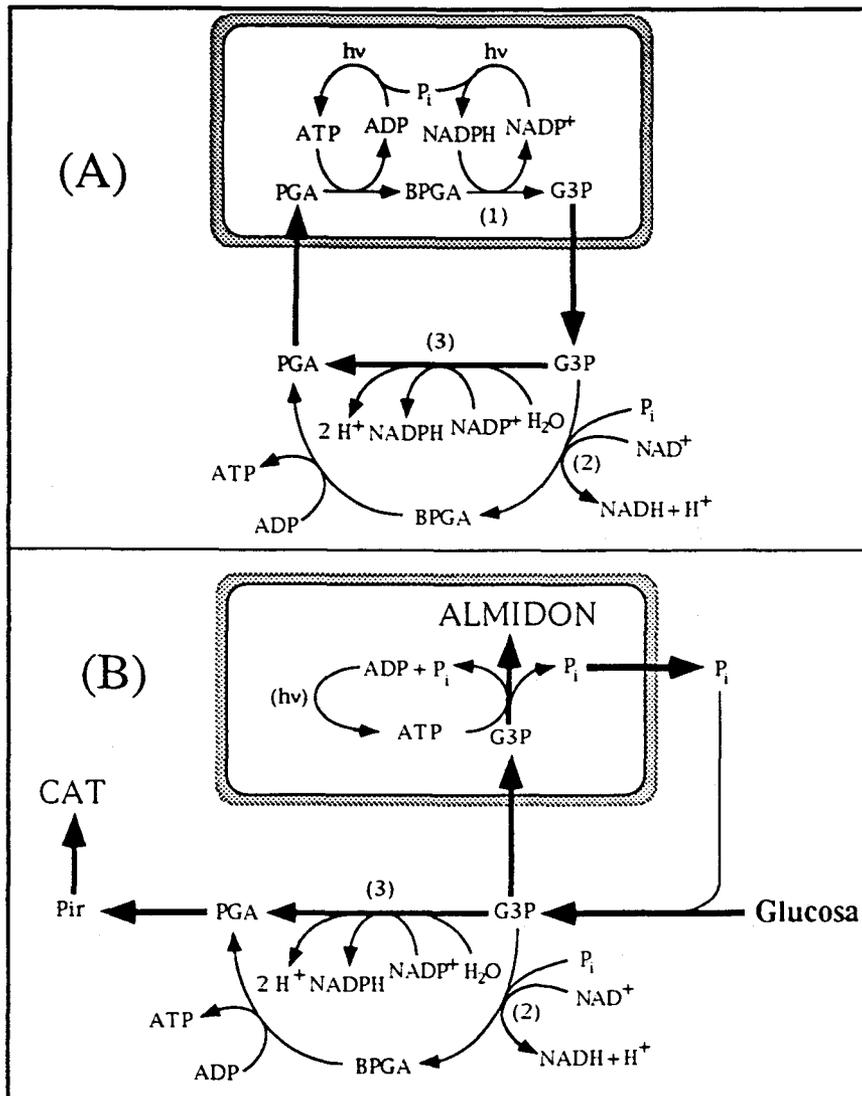
celulares de las G3P DHasas citosólicas, no fosforilante y fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$ , siguen pautas análogas a las de los cultivos fotoautotróficos: no presentan grandes cambios por la presencia de compuestos carbonados, si acaso una cierta estimulación en esas condiciones, lo que indica que ambos serían enzimas constitutivos implicados en el metabolismo central del carbono (Apdo. III.C.3). De hecho, se han detectado niveles altos de la G3P DHasa no fosforilante en cultivos de *C. fusca* desarrollados heterotróficamente en la oscuridad con glucosa como fuente de carbono, esto es en ausencia total de fotosíntesis (Apdo. III.C.3).

Hay que hacer notar que un descenso hasta niveles indetectables del nivel celular de la actividad G3P DHasa fosforilante cloroplástica se ha observado también en cultivos de *C. fusca* sometidos a estrés nutricional ("hambre" de carbono) producido en dos situaciones en las que no hay fuente de carbono inorgánico disponible: gaseo con aire sin  $\text{CO}_2$  o con  $\text{N}_2$  (Apdos. III.C.6 y III.C.7). En esta situación los niveles de las dos G3P DHasas citosólicas se mantienen, sin embargo, constantes a lo largo del tiempo de cultivo. Aunque no tenemos una explicación concreta de estos procesos, el contenido en carbohidratos y azúcares reductores disminuye en estas células probablemente por su degradación, -necesaria para mantener un metabolismo basal y en la que podrían participar las G3P DHasas citosólicas- que presumiblemente podría generar el producto metabólico responsable de la represión por catabolito que tendría lugar también en estas condiciones. Por otra parte, el hecho de que la caída de la actividad G3P DHasa cloroplástica se produzca también en cultivos en "hambre" de carbono mantenidos en condiciones microaeróbicas (gaseados con  $\text{N}_2$ ) descarta un posible efecto inhibitor del oxígeno molecular o sus derivados activados sobre las actividades G3P DHasas (Apdo. III.C.7).

Ya que la presencia de azúcares en el medio de cultivo debe inhibir la fijación fotosintética de carbono, muy posiblemente el alga en estas condiciones reorganiza su metabolismo orientándolo a la metabolización de la fuente de carbono orgánico exógeno. Así, se ha descrito y hemos constatado por observaciones microscópicas que en presencia de azúcares las células de la microalga *C. fusca* sufren una apreciable modificación estructural y un aumento significativo del tamaño celular consecuencia de la acumulación de polisacáridos de reserva (Rodríguez-López, 1965). En nuestros cultivos se produce, en efecto, una mayor cantidad de material celular por unidad de volumen en presencia de glucosa, aunque las tasas de crecimiento son análogas a las de cultivos fotoautotróficos (Apdo. III.C.8). Ya que hemos detectado un claro incremento del contenido celular de carbohidratos totales en estas condiciones, esto puede ser debido a una acumulación de polisacáridos de reserva, fundamentalmente almidón (Apdo. III.C.8). La activa incorporación del azúcar se pone de manifiesto por el mayor contenido celular tanto de carbohidratos totales como azúcares reductores en cultivos de *C. fusca* desarrollados con glucosa, tanto en la luz como en la oscuridad, en relación con los cultivos fotoautotróficos, en los cuales se produce una cierta acumulación de carbohidratos fundamentalmente en la fase estacionaria. Esta acumulación no se produce en la oscuridad en ausencia de glucosa exógena, situación en la cual el contenido en carbohidratos se mantiene prácticamente constante, y si acaso disminuye ligeramente. Este aumento en el contenido de carbohidratos de reserva y de azúcares reductores se produce igualmente en cultivos iluminados con glucosa como fuente exclusiva de carbono, lo que de nuevo pone de manifiesto que *C. fusca* es capaz de desarrollar un metabolismo fotoheterotrófico utilizando el azúcar. En esta situación los niveles de las actividades G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  y no fosforilante siguen, como hemos comentado, pautas similares a las de cultivos fotoautotróficos. Hay que hacer notar que

los niveles de máxima actividad de estos enzimas, que se producen durante el estadio de mayor actividad metabólica de los cultivos, coinciden en el tiempo con el máximo detectado en los azúcares reductores, lo que permite pensar que estarían directamente implicados en la metabolización de estos compuestos. Por el contrario, en ausencia de CO<sub>2</sub> ("hambre" de carbono) los contenidos celulares en carbohidratos totales y azúcares reductores disminuyen progresivamente siendo probablemente utilizados por el alga para mantener un metabolismo basal en esta situación de estrés nutricional (Apdo. III.C.8).

