

R. 14070

TD/411



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA VEGETAL Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

**METABOLISMO DEL AZUFRE INORGÁNICO EN LA MICROALGA  
EUCARIÓTICA *Chlamydomonas reinhardtii***

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas  
por el Licenciado

José Luis Prieto Rodríguez

Directores

Dr. José María Vega Piqueres

Catedrático de Bioquímica y  
Biología Molecular

Dr. José Román Pérez Castiñeira

Investigador contratado C.S.I.C.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARÍA GENERAL

Comunicación de la tesis Doctoral  
n.º 186 número 173 del libro

caja nº 9-10-96  
Sevilla, a 9 de Octubre de 1996

Alena Raffill

UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

Depositado en Dpto. Bioquímica Vegetal y Biología Molecular  
Facultad de Biología

en la Universidad desde el día 11-10-96.

Fecha 29-10-96

Sevilla, 20 de Noviembre de 1996

EL DIRECTOR DE Dpto de Bioquímica Vegetal y  
Biología Molecular

Alena Raffill

*A Mammen*

## **Agradecimientos**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, y dirigida por el Dr. José M. Vega Piqueres, a quien agradezco el haber aceptado incluirme en su grupo de investigación, así como su constante dedicación para el desarrollo de este trabajo, y el Dr. José Román Pérez Castiñeira, a quien agradezco su colaboración en la escritura de esta tesis.

Por distintos motivos y avatares la realización de esta tesis ha pasado por una serie de etapas, de modo que muchas personas han contribuido, a veces de muy diferentes maneras, a que este trabajo sea una realidad. Desde aquí quiero agradecerles a todos sus aportaciones, tanto profesionales como personales, porque todas ellas han enriquecido mi formación.

Tanto a la Junta de Andalucía, (Grupo de Investigación número 3213), como a la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) (proyecto PB93-0735) deseo agradecerles el apoyo económico recibido para la realización de este trabajo.

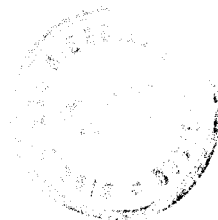


**ABREVIATURAS**

Abs	Absorbancia
ADNc	ADN complementario
ADP	Adenosín-5'-difosfato
AMP	Adenosín-5'-monofosfato
APS	Adenosín-5'-fosfosulfato
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
Cys	Cisteína
CHES	Ácido 2-(N-ciclohexilamino)-etanosulfónico
Chl	Clorofila
cpm	cuentas por minuto
DEAE	Dietilaminoetil
DOC	Deoxicolato sódico
DMS	Dimetilsulfuro
DTE	Ditioeritritol (eritro-2,3-hidroxi-1,4-ditiolbutano)
DTT	Ditiotreitol (treo-2,3-hidroxi-1,4-ditiolbutano)
$\epsilon_0$	Coefficiente de extinción
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
$\phi$	Diámetro interno
FAD	Flavín adenín dinucleótido (forma oxidada)
Fd	Ferredoxina
FMN	Flavín adenín mononucleótido (forma oxidada)
$g$	Aceleración de la gravedad
GEE	Glicina etil éster
GSH	Glutación ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina)
GTP	Guanosín-5'-trifosfato
IAA	Iodoacetamida
Met	Metionina
MMTS	Metilmetanotiosulfonato
NAD(P)H	$\beta$ -nicotinamida adenín dinucleótido (fosfato)
OAS	O-acetil-L-serina
OASS	O-acetil-L-serina sulfhidrilasa
PAPS	3'-fosfoadenosín-5'-fosfosulfato

<i>p</i> HMB	<i>para</i> -Hidroxi-mercuri-benzoato
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
RDN	Rodanasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SiR	Sulfito reductasa
SiRHP	Fracción de hemoproteína de la NADPH-sulfito reductasa
SiRFP	Fracción de flavoproteína de la NADPH-sulfito reductasa
TCA	Ácido Tricloroacético
TNBS	Ácido Trinitrobencensulfónico
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TSR	Tiosulfato reductasa
U	Unidad de actividad enzimática

# ÍNDICE



<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>19</b>
<b>1. Ciclos biogeoquímico y biológico del azufre</b>	<b>19</b>
<b>2. Ciclo no asimilatorio del azufre (Sulfuretum)</b>	<b>24</b>
2.1. Reducción de compuestos azufrados	24
2.2. Oxidación de compuestos azufrados	25
<b>3. Asimilación de sulfato</b>	<b>28</b>
3.1. Transporte de sulfato	29
3.2. Activación de sulfato	30
3.3. Reducción del sulfato activado (+6) a sulfito (+4)	32
<i>Reducción del APS</i>	32
<i>Reducción del PAPS</i>	34
3.4. Reducción de sulfito a sulfuro: tiosulfonato reductasa y sulfito reductasas (SiR)	35
<i>NADPH-SiR</i>	36
<i>Ferredoxina-SiR</i>	37
3.5. Incorporación a esqueletos carbonados	37
<b>4. Bioquímica del tiosulfato en los seres vivos</b>	<b>43</b>
4.1. El tiosulfato en el metabolismo no asimilatorio	44
4.2. El tiosulfato en la reducción asimilatoria	46
4.3. La actividad tiosulfato:aceptor sulfotransferasa: el "pool" de sulfanos	47
4.4. La actividad rodaneso o rodanasa	49
4.5. La actividad tiosulfato reductasa	51
4.6. Función fisiológica de las actividades rodanasa y tiosulfato reductasa	52
<b>5. Biología Molecular del metabolismo de azufre</b>	<b>55</b>
5.1. Estudios en <i>E. coli</i>	55
5.2. La asimilación de sulfato en <i>S. cerevisiae</i>	58
5.3. La genética de la asimilación de sulfato en otros organismos	60
<b>6. Objetivos</b>	<b>60</b>

---

<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>63</b>
1. Organismo y condiciones de cultivo	63
2. Consumo de sulfato por <i>C. reinhardtii</i>	65
3. Permeabilización de células de <i>C. reinhardtii</i> y obtención de extractos crudos	66
3.1. Rotura por congelación-descongelación en N <sub>2</sub> líquido	66
3.2. Rotura por sonicación	66
4. Determinaciones analíticas	67
4.1. L-Cisteína	67
4.2. Clorofila	67
4.3. Proteína	67
4.4. Sulfito	68
4.5. Sulfuro	70
5. Actividades enzimáticas	71
5.1. Tiosulfato reductasa	71
5.2. Rodanasa	72
5.3. O-acetil-L-serina sulfhidrilasa	72
6. Concentración de proteínas	73
7. Electroforesis en geles de poliacrilamida	73
7.1. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida	75
7.2. Tinción de actividades TSR y RDN	75
8. Diálisis	76
9. Reactivos	76
10. Aparatos	78
<b>III. RESULTADOS</b>	<b>81</b>
1. Consumo de sulfato por células de <i>C. reinhardtii</i>	81
1.1. Caracterización del consumo	81
1.2. Estudios cinéticos	82
1.3. Regulación del consumo	83



<b>2. Estudio de las actividades tiosulfato reductasa y rodanasa de <i>C. reinhardtii</i></b>	<b>86</b>
2.1. Caracterización de las actividades TSR y RDN	86
2.2. Purificación de las actividades TSR y RDN	92
<i>Tratamiento con sulfato de protamina</i>	92
<i>Cromatografía en DEAE-sefacel</i>	93
<i>Cromatografía en Fenil-sefarosa</i>	93
<i>Tablas de purificación</i>	95
2.3. Propiedades cinéticas de la DTE-TSR	97
<i>Efecto del pH</i>	97
<i>Efecto de la temperatura</i>	98
<i>Determinación de los valores de <math>K_m</math> para los distintos sustratos de la actividad DTE-TSR</i>	100
<i>Efecto de inhibidores sobre la actividad DTE-TSR</i>	104
2.4. Propiedades cinéticas de la actividad RDN	105
<i>Efecto del pH</i>	105
<i>Efecto de la temperatura</i>	105
<i>Determinación de los valores de <math>K_m</math> para los distintos sustratos de la actividad RDN</i>	108
<i>Efecto de inhibidores sobre la actividad rodanasa</i>	109
<b>3. Separación y caracterización de tres isoenzimas con actividad O-acetil-L-serina-sulfhidrilasa de <i>C. reinhardtii</i></b>	<b>111</b>
3.1. Purificación de las isoenzimas con actividad OASS	111
<i>Tratamiento con sulfato de protamina</i>	111
<i>Cromatografía en DEAE-sefacel</i>	112
<i>Cromatografía en Fenil-sefarosa para la preparación OASS<sub>1</sub></i>	113
<i>Cromatografía en Fenil-sefarosa para la preparación OASS<sub>2,3</sub></i>	114
<i>Tabla de purificación</i>	117
3.2. Propiedades cinéticas de las isoenzimas	117
<i>Efecto del pH</i>	117
<i>Efecto de la temperatura</i>	119

---

<i>Determinación de los valores de <math>K_m</math> para los sustratos de la actividad OASS</i>	121
<i>Inhibición de la actividad OASS</i>	124
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	<b>127</b>
1. Consumo de sulfato	127
2. Actividades tiosulfato reductasa y rodanasa	132
3. Actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa	138
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>143</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>145</b>

## Índice de figuras y tablas

### Figuras

Fig. 1.	Ciclo biogeoquímico del azufre	20
Fig. 2.	Ciclo del azufre en la Biosfera	24
Fig. 3.	Asimilación de sulfato por los seres vivos	29
Fig. 4.	Reducción asimilatoria de sulfato vía APS	41
Fig. 5.	Reducción asimilatoria de sulfato vía PAPS	42
Fig. 6.	Ciclo del tiosulfato en animales	55
Fig. 7.	Alga verde unicelular <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	63
Fig. 8.	Espectro de absorción del complejo resultante en la determinación de sulfito	69
Fig. 9.	Calibración tipo para la determinación de sulfito	70
Fig. 10.	Consumo de sulfato por células de <i>C. reinhardtii</i> . Efecto de la luz	81
Fig. 11.	Consumo de sulfato por células de <i>C. reinhardtii</i> . Estudios cinéticos	82
Fig. 12.	Efecto del pH del medio de cultivo sobre el consumo de sulfato por <i>C. reinhardtii</i>	83



---

Fig. 13. Consumo de sulfato por células de <i>C. reinhardtii</i> sometidas previamente a carencia de azufre	84
Fig. 14. Inhibición por tiosulfato del consumo de sulfato por células de <i>C. reinhardtii</i>	85
Fig. 15. Efecto de diferentes tioles sobre la actividad TSR de <i>C. reinhardtii</i>	87
Fig. 16. Efecto del DTT en el tampón de extracción sobre la actividad TSR de <i>C. reinhardtii</i>	91
Fig. 17. Efecto de la protamina en el extracto sobre la actividad tiosulfato reductasa de <i>C. reinhardtii</i>	92
Fig. 18. Cromatografía en DEAE-sefacel de una preparación enzimática de <i>C. reinhardtii</i>	94
Fig. 19. Cromatografía en Fenil-sefarosa de la tiosulfato reductasa y rodanasa de <i>C. reinhardtii</i>	95
Fig. 20. pH óptimo para el ensayo de actividad DTE-tiosulfato reductasa de <i>C. reinhardtii</i>	97
Fig. 21. Temperatura óptima para el ensayo de la actividad DTE-tiosulfato reductasa	99
Fig. 22. Inactivación térmica de la actividad DTE-tiosulfato reductasa de <i>C. reinhardtii</i>	100
Fig. 23. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de la $K_m$ para tiosulfato de la tiosulfato reductasa de <i>C. reinhardtii</i>	101

---

Fig. 24. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de la Km para DTE y glutatión de la tiosulfato reductasa de <i>C. reinhardtii</i>	102
Fig. 25. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de la Km para DTT y cisteína de la tiosulfato reductasa de <i>C. reinhardtii</i>	103
Fig. 26. Efecto del pH sobre la actividad rodanasa de <i>C. reinhardtii</i>	105
Fig. 27. Temperatura óptima de trabajo para la actividad rodanasa de <i>C. reinhardtii</i>	106
Fig. 28. Inactivación térmica de la actividad rodanasa de <i>C. reinhardtii</i>	107
Fig. 29. Representación de Lineweaver-Burk para determinar la Km para tiosulfato de la rodanasa de <i>C. reinhardtii</i>	108
Fig. 30. Representación de Lineweaver-Burk para determinar la Km para cianuro de la rodanasa de <i>C. reinhardtii</i>	109
Fig. 31. Efecto del DTE sobre la actividad rodanasa de <i>C. reinhardtii</i>	110
Fig. 32. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sefacel de una preparación de O-acetil-L-serina de <i>C. reinhardtii</i>	113
Fig. 33. Cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa de la preparación OASS <sub>1</sub> de <i>C. reinhardtii</i>	114

---

Fig. 34. Cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa de la preparación OASS <sub>2,3</sub> de <i>C. reinhardtii</i>	115
Fig. 35. Cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa de la preparación de OASS <sub>2</sub> obtenida en la cromatografía anterior	116
Fig. 36. Efecto del pH sobre la actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de <i>C. reinhardtii</i>	118
Fig. 37. Efecto de la temperatura sobre la actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de <i>C. reinhardtii</i>	119
Fig. 38. Representación de Arrhenius para la determinación de la energía de activación de las reacciones catalizadas por las isoenzimas OASS de <i>C. reinhardtii</i>	120
Fig. 39. Inactivación térmica de las isoenzimas con actividad OASS de <i>C. reinhardtii</i>	121
Fig. 40. Representación de Lineweaver-Burk para determinar los valores de Km para OAS de la O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de <i>C. reinhardtii</i>	122
Fig. 41. Representación de Lineweaver-Burk para determinar los valores de Km para sulfuro de la O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de <i>C. reinhardtii</i>	123
Fig. 42. Inhibición por O-acetil-L-serina de la actividad OASS de <i>C. reinhardtii</i>	124
Fig. 43. Inhibición por sulfuro de la actividad OASS de <i>C. reinhardtii</i>	125

---

Fig. 44. Inhibición por L-metionina de la actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de <i>C. reinhardtii</i>	126
Fig. 45. Mecanismos de transporte de sulfato al interior celular	131

### Tablas

Tabla 1. Compuestos de azufre de importante impacto ambiental que son producidos y/o degradados por microorganismos	21
Tabla 2. Características de la oxidación no asimilatoria de compuestos de azufre	26
Tabla 3. Genes involucrados en la biosíntesis de cisteína en <i>E. coli</i>	57
Tabla 4. Genes involucrados en la asimilación de azufre en <i>S. cerevisiae</i>	59
Tabla 5. Efecto de aniones divalentes sobre el consumo de sulfato por células de <i>C. reinhardtii</i>	85
Tabla 6. Caracterización de la actividad tiosulfato reductasa de <i>C. reinhardtii</i>	86
Tabla 7. Caracterización de la actividad rodanasa de <i>C. reinhardtii</i>	88
Tabla 8. Niveles de actividad tiosulfato reductasa y rodanasa en extractos crudos de <i>C. reinhardtii</i>	88

Tabla 9. Efecto del tampón de extracción sobre los niveles de actividad tiosulfato reductasa y rodanasa en extractos crudos de <i>C. reinhardtii</i>	89
Tabla 10. Efecto del tampón de extracción sobre los niveles de actividad tiosulfato reductasa y rodanasa en extractos crudos de <i>C. reinhardtii</i>	89
Tabla 11. Efecto del DTT sobre la estabilidad de la actividad tiosulfato reductasa en extractos crudos de <i>C. reinhardtii</i>	90
Tabla 12. Efecto del DTT sobre la estabilidad de la actividad rodanasa en extractos crudos de <i>C. reinhardtii</i>	90
Tabla 13. Tabla de purificación para la actividad DTE-tiosulfato reductasa de <i>C. reinhardtii</i>	96
Tabla 14. Tabla de purificación para la actividad GSH-tiosulfato reductasa de <i>C. reinhardtii</i>	96
Tabla 15. Tabla de purificación para la actividad rodanasa de <i>C. reinhardtii</i>	96
Tabla 16. Efecto de inhibidores sobre la actividad DTE-TSR en <i>C. reinhardtii</i>	104
Tabla 17. Efecto de inhibidores sobre la actividad RDN en <i>C. reinhardtii</i>	110
Tabla 18. Tabla de purificación para la actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de <i>C. reinhardtii</i>	117



# I. INTRODUCCIÓN

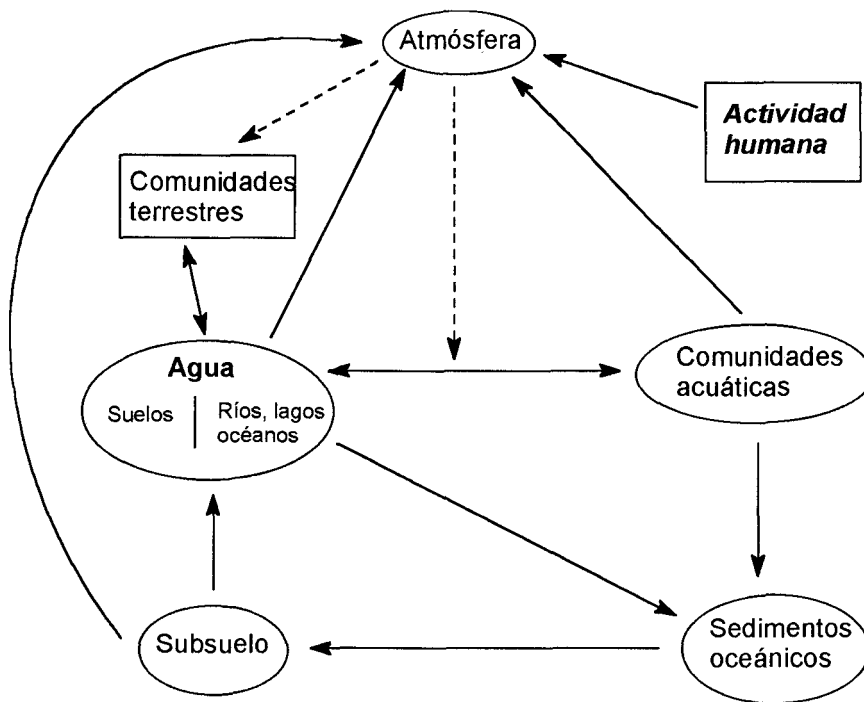
## 1. Ciclos biogeoquímico y biológico del azufre

El azufre es un elemento químico perteneciente al grupo del oxígeno en la Tabla Periódica. Es escaso tanto en la corteza terrestre (0,5 %) como en los seres vivos (< 2 % en peso seco). Sin embargo, la propiedad del azufre de presentarse en diversos estados de oxidación lo hace cualitativamente muy importante para los seres vivos; de hecho, constituye uno de los 27 elementos esenciales para éstos (Trüdinger y Loughlin, 1981). Por otro lado, el azufre es extremadamente importante para la sociedad industrializada, influyendo, bien de forma directa (la industria del ácido sulfúrico es básica en la civilización actual) o de forma indirecta (la quema de combustibles fósiles provoca emisiones de azufre a la atmósfera con importantes consecuencias) en nuestras vidas.

El azufre puede presentarse en la naturaleza en distintos estados de oxidación, desde -2 (sulfuros y tioles) hasta +6 (sulfatos), pasando por +2 (tiosulfatos), +4 (sulfitos) y 0 (formas alotrópicas del azufre elemental). Asimismo, aparece tanto en compuestos inorgánicos como orgánicos, mostrando una enorme ubicuidad química. La evolución cíclica de los compuestos azufrados mediante una serie de procesos físicos, químicos y biológicos configura el llamado *ciclo biogeoquímico del azufre* (Fig. 1).

El azufre presenta su máxima estabilidad en forma de sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) en las condiciones de presión y temperatura habituales en la Biosfera. Algunos seres vivos metabolizan el azufre reduciéndolo e incorporándolo a sus estructuras biológicas (metabolismo *asimilatorio* presente en algas, plantas y levaduras). Este azufre asimilado asciende por la cadena trófica a todos los seres vivos. Otros organismos, en cambio, utilizan los sulfatos como aceptores de electrones en la cadena respiratoria, excretando al medio ambiente

distintas formas de azufre más o menos reducido (sulfitos, azufre elemental y sulfuros). Este último constituye el llamado metabolismo *no asimilatorio* y suele aparecer en microorganismos anaerobios. Los organismos pueden también excretar compuestos azufrados como consecuencia de la degradación de sus propias estructuras. Es particularmente interesante y rica la capacidad de transformar compuestos de azufre por parte de los microorganismos (Tabla 1).



**Fig. 1. Ciclo biogeoquímico del azufre**

**Tabla 1. Compuestos de azufre de importante impacto ambiental que son producidos y/o degradados por microorganismos**

Compuesto	Fórmula	Observaciones
<i>Inorgánicos</i>		
Sulfuro de Hidrógeno	SH <sub>2</sub>	Volátil, importante intermediario
Sulfuros Metálicos	M <sub>2</sub> S MS MS <sub>2</sub>	Sólidos, donde M es Fe, Cu, Co, Mo, Ni, Zn, Ag
Anhídrido Sulfuroso	SO <sub>2</sub>	Volátil, procedencia industrial
Sulfato	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	
Sulfito	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	
Tiosulfato	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	
Azufre	S <sub>8</sub>	
Politionatos	S <sub>n</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup> , el más importante
<i>Orgánicos</i>		
Carbonilsulfuro	COS	Sulfuros orgánicos volátiles
Disulfuro de carbono	CS <sub>2</sub>	
Dimetil-sulfuro (DMS)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S	
Dimetil-disulfuro	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	
Metanotiol	CH <sub>3</sub> SH	
Cisteína	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> NS	Aminoácidos proteicos
Metionina	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> NS	
Tiofeno	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> S	Anillo heterocíclico
Butanotiol	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SH	Metabolismo no conocido



Las especies azufradas excretadas por los seres vivos al medio ambiente pueden ser sulfato directamente u otras especies más reducidas. Éstas se oxidan bien de forma natural por la acción del oxígeno del aire, o bien por la propia acción biológica dando de nuevo sulfato que vuelve a entrar en el ciclo. Por otro lado, el azufre asimilado por los seres vivos puede acumularse en los combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas natural), liberándose a la atmósfera a partir de éstos después de miles de años en el subsuelo.

El azufre también puede acceder a la Biosfera mediante la acción de los volcanes, que lanzan a la atmósfera gases sulfurosos provenientes del interior de la corteza terrestre. Dichos gases se oxidan en el aire y caen disueltos en el agua de lluvia como ácido sulfúrico, que rápidamente pasa a sulfato en el suelo provocando la acidez de los mismos.

Los procesos que configuraban el ciclo del azufre estaban perfectamente regulados hasta la aparición de la Revolución Industrial en el siglo XVIII, que daría lugar a un cambio radical en la actividad humana, así como en la actitud del hombre hacia el medio ambiente: la utilización masiva de combustibles fósiles por parte del hombre desde esa época ha dado lugar a la liberación de ingentes cantidades de gases tales como el  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{NO}_x$  y  $\text{SO}_2$ . Estos dos últimos son los principales contribuyentes de la llamada "lluvia ácida" que ha destruido cantidad ingente de vegetación, especialmente en los países del llamado Primer Mundo.

En plantas y algas la cantidad de azufre presente es 20 veces menor que la de nitrógeno y el sulfato que metabolizan es sólo el 0,1 % del carbono asimilado. Sin embargo, el azufre es un elemento esencial para los seres vivos, donde puede presentarse en varios estados de oxidación, entre los que podemos destacar:

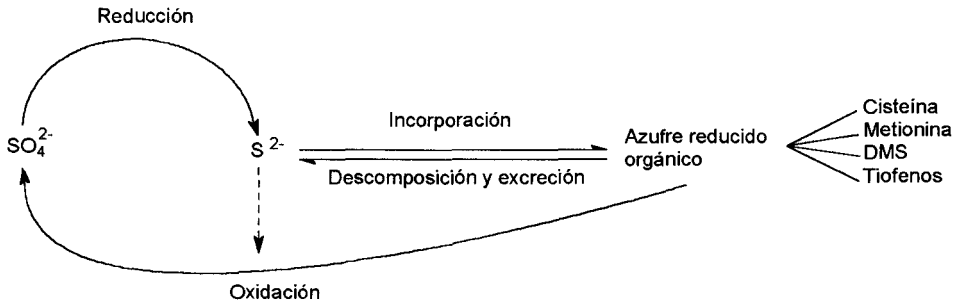
1. Sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ): formando ésteres con función estructural y de almacén de azufre.

2. Sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ): en los sulfolípidos de las membranas cloroplásticas.
3. Tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ): intermediario metabólico.
4. Sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ): en cisteína, metionina, coenzimas, vitaminas y agrupaciones sulfoféricas.

Todos los seres vivos pueden metabolizar compuestos azufrados en procesos anabólicos, catabólicos, o de excreción (Fig. 2). El sulfuro *asimilado* ligado a la Biosfera de la Tierra asciende a  $5,6 \times 10^9$  toneladas métricas, incluyendo el azufre en la materia orgánica muerta; sin embargo, la cantidad de azufre que está siendo constantemente oxidado y reducido por bacterias en el ciclo biogeoquímico, y que tiene lugar en suelos, sedimentos, superficies rocosas, océanos y ambientes acuáticos, es varios órdenes de magnitud mayor (Kellog *et al.*, 1972).

La razón por la cual los compuestos azufrados pueden ser utilizados por seres vivos para obtener energía, tanto en procesos oxidativos como reductivos, se debe precisamente a la amplia variedad de estados de oxidación que presenta el azufre y que da lugar a que algunos de sus compuestos sean excelentes donadores de electrones y otros excelentes aceptores.

### a) Ciclo asimilatorio



### b) Ciclo no asimilatorio

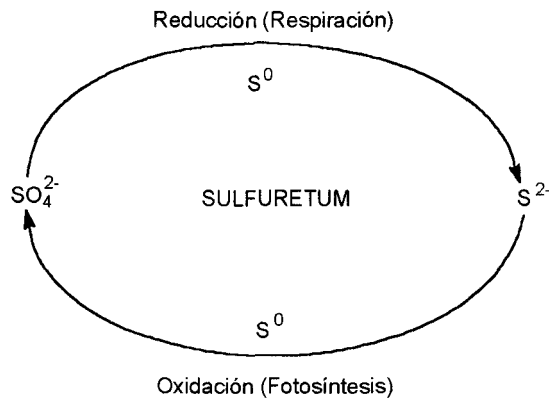


Fig. 2. Ciclo del azufre en la Biosfera

## 2. Ciclo no asimilatorio del azufre (Sulfuretum)

### 2.1. Reducción de compuestos azufrados

La reducción no asimilatoria de sulfato la realizan un amplio grupo de bacterias anaeróbicas estrictas, definidas por su capacidad de utilizar este ion como aceptor terminal de electrones, como son: *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas*, *Desulfobacter*, *Thermodesulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*,

*Desulfonema*, *Desulfobulbus*. Estas bacterias acoplan producción neta de ATP a la reducción de sulfato, y los electrones pueden provenir de hidrógeno o compuestos orgánicos. De hecho, estas bacterias, junto con las bacterias metanogénicas, son los consumidores finales de compuestos orgánicos más importantes en la cadena trófica anaeróbica en la naturaleza, especialmente en ambientes acuáticos (sedimentos oceánicos, lodos de estuarios, marismas, lagunas, aguas residuales, etc.) (Trüper, 1984). Las principales fuentes de carbono de estos organismos son ácidos grasos de hasta 18 átomos de carbono, también pueden consumir etanol y benzoato y algunas son autótrofas. Por otra parte, la capacidad de algunas de estas bacterias de oxidar  $H_2$  provoca despolarizaciones catódicas en las superficies de estructuras de hierro y acero sumergidas provocando corrosión con sus enormes consecuencias económicas (Peck y Lissolo, 1988).

Otras bacterias pueden efectuar la reducción del azufre elemental, en condiciones análogas, y son las del género *Desulfuromonas*, *Campylobacter* (algunos), *Chromatiacea* y *Chlorobiaceae* (en oscuridad), *Arqueobacterias* (algunas), y *Wollinella*.

Las rutas metabólicas reductivas del ciclo no asimilatorio del azufre son relativamente simples en el sentido de que el sulfuro de hidrógeno parece ser el único producto final de relevancia que excretan las células. Por el contrario, las rutas oxidativas son mucho más complejas y poco conocidas.

## **2.2. Oxidación de compuestos azufrados**

La oxidación no asimilatoria de especies de azufre se debe a la utilización de sulfuro y/o azufre como donadores de electrones en procesos diferentes: fotosíntesis y respiración. Según las características metabólicas se distinguen tres tipos principales de oxidación (Tabla 2) (para una revisión ver Jorgensen, 1988).

**Tabla 2. Características de la oxidación no asimilatoria de compuestos de azufre**

Metabolismo	Mecanismo	Microorganismos	
Fototrófico anaeróbico	<u>Donador de electrones:</u>	Sulfuro Azufre Tiosulfato Sulfito	Bacterias verdes ( <i>Chlorobiaceae</i> , <i>Chloroflexaceae</i> ) <i>Ectothiorhodospiraceae</i> Cianobacterias (algas verde-azuladas) Bacterias púrpuras ( <i>Rhodospirillaceae</i> , <i>Chromatiaceae</i> )
	<u>Aceptor de electrones:</u>	CO <sub>2</sub>	
	<u>Producto:</u>	Sulfato	
	<u>Fuente de carbono:</u>	CO <sub>2</sub> y/o compuestos orgánicos	
Quimiotrófico anaeróbico	<u>Donador de electrones:</u>	Sulfuro Azufre Tiosulfato Sulfito	<i>Thiobacillus denitrificans</i> <i>Thiomicrospira denitrificans</i>
	<u>Aceptor de electrones:</u>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> CO <sub>2</sub>	( <i>Rhodospirillaceae</i> , <i>Chromatiaceae</i> )
	<u>Producto:</u>	Sulfato	
	<u>Fuente de carbono:</u>	CO <sub>2</sub>	
Quimiotrófico aeróbico	<u>Donador de electrones:</u>	Sulfuro Azufre Tiosulfato Sulfito	<i>Thiobacillus</i> <i>Thiomicrospira</i> <i>Sulfolobus</i> <i>Thermotrix</i> <i>Paracoccus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Beggiatoa</i> <i>Thiotrix</i>
	<u>Aceptor de electrones:</u>	O <sub>2</sub>	<i>Thiospira</i> <i>Thioploca</i>
	<u>Producto:</u>	Sulfato	<i>Macromonas</i> <i>Achromatium</i> <i>Thiobacterium</i>
	<u>Fuente de carbono:</u>	CO <sub>2</sub> y/o comp. orgánicos	<i>Chromatiaceae</i> (algunas, oscuridad) Muchos heterótrofos



a) *Fotolitotrófica*. Realizada por bacterias fotosintéticas en ausencia de aire. Los electrones son transferidos a las bacterioclorofilas proveyendo así el proceso fotosintético. El uso de compuestos de azufre como donadores de electrones para fotosíntesis anoxigénica ha sido observado en diferentes grupos de eubacterias, como bacterias púrpuras (*Rhodospirillaceae* y *Chromatiaceae*) y verdes (*Chlorobiaceae*, *Chloroflexaceae*). Estas bacterias aparecen en multitud de ambientes, tales como lagos estratificados, lagunas costeras, fiordos, estuarios, lagos salados, marismas, aguas residuales, etc. Si bien algunas especies pueden utilizar un número limitado de compuestos carbonados, estos organismos son importantes fijadores de CO<sub>2</sub> en ambientes anóxicos.

Las *Chlorobiaceae* son organismos fotoautótrofos obligados, pueden usar tanto sulfuro como azufre elemental y puede observarse acumulación de gránulos de azufre en el exterior de la mayoría de ellos. Algunas cepas oxidan tiosulfato y politionatos. Las *Chromatiaceae* pueden dividirse en dos grupos de acuerdo con su capacidad de oxidar compuestos azufrados: unas usan sulfuro y azufre elemental como donadores de electrones y no disponen de reducción asimilatoria de sulfato, acumulan azufre cuando oxidan sulfuro a sulfato; otras oxidan tiosulfato y pueden reducir asimilatoriamente sulfato, acumulan azufre en la oxidación de tiosulfato. Las *Rhodospirillaceae* también se dividen en diversos grupos: unas sólo oxidan sulfuro a azufre, que se acumula; otras producen tiosulfato y politionatos como productos finales, y otras oxidan sulfuro a sulfato produciendo azufre como intermediario y también oxidan directamente tiosulfato a sulfato.

b) *Quimiolitotrófica*. Realizada por bacterias no fotosintéticas en medios tanto anaeróbicos como aeróbicos; en el primer caso, los electrones se ceden a un aceptor final que suele ser nitrato, y en el segundo el aceptor final es el oxígeno molecular. Puede ser:

- Anaeróbica. Sólo un pequeño número de especies bacterianas pueden utilizar compuestos de azufre reducido

como donadores de electrones de la cadena respiratoria. Estas especies son *Thiobacillus denitrificans* y *Thiomicrospira denitrificans* y son las únicas aparte de las bacterias fotosintéticas que pueden oxidar compuestos de azufre en medio anaeróbico.

- Aeróbica. Puede ser efectuada por una amplia variedad de microorganismos, tanto autótrofos (quimiosintéticos) como heterótrofos; algunas bacterias fotosintéticas pueden efectuar este tipo de oxidación incluso en la oscuridad (ver Tabla 2).

### 3. Asimilación de sulfato

Las plantas superiores, y muchos microorganismos que crecen con sulfato como única fuente de azufre, reducen éste hasta el nivel de sulfuro para la síntesis de cisteína, metionina, coenzimas, vitaminas y agrupaciones sulfo-férricas de proteínas. La secuencia de reacciones desde sulfato hasta sulfuro es lo que se denomina *reducción asimilatoria* de sulfato en contraposición con *la reducción disimilatoria o no asimilatoria*.

En organismos fotosintéticos la reducción asimilatoria de sulfato hasta sulfuro o tiol es un proceso controlado por la luz (Anderson, 1981) que está acoplado a la maquinaria fotosintética y que requiere ocho electrones y alrededor de 752 kJ/mol. Si se tiene en cuenta que la reducción de nitrato requiere alrededor de 376 kJ/mol y que la proporción N/S es de aproximadamente 20 en algas y plantas, resulta que el requerimiento energético para la asimilación de sulfato supone la décima parte del consumo energético requerido para la asimilación de nitrato.

En la reducción asimilatoria de sulfato pueden distinguirse varias etapas: transporte al interior celular, activación del sulfato, reducción hasta sulfuro e incorporación a esqueletos carbonados (Fig. 3).

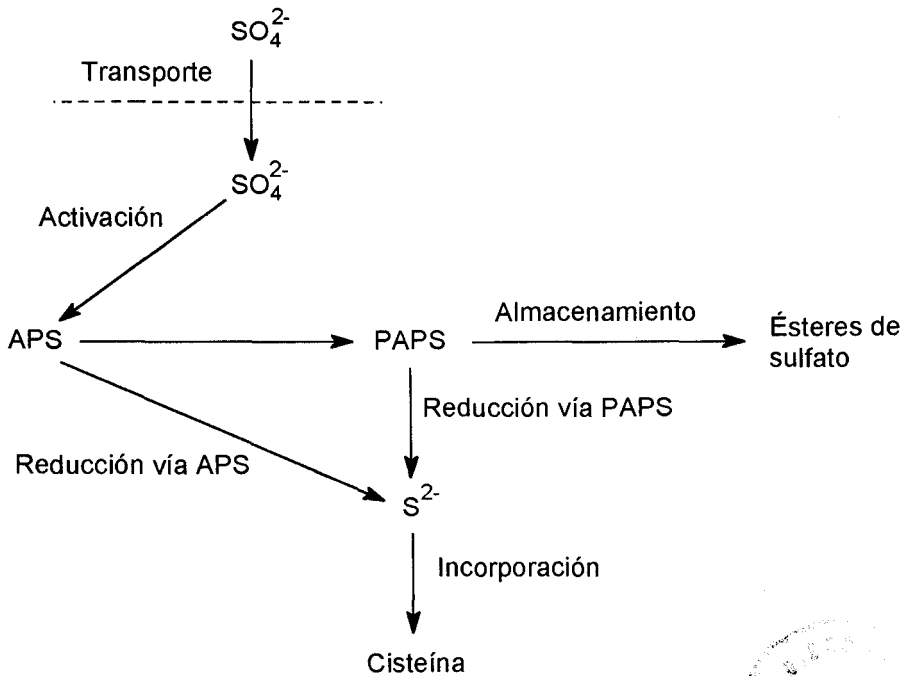


Fig. 3. Asimilación de sulfato por los seres vivos

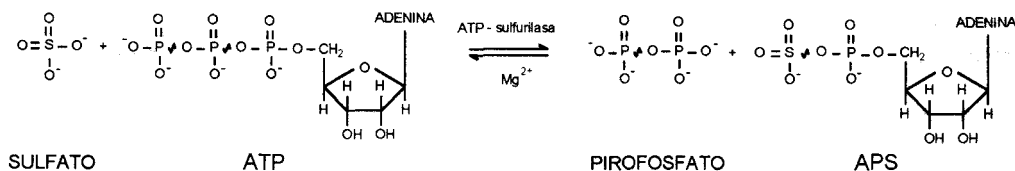
### 3.1. Transporte de sulfato

El transporte y consumo de sulfato ha sido estudiado en diferentes organismos desde procariotas a plantas superiores, si bien se tiene mayor información en microorganismos. Hay evidencias de la existencia de transporte activo de sulfato en microorganismos fotosintéticos, tales como cianobacterias (Utkilen *et al.*, 1976; Jeanjean y Broda, 1977; Menon y Varma, 1982), algas rojas (Millard y Evans, 1982), algas verdes (Biedlingmaier y Schmidt, 1989) y también en plantas superiores (Jones y Smith, 1981; Datko y Mudd, 1984; Cram, 1983). En todos los sistemas estudiados, el transporte de sulfato tiene características similares: es un proceso saturable,

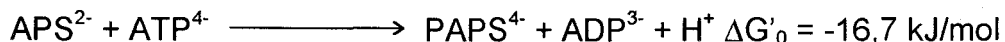
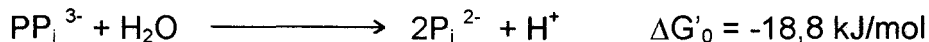
dependiente de energía y es inhibido por análogos de sulfato como  $\text{SeO}_4^{2-}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{WO}_4^{2-}$ ,  $\text{MoO}_4^{2-}$ , y algunas especies azufradas como  $\text{SO}_3^{2-}$ . Salvo excepciones, la cinética del transporte de sulfato se ha demostrado ser multifásica con dos o tres valores de  $K_m$ . Sin embargo, en algas eucarióticas estos estudios son escasos, y de aquí el interés por este punto.

### 3.2. Activación de sulfato

Análogamente a lo que ocurre en el metabolismo no asimilatorio, el primer paso en la reducción asimilatoria del sulfato es su activación mediante la utilización de ATP:



Esta reacción está catalizada por la ATP-sulfurylase (EC 2.7.7.4) y está fuertemente desplazada hacia la izquierda ( $\Delta G'_0 = +39,7 \text{ kJ/mol}$ ), por lo que se requiere la acción de una pirofosfatasa inorgánica que retire el  $\text{PP}_i$  del medio, así como de una nueva fosforilación del APS. De este modo, eliminando los productos de la reacción, el equilibrio se desplaza hacia la derecha.