Los esquemas de flujo metabólico propuestos para las tres G3P DHasas en cultivos de *C. fusca* desarrollados en distintas condiciones nutricionales se presentan en el Esquema 3. En condiciones fotoautotróficas (Esquema 3A) un flujo metabólico cíclico sería el predominante, en el cual el G3P generado fotosintéticamente en el estroma del cloroplasto se oxidaría a PGA en el citosol bien por acción de la G3P DHasa fosforilante dependiente de NAD<sup>+</sup> o con el concurso del enzima no fosforilante, que competiría con ventaja, dada su mayor afinidad por los sustratos, generando así el NADPH necesario para el funcionamiento del activo metabolismo biosintético en estas condiciones. La competencia entre estos dos enzimas estaría regulada por los requerimientos de NAD(P)H y la carga energética celular, así como por la disponibilidad de P<sub>i</sub> que es un inhibidor de la G3P DHasa no fosforilante (Iglesias y col., 1987) y sustrato de la G3P DHasa fosforilante. Por el contrario, en condiciones fotoheterotróficas (Esquema 3B) el azúcar exógeno se podría asimilar activamente siguiendo el ramal no fosforilante de la ruta glicolítica, independiente de la carga energética celular, en el que participaría la G3P DHasa no fosforilante parte del G3P se importaría sin embargo al cloroplasto con el concurso del translocador triosa-fosfato/fosfato. En estas condiciones el ATP necesario para la acumulación de almidón en el



- (1) G3P DHasa fosforilante dependiente de NADP<sup>+</sup> (EC 1.2.1.13)
- (2) G3P DHasa fosforilante dependiente de NAD<sup>+</sup> (EC 1.2.1.12)
- (3) G3P:NADP<sup>+</sup>oxido-reductasa (EC 1.2.1.9)

# ESQUEMA 3

cloroplasto podría ser generado fotosintéticamente por el flujo cíclico de electrones. En condiciones heterotróficas (en la oscuridad en presencia del azúcar) ambos ramales, fosforilante y no fosforilante, de la glicolisis también podrían participar en la degradación de carbohidratos en función principalmente de la disponibilidad de  $P_i$  y de la necesidad de NADPH/NADH y/o ATP en el citosol.

#### **IV.3. Purificación y caracterización de la G3P DHasa no fosforilante del alga clorofícea *C. reinhardtii***

La G3P DHasa no fosforilante se ha purificado principalmente de plantas (Rosemberg y Arnon, 1955; Kelly y Gibbs, 1973; Pupillo y Faggiani, 1979). Estas purificaciones se caracterizan en general por su bajo rendimiento, y están basadas en un fraccionamiento del extracto crudo con disolventes orgánicos, una precipitación fraccionada con sulfato amónico y diferentes pasos de cromatografía en columna, aunque en todos los casos se incluye una cromatografía de filtración molecular. Durante el desarrollo de esta Tesis se ha comprobado que los métodos de purificación descritos para plantas tienen escasa aplicación en la purificación de la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa de microalgas clorofíceas. Así, el tratamiento del extracto crudo con solventes orgánicos (p.e., acetona) provoca una importante pérdida de la actividad enzimática.

Nuestro grupo ha descrito en la clorofícea *C. reinhardtii* el único método de purificación publicado para la G3P DHasa no fosforilante de microalgas (Iglesias y col., 1987). El método incluye rotura celular por sonicación, una precipitación fraccionada con sulfato amónico (entre el 40-80% de saturación) del extracto crudo obtenido, cromatografía en DEAE celulosa, cromatografía en Procion Red 120 Agarosa, cromatoenfoco y filtración molecular en Sephacryl S-300. Estos cinco pasos de

purificación permitieron obtener preparaciones puras del enzima con un factor de purificación de unas 1500 veces y una recuperación total de aproximadamente el 30%. La actividad específica conseguida oscilaba en torno a las 8 U/mg de proteína.

En nuestro trabajo hemos modificado el método de purificación de la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa de *C. reinhardtii*, consiguiendo una mayor eficacia y simplicidad (Apdo. III.D). En el método descrito por Iglesias y col. (1987) se usaba la sonicación como método de rotura celular. Este es un método muy drástico que puede inducir una cierta inactivación de enzimas lábiles (y las G3P DHasas lo son). La destrucción de todas las estructuras celulares provoca además la liberación de proteínas cloroplásticas, entre ellas la G3P DHasa fosforilante dependiente de NADP<sup>+</sup>, que acompañan al enzima no fosforilante en el extracto crudo. Este método de rotura ha sido sustituido por la congelación a -80 °C y posterior descongelación a temperatura ambiente. Ello supone una rotura más suave de las células que además de evitar posibles inactivaciones de enzimas mantiene un cierto grado de integridad de los orgánulos como los cloroplastos, con lo que el extracto crudo resulta en una preparación proteica más limpia (más libre de pigmentos y proteínas cloroplásticas) que en el caso de la rotura por sonicación. Por otra parte, la estabilidad del enzima a lo largo del proceso de purificación parecía mejorarse cuando el tampón de rotura se suplementaba con un cóctel de inhibidores de proteasas (en este caso ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, benzamidina y PMSF). Resultaba igualmente ventajoso para el mantenimiento de la actividad la adición a los tampones cromatográficos, no sólo de agentes protectores de grupos sulfhidrilos (2-mercaptoetanol) y quelantes de metales (EDTA), sino además de glicerol. Por otra parte, en el método descrito en esta Tesis se empleó una sólo precipitación con sulfato amónico al 40% de saturación

(Apdo. III.D.1.1). Dado que mayores concentraciones de esta sal inhiben parcialmente la actividad G3P DHasa no fosforilante, este tratamiento se ha reducido al mínimo. El material proteico que en el método de Iglesias y col. (1987) se eliminaba por precipitación con una concentración mayor (80%) de sulfato amónico, se separa del enzima en este método modificado precipitando con una concentración más baja de la sal y pasando la solución por una columna de intercambio aniónico.

A excepción de una cromatografía de intercambio aniónico en DEAE celulosa DE-52 (Apdo. III.D.1.2), los pasos de purificación de cromatografía líquida en columnas son diferentes a los empleados por Iglesias y col. (1987). En este primer paso cromatográfico se separa la actividad G3P DHasa no fosforilante de la mayor parte de la ferredoxina y proteínas coloreadas contenidas en la preparación enzimática que no se adsorbían al lecho cromatográfico. La actividad G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa eluye de esta columna a concentración muy baja de NaCl, por lo que esta sal no interfiere en los sucesivos pasos cromatográficos. El rendimiento obtenido es bueno y el proceso resulta ser repetitivo.

La cromatografía en Red 120-Agarosa, el cromatoenfoco y la cromatografía de filtración en Sephacryl S-300 utilizados en el método de purificación de Iglesias y col. (1987) son técnicas que, además de consumir mucho tiempo, resultan en un elevado costo, en particular el cromatoenfoco en el que se consumen tampones con anfolitos. En el procedimiento descrito en esta Tesis, se han sustituido por una cromatografía hidrofóbica en Fenil Sefarosa 4B y una cromatografía de adsorción en hidroxapatito, mucho más asequibles económicamente. La eliminación de un paso cromatografico permitió además reducir el tiempo necesario para la purificación lo que se

traducía en una pérdida menor de actividad durante el proceso.

La cromatografía hidrofóbica en Fenil Sepharose 4B y la cromatografía en hidroxapatito (Apdos. III.D.1.3 y III.D.1.4) han resultado pasos determinantes en este nuevo proceso de purificación, obteniéndose tras ellos un significativo incremento en el grado de purificación (hasta 205 y 1380 veces, respectivamente) y un rendimiento similar al obtenido por otros autores tras el último paso cromatográfico. Sin embargo, el valor de actividad específica de las preparaciones (aprox. 30 U/mg de proteína) es superior al de las obtenidas por métodos anteriores (8-9 U/mg de proteína, descrito por Iglesias y col., 1987). Una posible causa de la diferencia observada de actividad específica puede ser el método de rotura celular empleado que al ser más suave, podría preservar mejor la actividad del enzima que en nuestro caso sería más activa. En ambos casos el resultado final de la purificación es, sin embargo, una preparación enzimática homogénea a juzgar por las electroforesis realizadas tanto en condiciones desnaturizantes como no desnaturizantes y las cromatografías analíticas llevadas a cabo (Apdo III.D.2; Iglesias y col., 1987). De hecho, nuestras preparaciones purificadas de enzima no muestran variaciones significativas tanto en los parámetros físico-químicos (Apdo. III.D.3.1) como en los valores de  $K_m$  para ambos sustratos (datos no mostrados) respecto de los estimados por Iglesias y col. (1987) para la G3P DHasa de *C. reinhardtii*. Estos resultados sugieren que de existir un cambio conformacional debe afectar a la eficiencia de la reacción (número de recambio) pero no a la afinidad del enzima por los sustratos.

La  $M_m$  del enzima ha sido estimada en condiciones no desnaturizantes tanto por cromatografía de filtración en gel como por electroforesis nativa (Apdo. III.D.3.1). Estos

métodos permiten establecer un valor cercano a los 200 kDa para el enzima nativo. La electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Apdo III.D.3.1) muestra una sola banda de proteína con un tamaño aparente de 50 kDa, que correspondería a la subunidad del enzima.

La proteína se muestra, por tanto, como un homotetrámero formado por cuatro subunidades idénticas, al igual que las G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasas purificadas de plantas superiores. Los datos obtenidos son, en cuanto a las propiedades fisico-químicas, concordantes con los presentados sobre el enzima purificado de *C. reinhardtii* y tejidos fotosintéticos de plantas (Rosemberg y Arnon, 1955; Kelly y Gibbs, 1973; Pupillo y Faggiani, 1979; Iglesias y col., 1987). Sin embargo, como se discute más adelante estos datos sobre  $M_m$ s contrastan con los publicados muy recientemente (durante la redacción de esta Tesis) para tres G3P DHasas no fosforilantes de organismos procarióticos no fotosintéticos.

El punto isoelectrico (pI) de la G3P DHasa no fosforilante de *C. reinhardtii* ha sido estimado mediante electroenfoque en gel de poliacrilamida y cromatoenfoque (Apdo III.D.3.1). El valor de pI obtenido por ambos métodos, coincide casi exactamente con el descrito por Iglesias y col. (1987) (pI 6,9) utilizando el cromatoenfoque en columna.

El espectro de adsorción del enzima purificado (Apdo III.D.3.2) aunque no presenta ninguna banda clara en la zona del visible, mostraba, además de la típica banda de absorción a 274 nm, una banda ancha en la zona azul-violeta del espectro visible centrada a 350 nm. Este es el primer espectro conocido de una G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa. Las G3P DHasas fosforilantes presentan también una banda visible que ha sido caracterizada como una banda de transferencia de carga, denominada banda de Racker, debida a la unión de

NAD<sup>+</sup> como cofactor (Racker y Krinsky, 1952; Racker, 1965). La relación anormalmente alta de A<sub>280</sub>/A<sub>260</sub> del espectro de la G3P DHasa no fosforilante purificada de *C. reinhardtii* permite deducir también la presencia de un cofactor nucleotídico, probablemente NADP<sup>+</sup>, unido al enzima. El comportamiento de esta banda del espectro de la G3P DHasa no fosforilante en respuesta a los reactivos de grupos sulfhidrilos (Apdo. III.D.3.2) indica que residuos de cisteína, probablemente la cisteína del sitio activo, puedan estar implicados en su existencia, al igual que ocurre con la banda de Racker de los espectros de las G3P DHasas fosforilantes (Racker y Krinsky, 1952; Racker, 1965).

La Tabla 11 muestra las propiedades moleculares y cinéticas de varias G3P DHasas purificadas de distintos organismos. Los valores de las M<sub>m</sub>s nativas oscilan entre los 63 y 350 kDa, y en su mayoría resultan ser proteínas oligoméricas, sin grupo prostético característico y con grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad enzimática. Tanto los datos bioquímicos como los de genética molecular indican que las G3P DHasas no fosforilantes de los eucariotas fotosintéticos y de la bacteria *S. mutans* están muy relacionados y se pueden considerar como el mismo enzima, mientras que los de las arqueobacterias *T. tenax* y *P. furiosus* son estructural y funcionalmente muy diferentes (Kelly y Gibbs, 1973; Pupillo y Faggiani, 1979; Crow y Wittenberger, 1979; Hensel y col., 1987; Iglesias y col., 1987; Iglesias y Losada, 1988; Boyd y col., 1995; Mukund y Adams, 1995).

**Tabla 11.** Comparación de las propiedades moleculares y cinéticas de varias G3P DHasas no fosforilantes purificadas de distintos organismos

	Plantas superiores	<i>C. reinhardtii</i>	<i>S. mutans</i>	<i>T. tenax</i>	<i>P. furiosus</i>
$M_m$ nativa (kDa)	190-200	200	350	210	63
$M_m$ subunidad (kDa)	50	50	51	49	63
Estado oligomérico	4	4	6 <sup>a</sup>	4	1
pI	6,0	7,0	ND <sup>b</sup>	ND	ND
$K_m$ ( $\mu$ M)					
G3P	30-50	51	140	ND	28
NADP <sup>+</sup>	10-20	10	100 <sup>c</sup>	-	--
NAD <sup>+</sup>	--	--	--	1100 <sup>d</sup>	--
Fd <sub>ox</sub>	--	--	--	--	6
Grupo prostético	--	--	--	--	pterina W/Fe

<sup>a</sup>Número mínimo de subunidades por oligómero.

<sup>b</sup>ND, no determinado.

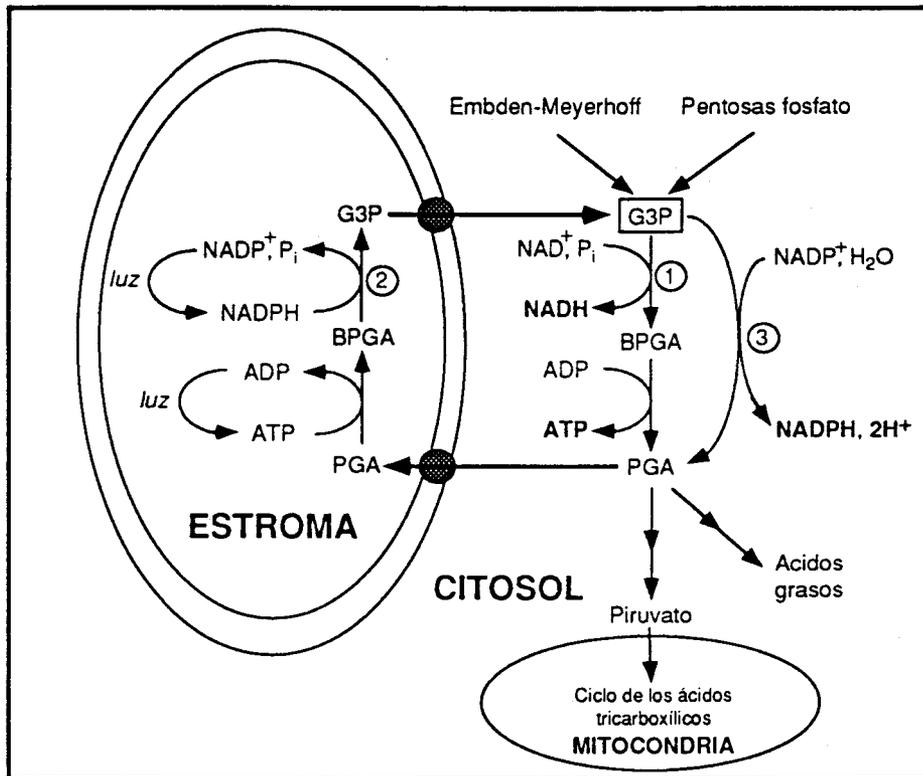
<sup>c</sup>Cinéticas no lineales sugieren inhibición por sustrato por G3P a concentraciones limitantes de NADP<sup>+</sup>.

<sup>d</sup>La actividad G3P DHasa de este enzima es estimulada por fosfato o arseniato, que duplican la  $V_{max}$  y reducen la  $K_m$  para el NAD<sup>+</sup> hasta un 25% del valor determinado sin estos efectores.