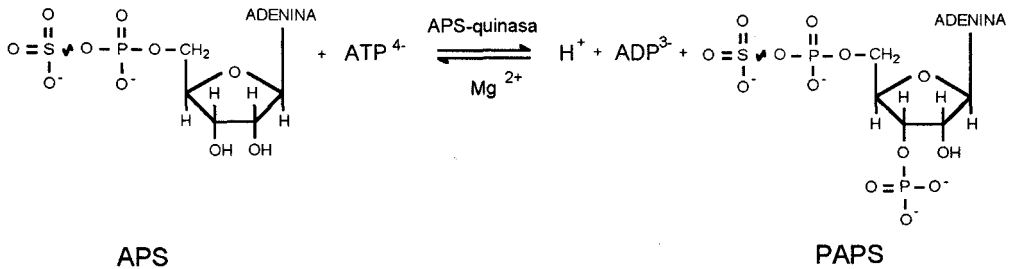
La importancia de la activación del sulfato para su posterior reducción radica en el hecho de que los agentes reductores fisiológicos tienen potenciales redox no suficientemente negativos como para poder reducir el sulfato. Así, por ejemplo, el par

NADP<sup>+</sup>/NADPH tiene un  $E'_0 = -0,32$  V y el par  $Fd_{ox}/Fd_{red}$   $-0,42$  V, mientras que el  $E'_0$  del par  $SO_4^{2-}/SO_3^{2-}$  es de  $-0,50$  V. Esto significa que la reducción de sulfato por NADPH sería un proceso endergónico; sin embargo el par  $APS^{2-}/SO_3^{2-}$  presenta un  $E'_0$  de  $-0,06$  V, por lo que la reducción de APS por NADPH o Fd es termodinámicamente favorable.

La ATP-sulfurilasa ha sido purificada a partir de varios organismos, incluyendo bacterias, hongos, levaduras y plantas superiores. De estas últimas pueden destacarse la de espinaca (Balharry y Nicholas, 1970), tabaco (Bergman *et al.*, 1980) y plantas C4 (Gerwick y Black, 1979; Gerwick *et al.*, 1980; Burnell, 1984). La actividad depende del pH y de  $Mg^{2+}$  u otros cationes divalentes. El  $Mg^{2+}$  se une al  $ATP^{4-}$  formando  $MgATP^{2-}$  que actúa como sustrato, siendo el ATP libre inhibidor competitivo (Leyh, 1993).

Se ha descrito que la ATP-sulfurilasa se encuentra regulada por represión-desrepresión según la disponibilidad de fuente de azufre (Reuveny y Filner, 1977). Por otro lado, el nivel de actividad aumenta en condiciones de carencia de fuente de azufre en células de tejidos, tanto verdes como no verdes, de plantas (Reuveny *et al.*, 1980; Passera y Ghisi, 1982; Zink, 1984). Se ha descrito también que el arseniato es un inhibidor competitivo de la enzima (Knowles, 1986). Finalmente, la enzima se inhibe por AMP y ADP, está localizada en el cloroplasto (Gerwick y Black, 1979; Burnell, 1984) y aparentemente muestra una regulación por cambios luz-oscuridad (Schwenn y Depka, 1977). También se ha sugerido que la formación de APS está energéticamente ligada a la hidrólisis de GTP mediante un mecanismo aún desconocido (Leyh, 1993).

Como ya hemos mencionado, el otro mecanismo utilizado por las células para desplazar la reacción de activación del sulfato hacia el APS consiste en fosforilar éste según la reacción:



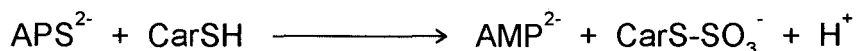
Esta reacción, también dependiente de cationes divalentes (Mg, Co y Mn), está catalizada por la APS-quinasa (EC 2.7.1.25), y está desplazada hacia la derecha, con  $\Delta G'_0 = -16,7$  kJ/mol. Esta actividad se ha identificado en bacterias (Satischandran y Markham, 1989; Schmidt, 1981), algas (Schwenn y Jender, 1981; Moller y Evans, 1976) y plantas superiores (Mercer y Thomas, 1969; Burnell y Anderson, 1973). La APS-quinasa de *Chlamydomonas reinhardtii* se activa por tioredoxina reducida (Schween y Schriek, 1984), lo que denota un cierto control por la luz.

### 3.3. Reducción del sulfato activado (+6) a sulfito (+4)

Tanto APS como PAPS pueden ser reducidos por las células; sin embargo, el PAPS puede acumularse en concentraciones del orden de milimolar en algunos organismos. Por tanto, no es sorprendente que muchos de éstos utilicen este compuesto como sustrato para la reducción de sulfato.

#### a) Reducción del APS

Las algas y plantas superiores disponen de una enzima llamada APS:tiol sulfotransferasa que puede catalizar la reducción del grupo sulfonato del APS hasta el nivel de sulfito en presencia de un transportador de naturaleza tiólica (CarSH), según la siguiente reacción:

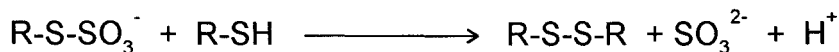


El glutatión puede servir como transportador *in vitro*; sin embargo parece poco probable que también lo sea *in vivo* (Tsang y Schiff, 1978; Schmidt y Jäger, 1992).

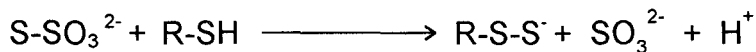
Se ha descrito que las algas eucarióticas y las cianobacterias pueden sintetizar PAPS (Tsang y Schiff, 1975; Schmidt y Christen, 1978); sin embargo no se ha demostrado que éste se encuentre directamente involucrado en el proceso de reducción. Se ha propuesto que el PAPS podría ser en estos organismos el punto inicial de la síntesis de ésteres de sulfato y sulfolípidos (Hoppe y Schwenn, 1981), ya que se ha descrito que los mutantes de *Chlorella* que no tienen actividad APS:tiol sulfotransferasa no pueden asimilar sulfato *in vivo* o reducirlo *in vitro* (Abrams y Schiff, 1973).

Los datos concernientes a las APS-sulfotransferasas han sido recogidos por Brunold (1990). Son específicas por APS frente a PAPS pero no muy específicas respecto al tiol (Schmidt, 1976a; 1976b; Tsang y Schiff, 1976). La APS-sulfotransferasa se reprime en condiciones de crecimiento con compuestos de azufre reducido, como cisteína o sulfuro (Brunold y Schmidt, 1976; 1978); sin embargo, la cisteína no afecta esta actividad en *Chlorella*, por lo que se ha sugerido que dicho aminoácido es sólo una señal secundaria (Schmidt, 1986).

A altas concentraciones de tioles o con ditioles puede desprenderse sulfito (Tsang y Schiff, 1976) mediante la reacción:



o bien

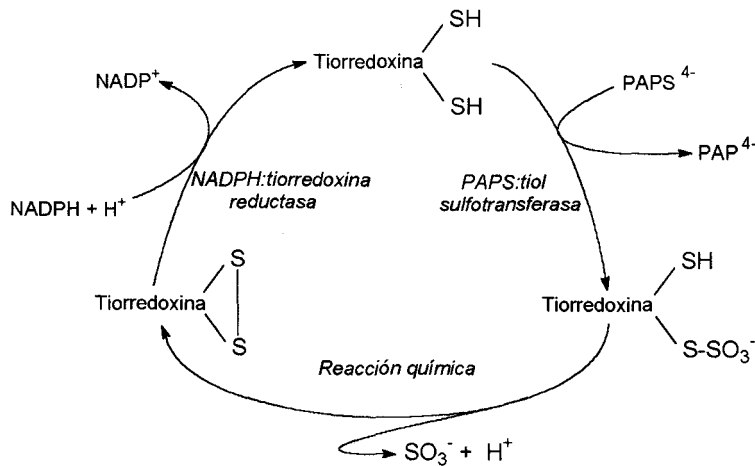


Ello explicaría la presencia de sulfito reductasa en la ruta (ver más adelante). Por otro lado, cuando el aceptor tiólico es el 2,3-dimercaptopropan-1-ol el producto de la reacción es tiosulfato (Tsang

y Schiff, 1973). Se ha propuesto que el tiosulfato podría ser el primer producto de la reducción de sulfato en *Chlamydomonas* y otras algas (Hodson y Schiff, 1971). Esta posibilidad implicaría la existencia de tiosulfato reductasas dependientes de tiorredoxina, que permitirían el aprovechamiento de los dos átomos de azufre del tiosulfato para su posterior asimilación.

### b) Reducción del PAPS

La presentan hongos, levaduras y bacterias. En estos organismos, el PAPS obtenido por la acción de la ATP-sulfurilasa y la APS-quinasa puede, además de ser utilizado para obtener ésteres de sulfato, ser reducido hasta sulfito mediante la utilización de NADPH como donador de electrones y a través de una serie de reacciones:



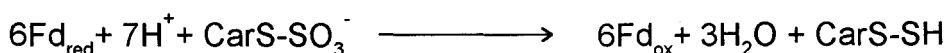
La reacción global sería:





### 3.4. Reducción de sulfito a sulfuro: tiosulfonato reductasa y sulfito reductasas (SiR)

En organismos fotosintéticos se ha propuesto que la reducción asimilatoria transcurre fundamentalmente por la vía de los compuestos de azufre ligados a transportador (Schmidt, 1982), mediante la actividad tiosulfonato reductasa, que cataliza la reacción:



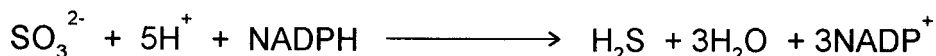
La enzima tiosulfonato reductasa se ha detectado en extractos de *Euglena* (Brunold y Schiff, 1976), espinaca y *Chlorella* (Schmidt *et al.*, 1974). Aunque se ha establecido que la tiosulfonato reductasa no puede reducir sulfito inorgánico, presenta ciertas semejanzas con la sulfito reductasa, lo cual permite pensar que ambas enzimas pueden estar bastante relacionadas.

Se ha visto que los mutantes de *Chlorella pyrenoidosa* que no disponen de actividad tiosulfonato reductasa, pero sí sulfito reductasa no pueden crecer con sulfato como única fuente de azufre y los extractos obtenidos de estos mutantes no pueden incorporar el átomo de azufre del APS a cisteína (Schmidt *et al.*, 1974). Sin embargo, la existencia en organismos fotosintéticos de enzimas tales como la ferredoxina-sulfito reductasa, la serina-acetil transferasa y la O-acetil-L-serina sulfhidrilasa, cuya conexión con esta vía no se ha aclarado totalmente, permite albergar dudas acerca del proceso que realmente tiene lugar.

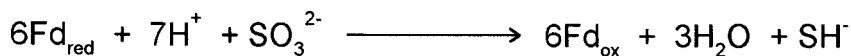
Se han identificado proteínas capaces de catalizar la reducción estequiométrica de sulfito a sulfuro, en presencia de donadores de electrones adecuados en diferentes organismos, tales como bacterias, hongos, algas y plantas superiores.

En este caso la reducción se produce sin liberación de intermediarios. Aparentemente las SiR de hongos y bacterias

aeróbicas (es decir, las de la ruta PAPS) utilizan NADPH como donador de electrones:



mientras que las SiR de organismos fotosintéticos (es decir las de la ruta APS), parecen utilizar ferredoxina como donador (Siegel, 1975; Peck y Lissolo, 1988):



En cualquier caso, todas las SiR pueden utilizar metilviológeno como donador de electrones *in vitro* (Peck y Lissolo, 1988).

Las sulfito reductasas se caracterizan por presentar un grupo prostético tipo hemo distinto de los otros grupos hemo encontrados en la naturaleza. Este grupo aparece únicamente en las nitrito reductasas, que también catalizan reducción con seis electrones, y se ha denominado "sirohemo". De hecho las SiR, excepto las de organismos fotosintéticos, pueden catalizar la reducción de nitrito a amonio. Parece ser que el grupo sirohemo es el sitio de interacción de la enzima con el sulfito (Vega *et al.*, 1975; Murphy y Siegel, 1973; Vega y Kamin, 1977). Las estructuras de las sulfito reductasas son diferentes según utilicen NADPH o ferredoxina como donador de electrones.

#### a) NADPH-SiR (EC 1.8.1.2)

La más estudiada de este grupo de SiR es la de *E. coli*, que es un oligómero formado por ocho flavoproteínas (SiRFP) de 66 kDa de peso molecular, cuatro de las cuales contienen una molécula de FAD y otras cuatro de FMN, y cuatro hemoproteínas (SiRHP) de 64 kDa, que contienen cada una un sirohemo (Siegel, 1975).

La SiRHP ha sido cristalizada y su estructura tridimensional determinada por difracción de rayos-X. Ello ha permitido conocer los sitios de unión de los cofactores (sirohemo y agrupaciones  $Fe_4S_4$ ), así como la proposición de un modelo para el mecanismo catalítico de la reacción (Crane *et al.*, 1995)

#### *b) Ferredoxina-SiR (EC 1.8.99.1)*

En organismos fotosintéticos se ha descrito la reducción de sulfito libre a sulfuro catalizada por la ferredoxina-sulfito reductasa. Dicha enzima se ha detectado y purificado en bacterias fotosintéticas (Peck *et al.*, 1974; Schedel *et al.*, 1979), cianobacterias (Koguchi y Tamura, 1988), células cultivadas de plantas (Schwenn y Kemena, 1984) y hojas de plantas (Aketagawa y Tamura, 1980; Koguchi *et al.*, 1988). Su papel en la reducción asimilatoria en estos organismos es discutida (Schmidt, 1982; Schmidt y Jäger, 1992), si bien, como ya hemos visto es posible la aparición de sulfito libre en organismos fotosintéticos.

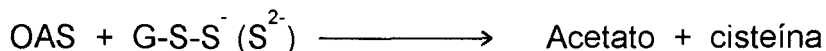
Las ferredoxina-SiR son más pequeñas que las anteriores y no contienen flavinas. La SiR de hojas espinacas tiene de dos a cuatro subunidades con pesos moleculares de 69 a 71 kDa y contiene un sirohemo y un grupo  $Fe_4S_4$  por subunidad (Aketagawa y Tamura, 1980).

Las ferredoxina-sulfito reductasas están relacionadas con el dominio de hemoproteína (SiRHP) de las NADPH-sulfito reductasas (ver apartado anterior).

### **3.5. Incorporación de sulfuro a esqueletos carbonados**

La última etapa de la asimilación de sulfato consiste en la incorporación de azufre reducido a esqueletos carbonados, que se produce fundamentalmente mediante la acción de la O-acetil-L-

serina sulfhidrilasa u O-acetil-L-serina(tiol)liasa (EC 4.2.99.8), que cataliza la reacción:



Esta enzima ha sido purificada en diferentes organismos, tales como bacterias (Chambers y Trüding, 1971), cianobacterias (Diessner y Schmidt, 1981), bacterias fotosintéticas (Hensel y Trüper, 1983), algas verdes (León *et al.*, 1987) y plantas, tanto en tejido verde (Murakoshi *et al.*, 1985; Ikegami *et al.*, 1988a) como no verde (Smith, 1972; Tamura *et al.*, 1976). Se ha descrito la existencia de dos isoenzimas en *Phaseolus* (Bertagnolli y Wedding, 1977), *Rhodospirillum tenue* (Hensel y Trüper, 1983) y *Citrullus vulgaris* (Ikegami *et al.*, 1988a). Se han separado tres isoenzimas de *Pisum sativum* (Ikegami *et al.*, 1987) y cinco a partir de hojas de soja (Nakamura y Tamura, 1989).

La mayoría de las enzimas aisladas de diferentes fuentes son de origen cloroplástico (Ng y Anderson, 1978a; Droux *et al.*, 1992), aunque en los casos en los que se presentan isoenzimas se ha descrito una localización cloroplástica para una de ellas y citoplásmica (Fankhauser y Brunold, 1979) y/o mitocondrial (Lunn *et al.*, 1990) para la otra.

Todas las O-acetil-L-serina sulfhidrilasas requieren piridoxal-5'-fosfato para ser activas, siendo éste componente integral de la enzima (Masada *et al.*, 1975). La mayoría tienen un peso molecular de 50-70 kDa y están constituidas por dos subunidades similares. Su cinética respecto a OAS y sulfuro es Bi-Bi ping pong (Cook y Wedding, 1976). Aunque presenta alta afinidad por sulfuro no es específica para éste, pudiendo formar selenocisteína o  $\beta$ -cianoalanina a partir de O-acetil-L-serina y seleniuro y cianuro respectivamente (Ng y Anderson, 1978b; Hendrikson y Conn, 1969).

Por otro lado, los estudios de estereoespecificidad de la reacción han demostrado que se retiene la configuración del átomo

de carbono asimétrico de la O-acetil-L-serina en el transcurso de la sustitución del grupo acetilo por sulfhidrilo (Akhtar *et al.*, 1984). Además de la biosíntesis de L-cisteína, la O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de hojas de espinaca y de *Chlorella* cataliza una reacción de intercambio isotópico entre L-cisteína y sulfuro (Schmidt, 1977a; 1977b)

Si bien esta ruta parece ser la más importante para la biosíntesis de aminoácidos azufrados, en la mayoría de organismos aparece una actividad homoacetilserina sulfhidrilasa, que cataliza la misma reacción sustituyendo O-acetil-L-serina por O-acetil-L-homoserina. Sin embargo, sólo en levaduras parece tener esta enzima importancia fisiológica (Thomas *et al.*, 1992).

Los seres vivos requieren, además de la L-cisteína, otro aminoácido azufrado: la L-metionina, componente de proteínas y de metionil-ARN transferente en eucariotas y formilmetionil-ARN transferente en procariontes, estos dos últimos esenciales para la iniciación de la síntesis de proteínas. La L-metionina es también componente de la adenosil-metionina que es el principal donador de grupos metilo, esenciales en muchas reacciones del ciclo celular.

Sólo los organismos fotosintéticos contienen la dotación enzimática necesaria para sintetizar la homocisteína, intermediario obligatorio de la síntesis de metionina. La síntesis de homocisteína transcurre básicamente por dos caminos:

- Sulfhidrilación directa de la O-fosfohomoserina.
- Transulfuración a partir de cisteína, formándose cistationina.

Experimentos isotópicos realizados en el alga verde *Chlorella sorokiana* han demostrado que sólo un 3 % de la metionina se produce por sulfhidrilación directa de la O-fosfohomoserina (Giovanelli *et al.*, 1978).



La formación de metionina a partir de cisteína, vía cistationina se produce a través de la siguiente serie de reacciones:

- (1) Homoserina + ATP  $\longrightarrow$  O-fosfohomoserina + ADP
- (2) O-fosfohomoserina + L-cisteína  $\longrightarrow$  Cistationina + P<sub>i</sub>
- (3) Cistationina  $\longrightarrow$  Homocisteína + Piruvato + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>
- (4) Homocisteína + X-CH<sub>3</sub>  $\longrightarrow$  L-metionina

La reacción (1) está catalizada por la homoserina-quinasa (EC 2.7.1.39), purificada en algas verdes (Giovanelli *et al.*, 1974) y plantas (Aarnes, 1976). La (2) por la cistationina- $\gamma$ -sintasa (EC 4.4.1.1), caracterizada en *Lemna minor*, siendo regulada por L-metionina e inactivada por L-cisteína (Thompson *et al.*, 1981). La reacción (3) está catalizada por la cistationina- $\beta$ -liala (EC 4.4.1.8), que ha sido purificada a partir de hojas de espinaca (Giovanelli y Mudd, 1971) y contiene piridoxal-5'-fosfato como grupo prostético. Finalmente, la reacción (4) está catalizada por la tetrahydropteróil triglutamato metiltransferasa (EC 2.1.1.14), que es dependiente de cobalamina y que usa un derivado del N<sup>5</sup>-metil tetrahydrofolato.

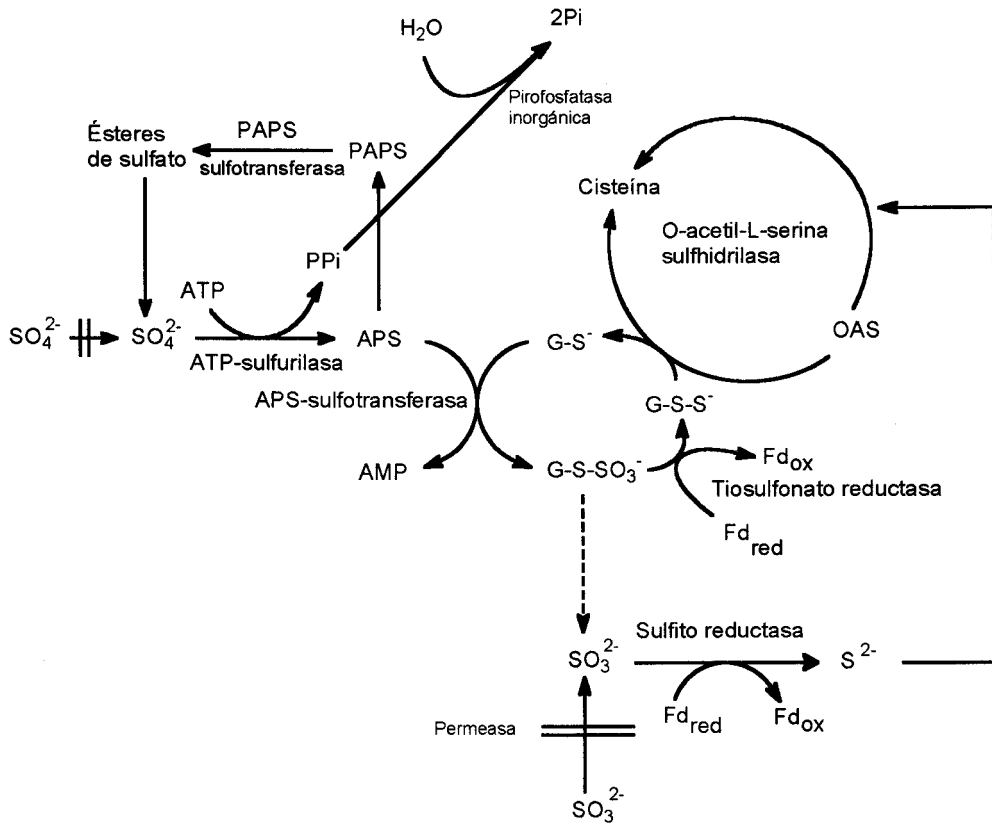


Fig. 4. Reducción asimilatoria de sulfato vía APS

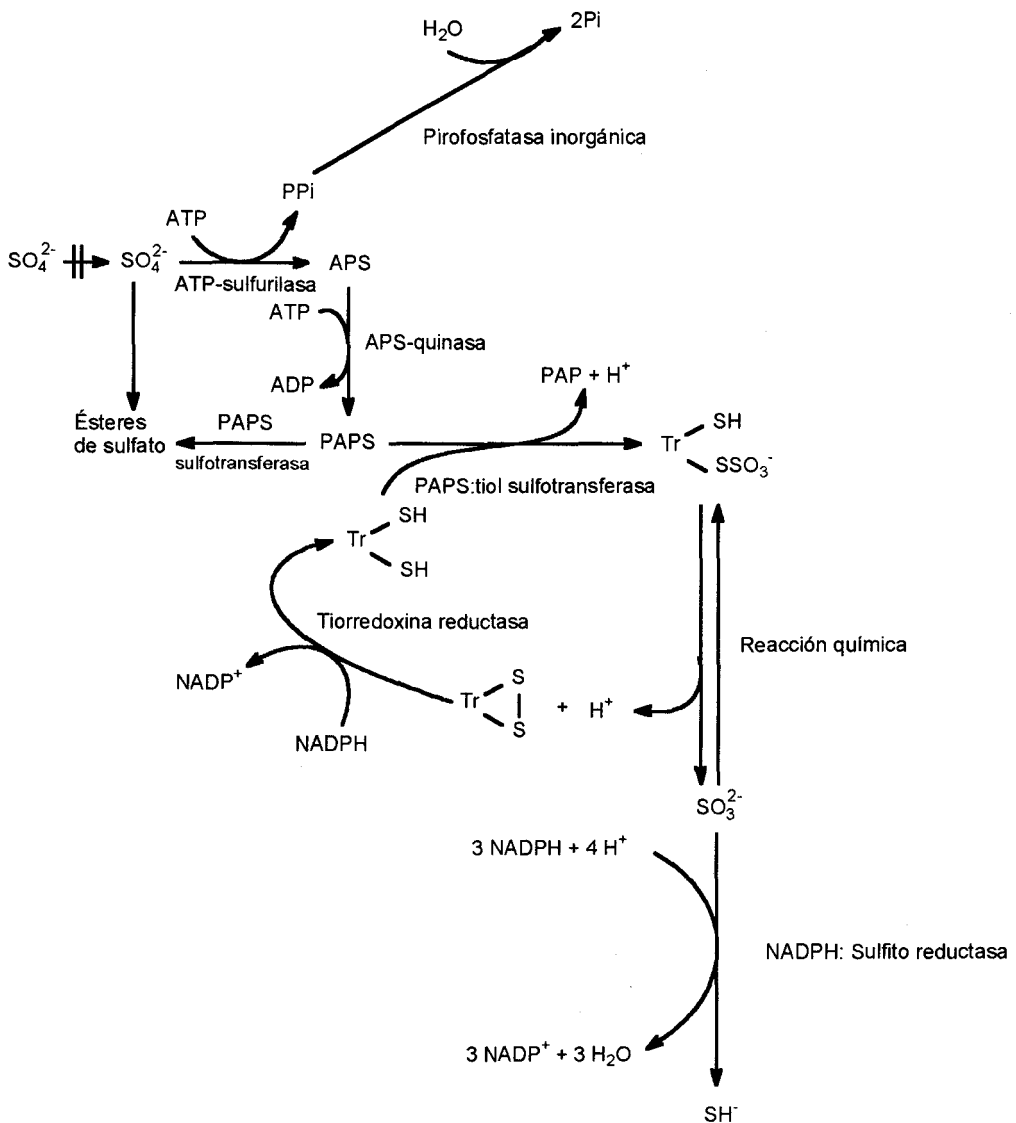
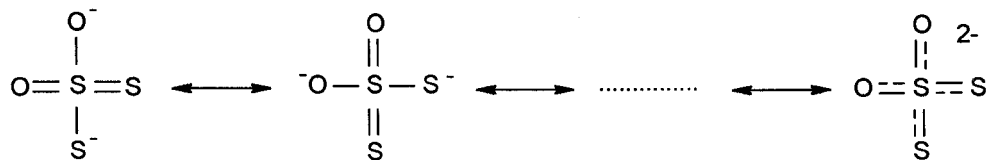


Fig. 5. Reducción asimilatoria de sulfato vía PAPS

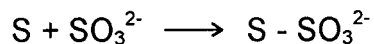


#### 4. Bioquímica del tiosulfato en los seres vivos

El anión tiosulfato puede considerarse formalmente como un derivado del sulfato donde uno de los oxígenos ha sido sustituido por un azufre. La estructura del tiosulfato puede representarse mediante, al menos, dos formas en resonancia, de tal manera que el enlace entre el azufre central y el periférico tiene cierto carácter de doble enlace.



Químicamente el tiosulfato se obtiene calentando azufre elemental en presencia de sulfitos.



Esta reacción se revierte en medio ácido, ya que el ácido tiosulfúrico no es estable en disolución acuosa, dando de nuevo los reactivos. Sin embargo, el ácido tiosulfúrico ha podido ser sintetizado en medio etanol.

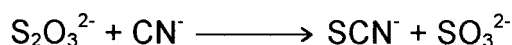
Los tiosulfatos tienen carácter reductor, pudiendo reducir el yodo a ión yoduro, oxidándose ellos a tetrationato ( $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ).

Como ya hemos comentado, cada molécula de tiosulfato presenta dos átomos de azufre diferentes: uno actúa de átomo central con un número de oxidación de +6, mientras que el otro actúa como ligando respecto al azufre central. Este último átomo de azufre se denomina "azufre sulfano" (Westley, 1981), pudiendo definirse como aquel átomo de azufre que está unido covalentemente sólo a otro u otros átomos de azufre. El tiosulfato no es el único compuesto

que presenta este azufre particular y entre otros compuestos que lo presentan podemos destacar:

- Polisulfuros inorgánicos            HS-S-S-S-.....-S-SH
- Persulfuros orgánicos            R-S-SH
- Polisulfuros orgánicos            R-S-S-S-...-S-S-R
- Tiosulfonatos                        R-SO<sub>2</sub>-SH
- Politionatos                          <sup>2-</sup>O<sub>3</sub>S-S-...-S-SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>
- Distintas formas alotrópicas de azufre elemental

Los átomos de azufre sulfano así definidos pueden ser captados por una especie tiofílica, como puede ser el cianuro, entre otras, según la siguiente reacción:



La presencia de compuestos con azufre sulfano tales como tiosulfato, tiosulfonatos o politionatos en los seres vivos está bien documentada en todo tipo de organismos:

- Los que realizan la reducción no asimilatoria de sulfato.
- Los que efectúan la oxidación no asimilatoria de compuestos reducidos de azufre.
- Los que efectúan la reducción asimilatoria del sulfato.
- Los que efectúan la oxidación metabólica de aminoácidos azufrados.

#### 4.1. El tiosulfato en el metabolismo no asimilatorio

La reducción no asimilatoria de tiosulfato es llevada a cabo por un heterogéneo grupo de bacterias y arqueobacterias que viven en ambientes con temperaturas de hasta 105 °C (Hansen, 1994). Dicha reducción se efectúa a través de una serie de reacciones metabólicas que implican pasos de activación del sulfato mediante ATP, posterior reducción del APS así formado a sulfito y reducción de este último a sulfuro. Sin embargo, existe la controversia sobre si el

mecanismo de reducción de sulfito a sulfuro implica una única etapa o una serie sucesiva de reacciones (Hansen, 1994), es decir, si la sulfito reductasa no asimilatoria es una única proteína que cataliza una reducción con seis electrones implicados o es en realidad un complejo formado por varias reductasas que reducen el sulfito a sulfuro en varias etapas. Se ha descrito que extractos de *Desulfovibrio vulgaris* pueden formar tiosulfato a partir de sulfito (Findley y Akagi, 1969).

Se ha sugerido que la reducción no asimilatoria de sulfito a sulfuro transcurre a través de tritionato y tiosulfato, de modo que habría tres reductasas, cada una catalizando un paso de dos electrones. Por tanto el tiosulfato sería un intermediario obligado en la reducción no asimilatoria del azufre. Entre los donadores de éstas estarían la flavodoxina, el citocromo c3 y una hidrogenasa (Metzler, 1981).

Es también destacable que se han identificado genes en *Salmonella typhimurium* que codifican proteínas capaces de mediar la reducción de tiosulfato a sulfuro en condiciones no asimilatorias de anaerobiosis (Heinzinger *et al.*, 1995; Alami y Hallenbeck, 1995).

Las rutas de la oxidación no asimilatoria de compuestos azufrados son, al contrario que las de la reducción, enormemente complejas y varían en los distintos organismos que efectúan dicha oxidación según ésta sea quimiotrófica aerobia, quimiotrófica anaerobia o fototrófica. En cualquier caso, parece ser que el tiosulfato y los politionatos son intermediarios habituales de la mayoría de las posibles rutas de oxidación no asimilatoria, apareciendo también como productos finales en algunos organismos (Kelly, 1988; Brune, 1989).

Por otro lado y más recientemente, se han descrito dos grupos de bacterias dulceacuícolas que contienen bacterioclorofila-A que son capaces de oxidar tiosulfato a tetracionato (*Erythromicrobium hydrolyticum*) o a sulfato (*Roseococcus thiosulphatophilus*), tanto en

luz como en oscuridad (Yurkov *et al.*, 1994), pudiendo vivir con tiosulfato como fuente de energía.

#### 4.2. El tiosulfato en la reducción asimilatoria

Se ha comprobado que en *Salmonella typhimurium* una de las isoenzimas de O-acetil-L-serina sulfhidrilasa, que está codificada por el gen *CysM*, puede utilizar tiosulfato como sustrato para obtener cisteína a partir de la O-acetil-L-serina (Hulanicka *et al.*, 1986; Nakamura *et al.*, 1983; 1984). Esta reacción transcurre a través de S-sulfocisteína (Kredich, 1987). Parece ser que este mecanismo se utiliza cuando el tiosulfato es la única fuente de azufre disponible; sin embargo, éste no parece ser un intermediario obligatorio de la asimilación de sulfato, al menos en condiciones asimilatorias (Thomas *et al.*, 1992), aunque en condiciones no asimilatorias de anaerobiosis, este organismo parece ser capaz de utilizar el tiosulfato como fuente de sulfuro.

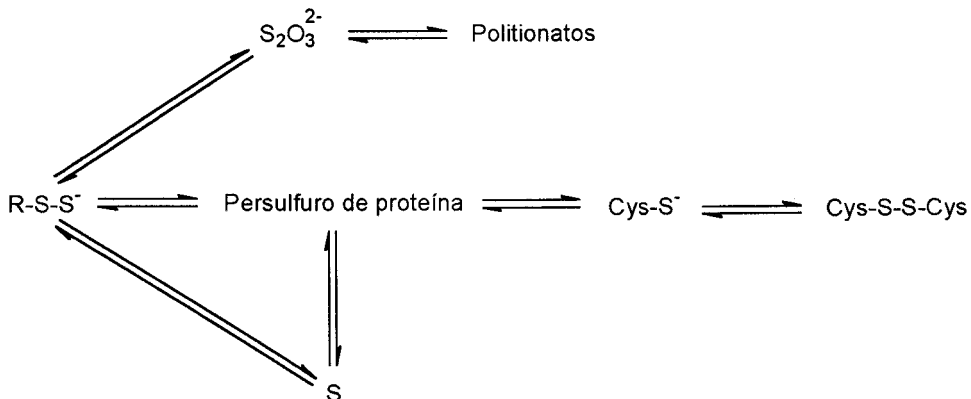
En cuanto a hongos y levaduras, el tiosulfato sí parece ser un intermediario obligatorio de la reducción asimilatoria de sulfato en los hongos del género *Streptomyces* (Kitano *et al.*, 1985; Lydiate *et al.*, 1988). En *Saccharomyces cerevisiae*, se ha descrito que las cepas silvestres pueden metabolizar los dos azufres del tiosulfato; sin embargo, mutantes carentes de sulfito reductasa sólo pueden asimilar uno de dichos átomos, lo cual demuestra que la utilización de éste se hace a través de la sulfito reductasa (Thomas *et al.*, 1992). Es probable que el otro átomo sea convertido directamente en sulfuro a través de una actividad tiosulfato reductasa (ver más adelante).

Hodson y Schiff (1971) han descrito que extractos de varias especies de organismos que realizan la reducción asimilatoria de sulfato, son capaces de reducir sulfato a tiosulfato, cuando son suplementados con ATP,  $Mg^{2+}$  y un reductor (piridín-nucleótido o tioles). Entre estos organismos están *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Saccharomyces cerevisiae*. Estos resultados sugerirían

que la capacidad de formación de tiosulfato a partir de sulfato sería general en los organismos asimiladores de este último. Se ha sugerido incluso que el PAPS o el APS pueden donar su átomo de azufre para formar sulfito o tiosulfato dependiendo de las condiciones de cultivo (Hodson y Schiff, 1971).

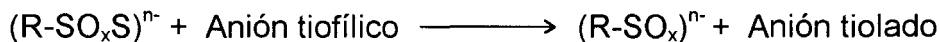
### 4.3. La actividad tiosulfato:aceptor sulfotransferasa: el “pool” de sulfanos

Cuando un animal es inyectado con un compuesto que contiene un átomo de azufre sulfano radiactivo, un análisis posterior del plasma de dicho animal muestra que la radiactividad se ha incorporado a una serie de compuestos caracterizados muchos de ellos en que también tienen en sus moléculas azufre sulfano (Westley, 1981). Este hecho ha llevado a la conclusión por parte de algunos autores de que existe, al menos en animales, lo que se denomina el “pool” de sulfanos, que consiste en una serie de compuestos que tienen ese tipo de átomo de azufre y que se encuentran entre sí en un rápido equilibrio en condiciones fisiológicas.



La interconversión entre los componentes del “pool” de sulfanos está mediada, al menos en parte, por actividades

sulfano:aceptor sulfotransferasas, que catalizan la reacción (Westley, 1981):



El grupo R del donador de azufre puede ser el oxígeno, con lo cual estaríamos en el caso de una actividad tiosulfato:aceptor sulfotransferasa, también denominada tiosulfato reductasa porque el tiosulfato da lugar a un grupo tiol (-SH) asociado a un anión aceptor. El aceptor tiofílico puede ser muy variable; entre los conocidos tanto *in vivo* como *in vitro* podemos destacar: cianuro, dihidrolipoato y reactivos tiólicos tales como cisteína, glutatión reducido, mercaptoetanol, ditiotreitól y ditioeritritol.

En el caso concreto de que el aceptor sea el cianuro nos encontramos ante la llamada actividad *rodanasa* o *rodaneso*. Parece ser que la traducción más correcta del original "*rhodanese*" (y no "*rhodanase*") es *rodaneso* ya que *rodanasa* significaría "*enzima que rompe tiocianato*", cuando en realidad nos encontramos ante una enzima que *forma* tiocianato (Sykes, 1981). En cualquier caso es posible encontrar ambas palabras en los textos traducidos al castellano (Meztler, 1981; White *et al.*, 1983).

Por otro lado, existe cierta inclinación en la literatura a considerar como actividad rodanasa toda actividad sulfano sulfotransferasa, cuando hemos visto que aquélla sólo se produce cuando se forma tiocianato, es decir, cuando el aceptor de azufre es el cianuro. Este problema no es únicamente lingüístico ya que hay proteínas que son básicamente rodanasas y otras sulfano (tiosulfato) reductasas. La diferencia entre unas y otras radica en la diferente afinidad que tengan por cianuro o por aceptores tiólicos: si presentan mayor afinidad por el cianuro estaremos en el caso de una rodanasa, en caso contrario se habla de tiosulfato reductasa (Westley, 1981). La necesidad de diferenciar ambos tipos de proteínas queda también ilustrada por el hecho de que parecen tener distintos mecanismos de acción. Esto claramente indica que nos encontramos ante dos

proteínas diferentes, si bien, las rodanasas catalizan la reacción de las tiosulfato reductasas y viceversa.

#### 4.4. La actividad rodaneso o rodanasa

Se conoce desde hace bastante tiempo que el cianuro es una sustancia tóxica para los seres vivos (Sykes, 1981). Esta molécula puede actuar a varios niveles dentro de los organismos vivos siendo quizá su papel más conocido el de inhibidor de la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria de mitocondrias (Solomonson, 1981).

Otras enzimas sensibles a cianuro son: catalasa, mioglobina, citocromo P-450, superóxido dismutasa, ribulosa difosfato carboxilasa, nitrito reductasa, nitrogenasa y nitrato reductasa (Solomonson, 1981). La dosis mortal para el hombre está entre 0,5 y 3,5 mg por kg de peso del individuo. El cianuro, o sus precursores, se encuentra en la naturaleza en gran cantidad de vegetales, tales como yuca, lima, sorgo, patatas dulces, maíz, bambú, etc. Aparentemente el cianuro puede formarse a partir de compuestos endógenos en plantas y microorganismos. Así, las bacterias cianogénicas lo forman a partir de glicina (Castric, 1981), mientras que en organismos fotosintéticos las potenciales fuentes de cianuro son los aminoácidos aromáticos, la histidina y el glioxilato (mas hidroxilamina) (Vennesland *et al.*, 1981).