#### IV.4. Función fisiológica de la G3P DHasa no fosforilante en los organismos fotosintéticos eucarióticos.

La función fisiológica de las G3P DHasas fosforilantes está bien establecida, a diferencia de la del enzima no fosforilante cuya función no está aún totalmente aclarada. Se ha propuesto la participación de este enzima, en colaboración con su homóloga fosforilante cloroplástica y el traslocador triosa-fosfato/3-fosfoglicerato, en la exportación desde el estroma al citosol del poder reductor generado en la fotosíntesis (Bamberger y col., 1975; Iglesias y col., 1987; Flügge y Heldt, 1981). Sin embargo, basándonos en la liberación de protones a bajo pH -caracterizada por primera vez en esta Tesis (Apdo. III.E.1)- que conlleva la actividad redox de la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa y en que no se ha detectado actividad H<sup>+</sup>-ATPasa en la doble membrana del cloroplasto (Flügge y Heldt, 1981) nuestro grupo ha propuesto (Esquema 4) que este enzima puede desempeñar también un papel esencial en el mantenimiento del gradiente de pH de casi dos unidades existente entre el estroma del cloroplasto y el citosol (Iglesias y col., 1987; Iglesias y Losada, 1988), un gradiente necesario, por otra parte, para el funcionamiento óptimo del translocador triosa-fosfato/3-fosfoglicerato, considerado el traslocador más importante en la exportación del carbono fijado en fotosíntesis desde el cloroplasto al citosol (Flügge y Heldt, 1981).

El estudio comparativo de las reacciones que catalizan las G3P DHasas fosforilante y no fosforilante debe tener gran relevancia en bioenergética. La transferencia de oxígeno reducido (anión óxido, O<sup>2-</sup>) debe jugar indudablemente un papel esencial no solo en la fosforilación a nivel de sustrato (fermentación) sino también, de acuerdo con los resultados descritos en esta Tesis, en el mecanismo básico de los procesos de

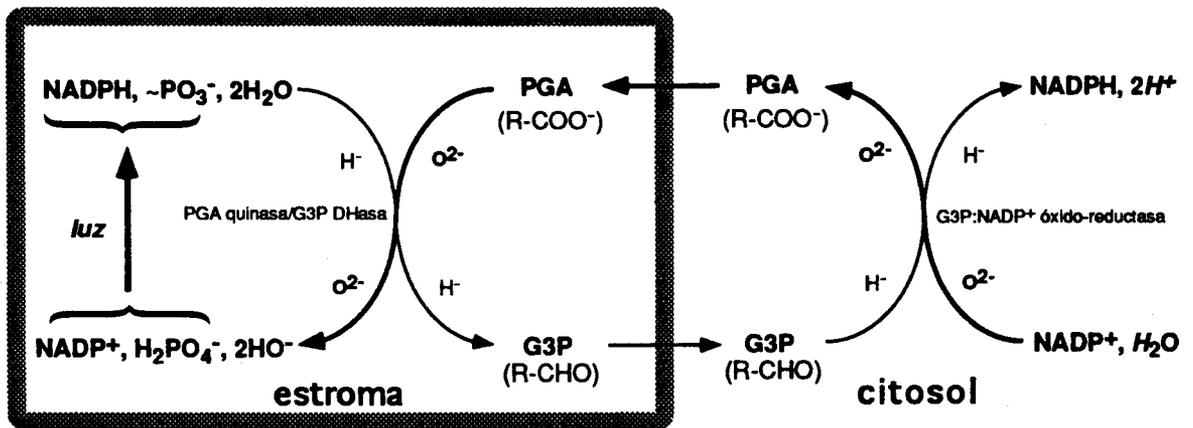


- 1, G3P DHasa fosforilante dependiente de NAD<sup>+</sup> (EC 1.2.1.12)
- 2, G3P DHasa fosforilante dependiente de NADPH (EC 1.2.1.13)
- 3, G3P:NADPH-óxido-reductasa (EC 1.2.1.9)

# ESQUEMA 4

transducción de energía a nivel de membrana como son la transhidrogenación y la fosforilación (tanto fotofosforilación como fosforilación oxidativa). Si, como se ha propuesto recientemente (Losada, 1992 a y b), este fuera el caso, el oxígeno tendría en bioenergética un papel ácido-base además de su bien establecido papel redox (donador de electrones en la fotosíntesis y aceptor de electrones en la respiración). En otro aspecto, hay que hacer notar que el citosol de las células fotosintéticas eucarióticas (donde se localiza la G3P DHasa no fosforilante) es más ácido, alrededor de dos unidades de pH, que el estroma del cloroplasto (donde se encuentra la G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$ ). Este sistema multienzimático formado por ambas G3P DHasas dependientes de  $\text{NADP}^+$  y el translocador de la triosa fosfato/fosfato, capaz de generar un gradiente electroquímico de protones a expensas del ATP a través de la membrana del cloroplasto, se puede considerar como un sistema modelo muy útil en bioenergética (Figura 37).

De otro lado los patrones de regulación nutricional observados en cultivos de microalgas de las G3P DHasas no fosforilante y fosforilante glicolítica, similares entre sí y muy diferentes al del enzima cloroplástico (Apdo. III.C), indican que el enzima no fosforilante debe jugar un papel en el metabolismo no fotosintético de los hidratos de carbono. A este respecto hay que señalar que han sido detectados niveles altos de la G3P DHasa no fosforilante en tejidos de plantas con alta actividad gluconeogénica (Jacob y D'Auzac, 1972), y además en esta Tesis hemos detectado por vez primera este enzima en raíces (Apdo. III.A.3). Ya que en microalgas cultivadas heterotróficamente se ha observado niveles altos de actividad G3P DHasa no fosforilante, además de su función en fotosíntesis, este enzima debería participar, como se ha comentado en el Apartado IV.2, en el metabolismo degradativo de los hidratos de carbono de los eucariotas fotosintéticos,



**Figura 37.** Generación dependiente de ATP de un potencial electroquímico de protones a través de la membrana del cloroplasto.

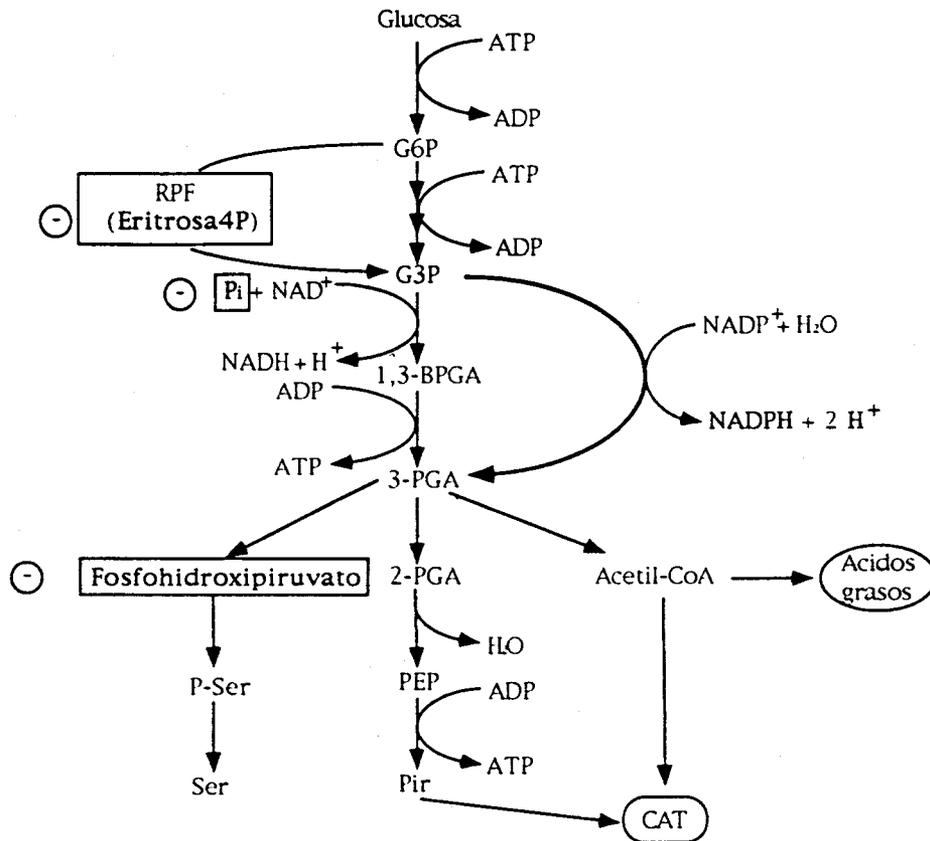
Las dos G3P DHasas dependientes de  $\text{NADP}^+$  presentes en los eucariotas fotosintéticos, fosforilante (cloroplástica) y no fosforilante (citósólica), podrían actuar en cooperación con el translocador triosa-fosfato/fosfato de la membrana interna del cloroplasto en la exportación dependiente de ATP tanto de poder reductor como de protones desde el estroma del cloroplasto al citósol.