Se ha sugerido que el cianuro podría ser utilizado por algunos organismos como inhibidor reversible para regular la actividad nitrato reductasa y controlar así la asimilación de nitrato (Solomonson, 1981).

La presencia de cianuro en tejidos animales resulta en la formación de tiocianato, en un proceso que se favorece con la adición de tiosulfato. El tiocianato es relativamente inocuo y su formación a partir de tiosulfato y cianuro se vio desde el principio como un proceso de detoxificación que, posteriormente, se sugirió podría ser mediado enzimáticamente (Sykes, 1981). Como ya hemos

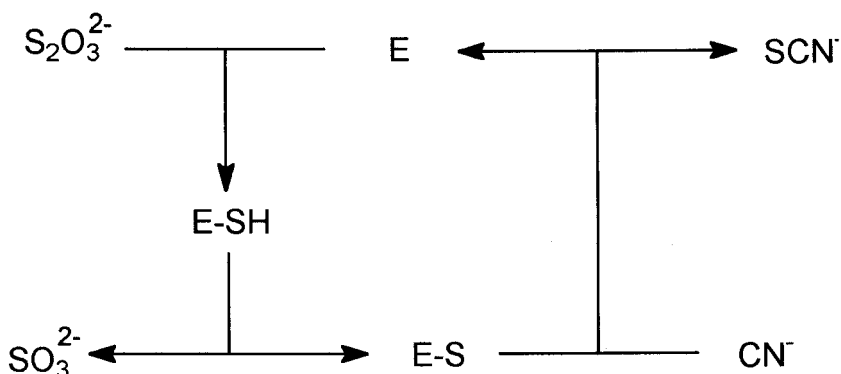
visto la enzima que cataliza esta reacción se conoce con el nombre de *rodanasa* o *rodaneso* y se admite que tiene una función básicamente detoxificante *in vivo* (ver más adelante).

La actividad rodanasa es ubicua en los seres vivos y ha sido descrita en hongos, actinomicetos, bacterias, algas, plantas y animales (Westley, 1981). Se ha estudiado en detalle la rodanasa de bovino, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. La proteína de bovino es un dímero de 37 kDa de peso molecular compuesto por dos subunidades aparentemente iguales de unos 19 kDa conectadas por un puente de 16 aminoácidos (Luo *et al.*, 1995). Cada dímero presenta dos sitios catalíticos y dos sitios de unión independientes para cationes divalentes, así como dos grupos sulfhidrilo esenciales (Volini y Alexander, 1981). Aparece abundantemente en hígado, en menor cantidad en riñones y en mucha menor cantidad en otros órganos. En hígado se localiza exclusivamente en la matriz mitocondrial (Westley, 1981).

Las rodanasas de *E. coli* y *P. aeruginosa* tienen 14 y 33 kDa de peso molecular respectivamente, lo que sugiere que la forma estable *in vivo* de la de *E. coli* es el monómero, mientras que la de *P. aeruginosa* y bovino es el dímero. La existencia de monómeros se ha detectado en hígado de rata y en algunas especies de *Thiobacillus* (Volini y Alexander, 1981).

La proteína se ha cristalizado y se ha establecido su estructura tridimensional por difracción de rayos X a 0,21 nm de resolución, lo que ha permitido descartar que la rodanasa sea una metaloproteína (Brune, 1989). En base a estos datos estructurales y a los datos químicos y cinéticos conocidos se ha establecido un modelo de mecanismo de acción enzimática: la enzima libre reacciona con el azufre sulfano del tiosulfato, formando persulfuro de cisteína en el sitio activo y liberando sulfito al medio. El complejo enzimático tiolado cede después el átomo de azufre al cianuro (Brune, 1989; Westley, 1981) (ver esquema).

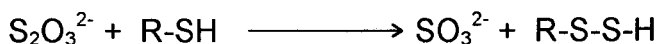




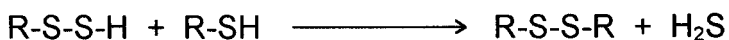
La rodanasa es una de las proteínas más estudiadas debido a su capacidad de renaturalización mediada por chaperonas, así como por sus cambios conformacionales reversibles frente al pH. Estas características hacen muy útil a esta proteína para estudios de plegamiento (Smith y Fisher, 1995; Horowitz y Xu, 1992; Mendoza *et al.*, 1992). Sin embargo la información acerca de esta actividad en algas eucarióticas es muy escasa.

#### 4.5. La actividad tiosulfato reductasa

Esta actividad cataliza la transferencia del azufre sulfano del tiosulfato a un aceptor tiólico de acuerdo con la reacción (Thomas *et al.*, 1992; Chauncey y Westley, 1983a):



En presencia de un exceso de tioles, ocurriría la siguiente reacción química:



Esta actividad ha sido identificada y purificada en *S. cerevisiae* (Chauncey y Westley, 1983a) y se ha demostrado su participación en la asimilación de azufre en este organismo, ya que

es capaz de crecer con tiosulfato como única fuente de azufre. El mecanismo a través del cual se utiliza el tiosulfato parece implicar la existencia de una tiosulfato reductasa, como se ha podido ver con el aislamiento de mutantes adecuados (Thomas *et al.*, 1992).

La cinética de la actividad tiosulfato reductasa de *S. cerevisiae* ha sido estudiada en detalle (Chauncey y Westley, 1983b). Así, cuando se utiliza tiosulfato como donador, los sustratos parecen unirse al azar a la enzima, al contrario que en el caso de la rodanasa, en el que los sustratos se unen por orden, como vimos anteriormente. Sin embargo, cuando se utilizan otros donadores de azufre sulfano (como el bencenotiosulfonato) los sustratos se unen por orden a la enzima, si bien, al contrario que en la rodanasa, en la tiosulfato reductasa se une primero el aceptor tiólico a la enzima y luego el donador (Chauncey y Westley, 1983b).

También se ha detectado actividad tiosulfato reductasa en plantas superiores, algas verdes y cianobacterias (Schmidt, 1986). En algas esta actividad se induce en condiciones de azufre limitante, lo que demuestra la relación de esta actividad con la disponibilidad de fuente de azufre. Se ha especulado que la tiosulfato reductasa utiliza tiosulfato como sustrato *in vitro* y que su sustrato natural es otro sulfano (Schmidt, 1986). De hecho la tiosulfato reductasa de levadura prefiere como sustrato el bencenotiosulfonato frente al tiosulfato (Chauncey y Westley, 1983b). También se ha visto que la tiosulfato reductasa de *Chlorella* se activa por tiorredoxina, lo que apoya la idea de su implicación en la reducción de sulfato dependiente de la luz (Schmidt, 1986).

#### **4.6. Función fisiológica de las actividades rodanasa y tiosulfato reductasa**

La primera función fisiológica dada concretamente a la actividad rodanasa es la de detoxificación, ya que desde hace bastante tiempo se sabe que el cianuro que se pueda producir por distintas reacciones metabólicas o incluso por ingestión accidental

puede ser procesado, preferentemente en el hígado, en una reacción favorecida por la presencia de tiosulfato y que da lugar a tiocianato (Sykes, 1981).

La sensibilidad a cianuro de distintas cepas de *E. coli* con diferentes niveles de actividad rodanasa es muy similar, lo que sugeriría que la actividad rodanasa disponible para detoxificación es siempre la misma y además no muy elevada, por lo que se concluye que la función primordial de la actividad *in vivo* no es la detoxificación (Volini y Alexander, 1981). Los autores de este estudio concluyen de estos resultados que, al menos en *E. coli*, la actividad rodanasa tiene sólo un papel detoxificador secundario en el metabolismo, siendo el papel de sulfotransferasa, concretamente el de donador de sulfuros a proteína, el papel fisiológico fundamental. En este sentido es destacable que también se ha puesto en duda la existencia de actividad rodanasa específica en plantas superiores, ya que no se ha podido encontrar correlación entre cianogénesis y dicha actividad (Kakes y Hakvoort, 1992).

Con respecto al papel de la actividad sulfotransferasa en la formación de agrupaciones sulfoférricas, se ha comprobado que se pueden reconstituir apoproteínas de ferredoxina o adrenodoxina incubando con rodanasa en presencia de sus sustratos, iones de hierro y un agente reductor. Este resultado puede obtenerse sustituyendo la proteína y su sustrato por iones sulfuro (Volini y Alexander, 1981). También se ha descrito la reconstitución del grupo sulfoférrico de la ferredoxina de espinaca *in vitro* en condiciones similares (Ogasawara *et al.*, 1995). En *E. coli* la actividad rodanasa decrece en un orden de magnitud cuando se crecen las células en condiciones anaerobias. Esto sugiere que esta actividad está implicada en el metabolismo aerobio de este organismo, lo que apoyaría la idea de su participación en la biosíntesis de proteínas con agrupaciones sulfoférricas (Volini y Alexander, 1981).

Por tanto, la implicación de la actividad tiosulfato sulfotransferasa en la formación de grupos sulfoférricos de proteínas,

parece estar bien establecida en diferentes organismos, si bien no se sabe si esta implicación se reduce simplemente a la formación de sulfuro, o bien actúa transfiriendo el átomo de azufre desde el donador (tiosulfato) hasta la proteína, que sería el aceptor final.

Quizá la mayor controversia se suscita con respecto a la participación de la actividad tiosulfato:aceptor sulfotransferasa en las rutas metabólicas de asimilación del sulfato, ya que, según vimos anteriormente, salvo en el caso de *Streptomyces*, el tiosulfato no parece ser un intermediario obligatorio de esta ruta. Sin embargo, como también se ha visto, bajo determinadas condiciones, el tiosulfato aparece en los extractos de múltiples organismos asimiladores de sulfato (Hodson y Schiff, 1971) y se ha sugerido que la reducción no asimilatoria de sulfito a sulfuro transcurre a través de tiosulfato (Metzler, 1981). Es, por tanto, claro que aún quedan muchas cosas por establecer en la ruta de asimilación del sulfato y, concretamente, el papel del tiosulfato en las mismas es algo aún por dilucidar.

El tiosulfato sí parece ser intermediario en el metabolismo catabólico de aminoácidos azufrados en animales, donde se ha propuesto el llamado *ciclo del tiosulfato* (Cooper, 1983), en el que la actividad tiosulfato reductasa juega un papel primordial (Fig. 6).

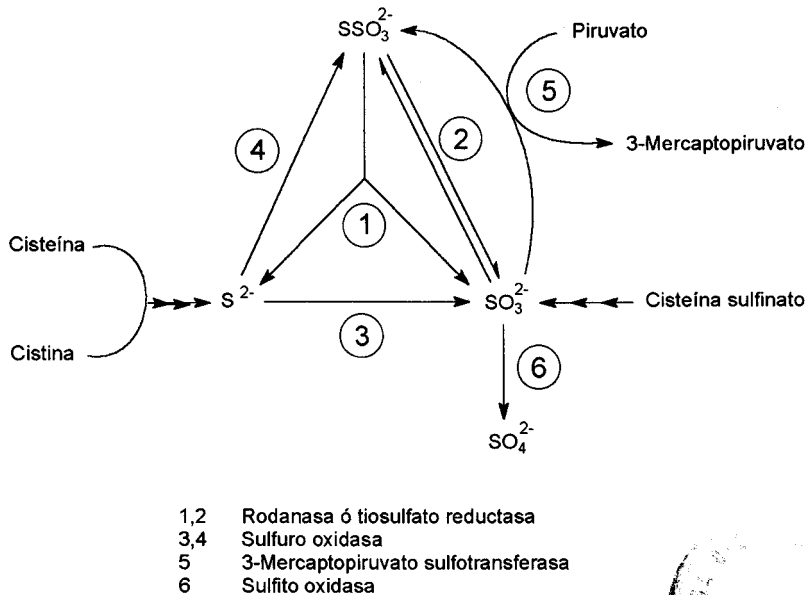


Fig. 6. Ciclo del tiosulfato en animales

## 5. Biología Molecular del metabolismo del azufre

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

### 5.1. Estudios en *E. coli*

En *E. coli* (y en *Salmonella typhimurium*) los genes que codifican las proteínas de la asimilación de sulfato están extendidos a lo largo de cinco regiones diferentes del cromosoma, concretamente en el caso de *E. coli* entre 28 y 80'. Se conocen hasta ahora 18 genes involucrados en la síntesis de cisteína de este organismo (ver Tabla 3). Dichos genes se denotan por la palabra Cys seguida de una letra

mayúscula, ya que cualquier lesión en estos genes produce un requerimiento nutricional por cisteína en la bacteria.

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

El gen *CysB* ha sido clonado y secuenciado y la proteína que codifica (*CysBp*) sobreexpresada y purificada (Ostrowski *et al.*, 1987; Miller y Kredich, 1987). *CysBp* estimula la transcripción en los promotores del regulón pero inhibe la transcripción de su propio promotor (Leyh, 1993). Sólo los genes *CysG* y *CysE* no están bajo el control de *CysBp* (Schmidt y Jäger, 1992).

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

**Tabla 3. Genes involucrados en la biosíntesis de cisteína en *E. coli***

GEN	FUNCION
<u>Transporte de sulfato (52')</u>	
<i>CysP</i>	Unión de tiosulfato
<i>CysT</i> <i>CysW</i>	Subunidades integrales de membrana de la permeasa
<i>CysA</i>	Subunidad periplásmica de la permeasa
<i>CysK</i> <i>CysM</i>	O-acetil-L-serina sulfhidrilasa-A O-acetil-L-serina sulfhidrilasa-B (puede utilizar tiosulfato)
<u>Activación de sulfato (59')</u>	
<i>CysC</i>	APS-quinasa
<i>CysD</i>	ATP-sulfurilasa, subunidad pequeña
<i>CysN</i>	ATP-sulfurilasa, subunidad grande
<i>CysH</i>	PAPS-sulfotransferasa
<i>CysI</i>	Sulfito-reductasa, hemoproteína
<i>CysJ</i>	Sulfito-reductasa, flavoproteína
<u>Otros genes importantes</u>	
<i>CysB</i>	Activador transcripcional del regulón de cisteína (28')
<i>CysE</i>	Serina transacetilasa (81')
<i>CysG</i>	Sulfito-reductasa, sirohemo (no se sabe si forma parte del regulón)

Referencias: Leyh, 1993; Schmidt y Jäger, 1992

## 5.2. La asimilación de sulfato en *S. cerevisiae*

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

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

Se han encontrado múltiples genes implicados de forma más o menos directa en la asimilación de azufre en levaduras (ver Tabla 4); sin embargo, no se conocen las funciones de todos ellos. Al igual que en el caso de *E. coli* y como consecuencia de los distintos proyectos GENOMA las secuencias de todos estos genes son o van a ser conocidas en breve, si bien el conocimiento de las funciones de las proteínas que codifican dichos genes requerirá un esfuerzo adicional.



**Tabla 4. Genes implicados en la asimilación de azufre en *S. cerevisiae***

GEN	FUNCIÓN
<u>Activación de sulfato</u>	
<i>MET3</i>	ATP-sulfurilasa
<i>MET14</i>	APS-quinasa
<u>Reducción de sulfato</u>	
<i>MET16</i>	PAPS-reductasa
<i>MET1</i>	
<i>MET5</i>	
<i>MET8</i>	Sulfito reductasa
<i>MET10</i>	
<i>MET20</i>	
<i>MET18</i>	Sulfito reductasa (?)
<u>Incorporación de azufre esqueleto carbonado</u>	
<i>MET25</i>	Homocisteína sintasa
<i>MET2</i>	Homoserina-acil transferasa
<u>Otros genes</u>	
<i>MET4</i>	Activador transcripcional
<i>MET22 (HAL2)</i>	PAP-fosfatasa
<i>MET6</i>	Hcys-metil transferasa

Referencias: Thomas *et al.*, 1992; Murguía *et al.*, 1995

### 5.3. La genética de la asimilación de sulfato en otros organismos

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

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

Los genes que codifican las distintas isoformas de O-acetil-L-serina sulfhidrilasa han sido aislados y secuenciados en *Arabidopsis thaliana* (Barroso *et al.*, 1995), *Capsicum annuum* (Romer *et al.*, 1992), *Citrullus vulgaris* (Noji *et al.*, 1994), maíz (Brander *et al.*, 1996) y *Spinacia oleracea* (Saito *et al.*, 1993).

## 6. Objetivos

En esta tesis, hemos pretendido conocer mejor el metabolismo del azufre inorgánico en algas eucarióticas por ser un campo poco conocido y su interés evidente, dada la importancia que tiene este elemento para la productividad vegetal, así como sus implicaciones medioambientales.

Para realizar dicho estudio, hemos utilizado la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, tradicionalmente utilizada en nuestro laboratorio por sus innumerables ventajas genéticas y bioquímicas.

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

a) *Publicaciones en revistas*

1. SULFATE UPTAKE IN *Chlamydomonas reinhardtii*. Pérez-Castiñeira, J.R., Prieto, J.L. y Vega, J.M. (1992). *Phyton* **32**, 91-94.

b) *Comunicaciones a Congresos*

1. STUDIES ON SULFITE CONSUMPTION BY THE EUCARYOTIC ALGA *Chlamydomonas reinhardtii*

José L. Prieto, José M. Vega

IV Portuguese-Spanish Biochemistry Congress, Resumen 2P15  
Póvoa de Varzim, Portugal, 1991.

2. SULFATE AND SULFITE UPTAKE IN *Chlamydomonas reinhardtii*

José R. Pérez-Castiñeira, José L. Prieto, José M. Vega

Workshop on sulphur metabolism in higher plants, Resumen SI(2)  
Garmisch-Partenkirchen, Alemania, 1992.

3. CHARACTERIZATION OF A THIOSULFATE REDUCTASE ACTIVITY FROM *Chlamydomonas reinhardtii*

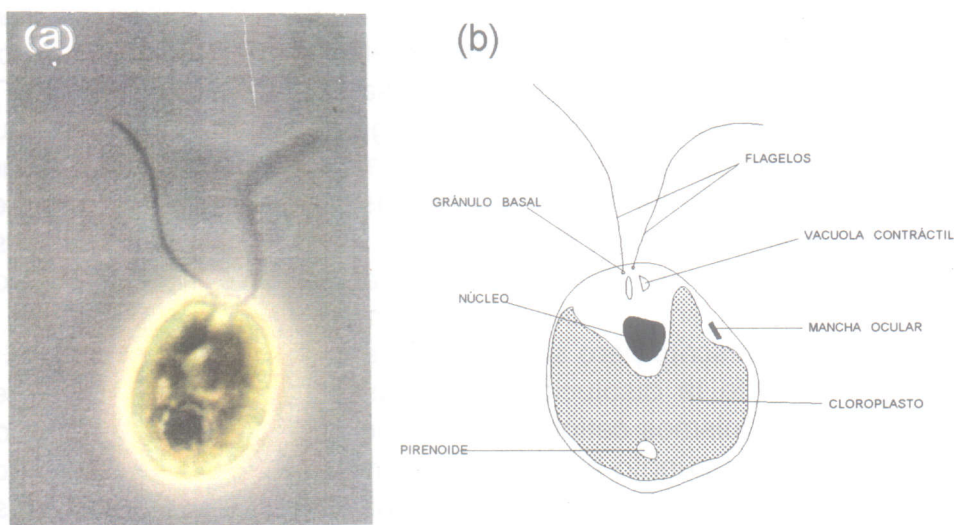
José L. Prieto, José R. Pérez-Castiñeira, José M. Vega

V Spanish-Portuguese Congress of Biochemistry, Resumen P-II  
Salamanca, 1994

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Organismo y condiciones de cultivo

Para la realización de este trabajo se ha utilizado la estirpe silvestre 21gr del alga eucariótica *Chlamydomonas reinhardtii* (Fig. 7). Las células se cultivaron a 25 °C, en medio líquido estándar con amonio 10 mM y sulfato 0,3 mM, como únicas fuentes de nitrógeno y azufre, en recipientes de vidrio de 0,25 a 20 litros, siendo iluminados de forma continua con luz fluorescente blanca con una potencia de 50 W/m<sup>2</sup> en la superficie de los cultivos.



**Fig. 7.** Alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. (a) Fotografía al microscopio óptico (100 aumentos). (b) Dibujo esquemático de la célula mostrando sus principales características.

El medio de cultivo empleado fue el previamente descrito por Sueoka *et al.* (1967) y que contenía por litro: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,44 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,72 g; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,06 g; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0,02 g y 5 ml de una disolución que contenía trazas de algunos elementos y que

se preparó según se ha descrito por Hutner *et al.* (1950). La disolución de trazas contenía por litro:  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2,28 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4,40 g;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,02 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,00 g;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,32 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,32 g;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,22 g y EDTA (ácido libre), 10 g. Los medios de cultivo contenían además  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM como fuente de nitrógeno.

Para mantener las células en suspensión se hizo pasar por los cultivos una corriente de aire enriquecido con un 5 % (v/v) de  $\text{CO}_2$ , que servía como fuente de carbono. Bajo estas condiciones estándar de cultivo, el tiempo de generación observado para las células de *C. reinhardtii* fue de 8 h aproximadamente.

En determinadas ocasiones, las algas se cultivaron bajo condiciones especiales, generalmente relacionadas con la carencia de algún elemento o factor externo necesario para el crecimiento. Tal es el caso de la carencia de azufre o el grado de iluminación en que se mantuvieron las células en algunos experimentos. Para obtener cultivos en carencia de azufre, las células cultivadas en condiciones estándar se recogieron por centrifugación (3.000 g durante 5 min), se lavaron con medio fresco sin fuente de azufre y se resuspendieron finalmente en el mismo medio, el cual se preparó de forma análoga al anteriormente descrito pero sustituyendo el  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  por  $\text{MgCl}_2$ , y los sulfatos de la disolución de trazas por los correspondientes cloruros de los mismos cationes, manteniéndose la concentración de estos últimos. En cuanto al grado de iluminación, para mantener los cultivos en oscuridad, los recipientes correspondientes se envolvieron en papel aluminio.

Las células se crecieron en condiciones estériles hasta volúmenes de cultivo de 5 litros. Para ello, los recipientes y los medios de cultivo se esterilizaban mediante calentamiento a 120 °C (1 atmósfera de sobrepresión) durante 20 min en autoclave.

El microorganismo se conservó en medio sólido, obtenido suplementando el medio de cultivo estándar previamente descrito,

con agar al 2 % (p/v). Después de la inoculación, los cultivos en medio sólido se mantenían iluminados intensamente durante 3-4 días, y posteriormente se conservaban en luz difusa. Los cultivos se renovaban cada tres meses.

## 2. Consumo de sulfato por *C. reinhardtii*

Para los estudios de consumo de sulfato se siguió el protocolo descrito previamente por Pérez-Castiñeira *et al.* (1992). Las células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento se recogieron por centrifugación a 5.000 *g* durante 5 min, se lavaron dos veces con medio sin azufre y se resuspendieron en el mismo medio de manera que la concentración final de clorofila fuera de aproximadamente 20  $\mu\text{g Chl/ml}$ . La suspensión celular se situó en un baño termostatzado a 25 °C, con iluminación continua de luz blanca (30  $\text{W/m}^2$ ), y los experimentos se iniciaron mediante adición de sulfato marcado con  $^{35}\text{S}$ . La cantidad de radiactividad utilizada en los experimentos fue de 0,05  $\mu\text{Ci/ml}$  (sulfato total 0,3 mM). En los estudios cinéticos, la cantidad de sulfato en los cultivos fue variable, mientras que la radiactividad se mantuvo siempre por debajo de 0,5  $\mu\text{Ci/ml}$ .

Cada 2-3 min se tomaban muestras de 0,5 ml de cultivo y se añadían a tubos de microcentrifuga conteniendo 0,5 ml de medio de cultivo carente de azufre, para centrifugar rápidamente a 15.000 *g* durante 30 s. Se descartaron los sobrenadantes, y los precipitados celulares se lavaron con 0,5 ml de medio de cultivo carente de azufre. Se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones y el precipitado celular se disolvió en 0,5 ml de líquido de centelleo (Beckman "Ready Protein"). Las muestras así tratadas se colocaron en viales de centelleo, se les añadieron 3,5 ml más de líquido de centelleo y la radiactividad acumulada se contó en un aparato Beckman LS-6000IC.

### **3. Permeabilización de células de *C. reinhardtii* y obtención de extractos crudos**

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

Para la obtención de extractos crudos, las células se recogieron a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento ( $A_{660} = 1,5-2,0$ ), por centrifugación a 5.000 g durante 5 min. La rotura de las células se realizó mediante dos métodos alternativos:

#### **3.1. Rotura por congelación-descongelación en N<sub>2</sub> líquido**

Las células se congelaron mediante inmersión en N<sub>2</sub> líquido durante 90 s y se descongelaron posteriormente por agitación continua durante 1 h en presencia de tampón (5 ml por g de peso húmedo de células) a 4 °C. El tampón de trabajo para las enzimas con actividad tiosulfato reductasa y rodanasa fue CHES-KOH 10 mM, pH 9,5 conteniendo 5 mM DTT, y para la OASS, tampón fosfato 10 mM conteniendo 2 mM DTT. La preparación resultante se centrifugó a 16.000 g durante 15 min a 4 °C, utilizándose el sobrenadante como extracto crudo libre de células.

#### **3.2. Rotura por sonicación**

Las células recogidas por centrifugación se resuspendieron en tampón estándar (5 ml por g de peso húmedo de células) y se rompieron mediante sonicación a 4 °C, utilizando tres períodos de 15 s a 60 W con intervalos de 30 s entre ellos. El homogenado resultante se centrifugó a 16.000 g durante 15 min y el sobrenadante se utilizó como extracto crudo libre de células.

## 4. Determinaciones analíticas

### 4.1. L-Cisteína

La determinación específica de L-cisteína en presencia de otros aminoácidos se efectuó según el método de Gaitonde (1967) en el que el grupo  $\alpha$ -amino del aminoácido reacciona con un reactivo de ninhidrina, preparado inmediatamente antes de usar, y que contiene 0,25 g de este compuesto disueltos en una mezcla de 6 ml de ácido acético glacial y 4 ml de ácido clorhídrico 35 % (p/v). A la muestra (conteniendo entre 0 y 400 nmoles de L-cisteína en un volumen máximo de 1,5 ml) se le añadieron 0,5 ml del reactivo de ninhidrina descrito. Tras calentar a 100 °C durante 10 min, la mezcla se enfrió inmediatamente en baño de hielo y, finalmente, se le añadieron 7,5 ml de etanol al 96 % (v/v) para estabilizar el complejo coloreado formado. Posteriormente se midió la absorbancia a 560 nm ( $\epsilon_{560} = 6,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 4.2. Clorofila

La concentración de clorofila se determinó mediante el método de Arnon (1949). Alícuotas de 1 ml de suspensión celular de los correspondientes cultivos se calentaron a 100 °C durante 2 min. Posteriormente se añadieron 4 ml de acetona y se agitó vigorosamente durante 15 s. Tras centrifugar a 3.000 g durante 5 min se midió la absorbancia a 652 nm ( $\epsilon_{652} = 34,5 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 4.3. Proteína

La proteína se determinó por el método de Peterson (1977). Cada muestra, conteniendo entre 5 y 60  $\mu\text{g}$  de proteína total se llevaba hasta 0,4 ml con agua destilada, y se añadían 40  $\mu\text{l}$  de DOC 0,15 % (p/v). Tras agitar vigorosamente, se añadían 40  $\mu\text{l}$  de TCA 72 % (p/v) y se agitaba de nuevo. Después de centrifugar a 15.000 g durante 10 min, se eliminaba el sobrenadante y se añadía al precipitado, sucesivamente, 0,4 ml de agua destilada, 0,4 ml del



reactivo A (volúmenes iguales de agua destilada, NaOH 0,8 N, SDS 10 % (p/v), y de una mezcla que contiene  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 % (p/v), tartrato sódico-potásico anhidro 2 g/l y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1 g/l), y 0,2 ml del reactivo B (Reactivo Folin-Ciocalteu comercial diluido 6 veces). Se agitaba y se medía la absorbancia a 750 nm tras 30 min a temperatura ambiente.

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

#### **4.4. Sulfito**

La concentración de sulfito se determinó siguiendo el método de Chauncey *et al.* (1987), aunque con algunas modificaciones. 0,5 ml de muestra se añadían sobre una mezcla de 1 ml de formaldehído 0,02 % (v/v) en agua destilada y 1 ml de fucsina 0,04 % (p/v) disuelta en HCl 0,72 N. Tras 10 min a temperatura ambiente se medía la absorbancia a 600 nm. A esta longitud de onda es donde existe menor interferencia para la determinación, como muestra la Figura 8.

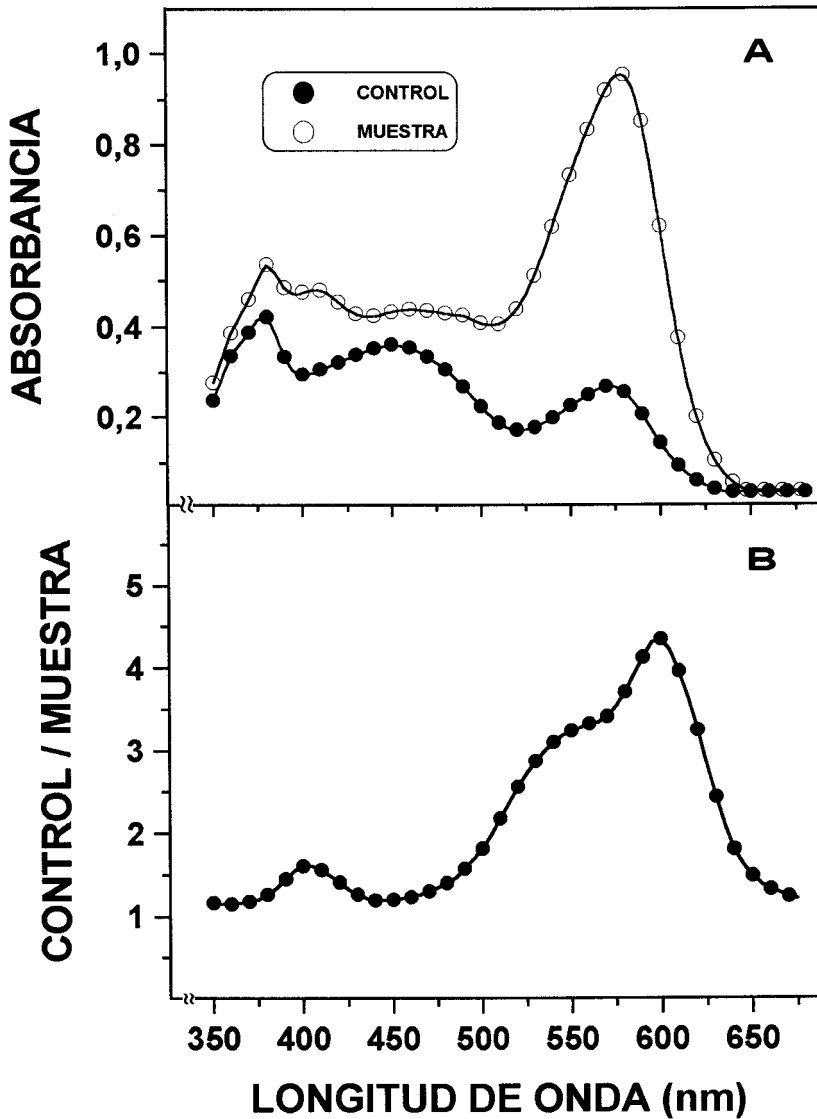
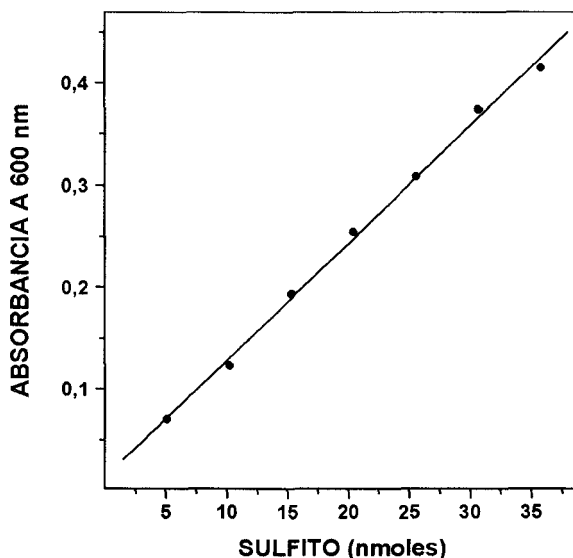


Fig. 8. Espectro de absorción del complejo resultante en la determinación de sulfito. A. Se procedió según se describe en el texto para una muestra conteniendo sulfito  $15 \mu\text{M}$  y para una muestra control. B. Optimización de la longitud de onda para la determinación de sulfito mediante la determinación de la máxima relación control / muestra.

El coeficiente de extinción a 600 nm se determinó en la zona 0-50 nmoles de sulfito. La Fig. 9 muestra una calibración tipo.



**Fig. 9. Calibración tipo para la determinación de sulfito.** Las muestras, conteniendo entre 0-50 nmoles de sulfito, se procesaron como se describe en el texto.

En estas condiciones, el coeficiente de extinción obtenido fue de  $\epsilon_{600} = 3,0 \times 10^{-2} \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

#### 4.5. Sulfuro

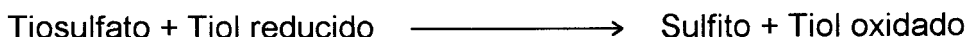
La medida de la concentración de sulfuro se basó en la microdeterminación directa descrita por Siegel (1965), que usa un método colorimétrico fundamentado en la incorporación de sulfuro al azul de metileno en presencia de N,N-dimetil-p-fenilendiamina. A una muestra de 1 ml, conteniendo entre 2 y 80 nmoles de sulfuro, en un tubo cerrado con tapón de goma, se le añadían (utilizando jeringa tipo Hamilton) 0,1 ml de disolución de sulfato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina 0,02 M disuelto en HCl 7,2 N y 0,1 ml de disolución de  $\text{FeCl}_3$  0,03 M en HCl 1,2 N. Tras agitación, se mantenía en la

oscuridad durante 20 min y se medía entonces la absorbancia a 650 nm ( $\epsilon_{650} = 19.000 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## 5. Actividades enzimáticas

### 5.1. Tiosulfato reductasa

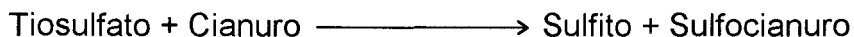
La actividad tiosulfato reductasa se determinó midiendo el sulfito liberado a partir de tiosulfato según la reacción:



La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 0,5 ml: 5  $\mu\text{moles}$  de tampón CHES-KOH, pH 9,5; 2,5  $\mu\text{moles}$  de ditiol (DTT o DTE) ó 5  $\mu\text{moles}$  de monotiol (GSH, cisteína); 5  $\mu\text{moles}$  de tiosulfato y la cantidad apropiada de preparación enzimática. Para la medida de actividad *in situ* se tomaban 0,25 ml de suspensión de células permeabilizadas con tolueno (correspondientes a 5 ml de cultivo con una concentración de clorofila de 20  $\mu\text{g/ml}$ ), como fuente de enzima. La reacción se inició mediante la adición de tiosulfato, y tras incubación a 50 °C durante 5 min, se detuvo por adición de 0,5 ml de disolución acuosa de  $\text{HgCl}_2$  0,23 M. Se centrifugó a 15.000 g durante 5 min, y se determinó sulfito en el sobrenadante según el método anteriormente descrito. Una unidad de actividad representa la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de sulfito por minuto.

## 5.2. Rodanasa

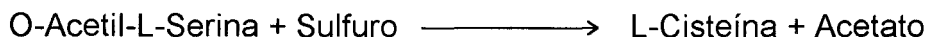
La actividad rodanasa se determinó siguiendo el método de Sörbo (1955) midiendo el sulfocianuro formado según la reacción:



La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 0,5 ml: 5  $\mu\text{moles}$  de tampón CHES-KOH, pH 9,5; 20  $\mu\text{moles}$  de cianuro, 5  $\mu\text{moles}$  de tiosulfato y la cantidad adecuada de preparación enzimática. Para la medida de actividad *in situ* se tomaban 0,25 ml de suspensión de células permeabilizadas con tolueno (correspondientes a 5 ml de cultivo con una concentración de clorofila de 20  $\mu\text{g/ml}$ ), como fuente de enzima. La reacción se inició mediante la adición de tiosulfato, y tras incubar a 50 °C durante 10 min, se detuvo por adición de 0,25 ml de  $\text{FeCl}_3$  0,5 M en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  20 % (v/v). Tras centrifugar a 15.000 g durante 10 min, se mide la absorbancia a 460 nm en el sobrenadante ( $\epsilon_{460} = 3,0 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). Una unidad de actividad representa la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de sulfocianuro por minuto.

## 5.3. O-Acetil-L-Serina sulfhidrilasa

La actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa se midió por determinación colorimétrica de la L-cisteína formada en la reacción:



La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1,5 ml: 50  $\mu\text{moles}$  de tampón fosfato potásico pH 7,5; 20  $\mu\text{moles}$  de O-acetil-L-serina; 10  $\mu\text{moles}$  de sulfuro sódico y la preparación enzimática necesaria para que se produjesen entre 0 y 400 nmoles de L-

cisteína. La reacción se inició mediante la adición de la disolución de sulfuro, y tras incubar a 50 °C durante 10 min, se detuvo por adición de 50 µl de TCA 20 % (p/v) y agitación vigorosa. La cisteína formada se determinó según el método previamente descrito. Una unidad de actividad representa la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de L-cisteína por minuto.

## 6. Concentración de proteínas

En general, la concentración de las proteínas se realizó mediante ultrafiltración en una unidad AMICON a través de una membrana Diaflo PM-10 de 1,5 nm de diámetro de poro que impide el paso de moléculas de peso superior a 10 kDa. El proceso se llevó a cabo a 4 °C bajo una presión constante de nitrógeno de 2 kg x cm<sup>2</sup> y con agitación suave de la preparación, la cual se concentraba hasta un volumen mínimo de 4 ml.

Para la concentración de volúmenes inferiores a 4 ml se utilizó una unidad de concentración MICROSEP de FILTRON tipo 10 K de límite de exclusión 10 kDa. El proceso se llevaba a cabo por centrifugación a 4 °C bajo una aceleración máxima de 7.500 g y las muestras se concentraban hasta un volumen mínimo de 35-50 µl.

## 7. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las electroforesis en geles de acrilamida se llevaron a cabo según el método descrito por Laemmli (1970) usando un gel separador al 10 % de acrilamida y un gel empaquetador al 4 %.

Para la preparación de los geles se utilizaron las siguientes disoluciones:

Disolución A: Acrilamida al 30 % (p/v) y bis-acrilamida al 0,45 % (p/v).

Disolución B: Tampón Tris-HCl 1,9 M, pH 8,8.

Disolución C: SDS al 20 % (p/v).

Disolución D: Tampón Tris-HCl 0,6 M, pH 6,8.