probablemente como un ramal no fosforilante, independiente de la carga energética nuclear y con diferente especificidad por el coenzima, alternativo al del clásico enzima fosforilante glicolítico. De este modo, en esta ruta metabólica alternativa, específica de los eucariotas fotosintéticos, la fosforilación a nivel de sustrato de la glicolisis clásica se sacrificaría en aras de la generación de protones (implicados en el balance iónico celular) y del NADPH necesario para satisfacer la intensa actividad anabólica de las células fotosintéticas. A este respecto es interesante hacer notar que recientemente se ha descrito la existencia en algunos procariotas no fotosintéticos de G3P DHasas no fosforilantes dependientes de nicotinamida-adenina dinucleótidos que estarían implicadas en rutas de degradación de carbohidratos (Hensel y col., 1987; Boyd y col., 1995), y se ha caracterizado además en la arqueobacteria *P. furiosus* una G3P DHasa no fosforilante dependiente de ferredoxina que participaría en una glicolisis no fosforilante (Mukund y Adams, 1995). Los componentes de esta "familia" de enzimas llevarían a cabo la oxidación del G3P independiente de  $P_i$  utilizando distintos cofactores:



Por otro lado, la independencia de  $P_i$  del ramal no fosforilante de la glicolisis definido por la G3P:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa puede tener una gran importancia ecológica. De hecho, la disponibilidad de fósforo es en muchos casos el factor limitante del crecimiento de los organismos fotosintéticos de ecosistemas acuáticos, en los que la

reserva de este elemento puede no ser suficiente para llevar a cabo los procesos metabólicos debido a que en su mayor parte se encuentra en forma de sales insolubles (Margalef, 1974). De acuerdo con esta propuesta, en cultivos de células vegetales en condiciones de deficiencia en fosfato se produce una inhibición de la G3P DHasa glicolítica junto con un aumento de los niveles del enzima no fosforilante y otros enzimas glicolíticos que usan pirofosfato (Duff y col., 1989). Estos resultados son sin embargo contradictorios con los obtenidos más recientemente en plantas intactas en las que la deficiencia en fosfato parece producir más bien una inhibición de la glicolisis y una acumulación de azúcares no fosforilados en las vacuolas (Rychter y Randall, 1994). Estudios de regulación enzimática *in vitro* apuntan sin embargo a un funcionamiento alternativo de ambas G3P DHasas en la glicolisis de eucariotas fotosintéticos en función de la disponibilidad de  $P_i$ , ya que es sustrato del enzima fosforilante, y al mismo tiempo un potente inhibidor de la G3P DHasa no fosforilante (Iglesias y col., 1987, Iglesias y Losada, 1988) (Esquema 5).



Metabolitos con potencial acción reguladora sobre la G3P deshidrogenasa no fosforilante

$\ominus$  : inhibición *in vitro* de la actividad

# ESQUEMA 5

## V. CONCLUSIONES

## V. CONCLUSIONES

1. La G3P DHasa no fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  de organismos fotosintéticos es un enzima típico y exclusivo de los que poseen cloroplastos o cianelos y no se encuentra en cianobacterias.
2. El enzima es citosólico tanto en plantas superiores como en microalgas.
3. Las distintas condiciones nutricionales afectan de forma diferencial a los niveles celulares de las tres G3P DHasas en microalgas clorofíceas.
4. Los niveles celulares de las tres actividades G3P DHasas de microalgas aumentan en los cultivos fotoautotróficos hasta alcanzar un valor máximo debido a síntesis *de novo* de proteína, mientras se mantienen bajos y constantes en cultivos mantenidos en la oscuridad.
5. La presencia de azúcares metabolizables en cultivos de *C. fusca* provoca una drástica disminución de la actividad G3P DHasa fosforilante cloroplástica dependiente de  $\text{NADP}^+$  hasta niveles indetectables, mientras que produce un aumento del nivel de la G3P DHasa no fosforilante citosólica. La eliminación del azúcar permite la recuperación del nivel de la G3P DHasa cloroplástica propio de las condiciones fotoautotróficas, en un proceso dependiente de síntesis *de novo* de proteína codificada por el genoma nuclear. Ya que estos cambios no se observan con análogos no metabolizables de azúcares, el efecto de la glucosa sobre la G3P DHasa cloroplástica se puede considerar análogo a la represión catabólica de sistemas enzimáticos observada en bacterias y levaduras.

6. La ausencia de fuente de carbono inorgánico ("hambre" de carbono) produce también una drástica disminución de la actividad G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NADP}^+$  mientras que las actividades de las dos G3P DHasas citosólicas se mantienen a niveles basales y constantes. La vuelta a las condiciones fotoautotróficas permite la recuperación de los niveles típicos de los tres enzimas en un proceso dependiente de síntesis *de novo* de proteínas codificadas por el genoma nuclear.

7. La presencia de D-glucosa como única fuente de carbono, incluso en la oscuridad, permite niveles de las actividades G3P DHasa no fosforilante y G3P DHasa fosforilante dependiente de  $\text{NAD}^+$  similares a los de cultivos fotoautotróficos.

8. La detección de niveles significativos de G3P DHasa no fosforilante en tejidos no fotosintéticos de plantas y el claro paralelismo de los niveles de este enzima y de la G3P DHasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  en cultivos heterotróficos de microalgas sugieren un papel alternativo para la G3P DHasa no fosforilante distinto del propuesto en fotosíntesis, probablemente en el metabolismo degradativo de los carbohidratos.

9. La G3P DHasa no fosforilante se ha purificado hasta homogeneidad del alga clorofícea *C. reinhardtii* utilizando un método que permite obtener el enzima con una mayor actividad específica que por el método anteriormente descrito, y ha permitido identificar una banda en su espectro de absorción análoga a la banda de Racker de la G3P DHasa fosforilante.

10. Los estudios *in vitro* sobre la capacidad de generación de protones de la G3P DHasa no fosforilante apoyan la participación de este enzima como componente de un sistema

de transporte indirecto de protones del estroma del cloroplasto al citosol.

11. Mediante un sistema reconstituido de enzimas solubles (PGA quinasa/G3P DHasa fosforilante/G3P DHasa no fosforilante) se ha logrado por vez primera, sin necesidad de sistemas complejos de proteínas de membrana, la transhidrogenación e ionización del agua dependientes de ATP. El agua actuaría en este sistema como sustrato primario para la conversión de la energía del ATP en energía ácido-base con el concurso del par anión carboxilato-cación acilio.

## VI. BIBLIOGRAFIA

## VI. BIBLIOGRAFIA

Ahrenhöfer, U. (1979) Reinigung und charakterisierung der NAD(P)-spezifischen glycerinaldehide-3-phosphat dehydrogenase aus *Chlorella fusca*. Dissertation, Universidad de Hannover. Alemania Federal.

Anderson, L.E. (1986) Light/dark modulation of enzyme activity in plants. *Adv. Bot. Res.* **12**, 1-46.

Andrews, P. (1965) The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**, 595-606.