Disolución E: Persulfato amónico al 10 % (p/v). (Recién preparada).

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (comercial).

El gel separador contenía, por placa, 2 ml de A, 1 ml de B, 1,95 ml de agua destilada, 25  $\mu$ l de C, 3  $\mu$ l de TEMED y 25  $\mu$ l de E. El gel empaquetador contenía por placa, 0,375 ml de A, 0,520 ml de D, 1,55 ml de agua destilada, 12,5  $\mu$ l de C, 3  $\mu$ l de TEMED y 37,5  $\mu$ l de E. Se utilizaron geles de 1 mm de espesor y 8,2 cm de anchura, con longitudes para los geles, separador y empaquetador, de 4 y 0,5 cm respectivamente.

La disolución del gel separador se añadió al sistema formador de geles, tras lo cual se cubrió el menisco con 2-propanol; una vez polimerizado el gel (30-45 min) se eliminó el alcohol lavando con abundante agua destilada. A continuación, y sobre este gel, se vertió la disolución del gel empaquetador, se colocó rápidamente el peine, que fue retirado tras la polimerización (15-20 min). Los pocillos obtenidos se lavaron con agua destilada para eliminar los restos de acrilamida no polimerizada.

Las muestras con un volumen final de 15  $\mu$ l se mezclaron con 5  $\mu$ l de tampón de muestra que contenía Tris-HCl 0,48 mM pH 6,8; sacarosa al 80 % (p/v); azul de bromofenol al 40 % (p/v) y SDS al 16 % (p/v). Se les adicionó 1  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol comercial y tras hervirlas durante 2 min se aplicaron a los pocillos con ayuda de una jeringa Hamilton.

El tampón de electroforesis usado, de pH 8,3, contenía por litro: 1 g de SDS, 3,03 g de Trizma base y 14,4 g de glicina.

Antes de comenzar la electroforesis los geles se sometían a una intensidad de corriente de 10 mA/placa durante 10 min;

transcurrido este tiempo se cargaban las muestras y el sistema se mantenía a 20 mA/placa hasta que el azul de bromofenol alcanzaba el final de la placa.

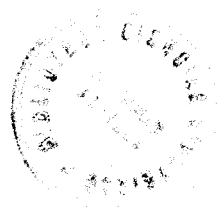
### **7.1. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida**

Para conseguir la tinción, los geles se sumergían durante 30 min con agitación suave y continua en una disolución de azul de Coomassie R-250 al 0,1 % (p/v) en etanol al 25 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v). Posteriormente los geles se lavaban con agua destilada para eliminar el exceso de reactivo y se desteñían mediante sucesivos lavados en una disolución de etanol al 25 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v) hasta que el fondo se decoloraba completamente mientras las bandas de proteína permanecían teñidas de azul. Finalmente se sumergían durante 15 min en una disolución de ácido acético al 7 % (v/v) para fijar la tinción.

### **7.2. Tinción de actividades tiosulfato reductasa y rodanasa**

Para teñir la actividad tiosulfato reductasa se sumergían los geles en una mezcla de reacción conteniendo tampón CHES-KOH 10 mM pH 9,5, tiosulfato sódico 10 mM y DTE 5 mM, durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaba con abundante agua destilada, y se sumergía en una disolución acuosa de azul de nitrotetrazolio 0,4 mg/ml durante 2 min. Se volvía a lavar con abundante agua destilada y finalmente se sumergía en una disolución acuosa de metosulfato de fenazina 0,1 mg/ml. Al cabo de 1-2 min aparece la banda de actividad, de color violeta, con suficiente contraste.

Para la actividad rodanasa, el proceso era esencialmente el mismo, salvo el uso de cianuro 20 mM en lugar de DTE.





## 8. Diálisis

Las membranas de diálisis (bolsas de celulosa SERVA, de tamaño de poro 2,4 nm) eran sometidas a un tratamiento previo que consistía en hervirlas durante 20 min en una disolución de  $\text{NaHCO}_3$  al 0,1 % (p/v) y EDTA al 0,01 % (p/v) y lavarlas a continuación con abundante agua destilada. Posteriormente se almacenaban en una disolución de etanol al 25 % (v/v) a 4 °C hasta su uso. Las membranas se lavaban exhaustivamente con agua destilada antes de introducir las preparaciones.

La eliminación de sales y moléculas pequeñas de las preparaciones enzimáticas se realizó introduciendo las mismas en las bolsas de celulosa y sumergiéndolas en un volumen del mismo tampón de la muestra 1.000 veces mayor, y en ausencia de las moléculas a eliminar. El tratamiento se realizó a 4 °C y se prolongó durante al menos 12 h.

Para pequeños volúmenes de muestra (inferiores a 1 ml) se realizaron microdiálisis utilizando tubos de microcentrífuga a los que se les abría un orificio en el tapón. El tubo se tapaba y cerraba ajustando con una membrana de diálisis y se colocaba flotando boca abajo sobre el tampón de diálisis, cuidando de no dejar burbujas de aire entre la membrana y el tampón. El proceso se prolongó igualmente durante 12 h y se realizó a 4 °C, con agitación suave.

## 9. Reactivos

Las sales utilizadas en grandes cantidades para la preparación de medios de cultivo y tampones, así como los ácidos acético, clorhídrico y sulfúrico, o los hidróxidos sódico y potásico fueron suministrados por Panreac. Las sales de cationes metálicos usadas para la preparación de los medios de cultivo y los fosfatos de sodio y potasio fueron adquiridas a Merck, así como algunos líquidos como acetona, etanol, tolueno, fenol, etilenglicol,  $\beta$ -mercaptoetanol,

ácido fosfórico, y algunos compuestos utilizados para determinaciones analíticas como el tiosulfato y el cianuro sódicos, tartrato sódico-potásico, reactivo Folin-Ciocalteu, formaldehído, fucsina, ninhidrina, acetato de cadmio. También fueron adquiridos a Merck el bicarbonato sódico, azida sódica, sacarosa, sulfuro sódico, EDTA e hipoclorito sódico.

El sulfato sódico marcado radiactivamente fue adquirido a Amersham International, Buks, U.K. El líquido de centelleo usado fue "Ready Protein" de Beckman.

Otros reactivos usados con fines analíticos como el azul brillante de Coomassie G, Trizma base, fenilgloxal, piridoxal-5'-fosfato, N,N-dimetil-p-fenilendiamina, glutatión, O-acetil-L-serina, glicina, azul de nitrotetrazolio, metosulfato de fenazina, marcadores de bajo peso molecular, sulfato de protamina o sulfato de estreptomina, DTT, DTE, L-cisteína, DOC, TCA, fueron suministrados por SIGMA.

Biorad suministró los reactivos utilizados en electroforesis, como acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, SDS, azul de bromofenol y persulfato amónico.

Las matrices cromatográficas DEAE-sefacel y Fenil-sefarosa fueron suministradas por Pharmacia, los reactivos con fines microbiológicos por Difco, las membranas de diálisis por Serva, las de concentración por AMICON y los sistemas de microconcentración por FILTRON.

El agua utilizada en todos los experimentos había sido primero desionizada mediante un desionizador Aqualab (Afora) y posteriormente destilada mediante un destilador Aquatron A8S.

El anhídrido carbónico y otros gases, así como el nitrógeno líquido fueron suministrados por la Sociedad Española del Oxígeno (SEO).

## 10. Aparatos

Las pesadas se efectuaron en balanzas Mettler, modelos PC 2200 y AE 160 y las medidas de pH se realizaron con un pH-metro Beckman modelo  $\emptyset$ 71.

Las esterilizaciones de medios de cultivo se realizaron en autoclaves Selecta modelos Austester 437-G y 437-P.

Los experimentos con radiactividad se llevaron a cabo en un aparato Warburg, modelo Aminco. Las medidas de radiactividad se realizaron en un contador de centelleo Beckman, modelo LS-6000IC.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en los espectrofotómetros ultravioleta-visible Beckman (modelo DU-7), Bausch & Lomb (modelo Spectronic 2000) y Shimadzu (modelo UV-1203), utilizando cubetas de 1 cm de paso de luz, de cuarzo, vidrio o plástico.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en centrífugas refrigeradas Beckman, modelo J2-21 con rotores JA-20 y JA-14 y Sorvall, modelo RC-5b, con rotores SS-34 y GSA; ésta última también se utilizó para la recolección de grandes volúmenes de biomasa mediante la adaptación de un sistema de flujo continuo SORVALL KSB al rotor SS-34. Para volúmenes de muestra inferiores a 1,5 ml se utilizaron centrífugas Heraeus, modelo Labofuge y Eppendorf, modelo 5415.

Las cromatografías se realizaron utilizando columnas de vidrio, bombas peristálticas (modelos P1 y Microperpex 2132) y colectores de fracciones Frac-100 y Redirac 2112 de Pharmacia-LKB. La absorbancia a 280 nm de las fracciones recolectadas se midió con un monitor ultravioleta Uvicord SII, modelo 2238, acoplado a un registrador, modelo 2210, ambos de LKB.

Los ensayos a temperatura constante fueron realizados en baños termostatzados Selecta, modelos Multibloc, Tectron S-5543 y Precis-Term.

La agitación de disoluciones se llevó a cabo bien con agitadores magnéticos Selecta, modelo Agimatic, o utilizando un Mixer 820 de Swelad.

Las electroforesis verticales se realizaron en una unidad de electroforesis Mighty Small II, modelo SE-250 de HOEFER.

Los geles de proteína teñidos, se fotografiaron con una máquina Minolta con lente de aproximación equipada con película Kodolith.

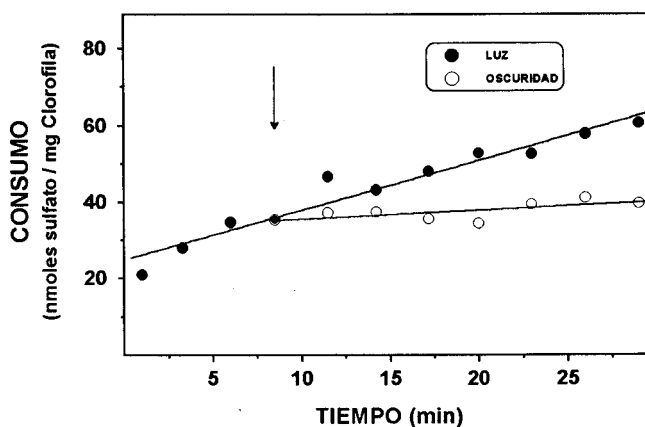
### III. RESULTADOS

#### 1. Consumo de sulfato por células de *C. reinhardtii*

##### 1.1. Caracterización del consumo

La representación de la radiactividad (medida en cpm) acumulada dentro de las células de *C. reinhardtii* frente al tiempo resultó ser una línea recta durante los 25-30 primeros min del experimento. A partir de este momento se producían resultados inconsistentes, al parecer por problemas de agregación celular.

La pendiente de la recta obtenida en la representación de cpm frente al tiempo se consideró el valor de la velocidad de consumo, que expresamos en nmoles de sulfato por mg de clorofila y por hora. El consumo de sulfato se mostró absolutamente dependiente de luz (Fig. 10) y no se alteró por la presencia adicional de bicarbonato 20 mM (datos no mostrados).



**Fig. 10. Consumo de sulfato por células de *C. reinhardtii*. Efecto de la luz.** El experimento de consumo se realizó como se describe en Materiales y Métodos. En el momento indicado por la flecha, el cultivo se dividió en dos partes; una de ellas se mantuvo en las mismas condiciones iniciales, y la otra se pasó a oscuridad envolviendo el recipiente en papel aluminio.

## 1.2. Estudios cinéticos

La representación de los valores iniciales de velocidad obtenidos con distintas concentraciones de sulfato en el medio frente a la concentración externa de sulfato mostró una cinética tipo Michaelis (Fig. 11), alcanzándose, a partir de 200  $\mu\text{M}$  de sulfato, un valor de velocidad máxima de 200 nmoles sulfato / mg Chl  $\cdot$  h.

La representación de Eadie-Hofstee (Fig. 11, interior) demostró la existencia de dos  $K_m$ , cuyos valores fueron alrededor de 10 y 40  $\mu\text{M}$  respectivamente, que se corresponden a su vez con velocidades máximas de 0,1 y 0,2  $\mu\text{moles}$  de sulfato por mg de clorofila y hora respectivamente. La representación de Hill de los datos anteriores dio un valor de  $n = 0,9$ , lo que sugiere un cierto grado de cooperatividad negativa suponiendo la existencia de una sola permeasa para sulfato en *C. reinhardtii*. No obstante, no podemos excluir la existencia de dos sistemas de transporte con diferentes afinidades por sulfato.

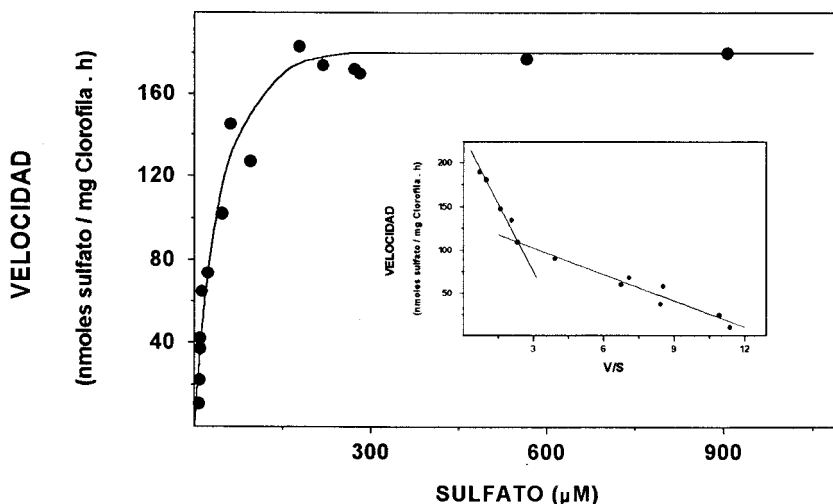


Fig. 11. Consumo de sulfato por células de *C. reinhardtii*. Estudios cinéticos. Se muestra la velocidad de consumo de sulfato por las células en función de la concentración inicial del mismo. En la parte interior se recoge la representación de Eadie-Hofstee de los datos obtenidos. Más detalles en Materiales y Métodos.

Por su parte, la Fig. 12 muestra que la velocidad de consumo de sulfato por células de *C. reinhardtii* es máxima a pH 7,0, que coincide bien con el pH habitual del medio de cultivo.

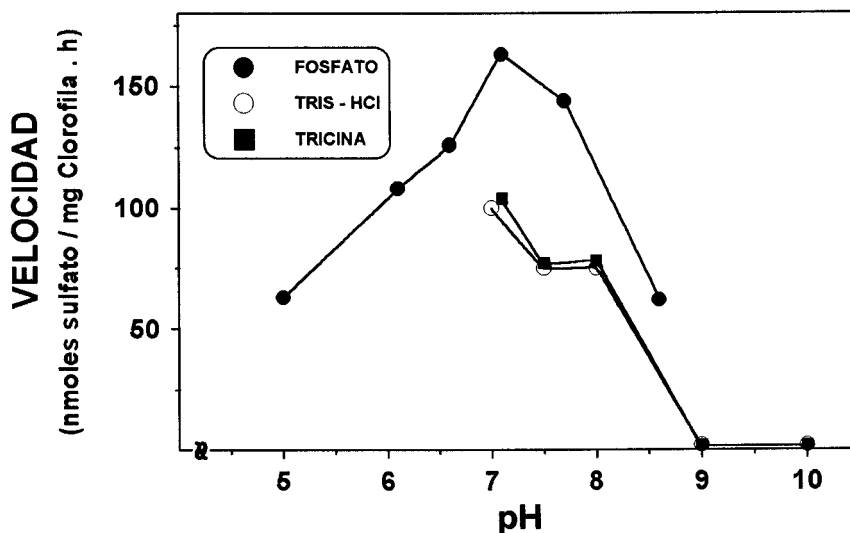


Fig. 12. Efecto del pH del medio de cultivo sobre el consumo de sulfato por *C. reinhardtii*. Se determinó la velocidad de consumo de sulfato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, utilizando los tampones indicados.

### 1.3. Regulación del consumo

Se realizaron experimentos de consumo de sulfato con células de *C. reinhardtii* sometidas a distintos tiempos en condiciones de carencia de azufre. Los resultados mostrados en la Fig. 13 indican que al cabo de 10 min de experimento la cantidad de radiactividad acumulada es 3 veces superior en células sometidas a hambre de azufre durante 2 h y 13 veces superior si el periodo previo de hambre de azufre se alargaba hasta 24 h. Llama poderosamente la atención la alta afinidad por sulfato de las células sometidas previamente a

hambre de azufre que hace que éstas se llenen inmediatamente de sulfato al iniciar el experimento.

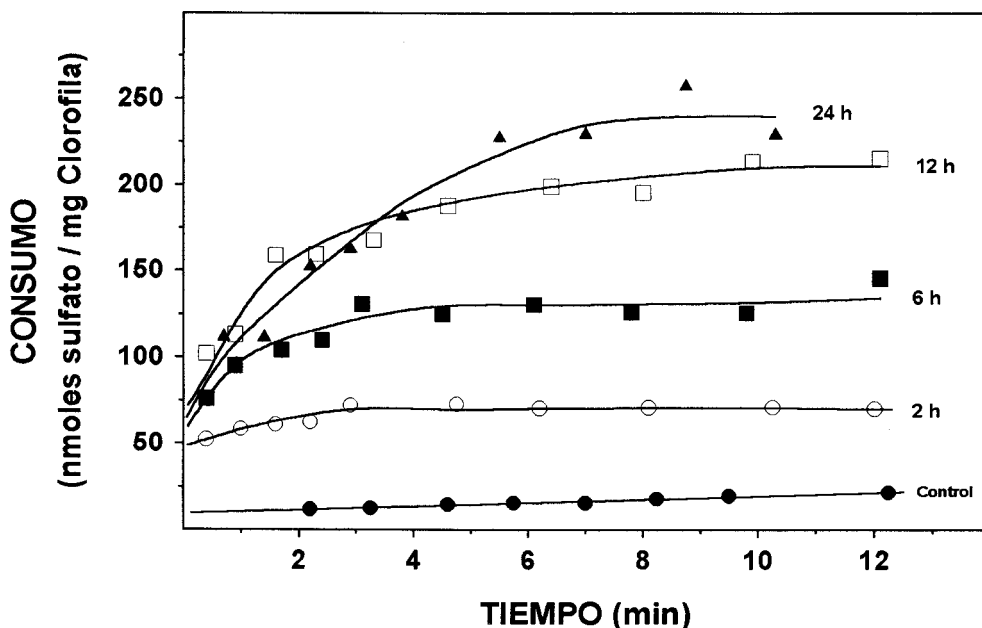


Fig. 13. Consumo de sulfato por células de *C. reinhardtii* sometidas previamente a carencia de azufre. Células cultivadas en las condiciones estándar con sulfato 0,3 mM se recogieron, lavaron y resuspendieron, a una concentración final de 25  $\mu\text{g}$  de clorofila por ml en medio fresco de cultivo carente de azufre, y se mantuvieron en condiciones de crecimiento durante los tiempos indicados. Las células así tratadas se utilizaron para estudios de consumo de sulfato, que se realizaron según se indica en Materiales y Métodos.

Se estudió también el efecto de la presencia de diferentes aniones del tipo  $\text{XO}_4^{2-}$  sobre el consumo de sulfato en condiciones de saturación (1 mM de sulfato externo). Los resultados mostrados en la Tabla 5 indican que en todos los casos hay inhibición apreciable del consumo de sulfato, si bien cromato, tiosulfato y seleniato resultaron ser los más eficaces al inhibir casi completamente el consumo de sulfato, cuando su concentración en el medio fue de 3 mM.



La Fig. 14 muestra la representación de Dixon para los datos obtenidos en un estudio más detallado de la inhibición por tiosulfato, que interfiere competitivamente el consumo de sulfato, con una  $K_i$  de 60  $\mu\text{M}$ .

Tabla 5. Efecto de aniones divalentes sobre el consumo de sulfato por células de *C. reinhardtii*

Anión	Consumo de sulfato (%)		
	0,3 mM	1 mM	3 mM
Sulfito	81	52	41
Seleniato	42	19	19
Cromato	22	0	0
Molibdato	75	67	28
Wolframato	81	80	80
Tiosulfato	71	46	20

Células crecidas en condiciones estándar de cultivo se prepararon para experimentos de consumo de sulfato, según se indica en Materiales y Métodos, excepto que en cada caso se incluyó además el anión a la concentración que se muestra. La velocidad de consumo sin inhibidor (100 %) fue de 165 nmoles sulfato/mg Clorofila · h.

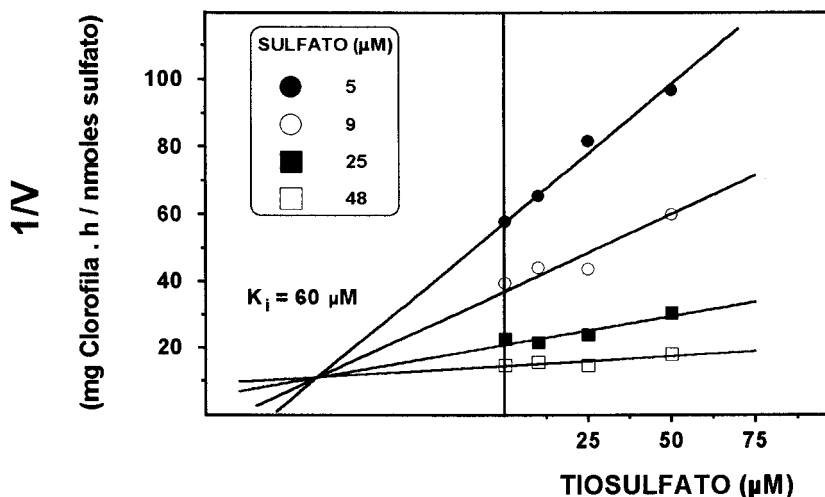


Fig. 14. Inhibición por tiosulfato del consumo de sulfato por células de *C. reinhardtii*. Se determinó velocidad de consumo de sulfato por las células como se describe en Materiales y Métodos, pero incluyendo en cada caso la concentración de tiosulfato para cada concentración de sulfato. La figura muestra la representación de Dixon de los resultados obtenidos.

## 2. Estudio de las actividades tiosulfato reductasa y rodanasa de *C. reinhardtii*

El hecho de que el tiosulfato fuese inhibidor competitivo del consumo de sulfato sugirió el estudio de enzimas que pudiesen utilizar tiosulfato como sustrato. Se detectaron en extractos crudos de *C. reinhardtii* las actividades tiosulfato reductasa y rodanasa, y se procedió a caracterizarlas.

### 2.1. Caracterización de las actividades TSR y RDN

La actividad tiosulfato reductasa, medida *in situ* e *in vitro* (extractos crudos), requiere tiosulfato y un tiol como sustratos de la reacción que cataliza, como se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6. Caracterización de la actividad tiosulfato reductasa de *C. reinhardtii***

Sistema	Actividad tiosulfato reductasa (%)	
	<i>in vitro</i>	<i>in situ</i>
Completo	100	100
- Tiosulfato	0	0,1
- DTE	0,8	2,2
- Enzima	1,2	0,5

El sistema completo contenía en un volumen final de 0,5 ml: 5  $\mu$ moles de tampón CHES-KOH, pH 9,5; 2,5  $\mu$ moles de DTE; 5  $\mu$ moles de tiosulfato y la cantidad apropiada de preparación enzimática. El 100 % de actividad *in vitro* fue de 5,37 U/ml, e *in situ* 0,93 U/mg Chl.

La enzima puede utilizar diferentes tioles como sustratos. Como se muestra en la Fig. 15, la máxima actividad se obtiene cuando se utiliza un ditiol reducido, como DTT o DTE, como sustrato (100 y 97,2 % de actividad relativa respectivamente). Para los

monotioles, la enzima muestra mucha menos actividad, siendo el más efectivo en cualquier caso la cisteína (23,9 %).

De manera análoga se caracterizó la actividad rodanasa. Como se muestra en la Tabla 7, la enzima requiere tiosulfato y cianuro como sustratos.

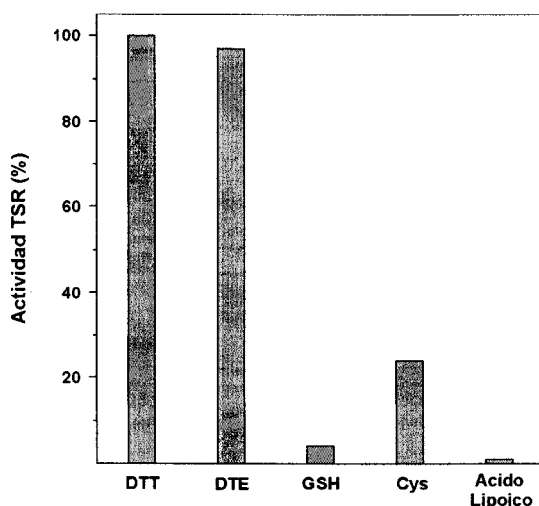


Fig. 15. Efecto de diferentes tioles sobre la actividad TSR de *C. reinhardtii*. Se determinó actividad tiosulfato reductasa en extractos crudos como se describe en Materiales y Métodos, usando distintos tioles como sustratos, a una concentración final de 10 mM para los monotioles y 5 mM en el caso de ditioles. El 100 % de actividad fue de 1,76 U/ml.

Una vez detectadas y caracterizadas las actividades, se estudiaron distintos métodos de rotura para la obtención de extractos crudos a partir de células de *C. reinhardtii*, de modo que la recuperación de actividad fuese la mayor posible. La Tabla 8 resume los valores obtenidos para ambas actividades como resultado de la obtención de extractos crudos mediante congelación/descongelación y por sonicación.



**Tabla 7. Caracterización de la actividad rodanasa de *C. reinhardtii***

Sistema	Actividad rodanasa (%)	
	<i>in vitro</i>	<i>in situ</i>
Completo	100	100
- Tiosulfato	0	0
- Cianuro	0,3	0,1
- Enzima	7,5	1,1

El sistema completo contenía en un volumen final de 0,5 ml: 5  $\mu$ moles de tampón CHES-KOH, pH 9,5; 20  $\mu$ moles de cianuro, 5  $\mu$ moles de tiosulfato y la cantidad adecuada de preparación enzimática parcialmente purificada. El 100 % de actividad *in vitro* fue de 1,90 U/ml, e *in situ* 0,44 U/mg Chl.

**Tabla 8. Niveles de actividad tiosulfato reductasa y rodanasa en extractos crudos de *C. reinhardtii***

Método de rotura	Proteína (mg/ml)	Act. enzimática (U/mg prot.)	
		DTE-TSR	RDN
Congelación	4,67	0,178	0,077
Sonicación	8,69	0,073	0,029

Las células se cultivaron en condiciones estándar con sulfato 0,3 mM como fuente de azufre. Durante la fase exponencial de crecimiento, se recogieron por centrifugación y se rompieron según se indica, y se determinaron ambas actividades como se describe en Materiales y Métodos.

Los mejores resultados de actividad específica corresponden a extractos crudos obtenidos mediante congelación/descongelación, de modo que se eligió este método para posteriores preparaciones. A continuación, se estudió el efecto del pH en la extracción de las actividades tiosulfato reductasa y rodanasa. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 9. Los mejores valores de actividad específica se obtuvieron a valores bajos de pH, usando tampón acético/acetato. Sin embargo, en cuanto a actividad total, se recuperaba la máxima cantidad en tampón fosfato, prácticamente la

misma cantidad a pH 6 y a pH 7 (0,366 y 0,363 U/ml respectivamente). En estos mismos extractos crudos se estudió la estabilidad de ambas actividades tras mantenerlas en frío, a 4 °C, durante 48 h. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 9. Efecto del tampón de extracción sobre los niveles de actividad tiosulfato reductasa y rodanasa en extractos crudos de *C. reinhardtii***

Tampón de extracción	pH	Proteína (mg/ml)	DTE-TSR (U/mg prot)	RDN
Acético/Acetato	4	0,294	0,588	0,203
Acético/Acetato	5	0,574	0,471	0,113
Fosfato potásico	6	1,805	0,203	0,095
Fosfato potásico	7	2,594	0,140	0,046
TRIS-HCl	8	2,659	0,085	0,017
CHES-KOH	9	2,751	0,103	0,032
CHES-KOH	10	2,937	0,103	0,031

Se recogieron células cultivadas en condiciones estándar y se obtuvieron extractos crudos por congelación/descongelación, utilizando los distintos tampones indicados, a una concentración final de 100 mM. Se midieron ambas actividades como se describe en Materiales y Métodos.

**Tabla 10. Efecto del tampón de extracción sobre la estabilidad de las actividades tiosulfato reductasa y rodanasa en extractos crudos de *C. reinhardtii***

Tampón de extracción	pH	Proteína (mg/ml)	DTE-TSR (U/mg prot)	RDN
Acético/Acetato	4	0,294	0,010	0,010
Acético/Acetato	5	0,574	0,023	0,007
Fosfato potásico	6	1,805	0,013	0,005
Fosfato potásico	7	2,594	0,014	0,003
TRIS-HCl	8	2,659	0,011	0,002
CHES-KOH	9	2,751	0,005	0,002
CHES-KOH	10	2,937	0,007	0,003

Se recogieron células cultivadas en condiciones estándar y se obtuvieron extractos crudos por congelación/descongelación, utilizando los distintos tampones indicados, a una concentración final de 100 mM. Después de incubar 48 h a 4 °C, se midieron ambas actividades como se describe en Materiales y Métodos.

En estas condiciones las actividades no eran estables a ninguno de los pH probados. De este modo no se podía afrontar un proceso de purificación con varias etapas. Se probó DTT como agente estabilizante y los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 11 y 12.

**Tabla 11. Efecto del DTT sobre la estabilidad de la actividad tiosulfato reductasa en extractos crudos de *C. reinhardtii***

Tampón de extracción	pH	Proteína (mg/ml)	Actividad DTE-TSR (U/mg prot)	
			t=0 h	t=48 h
Acético/Acetato	5	0,304	1,746	0,792
+ DTT	5	0,398	1,602	0,725
Fosfato potásico	6	2,512	0,284	0,017
+ DTT	6	2,730	0,322	0,238
CHES-KOH	9	3,216	0,214	0,039
+ DTT	9	3,477	0,281	0,129

Se recogieron células cultivadas en condiciones estándar y se obtuvieron extractos crudos con diferentes tampones, 100 mM, y donde se indica, DTT 2 mM. A los tiempos indicados se midió la actividad TSR según se indica en Materiales y Métodos.

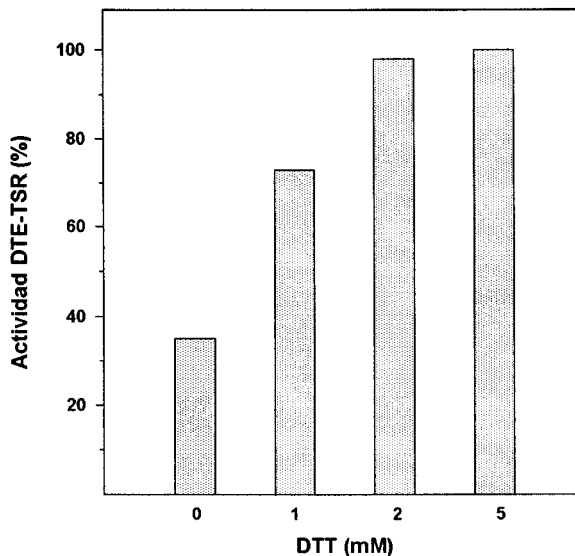
**Tabla 12. Efecto del DTT sobre la estabilidad de la actividad rodanasa en extractos crudos de *C. reinhardtii***

Tampón de extracción	pH	Proteína (mg/ml)	Actividad RDN (U/mg prot)	
			t=0 h	t=48 h
Acético/Acetato	5	0,304	0,681	0,306
+ DTT	5	0,398	0,467	0,245
Fosfato potásico	6	2,512	0,090	0,005
+ DTT	6	2,730	0,084	0,098
CHES-KOH	9	3,216	0,072	0,013
+ DTT	9	3,477	0,071	0,049

Se recogieron células cultivadas en condiciones estándar y se obtuvieron extractos crudos con diferentes tampones, 100 mM, y donde se indica, DTT 2 mM. A los tiempos indicados se midió la actividad RDN según se indica en Materiales y Métodos.

Como se aprecia en las tablas, en tampón acético/acetato, el DTT no ejerce ningún efecto estabilizante, pues para ambas actividades, la pérdida es similar (algo más del 50 %), independientemente de la presencia o ausencia de DTT. No obstante, su efecto es considerable en los otros dos tampones, donde la pérdida de actividad es significativamente menor en presencia de DTT.

Puesto que el DTT ejercía un efecto estabilizante sobre estas actividades, se optimizó la concentración del mismo para incluirlo en los tampones utilizados posteriormente en la purificación. Como se muestra en la Fig. 16, a partir de 2 mM la extracción de la actividad TSR es máxima.



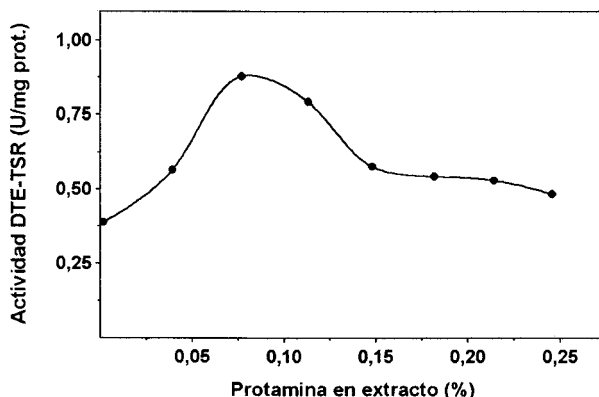
**Fig. 16. Efecto del DTT en el tampón de extracción sobre la actividad TSR de *C. reinhardtii*.** Se obtuvieron extractos crudos por congelación de las células, utilizando tampón CHES-KOH 10 mM pH 9,5, conteniendo distintas cantidades de DTT. El 100 % de actividad corresponde a 0,31 U/mg proteína. Más detalles en Materiales y Métodos.

## 2.2. Purificación de las actividades TSR y RDN

A partir de 29,5 g de células (peso fresco) se preparó un extracto crudo por congelación-descongelación y se procedió del modo siguiente:

### a) Tratamiento con sulfato de protamina

Mediante este tratamiento se separan sustancias, como ácidos nucleicos y pigmentos, que interfieren fuertemente en los posteriores procesos cromatográficos. La Fig. 17 muestra que la concentración óptima final de protamina en el extracto es de 0,077 % (p/v) para el caso de la tiosulfato reductasa. Según esto, al extracto crudo se le añadió lentamente disolución de sulfato de protamina al 2 % (p/v) en el mismo tampón de extracción, hasta alcanzar la concentración adecuada. Después de 10-15 min de agitación suave y continua a 4 °C para estabilización de la precipitación, se cetrifugó a 27.000 g durante 15 min, y el sobrenadante se utilizó como fuente de enzima para las posteriores etapas de purificación.



**Fig. 17. Efecto de la protamina en el extracto sobre la actividad tiosulfato reductasa de *C. reinhardtii*.** Alícuotas de un extracto crudo se tratan añadiendo distintas cantidades de sulfato de protamina. La mezcla se mantiene 15 min a 4 °C con agitación continua, se centrifuga a 15.000 g durante 15 min y se determina la actividad específica en cada caso.



### *b) Cromatografía en DEAE-sefacel*

El sobrenadante obtenido tras el tratamiento con sulfato de protamina, se filtró a través de una columna de intercambio iónico para realizar un primer fraccionamiento de las proteínas presentes en la preparación, en función de sus cargas eléctricas.

Las primeras cromatografías de este tipo se realizaron utilizando tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,5 conteniendo 2 mM de DTT pero los resultados obtenidos no fueron completamente satisfactorios. Por esta razón, se utilizó como tampón de trabajo para la purificación tampón CHES-KOH 10 mM pH 9,5, conteniendo 5 mM DTT.

El proceso cromatográfico puede describirse del modo siguiente: la preparación enzimática se pasó a través de una columna empaquetada con DEAE-sefacel, y equilibrada con tampón de trabajo, a un flujo máximo de 25 ml/h. Se lavó la columna con el mismo tampón y a continuación se eluyó la actividad correspondiente añadiendo al tampón 75 mM de KCl. Finalmente, se eluyó el resto de proteínas de la columna elevando hasta 2 M la concentración de sal. La Fig. 18 muestra el perfil de elución obtenido, apreciándose claramente una buena correlación en la elución de las tres actividades estudiadas. Las fracciones con mayor actividad se mezclaron y la preparación resultante se concentró por ultrafiltración y se suplementó con KCl hasta 300 mM antes de ser sometida a la siguiente etapa.

### *c) Cromatografía en Fenil-sefarosa*

Usualmente, para este tipo de cromatografía, la preparación enzimática se suplementaba con sulfato amónico para aumentar la fuerza iónica del medio y favorecer con ello las interacciones hidrofóbicas entre la matriz y las proteínas de la preparación. Sin embargo, para nuestra preparación era suficiente un aporte salino de

KCl de hasta 300 mM para conseguir la retención total de las actividades que nos interesaban.