Arnon, D.I. (1977) Photosynthesis 1950-75: Changing concepts and perspectives. En "Encyclopedia of Plant Physiology", New Series, vol **5**, pp. 7-56. (Trebst, A. y Avron, M., eds.). Springer Verlag, Berlin.

Arnon, D.I., Rosenberg, L.L. y Whatley, F.R. (1954) A new glyceraldehyde phosphate dehydrogenase from photosynthetic tissues. *Nature* **173**, 1132-1134.

Bailey, J.L. (1967) "Techniques in Protein Chemistry" (2nd ed.) p. 340. Elsevier, Amsterdam.

Bamberger, E.J., Ehrlich, B.A. y Gibbs, M. (1975) The glyceraldehyde-3-phosphate and glycerate 3-phosphate shuttle and carbon dioxide assimilation in intact spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **55**, 1023-1030.

Barber, J. (1976) Ionic regulation in intact chloroplasts and its effect on primary photosynthetic processes. En "The Intact Chloroplast" chapter 3, pp 89-134 . (Barber, J., ed.).

Bio-Rad Protein Assay (1979). Instruction manual. BIO-RAD LABORATORIES, Richmond, California.

Bishop, N.I. (1961) The photometabolism of glucose by an hydrogen-adapted alga. *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 323-332.

Böger, P. y San Pietro, A. (1967) Ferredoxin and cytochrome f in *Euglena gracilis*. *Z. Pflanzenphysiol.* **58**, 70-75.

Bothe, H. y Floener, L. (1978) Physiological characterization of *Cyanophora paradoxa*, a flagellate containing cyanelles in endosymbiosis. *Z. Naturforsch.* **33c**, 981-987.

Boyd, D.A., Cvitkovitch, D.G. y Hamilton, I.R. (1995) Sequence, expression and function of the gene for the nonphosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus mutants*. *J. Bacteriol.* **177**, 2622-2727.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Brinkmann, H., Martinez, P., Quigley, F., Martin, W. y Cerff, R. (1987) Endosymbiotic origin and codon bias of the nuclear gene for chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from maize. *J. Mol. Evol.* **26**, 320-328.

Brinkmann, H., Creff, R., Salomon, M. y Soll, J. (1989) Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the cytosolic precursors of subunits GapA and GapB of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pea and spinach. *Plant Mol. Biol.* **13**, 81-94.

Calvin, M. y Bassham, J.A. (1962) "The Photosynthesis of Carbon Compounds", Benjamin , Nueva York.

Cerff, R. (1978) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) from *Sinapsis alba*: steady-state kinetics. *Phytochemistry* **17**, 2061-2067.

Cerff, R. y Chambergs, S.E. (1979). Subunit Structure of higher plant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (EC 1.2.1.12 and EC 1.2.1.13). *J. Biol. Chem.* **254**, 6094-6098.

Cerff, R. (1979) Quaternary structure of higher plant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **94**, 243-247.

Cerff, R. (1982 a). Evolutionary divergence of chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from angiosperms. *Eur. J. Biochem.* **126**, 513-515.

Cerff, R. (1982 b) Separation and purification of NAD- and NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from higher plants. En "Methods in Chloroplast Molecular Biology" pp. 683-694. ( Edelman, M., Hallik, R.B. y Chua, N.H. eds.). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, .

Cerff, R., Hundrieser, J. y Friedrich, R. (1986) Subunit B of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is related to  $\beta$ -tubulin. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 44-51.

Chen, J.H., Gibson, J.L., Mc Cue, L.A. y Tabita, F.R. (1991) Identification, expression and deduced primary structure of trans-ketolase and other enzymes encoded within the form II CO<sub>2</sub> fixation operon of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* **266**, 20447-20452.

Chueca, A., Lázaro, J.J. y López-Gorgé, J. (1984). Light-induced nuclear synthesis of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Physiol.* **75**, 539-541.

Corbier, C., Della Seta, F. y Branlant, G. (1992) A new chemical mechanism catalyzed by a mutated aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **31**, 12532-12535.

Crow, V.L. y Wittenberger, C.L. (1979) Separation and properties of NAD- and NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Chem.* **25**, 1134-1142.

Danson, M.J. (1988) Archaeobacteria: the comparative enzymology of their central metabolic pathways. *Adv. Microb. Physiol.* **29**, 165-231.

De la Rosa, M.A., Hervás, M., Serrano, A. y Losada, M. (1989) "Fotobioquímica". Editorial Síntesis, Madrid.

Dubois, M. Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356.

Duff, S.M., Moorhead, G.B., Lefebvre, D. y Plaxton, W. (1989) Phosphate starvation inducible "bypasses" of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol.* **90**, 1275-1278.

Fabry, S. and Hensel, R. (1987) Purification and characterization of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the thermophilic archaeobacterium *Methanothermus fervidus*. *Eur. J. Biochem.* **165**, 147-155.

Ferri, G., Comerio, G., Iadarola, P., Zapponi, M.C. y Speranza, M.I. (1978). Subunit structure and activity of

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **522**, 19-31.

Ferri, G., Stoppini, M., Iadarola, P., Zapponi, M.C., Galliano, M. y Minchiotti, L. (1987). Structural characterization of the subunit of spinach chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP). *Biochim. Biophys. Acta* **915**, 149-156.

Flügge, U.I. y Heldt, H.W. (1981) The phosphate-triose-phosphate-phosphoglycerate translocator of the chloroplast. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 530-533.

Fothergill-Gilmore, L.A. y Michels, P.A.M. (1993) Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **59**, 105-235.

Fuller, R.C. y Gibbs, M. (1959) Intracellular and phylogenetic distribution of ribulose-1,5-diphosphate carboxylase and D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Plant Physiol.* **34**, 324.

Garavito, R.M., Rossman, M.G., Argos, P. y Eventoff, W. (1977) Convergence of active center geometries. *Biochemistry* **16**, 5065-5071.

Gold, A.M. (1967) Sulfonylation with sulfonyl halides. *Meth. Enzymol.* **11**, 706-711.

Gotto, J.W., Tabita, F.R. y Van Baalen, C. (1979) Isolation and characterization of rapidly-growing, marine, nitrogen-fixing strains of blue-algae. *Arch. Microbiol.* **121**, 15-159.

Grissom, F.C. y Kahn, J.S. (1975). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Euglena gracilis*. Purification and physical and chemical characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 444-458.

Habenicht, A., Hellman, U. y Cerff, R. (1994) Non-phosphorylating GAPDH of plants is a member of the aldehyde dehydrogenase superfamily with no sequence homology to phosphorylating GAPDH. *J. Mol. Biol.* **237**, 165-171.

Halliwel, B. (1984) "Chloroplast Metabolism". Clarendon Press, Oxford.

Harper-Jones, K., Lindahl, R., Baker, D.C. y Timkovich, R. (1987) Hydride transfer stereospecificity of rat liver aldehyde dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **262**, 10911-10913.

Harris, J.I. y Waters, M. (1976) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase "Oxidation-reduction". En "The Enzymes" (3<sup>a</sup> ed.), vol. **XIII**, pp. 1-50. (Boyer, P.D., ed.). Academic Press, Nueva York.

Heldt, H.W. (1976) Transport in Plants. En "Encyclopedia of Plant Physiology" vol **3**, pp. 137-143. (Stocking, C.R. y Heber, U., eds.). Springer-Verlag, Berlín y Nueva York.

Heldt, H.W., Werdan, K., Milovancev, M. y Geller, G. (1973) Alkalinization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space. *Biochim. Biophys. Acta.* **314**, 224-241.

Hensel, R., Lauman, S., Lang, J., Newman, H. y Lotspeich, F. (1987) Characterization of two D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the extreme thermophilic archaeobacterium *Thermoproteus tenax*. *Eur. J. Biochem.* **170**, 325-333.

Hensel, R., Zwickel, P., Fabry, S., Lang, J. y Palm, P. (1989) Sequence comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the three urkingdoms: evolutionary implications. *Can. J. Microbiol.* **35**, 81-85.

Hoagland, D. R. and Snyder, W. C. (1933) Nutrition of the strawberry plant under controlled conditions. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci **30**, 288-294.