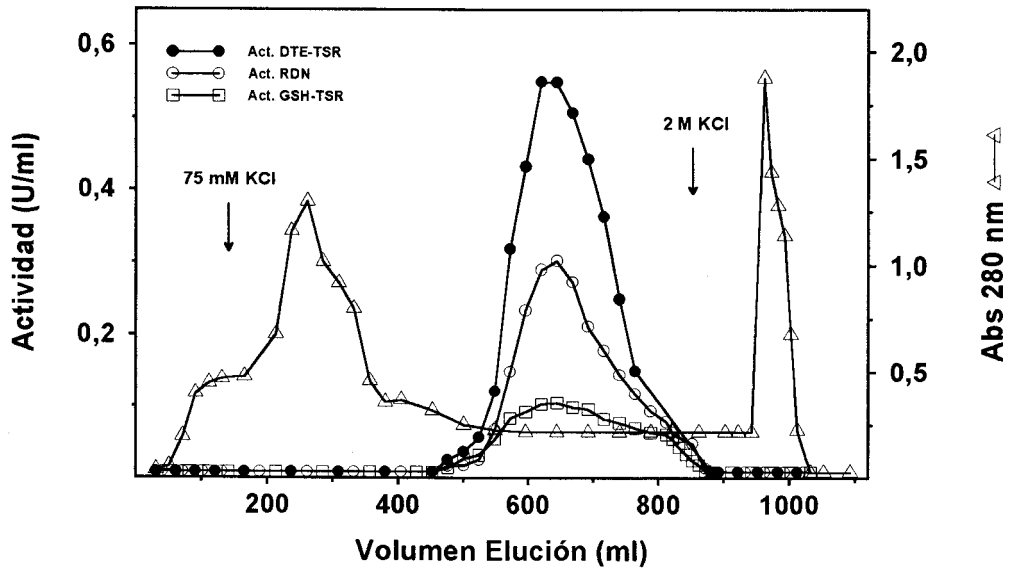
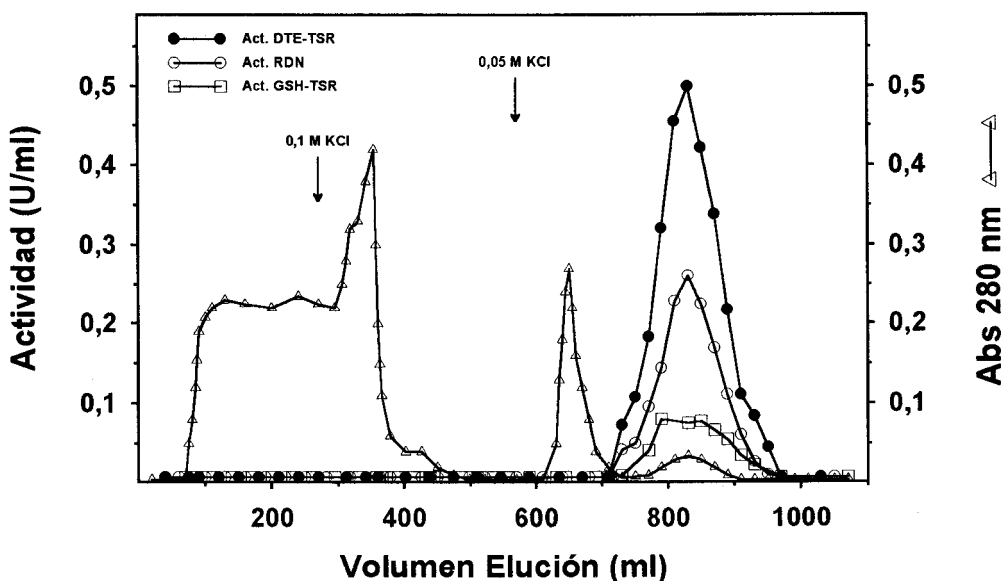


Fig. 18. Cromatografía en DEAE-sefacel de una preparación enzimática de *C. reinhardtii*. El sobrenadante del tratamiento con sulfato de protamina se filtró a través de una columna (1,6  $\phi$  x 40 cm) empaquetada con DEAE-sefacel. Las flechas indican las concentraciones salinas añadidas al tampón. Se recogieron fracciones de 3 ml. En las fracciones se midieron las actividades indicadas y la absorbancia a 280 nm. Más detalles en Materiales y Métodos.

Por ello, la preparación enzimática obtenida en la etapa anterior, con 300 mM de KCl se pasó a través de una columna empaquetada con Fenil-sefarosa y equilibrada con tampón de trabajo conteniendo 300 mM de sal. Posteriormente se lavó el lecho de la columna con el mismo tampón, conteniendo sucesivamente 300 mM y 100 mM de KCl. Las actividades enzimáticas estudiadas se eluyeron con 50 mM de sal. Finalmente, la columna se lavó con 30 % (v/v) de etilenglicol en el mismo tampón. El perfil de elución de la cromatografía se muestra en la Fig. 19. Al igual que sucediera en la etapa anterior, la coelución de las tres actividades seguidas es

evidente y en una zona con baja cantidad de proteína. Esto indica que dichas actividades podrían estar asociadas a la misma proteína. Las fracciones con mayor actividad se mezclaron y concentraron, y constituyen la fuente de enzima para posteriores experimentos.



**Fig. 19.** Cromatografía en Fenil-sefarosa de la tiosulfato reductasa y rodanasa de *C. reinhardtii*. La preparación enzimática resultante de la etapa anterior se suplementó con KCl hasta 300 mM y se sometió a una cromatografía hidrofóbica en una columna (1,6  $\phi$  x 40 cm) empaquetada con Fenil-sefarosa. La columna se lavó con el mismo tampón conteniendo 100 mM de sal y las actividades se eluyeron con el mismo tampón conteniendo 50 mM de KCl. Las flechas indican los cambios en la fase móvil. Se recogieron fracciones de 1,5 ml a un flujo máximo de 25 ml/h, donde se determinaron las actividades indicadas. Más detalles en Materiales y Métodos.

#### d) Tablas de purificación

El proceso de purificación descrito se resume en las Tablas 13, 14 y 15 para cada una de las actividades estudiadas.

**Tabla 13. Tabla de purificación para la actividad DTE-tiosulfato reductasa de *C. reinhardtii***

Etapa	Vol (ml)	Prot (mg)	Act. Total (U)	Act. Espec. (U/mg)	n	Rec (%)
Extracto crudo	140	569,0	164,2	0,29	1	100
Sbte. Sulfato de protamina	153	243,2	153,7	0,63	2,2	93,6
DEAE-Sefacel	278	9,7	81,1	8,39	29,1	49,4
Fenil-Sefarosa	11	0,7	30,9	44,42	154,0	18,8

Se realizó el proceso de purificación según se describe en el texto, a partir de 29,5 g de peso húmedo de células crecidas en condiciones estándar con sulfato 0,3 mM como fuente de azufre. Más detalles en Materiales y Métodos.

**Tabla 14. Tabla de purificación para la actividad GSH-tiosulfato reductasa de *C. reinhardtii***

Etapa	Vol (ml)	Prot (mg)	Act. Total (U)	Act. Específica (U/mg)	n	Rec (%)
Extracto crudo	140	569,3	33,6	0,059	1	100
Sbte. Sulfato de protamina	153	243,2	34,4	0,141	2,4	102,4
DEAE-Sefacel	278	9,7	14,7	1,516	25,7	43,6
Fenil-Sefarosa	11	0,7	2,6	3,79	64,2	7,8

Las condiciones fueron análogas a las descritas en la Tabla anterior.

**Tabla 15. Tabla de purificación para la actividad rodanasa de *C. reinhardtii***

Etapa	Vol (ml)	Prot (mg)	Act. Total (U)	Act. Específica (U/mg)	n	Rec (%)
Extracto crudo	140	569,3	93,7	0,165	1	100
Sbte. Sulfato de protamina	153	243,2	88,4	0,364	2,2	94,4
DEAE-Sefacel	278	9,7	43,3	4,48	27,2	46,3
Fenil-Sefarosa	11	0,7	17,6	25,26	153,0	18,7

Condiciones análogas a las descritas en la Tabla 13.

### 2.3. Propiedades cinéticas de la actividad DTE-TSR

#### a) Efecto del pH

En la Fig. 20 se muestra la dependencia de la actividad DTE-TSR con el pH en el intervalo comprendido entre 6 y 12 unidades.

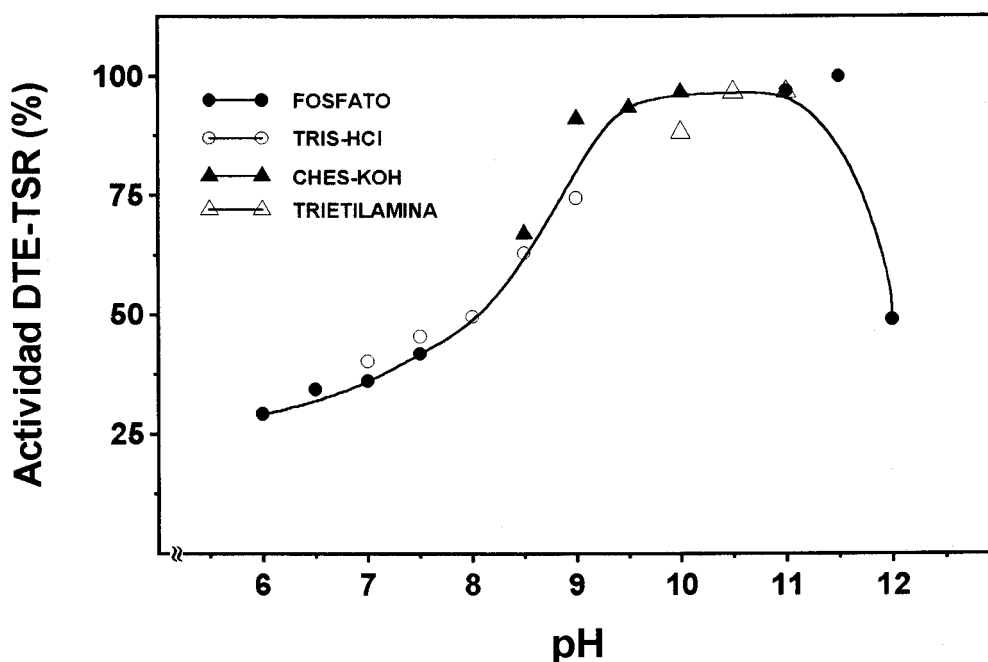


Fig. 20. pH óptimo para el ensayo de actividad DTE-tiosulfato reductasa de *C. reinhardtii*. Se midió DTE-TSR en la preparación purificada de la enzima pero usando el tampón correspondiente a una concentración de 50 mM en el ensayo, y el pH indicado. El 100 % de actividad corresponde a 2,2 U/ml.

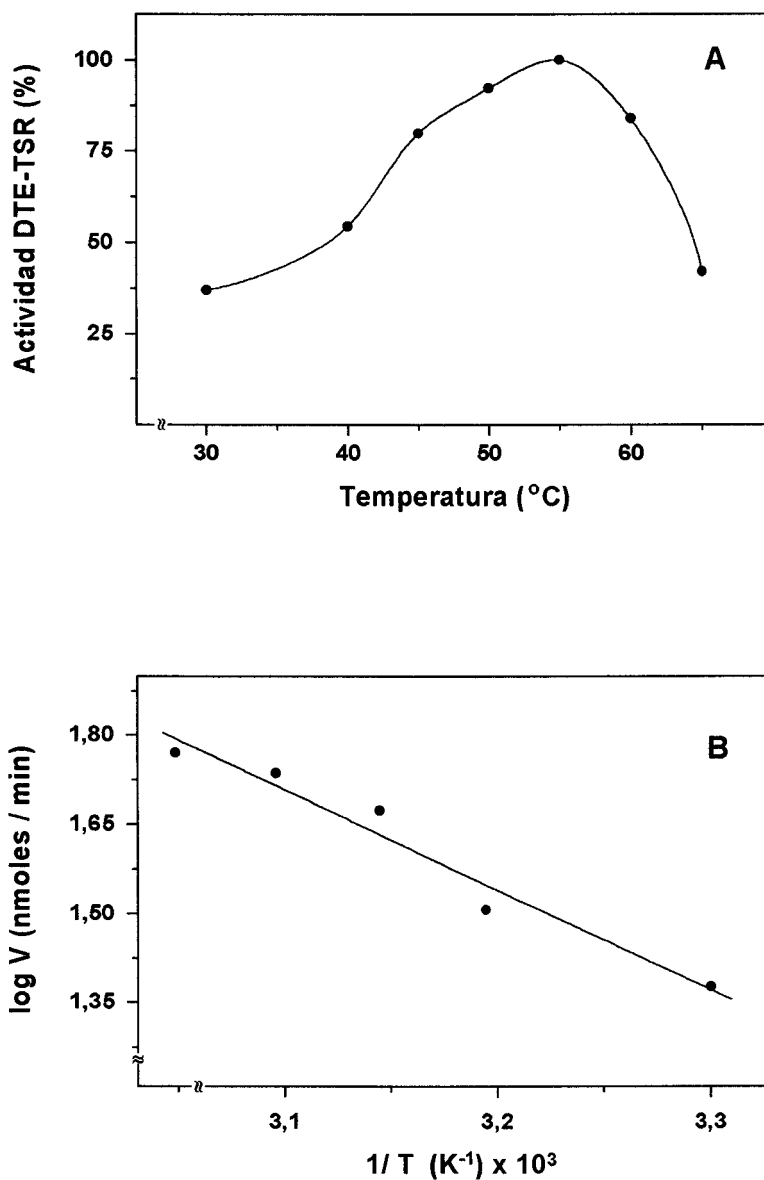
Existe una amplia zona de pH en la que la actividad es máxima, entre 9,5 y 11,5 aproximadamente. A medida que disminuye el valor del pH, lo hace también la actividad DTE-TSR detectada,

siendo de aproximadamente un 50 % a pH 8, y algo más del 25 % a pH 6.

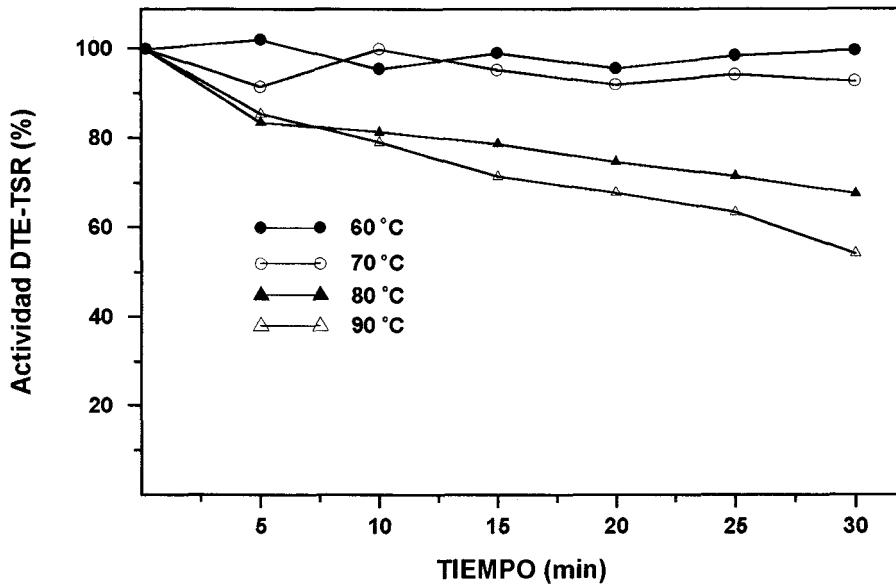
#### *b) Efecto de la temperatura*

El efecto de la temperatura sobre la actividad DTE-TSR se muestra en la Fig. 21A. La temperatura óptima de trabajo resultó ser 55 °C, si bien un incremento de sólo 5 °C supone una bajada de actividad hasta el 85 %, mientras que a 50 °C el nivel de actividad se mantiene por encima del 90 %. Por otra parte, la Fig. 21B muestra la representación de Arrhenius de las velocidades máximas a cada temperatura, en el intervalo 30-55 °C. Los valores obtenidos se disponen linealmente, siendo la pendiente de la recta ajustada proporcional a la energía de activación de la reacción catalizada por la enzima. Para esta reacción, el valor calculado a partir de los datos obtenidos fue de 32,2 kJ/mol.

Posteriormente se realizaron estudios de estabilidad de la actividad enzimática. Los resultados recogidos en la Fig. 22 muestran que tanto a 60 como a 70 °C, la enzima es estable incluso después de 30 min de incubación a estas temperaturas, conservando más del 90 % de actividad en ambos casos, de modo que el descenso de actividad observado a partir de 55 °C no se debe a inactivación de la enzima, sino más bien a posibles interferencias entre los sustratos o los productos de la reacción. A medida que aumenta la temperatura de incubación, disminuye el porcentaje de actividad que se conserva, siendo éste del 68 % a 80 °C y del 54 % a 90 °C.



**Fig. 21.** Temperatura óptima para el ensayo de la actividad DTE-tiosulfato reductasa. La actividad enzimática se midió como se describe en Materiales y Métodos, pero cambiando la temperatura de incubación, según se indica. El 100 % de actividad corresponde a 2,2 U/ml. **A.** Datos obtenidos. **B.** Representación de Arrhenius de los resultados en el intervalo 30-55 °C.

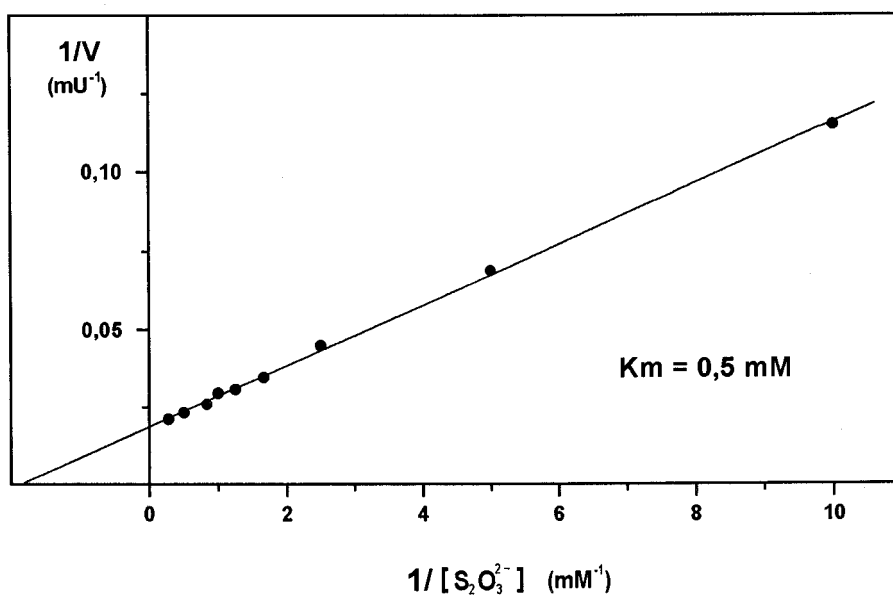


**Fig. 22. Inactivación térmica de la actividad DTE-tiosulfato reductasa de *C. reinhardtii*.** Preparaciones parcialmente purificadas de tiosulfato reductasa se incubaron a las distintas temperaturas en el tampón de ensayo de la actividad. A los tiempos indicados, se enfriaron los tubos en hielo y al final del experimento se completó la enzima con los reactivos del ensayo de actividad DTE-TSR, descrito en Materiales y Métodos, y se procedió a medir la misma. El 100 % de actividad corresponde a la preparación conservada a 4 °C y fue de 4,71 U/ml.

*c) Determinación de los valores de  $K_m$  para los distintos sustratos de la actividad DTE-TSR*

La Fig. 23 muestra el resultado de la determinación de la  $K_m$  para tiosulfato. Se determinaron también los valores de  $K_m$  para distintos tioles que la enzima puede utilizar como sustratos, tales como DTE, glutatión, DTT o cisteína. Los resultados se muestran en las figuras 24 y 25.





**Fig. 23.** Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de la  $K_m$  para tiosulfato de la tiosulfato reductasa de *C. reinhardtii*. Se midió la actividad DTE-TSR como se describe en Materiales y Métodos, salvo que la concentración de tiosulfato en el ensayo se varió como se indica en la figura. Se utilizó la preparación obtenida en el proceso de purificación.

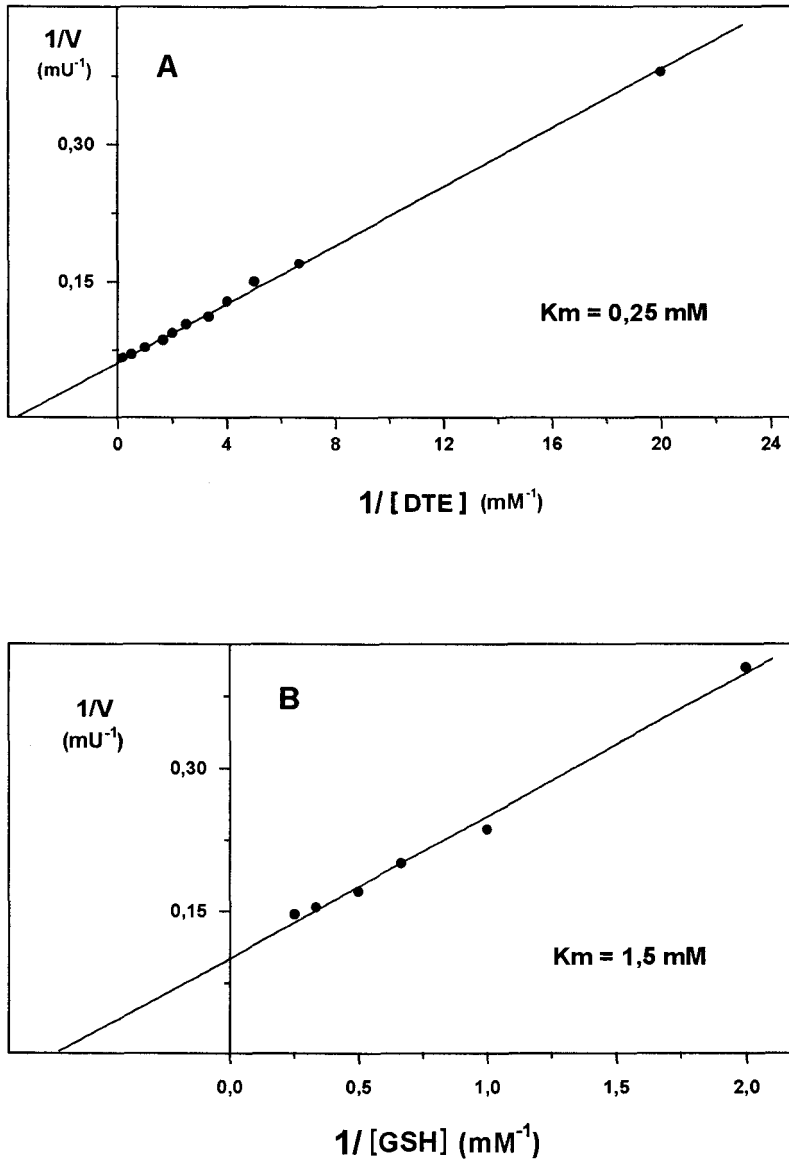
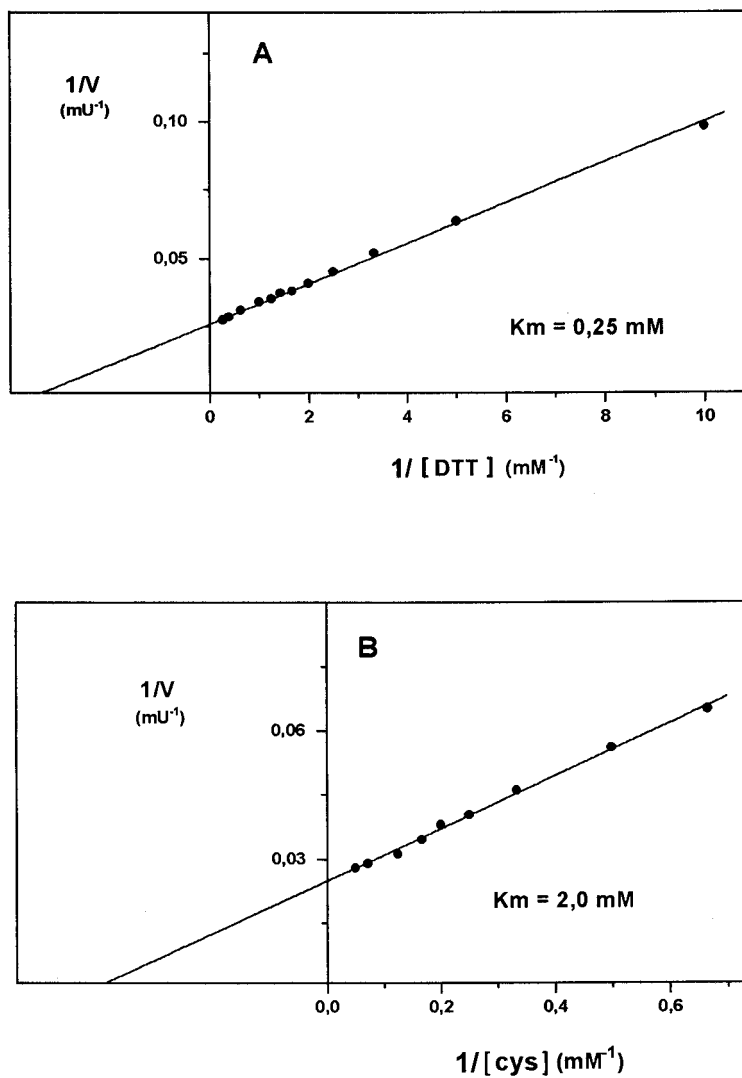


Fig. 24. Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de la  $K_m$  para DTE y Glutión de la tiosulfato reductasa de *C. reinhardtii*. Se midieron las actividades DTE-TSR, a distintas concentraciones de DTE (A), y GSH-TSR, a distintas concentraciones de glutión (B). Más detalles en Materiales y Métodos. Se utilizó la preparación parcialmente purificada de la enzima.



**Fig. 25.** Representación de Lineweaver-Burk para la determinación de la  $K_m$  para DTT y Cisteína de la tiosulfato reductasa de *C. reinhardtii*. Se midieron las actividades DTT-TSR, a distintas concentraciones de DTT (A), y Cys-TSR, a concentraciones variables de cisteína (B). Más detalles en Materiales y Métodos. Se utilizó la preparación parcialmente purificada de la enzima.

d) *Efecto de inhibidores sobre la actividad DTE-TSR*

En la Tabla 16 se muestra el efecto de algunos inhibidores sobre la actividad DTE-TSR. Los reactivos de grupos sulfhidrilo, no parecen afectar a la enzima, que aparenta ser más susceptible a la acción de reactivos de grupos amino, de modo que 1 mM de TNBS inhibe casi el 80 % de la actividad, lo que parece deberse a modificaciones en aminoácidos arginina, pues un reactivo específico de lisina, como es el piridoxal-5'-fosfato, casi no produce inhibición mientras que un reactivo específico de arginina como el fenilglioxal sí produce una fuerte inhibición de la actividad DTE-TSR.

**Tabla 16. Efecto de inhibidores sobre la actividad DTE-TSR en *C. reinhardtii***

Inhibidor	Conc. (mM)	Actividad DTE-TSR (%)		
		90 min	180 min	18 h
Control	---	100	100	100
MMTS	1	98,8	---	---
pHMB	0,01	102,7	102,3	101,6
pHMB	0,1	90,5	90,7	90,8
Iodoacetamida	1	98,0	94,0	94,3
TNBS	1	21,6	12,1	4,4
N-acetilsuccinimida	5	79,6	---	---
PLP	5	75,0	98,4	90,3
Fenilglioxal	5	28,3	31,7	10,2
2,3-Butanodiona	5	98,4	---	---
EDC+GEE	1+0,5	69,3	---	---

Alícuotas de una preparación enzimática parcialmente purificada, dializada frente a tampón CHES-KOH 10 mM pH 9,5, se incubaron a 4 °C junto con cada inhibidor. A los tiempos indicados, se midió la actividad DTE-TSR como se describe en Materiales y Métodos, pero incluyendo en la mezcla de ensayo el inhibidor indicado. El 100 % de actividad corresponde a la preparación dializada, concentrada y conservada a 4 °C, cuyo valor fue de 3,51 U/ml.

## 2.4. Propiedades cinéticas de la actividad RDN

### a) Efecto del pH

La Fig 26 muestra la variación con el pH de la actividad rodanasa, en el intervalo 6-12 unidades.

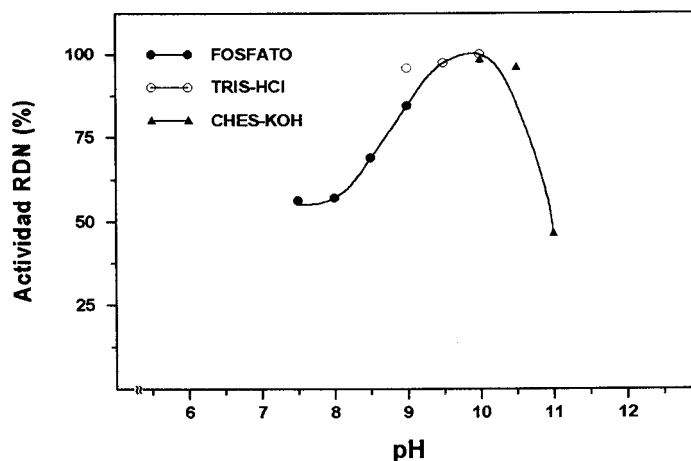


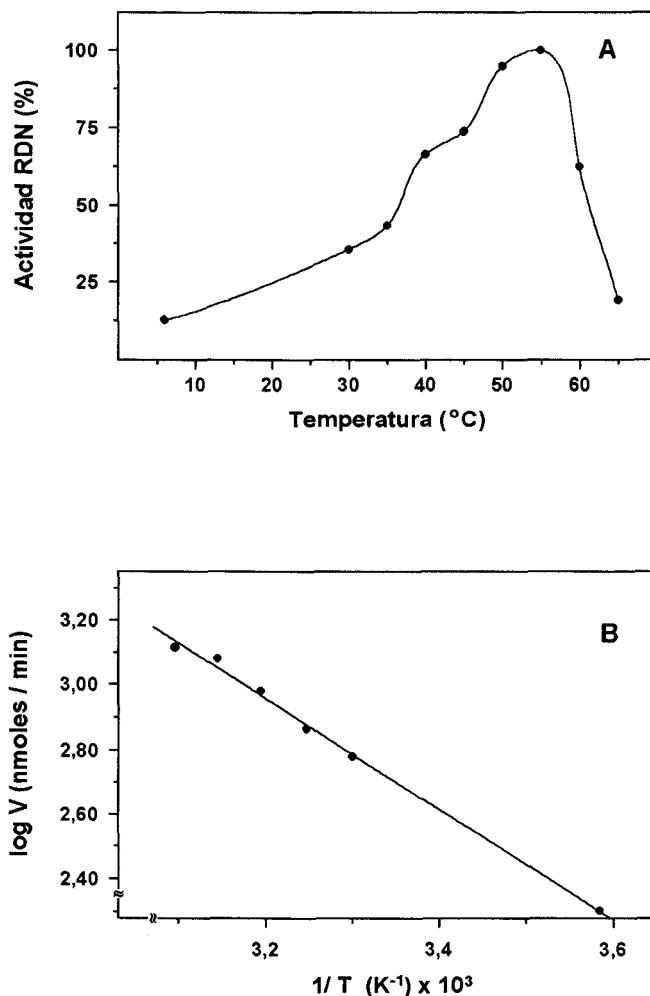
Fig. 26. Efecto del pH sobre la actividad rodanasa de *C. reinhardtii*. Se midió la actividad RDN utilizando como fuente de enzima una preparación parcialmente purificada, como se describe en Materiales y Métodos, pero utilizando el tampón correspondiente a una concentración de 50 mM en el ensayo. El 100 % de actividad corresponde a 0,40 U/ml.

La actividad es máxima entre pH 9,5-10 aproximadamente, mostrando una bajada significativa entre 10,5 y 11.

### b) Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura sobre la actividad RDN se muestra en la Fig. 27A. El máximo de actividad se alcanza a 55 °C, aunque a 50 °C ya se mide el 95 % de la misma, pasando a ser sólo del 62,3 %

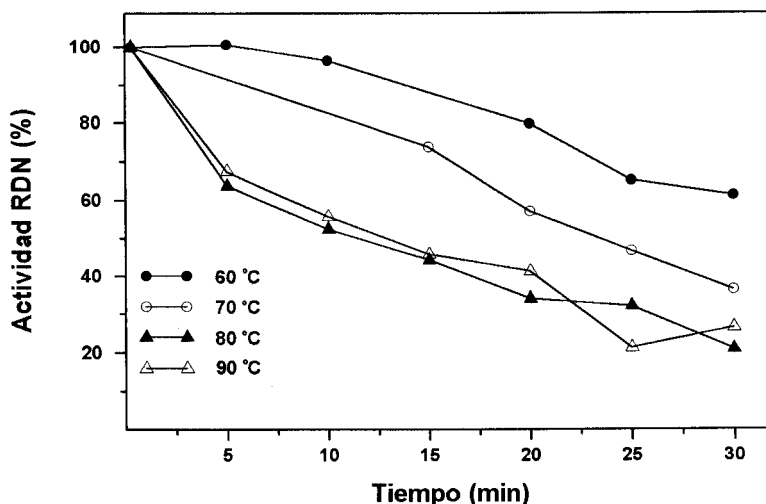
a 60 °C. Con los datos obtenidos se calculó la energía de activación de la reacción catalizada por la enzima, mediante la expresión de Arrhenius. La representación gráfica se muestra en la Fig. 27B.



**Fig. 27. Temperatura óptima de trabajo para la actividad rodanasa de *C. reinhardtii*.** Se midió actividad RDN utilizando como fuente de enzima una preparación parcialmente purificada, como se describe en Materiales y Métodos, pero cambiando la temperatura de incubación. El 100 % de actividad corresponde a 0,64 U/ml. **A.** Datos obtenidos. **B.** Representación de Arrhenius de los resultados en el intervalo 6-55 °C.

La energía de activación calculada para la rodanasa fue de 32,8 kJ/mol.

Por otra parte, la Fig. 28 muestra la resistencia a la inactivación térmica de la actividad rodanasa. Como puede apreciarse la incubación de la enzima a 60 °C durante 10 min supone una inactivación de sólo el 5 %, lo que indica que el descenso de actividad mostrado en la Fig. 27A a esta temperatura no se debe totalmente a la inactivación de la enzima sino que existe probablemente una interferencia significativa de reactivos y productos de la reacción. A esta temperatura, tras 30 min de incubación se conserva más del 60 % de la actividad inicial. A medida que la temperatura de incubación aumenta, disminuye la cantidad de actividad conservada tras el tratamiento, llegando a ser similar a 80 y 90 °C (21 y 26 % respectivamente).



**Fig. 28.** Inactivación térmica de la actividad rodanasa de *C. reinhardtii*. Preparaciones parcialmente purificadas de rodanasa se incubaron a las distintas temperaturas en el tampón de ensayo de la actividad. A los tiempos indicados, se enfriaron los tubos en hielo y al final del experimento se completó la enzima con los reactivos del ensayo de actividad RDN, descrito en Materiales y Métodos, y se procedió a medir la misma. El 100 % de actividad corresponde a la preparación conservada a 4 °C y fue de 1,30 U/ml.

c) Determinación de los valores de  $K_m$  para los distintos sustratos de la actividad RDN

Se determinó la  $K_m$  para tiosulfato. El resultado se muestra en la Fig. 29.

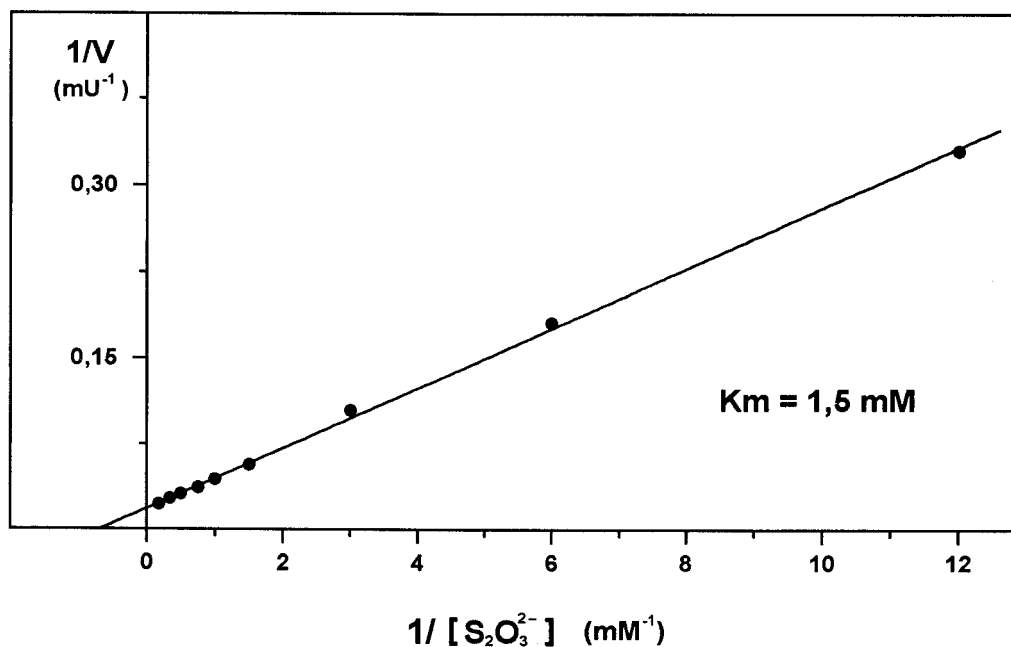


Fig. 29. Representación de Lineweaver-Burk para determinar la  $K_m$  para tiosulfato de la rodanasa de *C. reinhardtii*. Se midió la actividad RDN como se describe en Materiales y Métodos salvo que la concentración de tiosulfato en el ensayo se varió como se indica en la figura.

La determinación de  $K_m$  para el otro sustrato de la reacción catalizada por la rodanasa, el cianuro, se muestra en la Fig. 30.



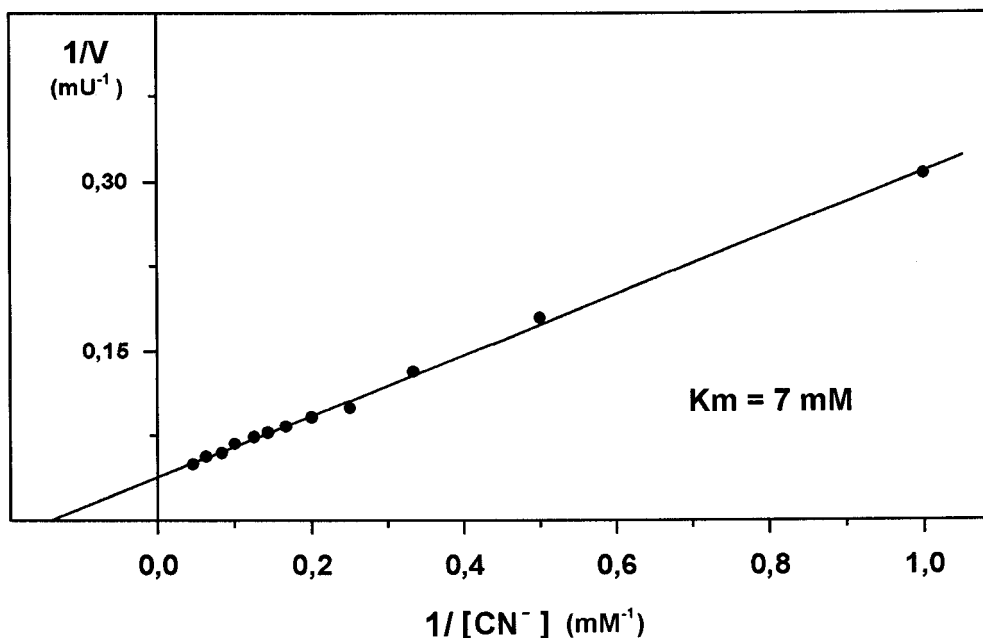


Fig. 30. Representación de Lineweaver-Burk para determinar la  $K_m$  para cianuro de la rodanasa de *C. reinhardtii*. Se midió la actividad RDN como se describe en Materiales y Métodos salvo que la concentración de cianuro en el ensayo se varió como se indica en la figura.

#### d) Efecto de inhibidores sobre la actividad rodanasa

Se estudió el efecto de algunos inhibidores sobre la actividad rodanasa. En primer lugar se observó que el DTE ejercía cierto efecto inhibitorio, y se realizó un estudio cinético. La Fig. 31 muestra la representación de dobles inversos de los datos obtenidos. El DTE resultó ser un inhibidor competitivo con el cianuro, con una  $K_i$  de 1 mM.

El efecto de otros inhibidores se resume en la Tabla 17. Como se observa, los reactivos de grupos sulfhidrilo no afectan a la actividad, mientras que reactivos de grupos amino producen una fuerte inhibición, fundamentalmente por modificación de residuos de arginina.

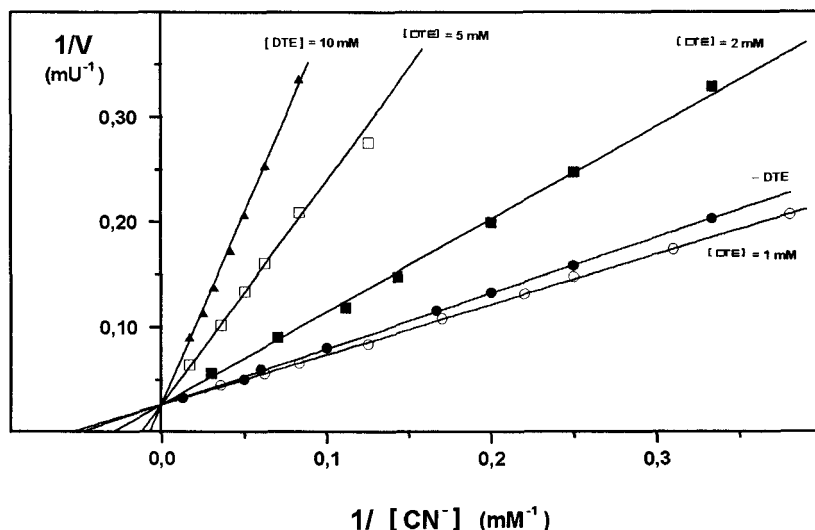


Fig. 31. Efecto del DTE sobre la actividad rodanasa de *C. reinhardtii*. Se midió la actividad RDN como se describe en Materiales y Métodos pero cambiando la concentración de cianuro y en presencia de las concentraciones indicadas de DTE.

Tabla 17. Efecto de inhibidores sobre la actividad RDN en *C. reinhardtii*

Inhibidor	Conc. (mM)	Actividad RDN (%)	
		90 min	180 min
Control	---	100	100
pHMB	0,01	119,0	115,6
pHMB	0,1	108,5	101,8
Iodoacetamida	1	65,2	52,2
TNBS	1	32,4	27,2
PLP	5	89,3	79,0
Fenilgloxal	5	13,5	20,8

Alícuotas de una preparación enzimática parcialmente purificada, dializada frente a tampón CHES-KOH 10 mM pH 9,5, se incubaron a 4 °C junto con cada inhibidor. A los tiempos indicados, se midió la actividad RDN como se describe en Materiales y Métodos. El 100 % de actividad corresponde a la preparación dializada, concentrada y conservada a 4 °C, cuyo valor fue de 0,73 U/ml.

### **3. Separación y caracterización de tres isoenzimas con actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de *C. reinhardtii***

La O-acetil-L-serina sulfhidrilasa (OASS) se denomina también O-acetil-L-serina(tiol)liasa (OAS-TL), y actualmente hay evidencias de que está asociada con la enzima serina acetil transferasa (SAT), formando el complejo funcional llamado cisteína sintasa. En nuestro trabajo vamos a utilizar la denominación O-acetil-L-serina sulfhidrilasa (OASS) en coherencia con trabajos anteriores.

#### **3.1. Purificación de las isoenzimas con actividad OASS**

Hasta ahora se habían descrito dos isoenzimas con actividad OASS en *C. reinhardtii* (León *et al.* 1987). Debido a que los datos recientes en la literatura continuaban siendo contradictorios acerca del número de isoenzimas OASS en organismos fotosintéticos, hemos considerado de interés hacer una revisión del número de isoenzimas presentes en este alga. Mediante el proceso que se describe a continuación hemos conseguido por primera vez separar y estudiar tres isoenzimas a partir de extractos crudos de *C. reinhardtii*.

El extracto crudo se sometió a un proceso análogo al descrito anteriormente para tiosulfato reductasa y rodanasa, que consiste en un tratamiento con sulfato de protamina para la separación de ácidos nucleicos y pigmentos por precipitación, y sucesivas cromatografías en DEAE-sefacel y Fenil-sefarosa.

##### *a) Tratamiento con sulfato de protamina*

Al extracto crudo se le añadía lentamente el 8 % de su volumen de una disolución de sulfato de protamina al 2 % (p/v) en el mismo tampón de extracción, para que la concentración final fuese de 0,16 %. Después de 10-15 min de agitación suave y continua a 4 °C para estabilización de la precipitación, se centrifugaba a 27.000 g

durante 15 min, y el sobrenadante se utilizaba como fuente de enzima para las posteriores etapas de purificación.

*b) Cromatografía en DEAE-sefacel*

El sobrenadante obtenido en la etapa anterior, se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sefacel. Como tampón de trabajo para la purificación se utilizó tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,5, conteniendo 2 mM DTT.

La preparación enzimática se pasó a través de una columna empaquetada con DEAE-sefacel, y equilibrada con tampón de trabajo. Después de lavar la columna con el mismo tampón se eluyó la primera isoenzima con actividad OASS añadiendo al eluyente 50 mM de KCl. Posteriormente, se eluyeron las otras dos utilizando un gradiente lineal de la misma sal entre 50 y 200 mM en tampón de trabajo. La Fig. 32 muestra el perfil de elución obtenido en este proceso.

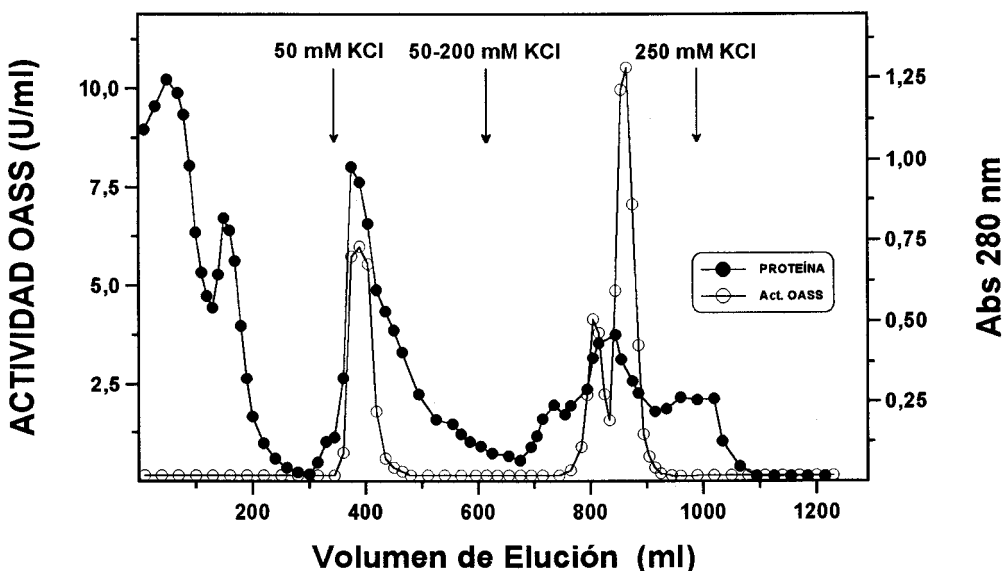


Fig. 32. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sefacel de una preparación de O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de *C. reinhardtii*. La preparación enzimática se aplicó a una columna (1,6  $\phi$  x 40 cm) empaquetada con DEAE-sefacel y equilibrada con tampón de trabajo, a un flujo máximo de 30 ml/h. Las flechas indican la concentración de KCl añadida al tampón de lavado. Se recogieron fracciones de 3 ml, donde se midió la actividad OASS y la absorción a 280 nm.

Las fracciones con actividad OASS se reunieron dando lugar a dos preparaciones, una con las fracciones correspondientes a la elución con 50 mM KCl (OASS<sub>1</sub>), y otra con las del gradiente salino (OASS<sub>2,3</sub>). Ambas preparaciones se sometieron a la siguiente etapa de purificación por separado.

### c) Cromatografía en Fenil-sefarosa para la preparación OASS<sub>1</sub>

Esta preparación se sometió a una cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa. Tras ser suplementada con sulfato amónico hasta el 10 % de saturación, se aplicó a una columna empaquetada con Fenil-sefarosa y equilibrada con tampón de trabajo, conteniendo 10 % de saturación de sulfato amónico. La columna se lavó sucesivamente con el mismo tampón conteniendo 10 %, 5 % y 0 %

de saturación de sulfato amónico. La Fig. 33 muestra el perfil cromatográfico obtenido.

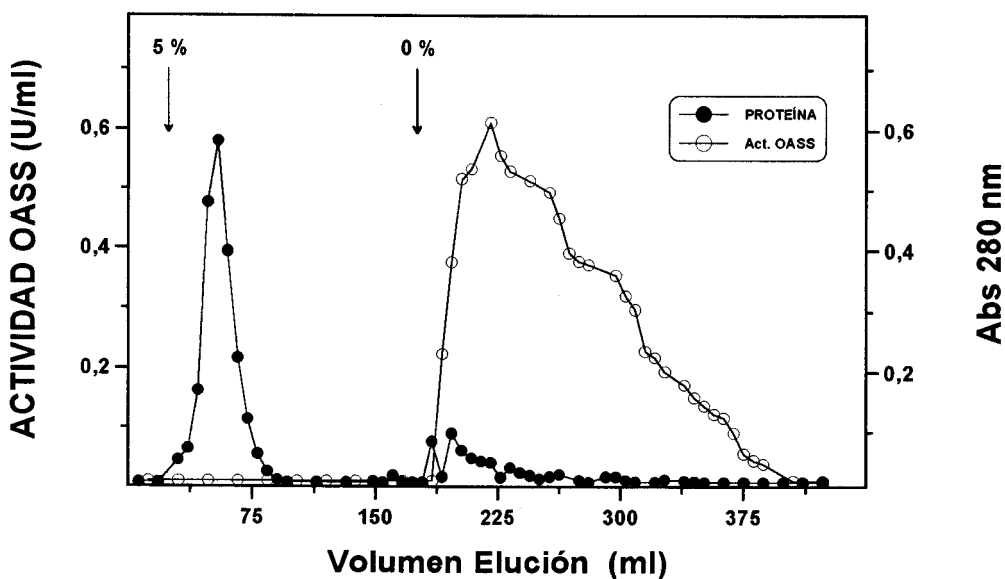
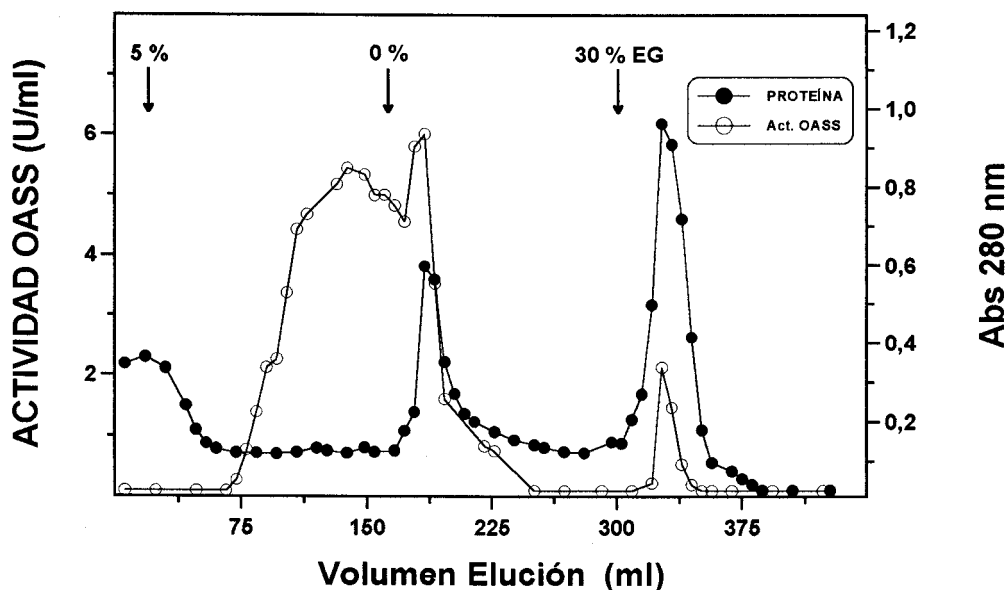


Fig. 33. Cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa de la preparación OASS<sub>1</sub> de *C. reinhardtii*. La preparación enzimática, conteniendo 10 % de saturación de sulfato amónico, se aplicó a una columna (1,6  $\phi$  x 20 cm) empaquetada con Fenil-sefarosa y equilibrada con tampón de trabajo conteniendo la misma cantidad de sulfato amónico, a un flujo máximo de 30 ml/h. Las flechas indican la cantidad de sulfato amónico en el tampón de trabajo. Se recogieron fracciones de 1,5 ml, donde se determinó la actividad OASS y la absorción a 280 nm.

#### d) Cromatografía en Fenil-sefarosa para la preparación OASS<sub>2,3</sub>

Para esta preparación se siguió el mismo proceso anterior, salvo que tras eluir con tampón de trabajo, se lavó con etilenglicol al 30 % (v/v) en el mismo tampón. La Fig. 34 muestra el perfil obtenido en el proceso.



**Fig. 34. Cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa de la preparación OASS<sub>2,3</sub> de *C. reinhardtii*.** La preparación enzimática, conteniendo 10 % de saturación de sulfato amónico, se aplicó a una columna (1,6  $\phi$  x 20 cm) empaquetada con Fenil-sefarosa y equilibrada con tampón de trabajo conteniendo la misma fuerza iónica, a un flujo máximo de 30 ml/h. Las flechas indican la cantidad de sulfato amónico o etilenglicol en el tampón de trabajo. Se recogieron fracciones de 1,5 ml, donde se determinó la actividad OASS y la absorción a 280 nm.

La actividad enzimática (OASS<sub>2</sub>) eluye mayoritariamente al 5 % de saturación de sulfato amónico. Es curioso y frecuente que cuando se quita la sal del tampón de elución incrementa la actividad que está saliendo, lo que se repite en los distintos experimentos realizados. Nosotros consideramos que ello se debe a un artefacto o bien a alguna impureza de OASS<sub>1</sub> (que siempre es menor del 10 %), que en la Fig. 33 vimos eluía al 0 % de sulfato amónico. Por otra parte, cuando se añade etilenglicol al 30 % (v/v) al tampón de lavado se produce la elución de un pico de actividad (OASS<sub>3</sub>) y otro bien definido de proteína. Para comprobar que esta última actividad era una isoenzima diferente y no un artefacto del proceso cromatográfico se sometió la isoenzima OASS<sub>2</sub> separada en la cromatografía anterior a una nueva cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa, y

condiciones análogas a las utilizadas previamente. El perfil de elución correspondiente se recoge en la Fig. 35, siendo de destacar la ausencia de actividad en las fracciones eluidas con etilenglicol al 30 %.

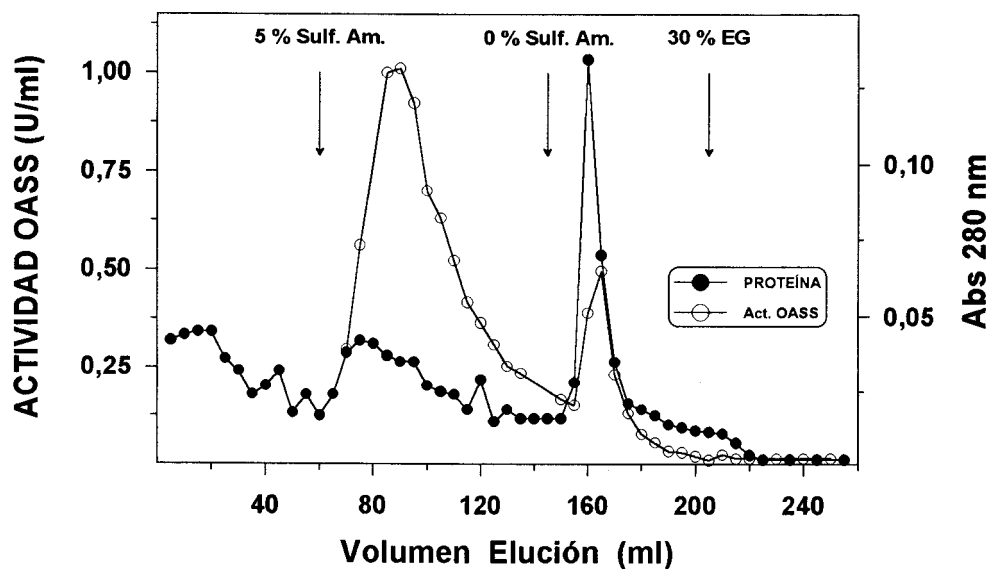


Fig. 35. Cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa de la preparación de OASS<sub>2</sub> obtenida en la cromatografía anterior. Se realizó una cromatografía en Fenil-sefarosa en una columna (1,6  $\phi$  x 10 cm) en las mismas condiciones de elución descritas anteriormente, salvo que el flujo máximo fue de 15 ml/h. Se recogieron fracciones de 1 ml, donde se midieron actividad OASS y absorbancia a 280 nm.



e) *Tabla de purificación*

El proceso de purificación descrito se resume en la Tabla 18.

**Tabla 18. Tabla de purificación para la actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de *C. reinhardtii***

Etapa	Vol (ml)	Prot (mg)	Act. Total (U)	Act. Especifica (U/mg)	n	Rec (%)
Extracto crudo	85	327	1.039	2,79	1	100
Sbte. protamina	90	218	1.028	4,71	1,7	99,0
DEAE-Sefacel						
OASS <sub>1</sub>	62	45,8	210,6	4,60	1,6	20,3
OASS <sub>2,3</sub>	225	32,3	504,3	15,61	5,6	48,5
Fenil-Sefarosa						
OASS <sub>1</sub>	12	5,74	111,6	19,47	7,0	10,7
OASS <sub>2</sub>	189	13,62	206,0	15,11	5,4	19,8
OASS <sub>3</sub>	59	10,44	23,96	2,19	0,78	2,3

Se realizó el proceso de purificación según se describe en el texto, a partir de 26,7 g de peso húmedo de células crecidas en condiciones estándar con sulfato 0,3 mM como fuente de azufre. Más detalles en Materiales y Métodos.

### 3.2. Propiedades cinéticas de las Isoenzimas

#### a) *Efecto del pH*

La Fig. 36 muestra la dependencia de la actividad OASS con el pH en el intervalo 4-12. A pH inferior a 6 apenas puede detectarse actividad, probablemente por volatilización de sulfuro como ácido sulfhídrico. Las tres isoenzimas presentan un máximo de actividad a pH 8 con tampón fosfato, y tanto OASS<sub>1</sub> como OASS<sub>3</sub>, presentan otro máximo de actividad a pH 9,5 en tampón CHES-KOH que podrían ser artefactos ya que a valores de pH superiores a 8,0 se produce un desplazamiento del grupo acetilo de la O-acetil-L-serina, que se transforma en N-acetil-L-serina (León, 1990). Por todo ello asumimos que pH 7,5-8 es el óptimo para las distintas isoenzimas OASS de *C. reinhardtii*.



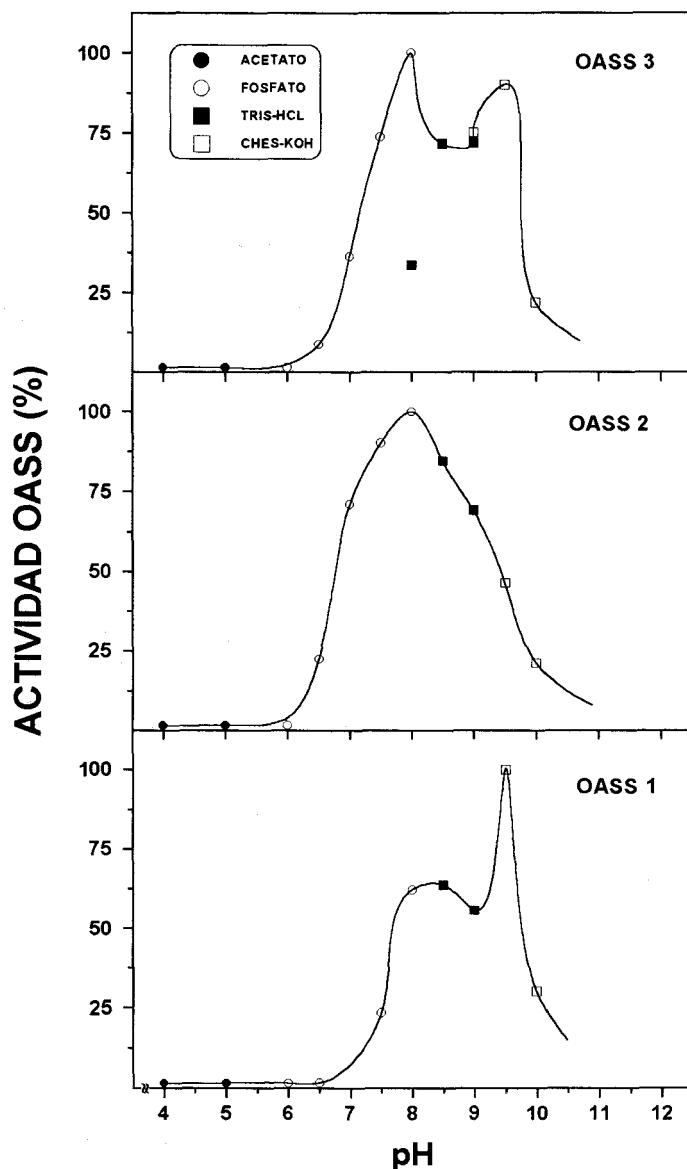


Fig. 36. Efecto del pH sobre la actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de *C. reinhardtii*. Se midió actividad OASS para las preparaciones purificadas de las tres isoenzimas como se describe en Materiales y Métodos, utilizando los tampones indicados a una concentración final de 50 mM. El 100 % de actividad fue de 2,77 U/ml, 13,3 U/ml y 3,22 U/ml para OASS<sub>1</sub>, OASS<sub>2</sub> y OASS<sub>3</sub> respectivamente.

### b) Efecto de la temperatura

La Fig. 37 muestra la dependencia de la actividad OASS con la temperatura, en el intervalo 25-70 °C.

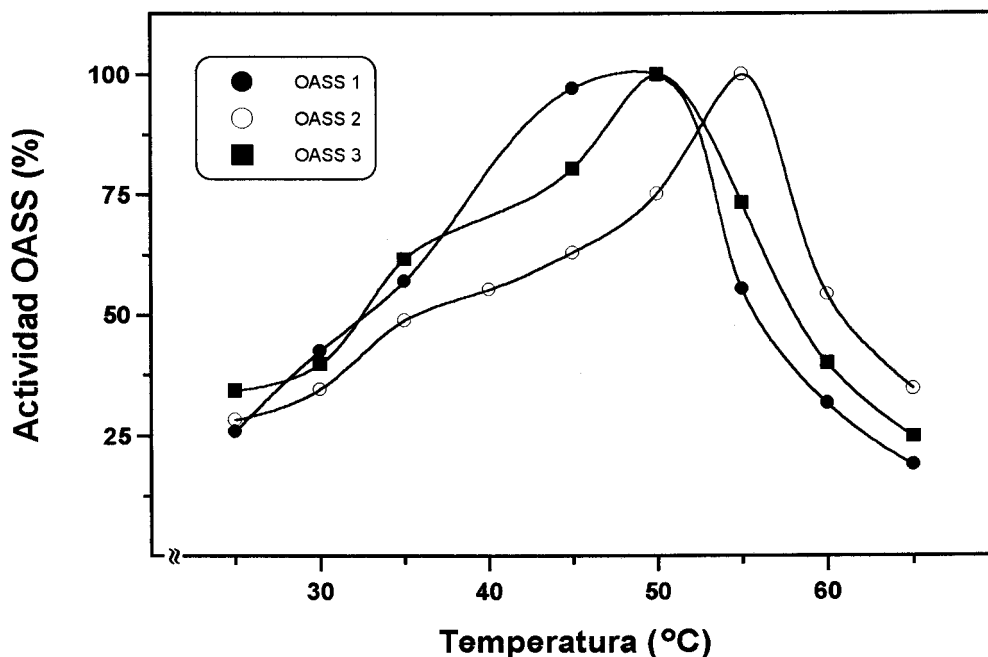


Fig. 37. Efecto de la temperatura sobre la actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de *C. reinhardtii*. Se midió la actividad OASS de las preparaciones purificadas correspondientes a las tres isoenzimas como se describe en Materiales y Métodos pero incubando a las temperaturas indicadas. El 100 % de actividad fue de 0,69 U/ml, 16,56 U/ml y 0,14 U/ml para OASS<sub>1</sub>, OASS<sub>2</sub> y OASS<sub>3</sub> respectivamente.

Como muestra la figura, la temperatura óptima de trabajo es 50 °C para las isoenzimas OASS<sub>1</sub> y OASS<sub>3</sub>, mientras que para OASS<sub>2</sub> es 55 °C.

A partir de estos valores se pueden calcular las energías de activación correspondientes a cada isoenzima. Esto se muestra en la Fig. 38.

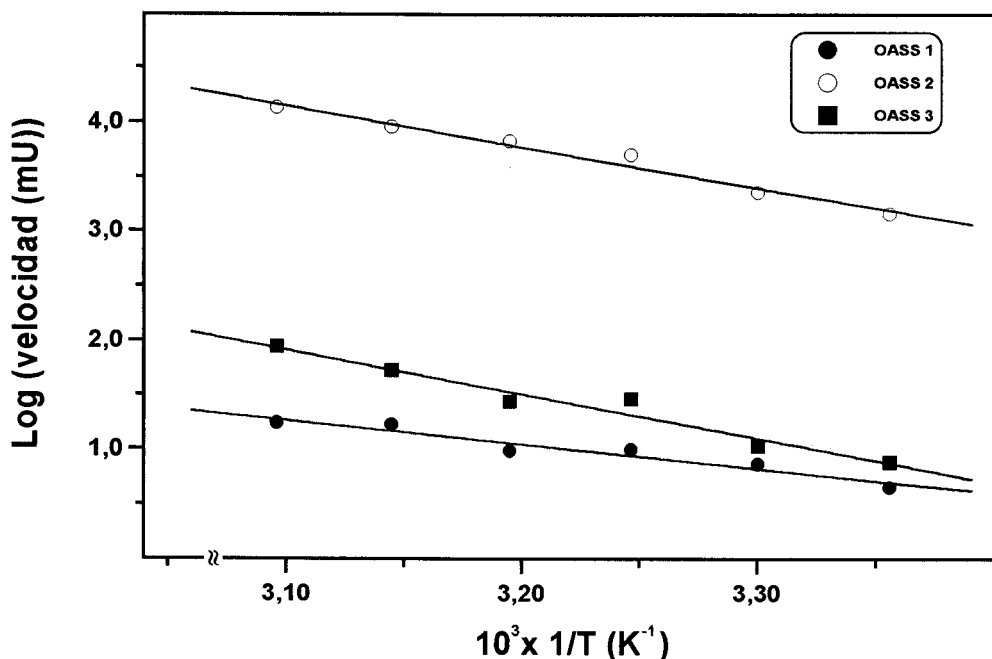
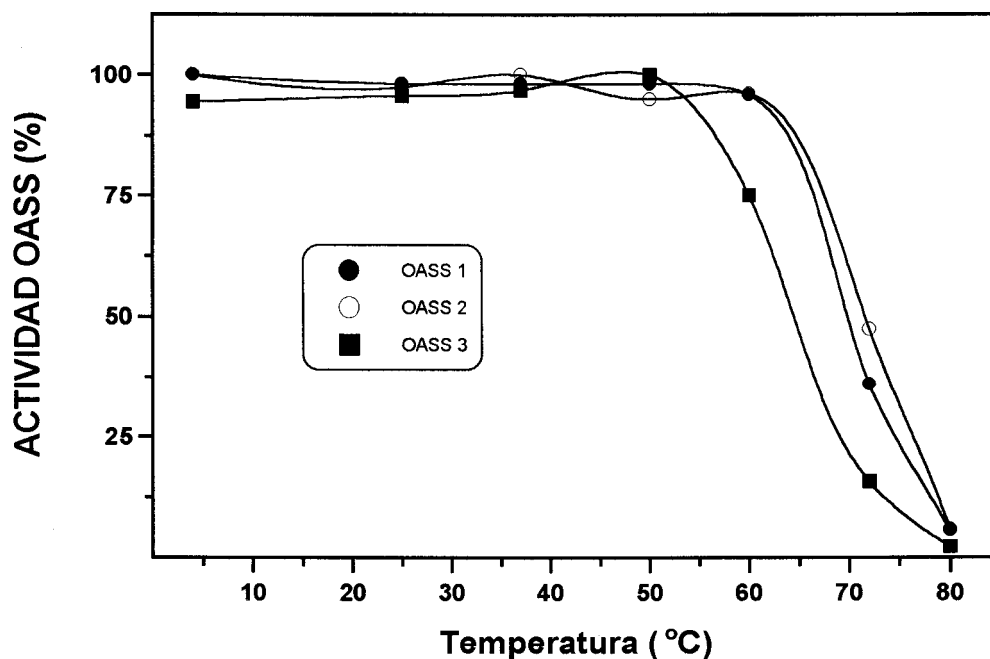


Fig. 38. Representación de Arrhenius para la determinación de la energía de activación de las reacciones catalizadas por las isoenzimas OASS de *C. reinhardtii*. Se representan los datos de la figura anterior, en el intervalo 25-55 °C.

Los resultados de energías de activación fueron 42,07 kJ/mol para OASS<sub>1</sub>, 78,17 kJ/mol para OASS<sub>2</sub>, y 71,81 kJ/mol para OASS<sub>3</sub>.

La Fig. 39 muestra las curvas de desnaturalización térmica correspondientes a las tres isoenzimas OASS. A partir de 60 °C comienza la inactivación térmica de OASS<sub>1</sub> y OASS<sub>2</sub>, siendo OASS<sub>3</sub> ligeramente menos estable. Estos resultados indican que la disminución de actividad observada en las curvas de temperatura óptima (Fig. 37) se debe, al menos en parte, a la desnaturalización térmica de la proteína en cada caso.



**Fig. 39. Inactivación térmica de las isoenzimas con actividad OASS de *C. reinhardtii*.** Preparaciones purificadas de las tres isoenzimas se incubaron en el tampón de medida de actividad durante 10 min a las temperaturas indicadas, tras lo cual se enfriaron en hielo. A continuación se pusieron los restantes reactivos y se procedió a medir actividad OASS como se describe en Materiales y Métodos. El 100 % de actividad, correspondiente a las preparaciones conservadas a 4 °C, fue de 0,92 U/ml, 9,12 U/ml y 6,92 U/ml para OASS<sub>1</sub>, OASS<sub>2</sub> y OASS<sub>3</sub> respectivamente.

*c) Determinación de los valores de  $K_m$  para los sustratos de la actividad OASS*

La Fig. 40 muestra la representación de dobles inversos para la determinación del valor de  $K_m$  para O-acetil-L-serina. En la Fig. 41 se muestra la representación de dobles inversos para la determinación de las  $K_m$  respecto a sulfuro.

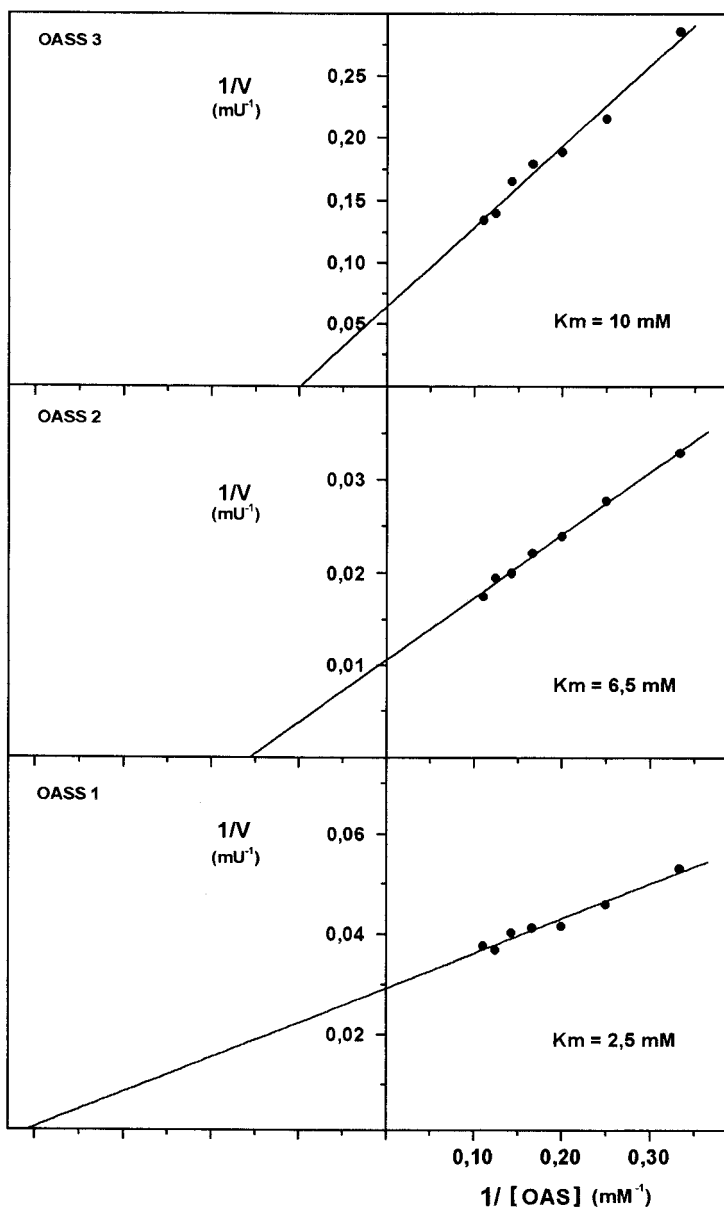


Fig. 40. Representación de Lineweaver-Burk para determinar los valores de  $K_m$  para OAS de la O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de *C. reinhardtii*. Se midió la actividad OASS como se describe en Materiales y Métodos salvo que la concentración de O-acetil-L-serina se varió como se indica en la figura.

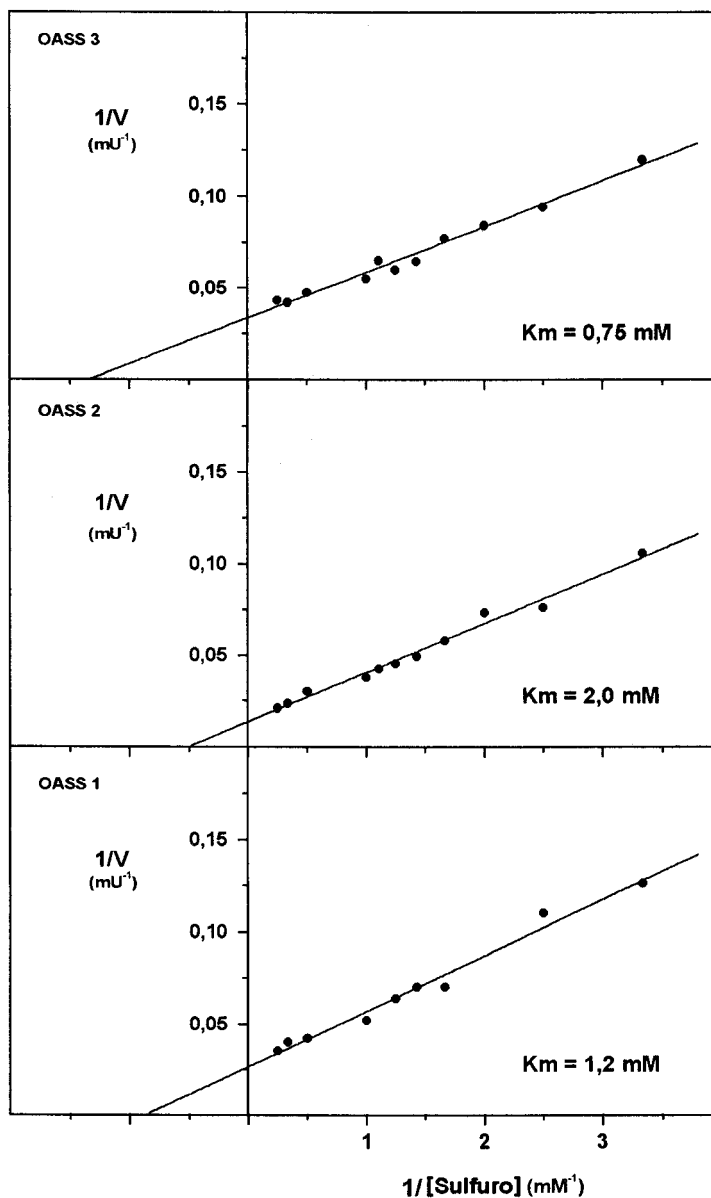


Fig. 41. Representación de Lineweaver-Burk para determinar los valores de  $K_m$  para sulfuro de la O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de *C. reinhardtii*. Se midió la actividad OASS como se describe en Materiales y Métodos salvo que la concentración de sulfuro se varió como se indica en la figura.

d) Inhibición de la actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa

Las figuras 42 y 43 muestran el efecto de cada uno de los dos sustratos de la actividad OASS sobre la misma. En ambos casos se observa inhibición por sustrato de las tres isoenzimas.