Hood, W. y Carr, N.G. (1969) Association of NAD and NADP linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. Planta **86**, 250-258.

Hudock, G.A. y Fuller, R.C. (1965) Control of triosephosphate dehydrogenase in photosynthesis. Plant Physiol. **40**, 1205-1211.

Hutner, S.H., Zahals, A.C., Aaranson, S. y Smillie, R.M. (1967) Resemblances between chloroplasts and mitochondria inferred from flagelates inhibited with the carcinogens 4-nitroquinoline N-oxide. En "Biochemistry of Chloroplasts", vol. **2** pp. 703-720. (Goodwin T.W., ed.), Academic Press, Nueva York.

Iglesias, A.A., Serrano, A., Guerrero, M.G. y Losada, M. (1987) Purification and properties of NADP-dependent non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochim. Biophys. Acta **925**, 1-10.

Iglesias, A. y Losada, M. (1988) Purification and kinetic and structural properties of spinach leaf NADP-dependent nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. **260**, 830-840.

Jacob, J.L. y D'Auzac, J. (1972) The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase du latex d'*Hebea brasiliensis*. Eur. J. Biochem. **31**, 255-265.

Janssen, I., Mucke, H., Loffelhardt, W. y Bohnert, H.J. (1978) The central part of the cyanobacterial rDNA unit of *Cyanophora paradoxa*: sequence comparison with chloroplasts and cyanobacteria. *Plant Mol. Biol.* **9**, 479-484.

John, P.C.L., Thurston, C.F. y Syrett, P.J. (1970) Disappearance of isocitrate lyase enzyme from cells of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochem. J.* **119**, 913-919.

Kelly, G.J. y Gibbs, M. (1973) Nonreversible D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of plants tissues. *Plant Physiol.* **52**, 111-118.

Kersanach, R., Brinkmann, H., Liaud, M. F., Zhang, D.X., Martin, W. y Cerff, R. (1994) Five identical intron positions in ancient duplicated genes of eubacterial origin. *Nature* **367**, 387-389.

Kochert, G. (1978) Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. En "Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods" pp. 95-97. (Hellebust, Y.A. y Graigie, J.S., eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

Krause, G.H. y Heber, U. (1976) Energetics of intact chloroplasts. En "The Intact Chloroplast" pp. 172-214. (Barber, J., ed.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Kuwabara, T. y Murata, N. (1982) Inactivation of photosynthetic oxygen evolution and concomitant release of three polypeptides in the photosystem II particles of spinach chloroplast. *Plant and Cell Physiol.* **23**, 533-539.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 4668-4673.

Latzko, E. y Kelly, G.J. (1979) Enzymes of the reductive pentose phosphate cycle. En "Encyclopedia of Plant Physiology", New Series, vol. 6 pp. 239-250. (Gibbs, M. y Latzko, E., eds.). Springer Verlag, Berlín.

Layne, E. (1957) Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Meth. Enzymol. 3, 447-454.

Levy, L.M. y Betts, G.F. (1989) Stereospecificity of C4 nicotinamide hydrogen transfer of the NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 997, 331-333.

Liaud, M.F., Zhang, D.X. y Cerff, R. (1990). Differential intron loss and endosymbiotic transfer of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes to the nucleous. Proc. Nat. Acad. Soc. U.S.A. 87, 8918-8922.

Losada, M. (1992 a) The double function of oxygen in bioenergetics. Bioelectrochem. Bioenerg. 28, 31-42

Losada, M. (1992 b) Sequential energy transduction in photosynthesis. En "Trends in Photosynthesis Research" pp. 87-102. (Barber, J., Guerrero, M.G. y Medrano, M., eds.) , Intercept, Andover.

Losada, M. y Arnon, D.I. (1964). Enzyme Systems in Photosynthesis. En "Modern Methods of Plant Analysis", vol 7, Springer Verlag, Berlín.

Losada, M., Guerrero, M.G., De la Rosa, M.A., Serrano, A., Hervás, M. y Ortega, J.M. (1990) Sequential transduction of light into redox and acid-base energy in photosynthesis. Bioelectrochem. Bioenerg. 23, 105-128.

Loiseaux, S. (1976). Ultrastructural modifications of plastids after action of cloramphenicol, lincomycin and rifampicin. *Physiol. Veg.* **14**, 1-10.

Mackinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **140**, 315-322.

Manzano, C. (1977). La reducción fotosintética del nitrato en el alga verde-azulada *Anacystis nidulans*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Margalef, R. (1974) "Ecología". Omega, Barcelona.

Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L. and Tolbert, N.E. (1987) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **87**, 206-210.

Martin, W., Brinkmann, H., Savona, C. y Cerff, R. (1993). Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: Eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **90**, 8692-8696.

Martinez, P., Martin, W. y Cerff, R. (1989). Structure evolution and anaerobic regulation of nuclear gene encoding cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from maize. *J. Mol. Biol.* **208**, 551-565.

McGrowan, R.E. y Gibbs, M. (1978) Comparative enzymology of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Pisum sativum*. *Plant Physiol.* **53**, 312-319.

Michels, S., Scargliarini, S., Della Seta, F., Carles, C., Riva, M., Trost, P. y Branlant, G. (1994) Arguments against a close relationship between non-phosphorylating and phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *FEBS Lett.* **339**, 97-100.

Morton, R.A. (1975) "Biochemical Spectroscopy", vol. 1, Adam Hilger, Londres.

Mukund, S. y Adams, W.W. (1995) Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase, a novel tungsten-containing enzyme with a potencial glycolytic role in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. J. Biol. Chem. **270**, 8389-8392.

Muñoz-Delgado, E., Gómez-Fernandez, J.C., Lopez Mayorga, O., Lozano, J.A. y Vidal, J. (1983) An ultrasensitive electrometric system of measure membrane-bound aceylcholinesterase activity. Anal. Biochem. **133**, 302-306.

Murdock, A.L. y Koeppe, O.J. (1964) The content and action of diphosphopyridine nucleotide in triosephosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem. **239**, 1983-1988.

Nomenclature Committee of IUBMB (1992) "Enzyme Nomenclature" pp.65-66. (Weeb, E.C., ed.). Academic Press, San Diego.

O'Brien, M.J., Woodrow, S., Easterby, J.S. and Powls, R. (1979). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Scenedesmus obliquus*: promotion of NADPH-dependent activity and antagonisation by NAD. Arch. Microbiol. **122**, 313-319.

Pharmacia Fine Chemicals (1980) Chromatofocusing, Uppsala.

Preiss, J. y Kosuge, T. (1970). Regulation of enzyme activity in photosynthetic systems. Annu. Rev. Plant Physiol. **21**, 433-466.

Pupillo, P. (1972) The specificity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in green plants, *Euglena* and *Ochromonas*. Phytochemistry **11**, 153-161.

Pupillo, P. y Picardi, G. (1973) The effect of NADP on the subunit structure and activity of spinach chloroplasts glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. Arch. Biochem. Biophys. **154**, 324-331.

Pupillo, P. y Faggiani, R. (1979) Subunit structure of three glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases of some flowering plants. Arch. Biochem. Biophys. **194**, 581-592

Racker, E. (1965) "Mechanisms in Bioenergetics". Academic Press, Nueva York.

Racker, E. y Krinsky, I. (1952) The mechanisms of oxidation of aldehydes by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem. **198**, 731-743.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Hermann, M. y Stainer, R.Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. **111**, 1-61.

Rippka, R. (1988) Recognition and identification of cyanobacteria. Meth. Enzymol. **167**, 28-67.

Robertson, E.F., Dannelly, H.K., Malloy, P.J. y Reeves, H.C. (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. Anal. Biochem. **167**, 290-294.

Robinson, J.M. y Stocking, C.R. (1968) Oxygen evolution and the permeability of the outer envelope of isolated whole chloroplasts. Plant Physiol **43**, 1597-1604.

Rodriguez-López, M. (1965) Morphological and structural changes produced in *Chlorella pyrenoidosa* by assimilable sugars. Arch. Mikrobiol. **52**, 319-324.