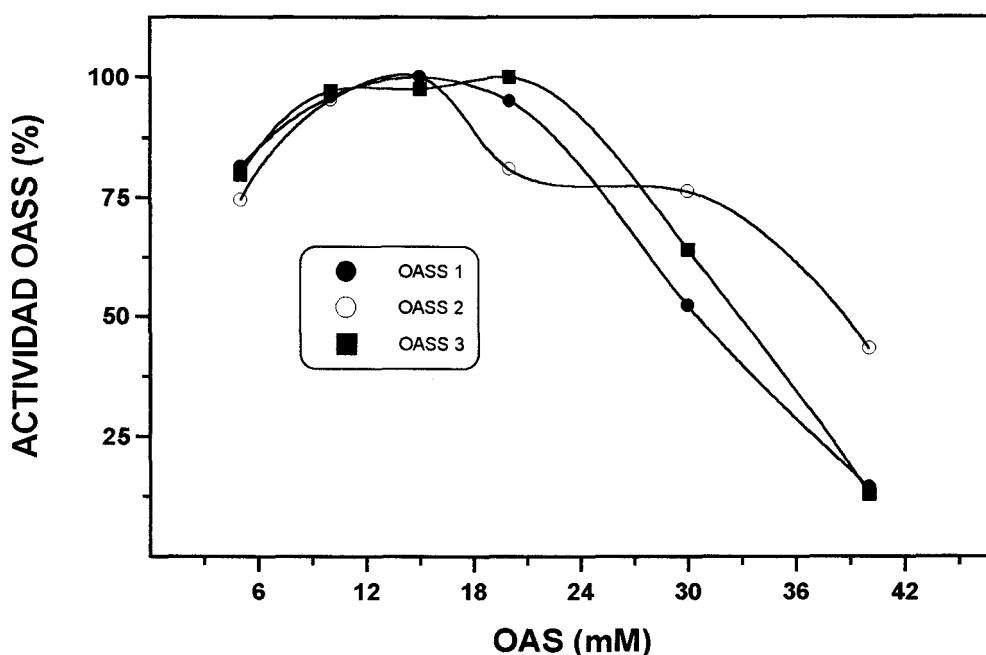
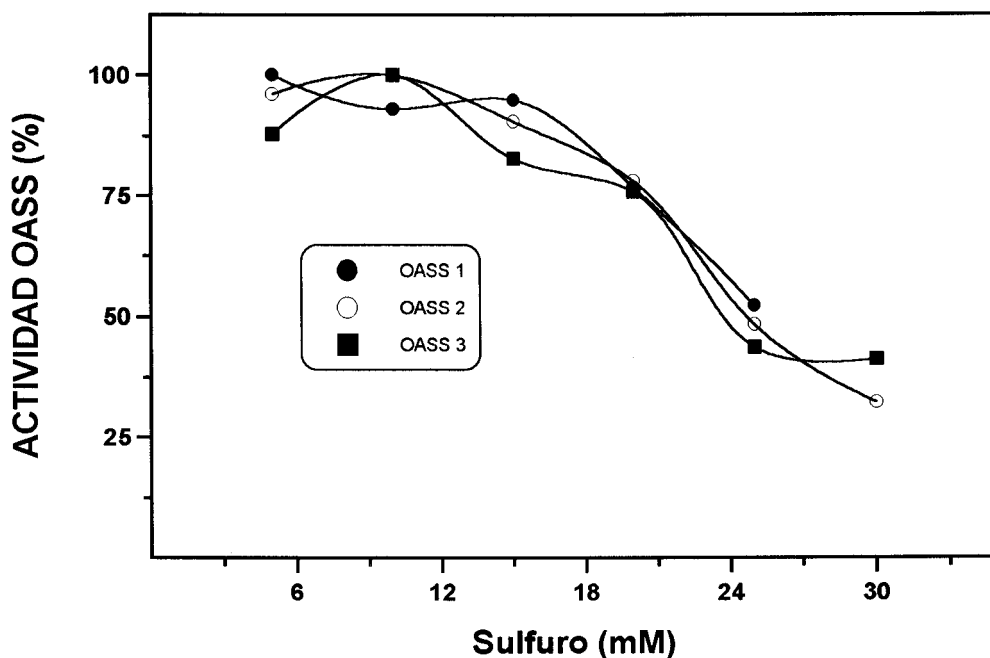


Fig. 42. Inhibición por O-acetil-L-serina de la actividad OASS de *C. reinhardtii*. Se midió la actividad OASS como se describe en Materiales y Métodos excepto que se incluyeron las concentraciones indicadas de OAS. El 100 % de actividad fue de 0,27 U/ml, 12,85 U/ml y 1,34 U/ml para OASS<sub>1</sub>, OASS<sub>2</sub> y OASS<sub>3</sub> respectivamente.

A partir de 20 mM comienza a apreciarse inhibición de la actividad por OAS. Para el sulfuro, la inhibición se observa a partir de 10 mM.





**Fig. 43.** Inhibición por sulfuro de la actividad OASS de *C. reinhardtii*. Se midió la actividad OASS como se describe en Materiales y Métodos excepto que se incluyeron las concentraciones indicadas de sulfuro. El 100 % de actividad fue de 0,25 U/ml, 12,38 U/ml y 1,62 U/ml para OASS<sub>1</sub>, OASS<sub>2</sub> y OASS<sub>3</sub> respectivamente.

Además de los sustratos, se estudió la inhibición producida por L-metionina. La Fig. 44 muestra la representación de Dixon para cada isoenzima, y se observa que la inhibición es no competitiva en los tres casos, calculándose unos valores de  $K_i$  de 1,4 mM, 0,5 mM y 1,0 mM para OASS<sub>1</sub>, OASS<sub>2</sub> y OASS<sub>3</sub> respectivamente.

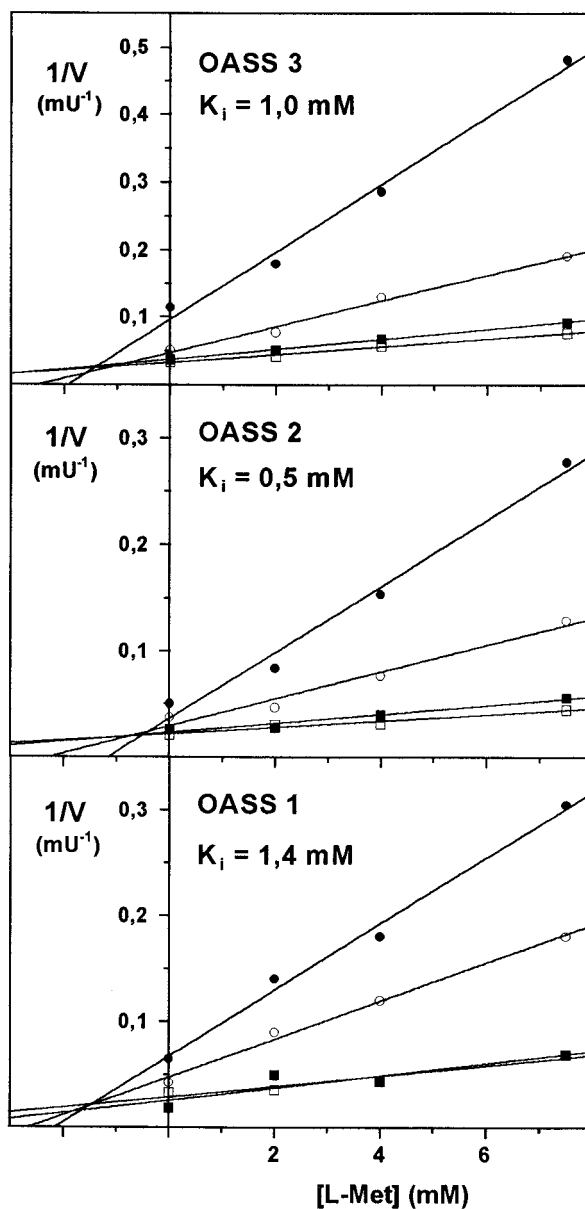


Fig. 44. Inhibición por L-metionina de la actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa de *C. reinhardtii*. Se midió la actividad OASS como se describe en Materiales y Métodos salvo variando la concentración de OAS 2 mM (●), 4 mM (○), 8 mM (■) y 10 mM (□), e incluyendo L-metionina en la mezcla de reacción a las concentraciones indicadas.

## IV. DISCUSIÓN

### 1. Consumo de sulfato

Muchos organismos pueden crecer con sulfato como única fuente de azufre, sintetizando a partir de él los compuestos que contienen este elemento y que son esenciales para la vida, como aminoácidos, sulfolípidos y otros metabolitos azufrados (Anderson, 1980; Schmidt, 1986). El consumo de sulfato se ha caracterizado en diferentes organismos autotróficos, tales como plantas superiores (Lass y Ullrich-Eberius, 1984), algas verdes (Biedlingmaier y Schmidt, 1989) y cianobacterias (Green y Grossman, 1988). En plantas, la mayor parte del sulfato obtenido por las raíces se transporta hasta las hojas, donde es reducido y asimilado hasta cisteína mediante reacciones dependientes de luz (Schmidt y Trebst, 1969; Schwenn y Trebst, 1976). Se produce también alguna reducción en tejido no fotosintético, pero es de mucha menor importancia (Anderson, 1980).

El consumo de sulfato por *C. reinhardtii* se mostró como un proceso dependiente de luz, con cinética multifásica en el rango 0-0,3 mM, y con valores de  $K_m$  de 10 y 40  $\mu\text{M}$ . Procesos multifásicos se han descrito previamente en plantas (Nissen y Nissen, 1983), así como en el alga verde *Chlorella fusca*, para la que los valores de  $K_m$  obtenidos fueron 13, 39 y 280  $\mu\text{M}$  (Biedlingmaier y Schmidt, 1989). Sin embargo, en la cianobacteria *Anacystis nidulans* el consumo de sulfato mostró un único valor de  $K_m$  de alrededor de 1,35  $\mu\text{M}$  (Green y Grossman, 1988). En tabaco, en el rango 0,01-10 mM, también se mostró cinética monofásica para el consumo de sulfato, con un valor de  $K_m$  de 20  $\mu\text{M}$  (Jones y Smith, 1981).

La velocidad de consumo de sulfato por *C. reinhardtii* presentó un valor máximo a pH 7,0 utilizando tampón fosfato, que coincide con el pH utilizado en el medio de cultivo. En *C. fusca*, el valor óptimo es

9 usando Tris-HCl como tampón, y 8,5 cuando se utiliza tampón fosfato (Biedlingmaier y Schmidt, 1989). Para *Anacystis nidulans* el pH óptimo es 8 (Utkilen *et al.*, 1976).

Cuando las células de cualquier organismo son sometidas a condiciones de hambre de azufre, aumenta considerablemente la velocidad de entrada de sulfato así como la afinidad aparente de la permeasa; ello sugiere que, bajo condiciones de hambre de azufre, algunos organismos pueden inducir la síntesis de una nueva permeasa más específica por sulfato (Jensen y König, 1982; Clarkson *et al.*, 1983).

En células de *C. reinhardtii* sometidas a carencia de azufre, el consumo se mostró 13 veces superior al control cuando el período de carencia de azufre en el medio de cultivo era de 24 h. Además, se obtuvo una alta afinidad por sulfato en las células sometidas a hambre de azufre, de modo que la radiactividad acumulada en el inicio del experimento era mayor a medida que aumentaba el período de carencia de azufre al que se sometían las células. En *Anacystis nidulans* se observa un incremento del orden de 10 veces (Green y Grossman, 1988), que no afecta a la  $K_m$ , tras 24 h de tratamiento en carencia de azufre. Tanto *Synechococcus sp. PCC 7942* como *C. fusca* muestran un elevado incremento en el consumo de sulfato por células sometidas a carencia de azufre (Laudenbach y Grossman, 1991; Biedlingmaier y Schmidt, 1989). Se han sugerido dos mecanismos para explicar este incremento en el consumo de sulfato en células sometidas a carencia de azufre: a) síntesis en mayor cantidad del sistema de transporte constitutivo, y/o b) síntesis de un nuevo sistema de transporte con mayor afinidad por sulfato. (Davies *et al.*, 1994). En *A. nidulans*, se ha descrito que el cloranfenicol, un inhibidor de la síntesis de proteínas inhibe el incremento de velocidad de consumo que se produce como consecuencia de la carencia de azufre, evidenciando que se requiere la síntesis de proteína para la adaptación a las condiciones de carencia (Green y Grossman, 1988). El hecho de que en *A. nidulans* no se modifique la  $K_m$  sugiere que no se sintetizan nuevos sistemas de transporte, sino

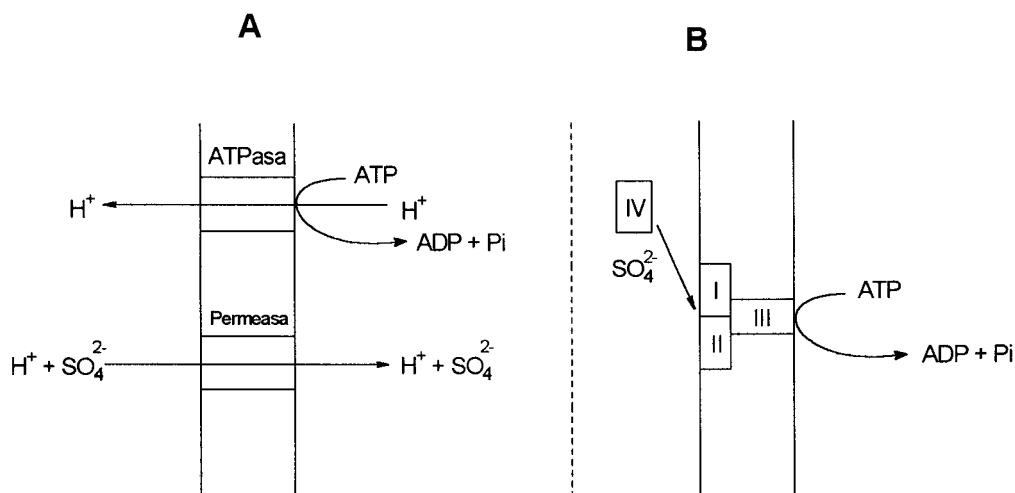
simplemente se incrementan los niveles del ya existente, de modo semejante a lo que sucede en *Salmonella typhimurium*. En *Synechococcus sp. PCC 7942*, se ha detectado la síntesis de una proteína, localizada como periplásmica, que se acumula específicamente en condiciones de carencia de azufre. El ARN mensajero que codifica para esta proteína muestra elevados niveles sobre 1 h después de que las células se pasan a un medio sin azufre, y decrece rápidamente cuando se repone sulfato al medio. Además, esta proteína tiene una secuencia de aminoácidos similar a la rodanasa de hígado bovino. El gen se localiza en la región que codifica para los componentes del sistema de transporte de sulfato (Laudenbach *et al.*, 1991). Por contra, en *Saccaromyces cerevisiae* existen dos sistemas de transporte, uno constitutivo, con baja afinidad por sulfato, y otro de mayor afinidad que se sintetiza en condiciones limitantes de azufre externo (Breton y Surdin-Kerjan, 1977).

El consumo de sulfato se inhibe por distintos aniones del tipo  $XO_4^{2-}$ , tales como cromato, seleniato, molibdato y wolframato, así como por otros compuestos de azufre como sulfito y tiosulfato. Entre los aniones  $XO_4^{2-}$  señalados, el más efectivo fue el cromato, que inhibió el consumo de sulfato en un 80 % a una concentración de inhibidor del orden de 1/3 de la concentración de sulfato en el medio; la inhibición fue completa cuando las concentraciones eran del mismo orden. El poder de inhibición fue menor sucesivamente para seleniato, molibdato y wolframato respectivamente. En *Chlorella fusca*, se ha descrito una inhibición similar, sugiriéndose que el tamaño iónico es el factor determinante del poder de inhibición (Biedlingmaier y Schmidt, 1989). Sin embargo, *Chlorella pyrenoidosa* (Vallée y Jeanjean, 1968), *Spirulina platensis* (Menon y Varma, 1982) y hongos (Tweedie y Segel, 1970), no pueden discriminar entre sulfato y molibdato o wolframato.

En cuanto a los análogos azufrados el tiosulfato inhibió algo más que el sulfito, y presentó una inhibición competitiva, siendo la  $K_i$  de 60  $\mu\text{M}$ . También sulfito y tiosulfato inhiben el consumo de sulfato

en *Chlorella fusca* (Biedlingmaier y Schmidt, 1989), y *A. nidulans* (Green y Grossman, 1988) y el tiosulfato puede utilizarse como sustrato alternativo al sulfato en hongos (Bradfield *et al.*, 1970), algas (Vallée y Jeanjean, 1968) y plantas superiores (Smith, 1976). En *E. coli* se ha descrito la existencia de una proteína periplásmica específica para la unión de tiosulfato, la cual competiría con la proteína que une específicamente sulfato por el sitio de unión con los componentes del transporte insertos en la membrana plasmática (Hryniewicz *et al.*, 1990). En *Synechococcus sp. PCC 7942*, el tiosulfato puede introducirse en la célula de dos formas: mediante la proteína periplásmica que une sulfato, compitiendo con éste en la unión, o bien mediante componentes de la membrana plasmática diferentes a los del sulfato, ya que mutantes en los genes que codifican para estos componentes pueden crecer, aunque muy lentamente, con tiosulfato como única fuente de azufre (Laudenbach y Grossman, 1991). En *Salmonella typhimurium* la inhibición del sistema de transporte de sulfato por tiosulfato se produce por competencia en la unión a nivel de la membrana plasmática, ya que la proteína periplásmica que une sulfato no es capaz de unir tiosulfato (Laudenbach y Grossman, 1991).

En lo que se refiere al mecanismo utilizado, mientras que en eucariotas hay evidencias de que el transporte de sulfato a través de la membrana plasmática está ligado a un gradiente de protones, o de potasio en algunas algas marinas (Lass y Ullrich-Eberius, 1984; Cram, 1990), en procariotas el transporte de sulfato parece ocurrir por medio de las llamadas *permeasas periplásmicas* (Ferro-Luzzi Ames y Joshi, 1990; Laudenbach y Grossman, 1991). Estos mecanismos se representan en la figura 45.



**Fig. 45. Mecanismos de transporte de sulfato al interior celular. A.** Permeasas integradas en la membrana. **B.** Existencia de permeasas periplásmicas.

Nuestros datos sugieren la existencia en *C. reinhardtii* de un transporte de sulfato con las siguientes características: a) requiere energía metabólica; b) está mediado por permeasas específicas, una constitutiva y otra probablemente inducida en ausencia de azufre; c) el tiosulfato entra en las células por el mismo sitio del sulfato; d) nuestros datos son compatibles con que el transporte de sulfato a través de la membrana plasmática está ligado a un gradiente electroquímico de protones, según se ha descrito para otros organismos eucarióticos.

Estas permeasas parecen estar reguladas por calcio (Jones y Smith, 1981), pH (Spedding *et al.*, 1980), aminoácidos (Hart y Filner, 1969) y la concentración interna de sulfato (Smith, 1980) y compuestos reducidos de azufre (Jones y Smith, 1981). En cualquier caso la evidencia experimental es escasa y se complica por la existencia de sulfato acumulado en vacuolas.

## 2. Actividades tiosulfato reductasa y rodanasa

Se detectaron en *C. reinhardtii* las actividades tiosulfato reductasa y rodanasa. El ensayo de actividad utilizado en este trabajo se basa en el previamente descrito por Chauncey *et al.*, (1987). En este trabajo se ha modificado la determinación de sulfito final del ensayo de actividad, de modo que se realiza a la longitud de onda donde el reactivo da mínima interferencia sobre el complejo que se determina. La calibración muestra la fiabilidad de la determinación, así como permite la obtención del coeficiente de extinción a la nueva longitud de onda.

Ambas actividades se mostraron absolutamente dependientes tanto de tiosulfato como de aceptor tiólico, *in vivo* e *in vitro* en medidas en extractos crudos. La actividad tiosulfato reductasa fue máxima cuando se utilizaron ditiolos (DTE ó DTT), si bien la enzima puede utilizar otros sustratos como glutatión, cisteína o ácido lipoico. En *Chlorella fusca* la actividad encontrada utilizando monotioles como sustratos es de aproximadamente el 10 % respecto a la encontrada utilizando DTE (Schmidt *et al.*, 1984).

Tanto la actividad tiosulfato reductasa como la actividad rodanasa se mostraron muy inestables en extractos crudos. La enzima de levadura se estabiliza con 1 mM de tiosulfato sódico en el tampón, si bien se muestra muy inestable en todos los procesos de cromatografía de intercambio iónico (Chauncey y Westley, 1983a). Las preparaciones con actividad rodanasa siempre se obtienen incluyendo en todos los procesos tiosulfato, que reacciona con la enzima produciendo lo que se denomina S-rodanasa, ya que la rodanasa libre es muy inestable (Weng *et al.*, 1978). En *Chlorella fusca*, si las células se rompen en ausencia de mercaptoetanol prácticamente no se detecta actividad en los extractos crudos. Aparece un buen nivel de actividad cuando las células se rompen en presencia de 10 mM de mercaptoetanol, y además, la actividad rodanasa que proviene de extractos libres de tiol puede reactivarse por la adición de este reactivo (Schmidt *et al.*, 1984). En nuestro



caso, ni el uso de tiosulfato sódico ni de mercaptoetanol en el tampón de extracción estabilizó la actividad, mientras que la presencia de DTT daba mejor resultado.

Los primeros intentos de purificación se realizaron utilizando tampón fosfato 10 mM pH 7,5 conteniendo 2 mM DTT, ya que éstas parecían las mejores condiciones de extracción y mantenimiento de la actividad. Sin embargo, siempre aparecía una parte de actividad que no se retenía en el gel de intercambio iónico utilizado (DEAE-sefacel), y la elución de la actividad tiosulfato reductasa se producía con la aparición de varios picos con actividad pero que no llegaban a resolverse. Además, estos resultados se mostraron difícilmente reproducibles. Tras diversos intentos, se optó por la utilización de tampón CHES-KOH 10 mM pH 9,5, conteniendo 5 mM DTT como tampón de trabajo, pues de este modo se conseguían resultados reproducibles.

Durante la purificación a partir de extractos crudos de *C. reinhardtii*, se siguieron ambas actividades, midiéndose la actividad tiosulfato reductasa tanto con DTE como con glutatión. Los diferentes cromatogramas mostraron que las actividades eluyen en las mismas fracciones. Como paso adicional para el proceso de purificación se intentaron cromatografías de afinidad en tiol-sefarosa y cisteína-sefarosa. Sin embargo, en un amplio rango de pH y de fuerza iónica la enzima no se retenía en ninguno de los soportes ensayados. Este mismo hecho se ha descrito para la tiosulfato reductasa de levadura (Chauncey y Westley, 1983a), donde ninguna de las actividades purificadas se retiene en este tipo de soportes.

Las tablas de purificación muestran valores muy similares para ambas actividades cuando la tiosulfato reductasa se mide con DTE, mientras que para la actividad medida con glutatión, tanto el número de veces que se purifica como el porcentaje de recuperación son sensiblemente menores. Estos datos, junto con los de elución sugieren que se trata de la misma enzima.

La actividad tiosulfato reductasa mostró ser bastante estable con el pH, manteniendo el 100 % de actividad en el rango 9,5-11,5. En *C. fusca*, todas las isoenzimas tienen un pH óptimo de 9,0 excepto una de ellas, para la que el valor es 8,5 (Schmidt *et al.*, 1984). Para la actividad rodanasa, el pH óptimo fue también de 9,5-10, si bien en este caso la zona de máxima actividad es más estrecha que para la actividad tiosulfato reductasa. En cuanto a la temperatura óptima, para la actividad tiosulfato reductasa fue de 55 °C, si bien entre 50 y 60 °C la actividad se mantiene por encima del 85 %. El valor de energía de activación calculado a partir de la representación de Arrhenius fue de 32,2 kJ/mol. Para la actividad rodanasa, la temperatura óptima fue de 55 °C también, aunque en este caso se produce un descenso mucho más pronunciado a partir de esa temperatura. La energía de activación calculada fue de 32,8 kJ/mol. Para la rodanasa de la bacteria metanogénica *Methanosarcina frisia*, el valor de pH óptimo es 11, y su temperatura óptima 60 °C (Turkowsky *et al.*, 1991).

La actividad tiosulfato reductasa se mostró más resistente frente a la temperatura que la actividad rodanasa. Después de 30 min de tratamiento a 70 °C, la actividad tiosulfato reductasa mantuvo más del 90 % de la actividad inicial, mientras que la actividad rodanasa sólo mantuvo un 40 % aproximadamente. Al aumentar la temperatura, la actividad tiosulfato reductasa se perdió en mayor medida, llegando a ser de algo más del 50 % tras el tratamiento a 90 °C. Para la actividad rodanasa, a 90 °C se mantuvo algo más del 20 % de la actividad inicial. La actividad rodanasa es mucho más estable que la de *E. coli*, que se mantiene activa sólo hasta 48 °C (Mendoza *et al.*, 1992). Estos datos indican que la disminución de actividad observada cuando la incubación de sustratos se realiza a temperaturas superiores a 55 °C podría deberse a algún efecto sobre los mismos, y no a la inactivación térmica de la enzima, o bien que una vez realizado el tratamiento térmico a la enzima, y suponiendo que ésta se desnaturalizase, el cambio a una temperatura inferior para la medida de actividad supusiera la renaturalización de la enzima, de modo que volviese a mostrarse activa. La rodanasa de hígado bovino

puede recuperar su plegamiento normal después de un tratamiento desnaturalizante con urea en aproximadamente un 80 % a 10 °C, mientras que esta renaturalización sólo se produce en un 10 % a 37 °C (Mendoza *et al.*, 1991). Entre 30-40 °C se produce una transición estructural que puede distinguirse por fluorescencia y que conduce a la inactivación de la enzima y su agregación, siendo también inactivos los agregados. Esta inactivación puede protegerse añadiendo altas concentraciones de 2-mercaptoetanol o por tiosulfato (Dungan y Horowitz, 1993).

Los valores de  $K_m$  para tiosulfato fueron muy parecidos para las dos actividades, 0,5 mM para la actividad tiosulfato reductasa y 1,5 mM para la rodanasa. Para las isoenzimas con actividad tiosulfato reductasa de *Chlorella fusca*, los valores determinados fueron del orden de 0,15 mM (Schmidt *et al.*, 1984), mientras que en la bacteria *Methanosarcina frisia* el valor encontrado fue de 0,53 mM (Turkowsky *et al.*, 1991). Sin embargo los valores para el segundo sustrato fueron significativamente distintos entre ambas actividades. Para los sustratos de la actividad tiosulfato reductasa, los valores estuvieron alrededor de 1-2 mM para los monotioles y sobre 0,25 mM para los ditioles. En cambio, para la actividad rodanasa la  $K_m$  para cianuro tiene un valor de 7 mM. En cuanto a este segundo sustrato la enzima de *Chlamydomonas* se muestra algo más afín que la de *Chlorella*, para la que se determinan valores de  $K_m$  para DTE entre 1,5-3 mM, para las diferentes isoenzimas con actividad tiosulfato reductasa en preparaciones parcialmente purificadas, y 20 mM para cianuro, utilizando extractos crudos de *Chlorella* (Schmidt *et al.*, 1984). En *M. frisia*, la  $K_m$  para cianuro es 1,57 mM (Turkowsky *et al.*, 1991).

La actividad tiosulfato reductasa no se afectó por la presencia en el medio de reacción de reactivos de grupos sulfhidrilo como el *p*-hidroximercuribenzoato (*p*HMB), metilmetanotiosulfonato (MMTS) ó iodoacetamida (IAA). La actividad rodanasa tuvo un comportamiento similar respecto al *p*HMB, mientras que la iodoacetamida sí ejerció sobre ella algún efecto inhibitor. Esto indica que no existen cisteínas

esenciales para la actividad en ninguno de los dos casos, o bien que los grupos sulfhidrilo de estos aminoácidos no son accesibles a los reactivos ensayados. La enzima de hígado bovino contiene 4 cisteínas por molécula, pero sólo una de ellas es esencial para la actividad (Miller-Martini *et al.*, 1994), y sigue un mecanismo de doble desplazamiento, en el que la cisteína-247 de la enzima reacciona primero con tiosulfato para dar el complejo S-rodanasa, que en un segundo paso transfiere el azufre a cianuro formando sulfocianuro y regenerando la enzima (Ploegman *et al.*, 1978). El complejo S-rodanasa es muy estable, y puede incluso cristalizarse (Weng *et al.*, 1978). La no inactivación de la actividad rodanasa de *Chlamydomonas* podría deberse a la formación de un complejo del mismo tipo, pero esta hipótesis supondría un mecanismo diferente, ya que debería formarse mediante reacción con el tiol presente en el tampón de purificación, el cual estabilizaría la actividad. Para la actividad GSH-tiosulfato reductasa de levaduras, se ha descrito que a pH 9 la enzima sigue un mecanismo de doble desplazamiento bien al azar o bien ordenado, en el que la enzima reaccionaría con el segundo sustrato, el GSH, para formar un complejo que posteriormente reaccionaría con el tiosulfato (Chauncey *et al.*, 1987)

En ambos casos el TNBS a concentración 1 mM inhibió casi el 80 % de la actividad tiosulfato reductasa y casi el 70 % de la actividad rodanasa inicial. En ambos casos la inhibición se debió a la modificación de grupos arginina, ya que el fenilglioxal, un reactivo específico de estos grupos mostró fuerte inhibición, mientras que el piridoxal-5'-fosfato, un reactivo modificador de grupos lisina mostró mucho menos efecto inhibitorio. Para la rodanasa de hígado bovino, la presencia de una arginina-186 y de una lisina-249 alrededor de la cisteína-247 son esenciales para la actividad, ya que se muestran fundamentales para la correcta orientación en la unión del tiosulfato (Luo y Horowitz, 1994). Cuando la arginina-186 se sustituye por leucina, se observa un incremento en la  $K_m$  para tiosulfato de 3,7 mM a 73 mM con una leve disminución en la velocidad máxima. Si se sustituye la lisina-249 por alanina, la enzima no puede utilizar

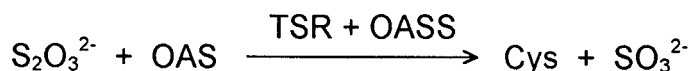
tiosulfato como sustrato, pero sí tiosulfonatos orgánicos (Luo y Horowitz, 1994).

El DTE se mostró inhibidor competitivo con respecto al cianuro de la actividad rodanasa, y con un valor de  $K_i$  de 1 mM. Este dato sugiere que ambos compiten por el mismo sitio activo de la enzima, o bien que el hecho de que se una uno de ellos modifique el sitio de unión del otro, ya que a bajas concentraciones de tiol lo que se observa es una activación de la enzima. En *Chlorella fusca*, las fracciones con actividad tiosulfato reductasa muestran también actividad rodanasa cuando se incluye en el medio de reacción algún tiol, mientras que la actividad no era detectada en ausencia de tioles. La concentración del tiol utilizado es fundamental, ya que elevadas concentraciones también pueden inhibir la actividad, lo que concuerda con los valores de  $K_m$  observados en *Chlorella fusca* (Schmidt *et al.*, 1984). Se ha descrito también activación de rodanasa con bajas concentraciones de cisteína, glutatión, DTE y dihidrolipoato en *Methanosarcina frisia* (Turkowsky *et al.*, 1991).

Existe una cierta tendencia en la literatura a identificar las rodanasas con las tiosulfato reductasas; ello se debe a la dificultad de distinguir si una proteína tiene prioritariamente una actividad u otra. Esto depende naturalmente de la afinidad que presente por cianuro o por el ditiol. En cualquier caso debe destacarse que ambas actividades van normalmente unidas, es decir, una rodanasa siempre puede utilizar un ditiol en vez de cianuro como aceptor de azufre, y viceversa.

Como vimos anteriormente, se han sugerido distintos papeles fisiológicos para las tiosulfato:ceptor sulfotransferasas (Cerletti, 1986), destacando su acción como insertasa de azufre en la génesis de los centros de reacción sulfoférrico de las proteínas redox (Pagani y Galante 1983; Pagani *et al.*, 1984; 1987). Las medidas de sulfuro libre en plantas y algas muestran concentraciones del orden de micromolar, mientras que la  $K_m$  aparente para sulfuro de la O-acetil-L-serina sulfhidrilasa es por lo general 3 órdenes de magnitud

superior (milimolar). Estos datos arrojan dudas de que efectivamente sea el sulfuro el sustrato normal de la enzima *in vivo*. En este sentido se ha especulado que una sulfotransferasa podría transferir el sulfuro reducido desde un donador a la O-acetil-L-serina sulfhidrilasa. La enzima de plantas no acepta tiosulfato como sustrato, pero se ha conseguido formar cisteína en un sistema libre de células acoplando tiosulfato con la OASS en presencia de tiosulfato reductasa (Schmidth y Jäger, 1992).



Recientemente se ha publicado el aislamiento, secuenciación y mutagénesis del gen que codifica la rodanasa de *Azotobacter vinelandii* (Colnaghi *et al.*, 1996), que ha supuesto un avance muy importante en el conocimiento del papel fisiológico y mecanismo de reacción de las sulfotransferasas. Los datos apuntan hacia una posible multifuncionalidad de las rodanasas que supone una importante solución a problemas fundamentales de la química del azufre en distintos contextos metabólicos de los seres vivos. Por otra parte resulta sorprendente las analogías secuenciales tan significativas que se presentan entre las rodanasas de vertebrados y aquéllas de organismos procarióticos.

### 3. Actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa

La O-acetil-L-serina sulfhidrilasa cataliza la formación de cisteína a partir de O-acetil-L-serina y sulfuro. Hasta la fecha, se habían descrito dos isoenzimas en *Chlamydomonas reinhardtii* (León *et al.*, 1987). En el presente trabajo, hemos purificado parcialmente tres isoenzimas con actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa, que se separan mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sefacel (OASS<sub>1</sub>) y cromatografía hidrofóbica en Fenil-sefarosa (OASS<sub>2</sub> y OASS<sub>3</sub>).

Las tres isoenzimas mostraron una dependencia similar con el pH y la temperatura. Para todas ellas, hay un máximo de actividad a pH 8, si bien OASS<sub>1</sub> y OASS<sub>3</sub> presentan otro máximo a pH 9,5. Las enzimas de plantas superiores como *Spinacia oleracea* (Murakoshi *et al.*, 1985), *Quiscalis indica* (Murakoshi *et al.*, 1986), *Brassica juncea* (Ikegami *et al.*, 1988b) y *Pisum sativum* (Ikegami *et al.*, 1987) muestran valores de pH óptimos similares para las isoenzimas y comprendidos entre 8 y 8,3. Por otra parte, las dos isoenzimas de *Rhodospirillum tenue* varían en su dependencia del pH, mostrando una de ellas un amplio intervalo de pH óptimo entre 7,3 y 8,2, mientras que la otra presenta un máximo agudo a pH 7,7 (Hensel y Trüper, 1983). También se ha descrito una inactivación rápida e irreversible de la enzima de *Phaseolus* a valores de pH inferiores a 7,4 (Bertagnolli y Wedding, 1977). Para la enzima de *Salmonella*, se ha descrito que los coeficientes de extinción correspondientes a los máximos de absorción a 280 y 412 nm no dependen del pH entre 5,5 y 10,8. La adición de OAS supone un desplazamiento del máximo a 412 nm hasta 470 nm, y el espectro es independiente del pH en el rango 5,5-9,2 (Cook *et al.*, 1992). Con respecto a la temperatura, tanto OASS<sub>1</sub> como OASS<sub>3</sub> tienen su óptimo a 50 °C, mientras que OASS<sub>2</sub> lo presenta a 55 °C. A partir de estos valores se produce una acusada disminución de actividad, y sólo 5 °C más supone la pérdida de algo menos del 50 % de actividad para OASS<sub>1</sub> y OASS<sub>2</sub> y sobre un 30 % para OASS<sub>3</sub>. Los valores de energías de activación calculados a partir de estos datos fueron 42,07 kJ/mol para OASS<sub>1</sub>, 78,17 kJ/mol para OASS<sub>2</sub> y 71,81 kJ/mol para OASS<sub>3</sub>.

En cuanto a la resistencia frente al calor, las tres isoenzimas mantienen íntegramente su actividad después del tratamiento a 50 °C. A 60 °C, sólo OASS<sub>3</sub> pierde algo de actividad, y para temperaturas superiores, la disminución es ya muy acusada. Tras el tratamiento a 80 °C, casi no se detecta actividad de ninguna de ellas.

La isoenzima OASS<sub>1</sub> se mostró con mayor afinidad por OAS, si bien los valores obtenidos para las  $K_m$  en los tres casos fueron muy parecidos. Para OASS<sub>1</sub> se obtuvo un valor de 2,5 mM, 6,5 mM para

OASS<sub>2</sub> y 10 mM para OASS<sub>3</sub>. Estos valores son algo más altos que los obtenidos para otros organismos donde se han aislado isoenzimas, en los que los valores suelen ser similares y oscilan entre 1 y 3 mM, excepto en *Quisqualis indica*, donde presentan valores de 1,9 y 7,1 mM (Murakoshi *et al.*, 1986), *Rhodospirillum tenue* donde se han determinado valores de 2,9 mM y 50 mM para cada una de las isoenzimas (Hensel y Trüper, 1983) y *Lathyrus sativus*, para la que los valores son 6,1 y 7,2 mM (Ikegami *et al.*, 1993). Para la enzima de *Salmonella*, se ha obtenido un valor de 3  $\mu$ M a pH 6,9, observándose un incremento de un orden de magnitud en este valor por cada unidad de pH que se disminuya (Cook *et al.*, 1992). Con respecto a sulfuro, el otro sustrato de la reacción, fue OASS<sub>3</sub> la más afín, aunque también en este caso los valores son muy parecidos entre sí, y globalmente menores que los obtenidos para OAS. Los valores de  $K_m$  para sulfuro obtenidos fueron 1,2 mM para OASS<sub>1</sub>, 2,0 mM para OASS<sub>2</sub> y 0,75 mM para OASS<sub>3</sub>. Los valores descritos para plantas son bastante más bajos, y oscilan entre 30 y 60  $\mu$ M (Ikegami *et al.*, 1988a; 1988b; Murakoshi *et al.*, 1985). Los valores determinados en este trabajo son similares a los obtenidos para cianobacterias (Diessner y Schmidt, 1981) o bacterias fotosintéticas (Hensel y Trüper, 1983), que son próximos a 1 mM.

Las actividades OASS detectadas en *C. reinhardtii* se inhiben por elevadas concentraciones de OAS y de sulfuro en el medio. A partir de 20 mM de OAS en el medio de reacción se produce inhibición de la actividad OASS, así como a partir de 10 mM de sulfuro en el medio. En *Phaseolus vulgaris*, y *Phaseolus polyanthus* una de las isoenzimas muestra inhibición por OAS a concentraciones mayores de 10 mM, mientras que la otra no se inhibe (Bertagnolli y Wedding, 1977). Por otra parte, la inhibición por sulfuro se ha observado en algunas plantas como *Phaseolus* (Bertagnolli y Wedding, 1977) y procariotas fotosintéticos como *Synechococcus* (Diessner y Schmidt, 1981) y *Rhodospirillum tenue* (Hensel y Trüper, 1983), mientras que no se manifiesta en otras plantas como *Citrullus vulgaris* (Ikegami *et al.*, 1988a) o *Brassica juncea* (Ikegami *et al.*, 1988b).



La L-metionina, uno de los productos finales de la ruta de asimilación de azufre, también mostró ser inhibidor de la actividad OASS. La caracterización cinética de esta inhibición mostró que era del tipo no competitivo, con valores de  $K_i$  de 1,4 mM para OASS<sub>1</sub>, 0,5 mM para OASS<sub>2</sub> y 1,0 mM para OASS<sub>3</sub>. Se ha descrito sin embargo la inhibición competitiva de L-metionina con respecto a sulfuro en hojas de trigo, con un valor de  $K_i$  de 1,75 mM (Ascaño y Nicholas, 1977).

Nuestros resultados son consistentes con la presencia de una isoenzima OASS en citosol, cloroplasto y mitocondria, con objeto de suministrar, en cada caso, los aminoácidos azufrados requeridos. Dicha situación se presenta también en tejido verde de plantas superiores. Se consolida la idea de que en organismos fotosintéticos la cisteína sintasa es un complejo multienzimático, integrado por las actividades L-serina-acetil transferasa (SAT) y O-acetil-L-serina sulfhidrilasa.

Nuestros objetivos inmediatos en *C. reinhardtii* serían dos: a) separar posibles isoenzimas SAT y b) hacer estudios de inmunolocalización de las isoenzimas SAT y OASS.

Sin duda esta información es esencial para conocer el mecanismo de la síntesis de cisteína y su regulación en organismos fotosintéticos.

## V. CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados sugieren la existencia en *C. reinhardtii* de un sistema de transporte de sulfato dependiente de la luz y con las siguientes características: a) requiere energía metabólica, aportada probablemente por un gradiente electroquímico; b) está mediado por permeasas específicas, una constitutiva, y otra con mayor afinidad por sulfato inducida en ausencia de azufre; c) aniones del tipo  $XO_4^{2-}$  inhiben competitivamente el transporte de sulfato al interior de las células del alga, siendo cromato y seleniato los más eficaces. Particular interés presenta la inhibición por tiosulfato, también de tipo competitivo, con una  $K_i$  de 0,06 mM. El tiosulfato entra en las células por el mismo sitio que el sulfato.

2. A partir de extractos crudos de *C. reinhardtii* hemos purificado una enzima con actividad tiosulfato-ditiol sulfotransferasa (TSR) y tiosulfato-cianuro sulfotransferasa (rodanasa). Dichas actividades son cuantitativamente equivalentes, y estudios cinéticos indican que el DTE y el cianuro compiten por el mismo sitio activo de la enzima, teniendo una afinidad 28 veces superior por el DTE. Ambas actividades son inhibidas preferentemente por reactivos específicos de residuos de arginina, mientras que la sensibilidad de la enzima hacia los reactivos específicos de residuos de lisina es menor. Particularmente interesante es que ninguna de las dos actividades se afecta por reactivos de grupos sulfhidrilo. Este comportamiento es compatible con sitios activos análogos para ambas actividades y mecanismos parecidos. El papel fisiológico de la enzima podría ser preferentemente asimilador del azufre sulfano, si bien no podemos descartar un papel detoxificador del cianuro generado endógenamente.

3. Por primera vez en *C. reinhardtii* se han separado tres isoenzimas, designadas OASS<sub>1</sub>, OASS<sub>2</sub> y OASS<sub>3</sub>, con actividad O-acetil-L-serina sulfhidrilasa (O-acetil-L-serina(tiol)liasa) y se han purificado a partir

de extractos crudos. El significado fisiológico de estas isoenzimas es que están localizadas en distinto compartimento celular: cloroplasto, citosol y mitocondria. La isoenzima OASS<sub>2</sub> es la forma más abundante, con un 60 % aproximadamente de la actividad total, mientras que las isoenzimas OASS<sub>1</sub> y OASS<sub>3</sub> suponen el 32 % y 8 % respectivamente. Las actividades específicas de las isoenzimas purificadas oscilan entre 19,5 de isoenzima 2 y 2,2 U/mg proteína correspondiente a la isoenzima 3.

4. La  $K_m$  para O-acetil-L-serina es de 2,5; 6,5 y 10 mM para las tres isoenzimas, mientras que para sulfuro son de 1,2; 2,0 y 0,75 mM respectivamente, indicando esto que su sustrato fisiológico serán tioles. Las tres isoenzimas muestran inhibición por los sustratos de la reacción, O-acetil-L-serina y sulfuro, a concentraciones superiores a 20 mM, por lo que carece de significación fisiológica. La L-metionina inhibe a las tres isoenzimas, de forma no competitiva con respecto a la O-acetil-L-serina, siendo los valores de  $K_i$  obtenidos de 1,4; 0,5 y 1,0 mM respectivamente. Estos datos indican un papel regulador importante para estas enzimas en la asimilación del azufre por *C. reinhardtii*.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aarnes, H.** (1976). Homoserine kinase from barley seedlings. *Plant Sci. Lett.* **7**, 187-194.
- Abrams, W.R. y Schiff, J.A.** (1973). Studies of sulfate utilization by algae. II. An enzyme-bound intermediate in the reduction of adenosine-5'-phosphosulfate (APS) by cell-free extracts of wild-type *Chlorella* and mutants blocked for sulfate reduction. *Arch. Mikrobiol.* **94**, 1-10.
- Aketagawa, J. y Tamura, G.** (1980). Ferredoxin-sulfite reductase from spinach. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2371-2378.
- Akhtar, M., Emery, V.C. y Robinson, J.A.** (1984). Pyridoxal phosphate-dependent enzymic reactions: mechanism and stereochemistry. En: *The Chemistry of Enzyme Action* (Page, M.I., ed.). Elsevier, Amsterdam, pp. 303-373.
- Alami, N. y Hallenbeck, P.C.** (1995). Cloning and characterization of a gene cluster *Phsbcdef* necessary for the production of hydrogen sulfide from thiosulfate by *Salmonella Typhimurium*. *Gene* **156**, 53-57.
- Anderson, J.W.** (1980). Assimilation of inorganic sulfate into cysteine. En: *The Biochemistry of Plants. Vol. 5*. Academic Press, New York. pp 203-223.
- Anderson, J.W.** (1981). Light-energy-dependent processes other than CO<sub>2</sub> assimilation. En: *The Biochemistry of Plants. Vol. 8* (Hatch, M.D. y Boardman, N.K., eds.). Academic Press, New York. pp. 473-500.
- Aron, D.I.** (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**, 1-15.
- Arz, H.E., Gisselmann, G., Schiffmann, S. y Schwenn, J.D.** (1994). A cDNA for adenylyl sulphate (APS)-kinase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* **1218**, 447-452.

- Ascaño, A. y Nicholas, D.J.D.** (1977). Purification and properties of O-acetyl-L-serine sulfhydrylase from wheat leaves. *Phytochemistry* **16**, 889-893.
- Balharay, G.J.E. y Nicholas, D.J.D.** (1970). ATP-sulphurylase in spinach leaves. *Phytochemistry* **16**, 889-893.
- Barroso, C., Vega, J.M. y Gotor, C.** (1995). A new member of the cytosolic O-acetyl-serine(thiol)lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **363**, 1-5.
- Bergman, L., Schwenn, J.D. y Urlaub, H.** (1980). Adenosine triphosphate sulfurylase and O-acetyl-serine sulfhydrylase in photoheterotrophically and heterotrophically cultured tobacco cells. *Z. Naturforsch* **35c**, 952-957.
- Bertagnolli, B.L. y Wedding, R.T.** (1977). Purification and initial kinetic characterization of different forms of O-acetylserine sulfhydrylase from seedlings of two species of *Phaseolus*. *Plant Physiol.* **60**, 115-121.
- Biedlingmaier, S. y Schmidt A.** (1989). Sulfate transport in normal and S-deprived *Chlorella fusca*. *Z. Naturforsch* **44c**, 495-503.
- Bradfield, G., Somerfield, P., Meyn, T., Holby, M., Babcock, D., Bradley, D. y Segel, I.H.** (1970). Regulation of sulfate transport in filamentous fungi. *Plant Physiol.* **46**, 720.
- Brander, K.A., Owtrim, G.W. y Brunold, C.** (1996). Isolation of a cDNA encoding a putative chloroplastic isoform of cysteine synthase from maize. *Plant Gene Reg.* (en prensa).
- Breton, A. y Surdin-Kerjan, Y.** (1977). Sulphate uptake in *Saccaromyces cerevisiae*: biochemical and genetic study. *J. Bacteriol.* **132**, 224-232.
- Brune, D.C.** (1989). Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **975**, 189-221.
- Brunold, C.** (1990). Reduction of sulfate to sulfide. En: Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants. (H. Rennenberg, C.H. Brunold, L.J. de Kok & I. Stulen eds.). Academic Publishing, The Hague, Netherlands.

- Brunold, C. y Schiff, J.A.** (1976). Studies of sulfate utilization by algae. 15. Enzymes of assimilatory sulfate reduction in *Euglena* and their cellular localization. *Plant Physiol.* **57**, 430-436.
- Brunold, C. y Schmidt, A.** (1976). Regulation of H<sub>2</sub>S in *Lemna minor* L. *Planta* **133**, 85-88.
- Brunold, C. y Schmidt, A.** (1978). Regulation of sulfate assimilation in plants. 7. Cysteine inactivation of adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase in *Lemna minor* L. *Plant Physiol.* **61**, 342-347.
- Burnell, J.N.** (1984). Sulfate assimilation in C<sub>4</sub> plants. Intercellular and intracellular localization of ATP-sulfurylase, cysteine synthase and cystathionine-β-lyase in maize leaves. *Plant Physiol.* **75**, 873-875.
- Burnell, J.N. y Anderson, J.W.** (1973). Adenosine-5'-sulphatophosphate kinase activity in spinach leaf tissue. *Biochem. J.* **134**, 565-579.
- Castric, P.A.** (1981). The metabolism of hydrogen cyanide in bacteria. En: Cyanide in Biology (Vennesland, Conn, Knowles, Westley and Wining, eds.). Academic Press, London.
- Cerletti, P.** (1986). Seeking a better job for an under-employed enzyme: rhodanese. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 369-372.
- Clarkson, D.T., Smith, F.W. y Vandenberg, P.J.** (1983). Regulation of sulphate transport in a tropical legume *Macroptilium atropurpureum*, cv. *Siratro*. *J. Exp. Botany* **34**, 1463-1483.
- Colnaghi, R., Pagani, S., Kennedy, C., Drummond, M.** (1996). Cloning, sequence analysis and overexpression of the rhodanese gene of *Azotobacter vinelandii*. *Eur. J. Biochem.* **236**, 240-248.
- Cook, P.F., Hara, S., Nalabolu, S. y Schnackerz, K.D.** (1992). pH-dependence of the absorbency and P-31 NMR-Spectra of O-acetylserine sulfhydrylase in the absence and presence of O-acetyl-L-serine. *Biochemistry* **31**, 2298-2303.
- Cook, P.F. y Wedding, R.T.** (1976). A reaction mechanism from steady state kinetics studies for O-acetylserine sulfhydrylase



- from *Salmonella typhimurium* LT-2. *J. Biol. Chem.* **251**, 2023-2029.
- Cooper, A.J.L.** (1983). Biochemistry of sulfur-containing aminoacids. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 187-222.
- Cram, W.J.** (1983). Characteristics of sulfate transport across plasmalemma and tonoplast of carrot root cells. *Plant Physiol.* **72**, 204-211
- Cram, W.J.** (1990). Uptake and transport of sulfate. En: Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants. (H. Rennenberg, C.H. Brunold, L.J. de Kok & I. Stulen eds.). Academic Publishing, The Hague, Netherlands.
- Crane, B.R., Siegel, L.M. y Getzoff, E.D.** (1995). Sulfite reductase structure at 1.6 Å. Evolution and catalysis for reduction of inorganic anions. *Science* **270**, 59-67.
- Chambers, L.A. y Trüding, P.A.** (1971). Cysteine and S-sulphocysteine biosynthesis in bacteria. *Arch. Mikrobiol.* **77**, 165-184.
- Chauncey, T.R. y Westley, J.** (1983a). Improved purification and sulfhydryl analysis of thiosulfate reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **744**, 304-311.
- Chauncey, T.R. y Westley, J.** (1983b). The catalytic mechanism of yeast thiosulfate reductase. *J. Biol. Chem.* **258**, 15037-15045.
- Chauncey, T.R., Uhteg, L.C., y Westley, J.** (1987). Thiosulfate reductase. *Methods in enzymology.* **143**, 350-354.
- Datko, A.H. y Mudd, S.H.** (1984). Sulfate uptake and its regulation in *Lemna paucicostata* Hegelm. 6746. *Plant Physiol.* **75**, 466-473.
- Davies, J.P., Yildiz, F. y Grossman A.R.** (1994). Mutants of *Chlamydomonas* with aberrant responses to sulfur deprivation. *The Plant Cell* **6**, 53-63.
- Diessner, W. y Schmidt, A.** (1981). Isoenzymes of cysteine synthase in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. *Z. Pflanzenphysiol.* **102**, 57-68.
- Droux, M., Martin, J., Sajus, P. y Douce, R.** (1992). Purification and characterization of O-acetyl-(thiol)lyase from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**, 379-390.

- Dungan, J.M. y Horowitz, P.M.** (1993). Thermally perturbed rhodanese can be protected from inactivation by self-association. *Journal of Protein Chemistry* **12**, 311-322.
- Fankhauser, H. y Brunold, C.** (1979). Localization of O-acetyl-L-serine sulfhydrylase in *Spinacea oleracea* L. *Plant Sci. Lett.* **14**, 185-192.
- Ferro-Luzzi Ames G. y Joshi, A.K.** (1990). Energy coupling in bacterial periplasmic permeases. *J. Bacteriol.* **172**, 4133-4137.
- Findley, J.E. y Akagi, J.M.** (1969). Evidence for thiosulfate formation during sulfite reduction by *Desulfovibrio vulgaris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 266-271.
- Gaitonde, M.K.** (1967). A Spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring aminoacids. *Biochem. J.* **104**, 627-633.
- Gerwick, B.C. y Black, C.C.** (1979). Sulfur assimilation in C<sub>4</sub> plants. Intercellular compartmentation of adenosine-5'-triphosphate sulfurylase in crabgrass leaves. *Plant Physiol.* **64**, 590-593.
- Gerwick, B.C., Ku, S.B. y Black, C.C.** (1980). Initiation of sulfate activation: a variation in C<sub>4</sub> photosynthesis plants. *Science* **209**, 513-515.
- Giovanelli, J. y Mudd, S.H.** (1971). Transulfuration in higher plants. Partial purification and properties of  $\beta$ -cystathionase of spinach. *Biochim. Biophys. Acta* **227**, 654-670.
- Giovanelli, J., Mudd, S.H y Datko, A.H.** (1974). Homoserine esterification in green plants. *Plant Physiol.* **54**, 725-736.
- Giovanelli, J., Mudd, S.H y Datko, A.H.** (1978). Homocysteine biosynthesis in green plants. Physiological importance of the transulfurylation pathway in *Chlorella sorokiniana* growing under steady-state conditions with limiting sulfate. *J. Biol. Chem.* **253**, 5665-5667.
- Green, L.S. y Grossman, A.R.** (1988). Changes in sulfate transport characteristics and protein composition of *Anacystis nidulans* R2 during sulfur deprivation. *J. Bacteriol.* **170**, 583-587.



- Hansen, T.A.** (1994). Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **66**, 165-185.
- Hart, J.W. y Filner, P.** (1969). Regulation of sulfate uptake by aminoacids in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* **44**, 1253-1259.
- Heinzinger, N.K., Fujimoto, S.Y., Clark, M.A., Moreno, M.S. y Barret, E.L.** (1995). Sequence analysis of the PHS operon in *Salmonella Typhimurium* and the contribution of thiosulfate reduction to anaerobic energy metabolism. *J. Bacteriol.* **177**, 2813-2820.
- Hendrikson, H.R. y Conn, E.E.** (1969). Cyanide metabolism in higher plants. IV. Purification and properties of the  $\beta$ -cyanoalanine synthase of blue lupine. *J. Biol. Chem.* **244**, 2632-2640
- Hensel, G. y Trüper, H.G.** (1983). O-acetylserinesulfhydrylase and S-sulfocysteine synthase activities of *Rhodospirillum tenue*. *Arch. Microbiol.* **134**, 227-232.
- Hodson, R.C. y Schiff, J.A.** (1971). Studies of sulfate utilization by algae. 8. The ubiquity of sulfate reduction to thiosulfate. *Plant Physiol.* **47**, 296-299.
- Hoppe, W. y Schwenn, J.D.** (1981). *In vitro* biosynthesis of the plant sulfolipid: on the origin of the sulphonate group. *Z. Naturforsch* **36c**, 820-826.
- Horowitz, P.M. y Xu, R.F.** (1992). Acid pH-induced conformational changes in bovine liver rhodanese. *J. Biol. Chem.* **267**, 19464-19469.
- Hryniewicz, M., Sirko, A., Palucha, A., Böck, A. y Hulanicka, D.** (1990). Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12. Identification of a gene encoding a novel protein involved in thiosulfate binding. *J. Bacteriol.* **172**, 3358-3366.
- Hulanicka, M.A., Garrett, C., Jagura-Burdzy, G. y Kredich, N.M.** (1986). Cloning and characterization of the *cys* AMK region of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **168**, 322-327.

- Hutner, S.H., Provosoli, L., Schatz, A. y Haskins, C.P. (1950). Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Amer. Phil. Soc.* **94**, 152-170.
- Ikegami, F., Kaneko, M., Kamiyama, H. y Murakoshi, I. (1988a). Purification and characterization of cysteine synthases from *Citrullus vulgaris*. *Phytochemistry* **27**, 697-701.
- Ikegami, F., Kaneko, M., Kobori, M., y Murakoshi, I. (1988b). Purification and characterization of cysteine synthase from *Brassica juncea*. *Phytochemistry* **27**, 3379-3383.
- Ikegami, F., Kaneko, M., Lambein, F., Kuo, Y. y Murakoshi, I. (1987). Difference between uracilylalanine synthases and cysteine synthases in *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **26**, 2699-2704.
- Ikegami, F., Ongena, G., Sakai, R., Itagaki, S., Kobori, M., Ishikawa, T., Kuo, Y.H., Lambein, F. y Murakoshi, I. (1993). Biosynthesis of  $\beta$ -(isoxazolin-5-on-2-yl)-L-alanine by cysteine synthase in *Lathyrus sativus*. *Phytochemistry* **33**, 93-98.
- Jeanjean, R. y Broda, E. (1977). Dependence of sulphate uptake by *Anacystis nidulans* on energy, on osmotic shock and on sulphate starvation. *Arch. Microbiol.* **114**, 19-23.
- Jensen, P., y König, T. (1982). Development of regulation mechanisms for sulfate influx in spring wheat. *Physiol. Plant.* **55**, 459-464.
- Jones, S.L. y Smith, I.K. (1981). Sulfate transport in cultured tobacco cells. Effects of calcium and sulfate concentration. *Plant Physiol.* **67**, 445-448.
- Jones-Mortimer, M.C. (1968). Positive control of sulfate reduction in *Escherichia coli*: the nature of the pleiotropic cysteineless mutants of *E. coli* K12. *Biochem. J.* **110**, 589-595.
- Jorgensen, B.B. (1988). En: The Nitrogen and Sulphur Cycles. (Cole, J.A. and Ferguson, S.J. eds.). Cambridge University Press.
- Kakes, P. y Hakvoort, H. (1992). Is there rhodanese activity in plants?. *Phytochemistry* **31**, 1501-1505.

- Kellog, W.W., Cadle, R.D., Allen, E.R., Lazrus, A.L. y Martell, E.A.** (1972). The Sulfur Cycle. *Science* **175**, 587-596.
- Kelly, D.P.** (1988). Oxidation of sulfur compounds. En: *The Nitrogen and Sulphur Cycles*. 42nd Symposium of the Society for General Microbiology (Cole & Ferguson, eds.). Cambridge University Press.
- Kitano, K., Nozaki, Y. y Imada, A.** (1985). Selective accumulation of unsulfated carbapenem antibiotics by sulfate transport-negative mutants of *S. Griseus* subsp. *Cryophilus* C-19393. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 677-684.
- Klonus, D., Hofgen, R., Willmitzer, L y Riesmeier, J.W.** (1994). Isolation and characterization of two cDNA clones encoding ATP-sulfurylase from potato by a complementation of a yeast mutant. *Plant J.* **6**, 105-112.
- Klonus, D., Riesmeier, J.W. y Willmitzer, L.** (1995). A cDNA clone for an ATP-sulfurylase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **107**, 653-654.
- Knowles, F.C.** (1986). Enzymatic reactions involving orthoarsenate: arsenate is competitive with sulfate in the ATP-sulfurylase reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**, 767-770.
- Koguchi, O. y Tamura, G.** (1988). Ferredoxin-sulfite reductase from a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 373-380.
- Koguchi, O., Takahashi, H y Tamura, G.** (1988). Purification and partial characterization of ferredoxin-sulfite reductase from rape leaves. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1867-1868.
- Kredich, N.M.** (1987). Biosynthesis of cysteine. En: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. (Niedhart ed.). American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 419-428.
- Kredich, N.M.** (1971). Regulation of L-cysteine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. I. Effects of growth on varying sulfur sources and O-acetyl-L-serine on gene expression. *J. Biol. Chem.* **246**, 3474-3484.

- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 1268-1272.
- Lass, B. y Ullrich-Eberius, C.I.** (1984). Evidence for proton/sulphate cotransport and its kinetics in *Lemna gibba* G1. *Planta* **161**, 53-60.
- Laudenbach, D.E. y Grossman, A.** (1991). Characterization and mutagenesis of sulfur-regulated genes in a cyanobacterium: evidence for function in sulfate transport. *J. Bacteriol.* **173**, 2739-2750.
- Laudenbach, D.E., Ehrhardt, D., Green, L. y Grossman, A.** (1991). Isolation and characterization of a sulfur-regulated gene encoding a periplasmically localized protein with sequence similarity to rhodanese. *J. Bacteriol.* **173**, 2751-2760.
- Lenstek, T., Murillo, M. y Cervantes, M.** (1994). Cloning of a cDNA encoding ATP-sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* by functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* **105**, 897-902.
- León, J.** (1990). Purificación, regulación e inmovilización de la O-acetil-L-serina sulfhidrilasa del alga eucariótica *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla. Sevilla.
- León, J., Romero, L.C., Galván, F. y Vega, J.M.** (1987). Purification and physicochemical characterization of O-acetyl-L-serine sulfhydrylase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* **53**, 93-99.
- Leyh, T.S.** (1993). The Physical Biochemistry and Molecular Genetics of sulfate activation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 515-542.
- Lunn, J.E., Droux, M., Martin, J. y Douce, R.** (1990). Localization of ATP-sulfurylase and O-acetylserine(thiol)lyase in spinach leaves. *Plant Physiol.* **94**, 1345-1352.
- Luo, G-X. y Horowitz, P.M.** (1994). The sulfurtransferase activity and structure of rhodanese are affected by site-directed replacement of arg-186 or lys-249. *J. Biol. Chem.* **269**, 8220-8225.

- Luo, G.X., Hua, S. y Horowitz, P.M.** (1995). Mutation in the interdomain tether influences the stability and refolding of the enzyme rhodanese. *Biochim. Biophys. Acta* **1252**, 165-171.
- Lydiate, D.J., Mendez, C., Kieser, H.M. y Hopwood, D.A.** (1988). Mutation and cloning of clustered *Streptomyces* genes essential for sulfate metabolism. *Molecular and General Genetics* **211**, 415-423.
- Masada, M., Fukushima, K. y Tamura, G.** (1975). Cysteine synthase from rape leaves. *J. Biochem.* **77**, 1107-1115.
- Mendoza, J.A., Rogers, E., Lorimer, G.H. y Horowitz, P.M.** (1991). Unassisted refolding of urea unfolded rhodanese. *J. Biol. Chem.* **266**, 3587-3591.
- Mendoza, J.A., Lorimer, G.H. y Horowitz, P.M.** (1992). Chaperonin *cpn60* from *Escherichia coli* protects the mitochondrial enzyme rhodanese against heat inactivation and supports folding at elevated temperatures. *J. Biol. Chem.* **267**, 17631-17634.
- Menon, V.K.N. y Varma, A.K.** (1982). Sulfate uptake in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**, 141-146.
- Mercer, E.I. y Thomas, G.** (1969). The occurrence of ATP-adenylylsulphate 3'-phosphotransferase in the chloroplasts of higher plants. *Phytochemistry* **8**, 2281-2285.
- Metzler, D.E.** (1981). En: Biochemistry. The chemical reactions of living cells. Academic Press, New York.
- Millard, P. y Evans, L.V.** (1982). Sulphate uptake in the unicellular marine red alga *Rhodella maculata*. *Arch. Microbiol.* **131**, 165-169.
- Miller, B.E. y Kredich, N.M.** (1987). Purification of the *cysB* protein from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **262**, 6006-6009.
- Miller-Martini, D.M., Chirgwin, J.M. y Horowitz, P.M.** (1994). Mutations of non catalytic sulfhydryl-groups influence the stability, folding and oxidative susceptibility of rhodanese. *J. Biol. Chem.* **269**, 3423-3428.
- Moller, M.E. y Evans, L.V.** (1976). Sulphate activation in the unicellular red alga *Rhodella*. *Phytochemistry* **15**, 1623-1626.

- Murakoshi, I., Ikegami, F. y Kaneko, M.** (1985). Purification and properties of cysteine synthase from *Spinacia oleracea*. *Phytochemistry* **24**, 1907-1911.
- Murakoshi, I., Kaneko, M., Koide, C. y Ikegami, F.** (1986). Enzymatic synthesis of the neuroexcitatory amino acid quisqualic acid by cysteine synthase. *Phytochemistry* **25**, 2759-2763.
- Murguía, J.R., Bellés, J.M. y Serrano, R.** (1995). A salt-sensitive 3'(2')5'-biphosphate nucleotidase involved in sulfate activation. *Science* **267**, 232-234.
- Murillo, M. y Lenstek, T.** (1995). ATP-sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* and *Escherichia coli* are functionally equivalent but structurally and kinetically divergent: nucleotide sequence of two ATP-sulfurylase cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Arch. Biochem. Biophys.* **323**, 195-204.
- Murphy, M.J. y Siegel, L.M.** (1973). Siroheme and sirohydrochlorin. The basis of a new type of porphyrin-related prosthetic group common to assimilatory and dissimilatory sulfite reductases. *J. Biol. Chem.* **248**, 6911-19.
- Nakamura, G. y Tamura, G.** (1989). Five isoforms of cysteine synthase in rape leaves. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2537-2538.
- Nakamura, T., Iwahashi, H. y Eguchi, Y.** (1984). Enzymatic proof for the identity of the S-sulfocysteine synthase and cysteine synthase B of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **158**, 1122-1127.
- Nakamura, T., Kon, Y., Iwahashi, H. y Eguchi, Y.** (1983). Evidence that thiosulfate assimilation by *Salmonella typhimurium* is catalysed by cysteine synthase. *J. Bacteriol.* **156**, 656-662.
- Ng, B.H. y Anderson, J.W.** (1978a). Chloroplast cysteine synthases of *Trifolium repens* and *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **17**, 879-885.
- Ng, B.H. y Anderson, J.W.** (1978b). Synthesis of selenocysteine by cysteine synthases from selenium accumulator and non-accumulator plants. *Phytochemistry* **17**, 2069-2074

- Nissen, P. y Nissen, O.** (1983). Validity of the multiphasic concept of ion absorption in plants. *Physiol. Plant.* **57**, 47-56.
- Noji, M., Murakoshi, I. y Saito, K.** (1994). Molecular cloning of a cysteine-synthase cDNA from *Citrillus vulgaris* (watermelon) by genetic complementation in an *Escherichia coli* *cys*<sup>-</sup> autotroph. *Mol. Gen. Genetics* **244**, 57-66.
- Ogasawara, Y., Isoda, S. y Tanabe, S.** (1995). Reconstitution of an iron-sulfur cluster with bound sulfur. A possible source of acid-labile sulfur in biological systems. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **18**, 1045-1048.
- Ostrowski, J., Jagura-Burdzy, G. y Kredich, N.M.** (1987). DNA sequences of the *cysB* regions of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 5999-6005.
- Pagani, S. y Galante, Y.M.** (1983). Interaction of rhodanese with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **742**, 278-284.
- Pagani, S., Bonomi, F. y Cerletti, P.** (1984). Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin. *Eur. J. Biochem.* **142**, 361-366.
- Pagani, S., Eldridge, M. y Eady, R.R.** (1987). Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: rhodanese-catalyzed restoration of activity of the inactive 2Fe species of the Fe protein. *Biochem. J.* **244**, 485-488.
- Passera, C. y Ghisi, R.** (1982). ATP-sulphurylase and O-acetylserine sulfhydrylase in isolated mesophyll protoplasts and bundle sheath strands of S-deprived maize leaves. *J. Exp. Bot.* **33**, 432-438.
- Peck, H.D. y Lissolo, T.** (1988). Assimilatory and dissimilatory sulphate reduction: enzymology and bioenergetics. En: *The Nitrogen and Sulphur Cycles*. (Cole, J.A. and Ferguson, S.J. eds.). Cambridge University Press.
- Peck, H.D., Tedro, S. y Kamen, M.D.** (1974). Sulfite reductase activity in extracts of various photosynthetic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 2404-2406.

- Pérez-Castiñeira, J.R., Prieto, J.L. y Vega, J.M.** (1992). Sulphate uptake in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phyton* **32**, 91-94.
- Peterson, G.L.** (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346-356.
- Ploegman, J.H., Drent, G., Kalk, K.H., Hol, W.G.J., Heinrikson, R.L., Keim, P., Weng, L. y Russell, J.** (1978). The covalent and tertiary structure of bovine liver rhodanese. *Nature* **273**, 124-129.
- Reuveny, Z. y Filner, P.** (1977). Regulation of adenosine triphosphate sulfurylase in cultured tobacco cells. Effects of sulfur and nitrogen sources on the formation and decay of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **252**, 1858-1864.
- Reuveny, Z., Dougall, D.K. y Trinity, P.M.** (1980). Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6670-6672.
- Romer, S., d'Harlingue, A., Camara, B., Schantz, R. y Kuntz, M.** (1992). Cysteine synthase from *Capsicum annuum* chromoplasts. Characterization and cDNA cloning of an up-regulated enzyme during fruit development. *J. Biol. Chem.* **267**, 17966-17970.
- Saito, K., Tatsuguchi, K., Murakoshi, I. y Hirano, H.** (1993). cDNA cloning and expression of cysteine synthase B localized in chloroplast of *Spinacia oleracea*. *FEBS Lett.* **324**, 247-252.
- Satischandran, S. y Markham, G.D.** (1989). Adenosine-5'-phosphosulfate kinase from *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **264**, 15012-15016.
- Schedel, M., Vanselow, M. y Trüper, H.G.** (1979). Siroheme sulfite reductase isolated from *Chromatium vinosum*. Purification and investigation of some of its molecular and catalytic properties. *Arch. Microbiol.* **121**, 29-36.
- Schmidt, A.** (1976a). Development of the adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Plant Physiol.* **78**, 164-168.



- Schmidt, A.** (1976b). The adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase from spinach (*Spinacea oleracea* L.). Stabilization, partial purification and properties. *Planta* **130**, 257-263.
- Schmidt, A.** (1977a). Protein-catalyzed isotopic exchange reaction between cysteine and sulfide in spinach leaves. *Z. Naturforsch* **32**, 219-225.
- Schmidt, A.** (1977b). Exchange of cysteine-bound sulfide with free sulfide and cysteine synthase activity in *Chlorella pyrenoidosa*. *Z. Pflanzenphysiol.* **84**, 435-446.
- Schmidt, A.** (1981). The role of thioredoxins for enzyme regulation in cyanobacteria. En: *Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur*. (Bothe, H. Y Trebst, A., eds.). Springer, Berlín. pp. 327-333.
- Schmidt, A.** (1982). Assimilation of sulfur. En: *On the origin of chloroplasts*. (Schiff, J.A. ed.), Elsevier, Amsterdam. pp. 179-190.
- Schmidt, A.** (1986). Regulation of sulfur metabolism in plants *Progress in Botany*, **48**, 133-150.
- Schmidt, A. y Christen, U.** (1978). A factor-dependent sulfotransferase specific for 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. *Planta* **140**, 239-244.
- Schmidt, A. y Jäger, K.** (1992). Open questions about sulfur metabolism in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 325-349.
- Schmidt, A. y Trebst, A.** (1969). The mechanism of photosynthetic sulfate reduction by isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **180**, 529-535.
- Schmidt, A., Abrams, W.R. y Schiff, J.A.** (1974). Reduction of adenosine 5'-phosphosulfate to cysteine in extracts from *Chlorella* and mutants blocked for sulfate reduction. *Eur. J. Biochem.* **47**, 423-434.
- Schmidt, A., Erdle, I. y Gamon, B.** (1984). Isolation and characterization of thiosulfate reductases from the green alga *Chlorella fusca*. *Planta* **162**, 243-249.

- Schwenn, J.D. y Depka, B.** (1977). Assimilatory sulfate reduction by chloroplast: the regulatory influence of adenosine-mono and adenosine-diphosphate. *Z. Naturforsch* **32c**, 792-797.
- Schwenn, J.D. y Jender, H.G.** (1981). A kinetic investigation of the APS-kinase from *Chlamydomonas reinhardtii* cw15. *Phytochemistry* **20**, 601-604.
- Schwenn, J.D. y Kemena, A.** (1984). Expression of the plant sulphite reductase in cell suspension cultures from *Catharanthus roseus* L. *Planta* **160**, 151-158.
- Schwenn, J.D. y Schriek, U.** (1984). A new role for thioredoxin in assimilatory sulfate reduction. Activation of the adenylylsulphate kinase from green alga *Chlamydomonas reinhardtii* cw15. *FEBS Lett*, **170**, 76-80.
- Schwenn, J.D. y Trebst, A.** (1976). En: The intact chloroplast (J. Barber eds.). Elsevier, Amsterdam. pp. 315-334.
- Siegel, L.M.** (1965). A direct microdetermination for sulfide. *Anal. Biochem.* **11**, 126-132.
- Siegel, L.M.** (1975). The Biochemistry of the sulfur cycle. En: metabolism of sulfur compounds, Vol. **VII**, 3ª edición. (David M. Greenberg de.). Academic Press, Inc.
- Smith, I.K.** (1972). Studies of L-cysteine biosynthetic enzymes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **50**, 477-479.
- Smith, I.K.** (1976). Characterization of sulfate transport in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* **58**, 358-362.
- Smith, I.K.** (1980). Regulation of sulfate assimilation in tobacco cells. Effect of nitrogen and sulfur nutrition on sulfate permease and O-acetylserine sulfhydrylase. *Plant Physiol.* **66**, 877-883.
- Smith, K.E. y Fisher, M.T.** (1995). Interactions between the Groe chaperonins and rhodanese. Multiple intermediates and release and rebinding. *J. Biol. Chem.* **270**, 21517-21523.
- Solomonson, L.P.** (1981). Cyanide as a metabolic inhibitor. En: Cyanide in Biology (Vennesland, Conn, Knowles, Westley and Wining, eds.). Academic Press, London.
- Sörbo, B.H.** (1955). Rhodanese. *Methods in enzymology* **2**, 334-337.

- Spedding, D.J., Ziegler, Y., Hampp, R. y Ziegler, H.** (1980). Effect of pH on the uptake of <sup>35</sup>S-sulphur from sulfate, sulfite and sulfide by isolated spinach chloroplasts. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* **96**, 351-364.
- Sueoka, N., Chiang, K.S. y Kates, J.R.** (1967). Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *J. Mol. Biol.* **25**, 47-66.
- Sykes, A.H.** (1981). Early studies on the toxicology of cyanide. En: Cyanide in Biology (Vennesland, Conn, Knowles, Westley and Wining, eds.). Academic Press, London.
- Tamura, G., Iwasawa, T., Masada, M. y Fukushima, K.** (1976). Some properties of cysteine synthase from radish roots. *Agric. Biol. Chem.* **40**, 637-638.
- Thomas, D., Barbey, R., Henry, D. y Surdin-Kerjan, Y.** (1992). Physiological analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in sulphate assimilation. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2021-2028.
- Thompson, G.A., Datko, A., Mudd, S.H. y Giovanelli, J.** (1981). Methionine biosynthesis in *Lemna*. Studies on the regulation of cystathionine- $\gamma$ -synthase, O-phosphohomoserine sulfhydrylase and O-acetylserine sulfhydrylase. *Plant Physiol.* **69**, 1077-1083.
- Trüding, P.A. y Loughlin, R.E.** (1981). Metabolism of simple sulphur compounds. En: Amino acid metabolism and sulphur metabolism. Vol. **19**, pp. 165-236.
- Trüper, H.G.** (1984). Phototrophic bacteria and their sulphur metabolism. En: Sulfur: its significance for Chemistry, for the Geo-, Bio- and Cosmosphere and Technology. (Müller, A. and Krebs, B. eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 351-365.
- Tsang, M.L.S. y Schiff, J.A.** (1973). Thiol dependent side products of the APS-sulfotransferase ("S" fraction) reaction. *Plant Physiol.* **51**, S-53.

- Tsang, M.L.S. y Schiff, J.A.** (1975). Two patterns of assimilatory sulfate reduction in photosynthetic and non-photosynthetic organisms. *Plant Physiol.* **56**, S-194.
- Tsang, M.L.S. y Schiff, J.A.** (1976). Studies of sulfate utilization by algae. 17. Reaction of the adenosine-5'-phosphosulfate (APS) sulfotransferase from *Chlorella* and studies of model reactions which explain the diversity of side products with thiols. *Plant Cell Physiol.* **17**, 1209-1220.
- Tsang, M.L.S. y Schiff, J.A.** (1978). Studies of sulfate utilization by algae. 18. Identification of glutathione as a physiological carrier in assimilatory sulfate reduction by *Chlorella*. *Plant Sci. Lett.* **11**, 177-183.
- Turkowsky, A., Blotevogel, K.H. y Fischer, U.** (1991). Properties of a soluble thiosulfate sulfur transferase (rhodanese) of the marine methanogen *Methanosarcina frisia*. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**, 251-256.
- Tweedie, J.W. y Segel, I.K.** (1970). Specificity of transport processes for sulfur, selenium, and molybdenum anions by filamentous fungi. *Biochim. Biophys. Acta* **196**, 95-106.
- Utkilen H.C., Heldal, M., y Knutsen, G.** (1976). Characterization of sulphate uptake in *Anacystis nidulans*. *Physiol. Plant.* **38**, 217-220.
- Vallée, M. y Jeanjean, R.** (1968). Le système de transport de  $\text{SO}_4^{2-}$  chez *Chlorella pyrenoidosa* et sa régulation. II. Recherches sur la régulation de l'entrée. *Biochim. Biophys. Acta* **150**, 607-617.
- Vega, J.M. y Kamin, H.** (1977). Spinach nitrite reductase. Purification and properties of a siroheme-containing iron-sulfur enzyme. *J. Biol. Chem.* **252**, 896-909.
- Vega, J.M., Garret, R.H. y Siegel, L.M.** (1975). Siroheme: a prosthetic group of the *Neurospora crassa* assimilatory nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* **250**, 7980-9.
- Vennesland, B., Pistorius, E.K. y Gewitz, H.-S.** (1981). En: Cyanide in Biology (Vennesland, Conn, Knowles, Westley and Wining, eds.). Academic Press, London.

- Volini, M. y Alexander, K.** (1981). Multiple forms and multiple functions of the rhodanases. En: Cyanide in Biology (Vennesland, Conn, Knowles, Westley and Wining, eds.). Academic Press, London.
- Weng, L., Henrikson, R.L. y Westley, J.** (1978). Active site and arginyl residues of rhodanese. *J. Biol. Chem.*, **253**, 8109-8119.
- Westley, J.** (1981). Cyanide and sulfane sulfur. En: Cyanide in Biology (Vennesland, Conn, Knowles, Westley and Wining, eds.). Academic Press, London.
- White, A., Handler, P., Smith, E.L., Hill, R.L. y Lehman, I.R.** (1983). Principios de Bioquímica. (McGraw Hill eds). New York.
- Yurkov, V.V., Krasilnikova, E.N. y Gorlenko, V.M.** (1994). Thiosulfate metabolism in the aerobic bacteriochlorophyll-A-containing bacteria *Erythromicobium hydrolyticum* and *Roseococcus thiosulfatophilus*. *Microbiology* **63**, 91-94.
- Zink, M.W.** (1984). Regulation of ATP-sulfurylase by various nitrogen and sulfur sources in cultured *Ipomoea* sp. *Can. J. Bot.* **62**, 2107-2113.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Excmo. Sr. Rector de la Universidad de Sevilla  
en el Claustro de Excmos. Señores Doctores

Don JOSE LUIS PRIETO RODRIGUEZ

por su Tesis Doctoral de

METABOLISMO DEL AZUFRE INORGANIZADO  
EN LA MICROALGA EUKARIOTICA C. reinhardtii

que ha sido aprobada por el Claustro de Excmos. Señores Doctores

por UNANIMIDAD

APTO " CON LAUDE "

18 NOVIEMBRE 1996

El Vocal,

*[Signature]*

El Vocal,

*[Signature]*

El Vocal,

*[Signature]*

El Secretario,

*[Signature]*

*[Signature]*

El Doctorado,

*[Signature]*

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672017