Rosemberg, L.L. y Arnon, D.I. (1955) The preparation and properties of a new glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from photosynthetic tissues. *J. Biol. Chem.* **217**, 361-371.

Rossmann, M.G., Liljas, A., Brändén, C.I. y Banaszak, I.J. (1975). Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. En "The Enzymes" 3rd ed., vol. **11**, pp. 62-102. (Boyer, P.D., ed.) Academic Press, Nueva York.

Rumpho, M.E., Edwards, G.E. y Loescher (1983) A pathway for photosynthetic carbon flow to mannitol in celery leaves. *Plant. Physiol* **73**, 869-873.

Russell, D.A. y Sachs, M.M. (1989) Differential expression and sequence analysis of the maize glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family. *The Plant Cell* vol **1**, 793-803.

Rychter, M.A. y Randall, D. (1994) The effect of phosphate deficiency on carbohydrate metabolism in bean roots. *Physiol. Plant.* **91**, 383-388.

Sager, R. y Granick, S., (1953). Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **56**, 831-838.

Sandmann, G., Reck, H., Kessler, E. y Böger, P. (1983) Distribution of plastocyanin and soluble plastidic cytochrome c in various classes of algae. *Arch. Microbiol.* **134**, 23-27.

Scopes, R. (1982) "Protein purification. Principles and Methods". Springer Verlag, Nueva York.

Schlösser, U.G. (1982) Sammlung von Algenkulturen. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **95**, 181-276.

Serrano, A. y Löffelhardt, W. (1994) Identification of two different glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (phosphorylating) in the photosynthetic protist *Cyanophora paradoxa*. Arch. Microbiol. 162, 14-19.

Servaites, J.C., Geiger D.R., Tucci, M.A. y Fondy, D.R. (1983) Leaf carbon metabolism and metabolite levels during a period of sinusoidal light. Plant Physiol. 89, 403-408.

Sigma Química (1990). Catálogo de reactivos químicos y bioquímicos, p. 533.

Shih, M.C. y Goodman, H. (1988) Differential light regulated expression of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Nicotiana tabacum*. EMBO J. 7, 893-898.

Shochat, S., Owens, G.C., Hubert, P. y Ohad, I. (1982) The cichlophenildimethyl-urea-binding site in thylakoids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Role of photosystem II reaction center and phosphorylation of the 32-35 kilodaltons polypeptide in the formation of the high-affinity binding site. Biochim. Biophys. Acta 681, 21-31.

Skarzynski, T., Moody, P.C.E. y Wonacott, A.J. (1987) Structure and holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1-8 Å resolution. J. Mol. Biol. 193, 171-187.

Slaughter, J.C. y Davies, D.D. (1968) The isolation and characterization of 3-phosphoglycerate dehydrogenase from pea. Biochem. J. 109, 743-748.

Smillie, R.M. y Fuller, R.C. (1960) Further observations on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in plants and photosynthetic bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 368-372.

Smillie, M. Bishop, D.G., Graham, D., Grieve, A.M., Raison, J.K. y Reger, B.J. (1971). Determination of the sites of synthesis of proteins and lipids of the chloroplast using chloramphenicol and cycloheximide. En "Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts". pp. 422-433. North-Holland, Amsterdam.

Solar Energy Research Institute (SERI) 1986 *Phaeodactylum tricornutum*, En "Microalgae Culture Collection 1985-1986", SERI, pp. 71-75.

Speranza, M.I. y Gozzer, C. (1978) Purification and properties of NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **522**, 32-42.

Staehelin, L.A. (1986) Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. En "Encyclopedia of Plant Physiology", New Series vol. **19**, pp. 1-84. (Staehelin L.A. y Arntzen C.J., eds.). Springer Verlag, Berlin.

Strayer, L. (1990) "Bioquímica". pp 809-811. Reverté S.A. Barcelona.

Sueoka, N., Chiang, K.S. y Kates, J.R. (1967) Deoxyribonucleic acid and replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *J. Mol. Biol.* **25**, 47-66.

Takeda, W.A., Okamoto, T. y Hirayama, O. (1994) Regulation mechanism of thiol enzymes involved in CO<sub>2</sub> fixation in algae. *Plant Cell Physiol.* **35** (suppl.), s108.

Theiss-Seuberling, H.B. (1984) Purification and immunochemical characterization of NADP-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of *Euglena gracilis*. *Plant Cell Physiol.* **25**, 601-609.

Tipton, K.F. (1992) Principles of enzyme assay and kinetic studies. En "Enzyme Assays: A Practical Approach" pp. 1-58. (Eisenthal, R. y Danson, M.J., eds.). IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Trentham, D.R. (1968) Aspects of the chemistry of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem. J.* **109**, 603-612.

Trentham, D.R. (1971) Reactions of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase facilitated by oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochem. J.* **122**, 59-69.

Udvardy, J., Balegh, A. y Farkas, G.L, (1982) Modulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Anacystis nidulans* by glutathione. *Arch. Microbiol.* **133**, 2-5.

Vacchi, C., Piccari, G.G. y Pupillo, P. (1973) Characterization of NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Euglena gracilis*. *Z. Pflanzenphysiol.* **69**, 351-358.

Van Ophem, P.W., Van Beeumen, J. y Duine, A.J. (1993) Nicotinoprotein (NAD(P)-containing) alcohol/aldehyde oxidoreductases. Purification and characterization of a novel type from *amycolates sis methanolica*. *Eur. J. Biochem.* **212**, 819-826.

Wasmann, C.C., Löffelhardt, W. y Bohnert, H.J. (1987) Cyanelles: organization and molecular biology. En *The Cyanobacteria* pp. 303-324. (Fray, P. y Van Baalen, C., eds.), Elsevier, Amsterdam.

Weber, K. y Osborn, M. (1975) Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. En "The Proteins" vol 1, pp. 179-221. (Neurath H., Hill, R.L. y Boeder, C.L., eds.) Academic Press. Nueva York.

Whatley, F.R. y Losada, M. (1964). The photochemical reactions of photosynthesis. En "Photophysiology" (Giese, A.C. ed.), vol. 1, Academic Press, Nueva York .

Whittaker, M. (1984) Acetyl-cholinesterase. En "Methods of Enzymatic Analysis" vol. 4, pp. 52-57. (Bergmeyer, H.U., ed.). Verlag Chemie, Weinheim.

Wiessner, W. y French, C.S. (1970) The forms of mature chlorophyll in *Chlamydomonas stellata* and their changes during adaptation from photo-heterotrophic to autotrophic growth. *Planta* 94, 78-90.

Wiessner, W. (1979) Photoassimilation of organic compounds. En "Encyclopedia of Plant Physiology", New Series, vol. 6 pp. 181-189. (Gibbs M. y Latzko E., eds.), Springer-Verlag, Berlín.

Yadav, P.K. y Mohanty P. (1984) Effect of 2-deoxy D-glucose on growth, chlorophyll synthesis and electron transport activities of the cyanobacterium *Synechococcus cedrorum*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 179, 45-53.

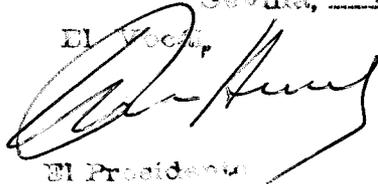
Yonushot, G.R., Orthwerth, B.J. y Koeppe, O.J. (1970). Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate requiring glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach leaves. *J. Biol. Chem.* **245**, 4193-4198.

Ziegler, H. y Ziegler, I. (1965). The influence of light on NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Planta* **65**, 369-380.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de Dña M<sup>te</sup> Isabel Mateos Matos titulada La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial de las excariotas fitoquímicas: distribución, regulación y función fisiológica acordó otorgarle la calificación de APTO CUM LAUDE POR UNANIMIDAD

Sevilla, 2 de Noviembre 1995

El Vocal,  


El Presidente



El Vocal,  


El Secretario,



El Vocal,  


El Doctorado,

