

intracatenario formado entre dos Cys distantes en la estructura primaria, lo que la mantendría compactada al desnaturalizarla con SDS. La incubación con DTT restituye totalmente la forma reducida de la enzima (carril 3).

Cabe destacar que no se descartan la formación de otros puentes disulfuros o de ácidos sulfénicos que no causaran una compactación apreciable, por lo que no se visualizarían por este método.

Por otro lado, la oxidación con NSP parece no producir una conformación distinta a la reducida (Carril 4), y su reducción por DTT sólo parece producir una banda más difusa (carril 5). Como se explicó en el apartado 4.1.5.4, esto podría deberse a una proteólisis causada por la reacción de Fenton (Fenton, 1894).

La oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue evaluada bajo dos condiciones: a alta concentración, en la que se espera observar las bandas correspondientes a formas no revertidas por agentes reductores, y a concentración baja, en la que se sabe el DTT revierte casi en su totalidad la oxidación, por lo que se visualizarían las formas que sí son revertidas. En los carriles 8 se observan dos bandas (“Ox2” y “Ox3”) distintas a la advertida luego de la oxidación con diamida. Estas serían las correspondientes a formas no revertidas por agentes reductores, como se ve en el carril 9. Sin embargo, no es sencillo saber a qué residuos atribuir el efecto, ya que a esta concentración de peróxido se oxidan Met, His, Lys, Tyr y Trp, además de las Cys (Zhang, 2010). Los radicales libres también pueden producir proteólisis y otros efectos relativamente inespecíficos. Finalmente, la oxidación causada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en baja concentración (carril 6) produce igual efecto que el observado luego de la oxidación con diamida, el cual es revertido totalmente por incubación con DTT (carril 7).

#### 4.1.5.7 Titulación de formas oxidadas de la *PtrPGKasa-1*.

Para poder dilucidar cuántos aminoácidos están involucrados en la oxidación y cuáles son sus formas oxidadas, y así plantear hipótesis sobre el mecanismo por el cual la *PtrPGKasa-1* se inactivaría por oxidación, se decidió realizar estudios químicos, ya no cinéticos, de las Cys de la enzima. En primer lugar se titularon los tioles libres accesibles al solvente con el reactivo DTNB, agente que reacciona con iones tiolatos mediante una reacción de intercambio tiol-disulfuro (Ellman, 1959). De esta forma se

cuantificaron 5 Cys en la conformación nativa de la *PtrPGKasa-1* y 6 cuando la enzima era tratada con un agente desnaturalizante previo a la titulación (Fig. 4.1.37 “Red”), indicando la existencia de una Cys no accesible al solvente o no susceptible al ataque por oxidantes.

En el paso siguiente se decidió titular las Cys sensibles a la oxidación. Para esto se utilizó el reactivo alquilante ácido iodoacético (IAA). Este reactivo reacciona irreversiblemente con tioles libres en una sustitución nucleofílica formando el correspondiente derivado carboximetilo (Zander y col., 1998). En primer lugar se realizó un estudio cinético de la inhibición causada por IAA sobre la *PtrPGKasa-1* mediante ensayos de actividad enzimática idénticos a los realizados con los oxidantes en el apartado 4.1.5.2, hallándose una  $k'$  igual a  $1,1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . De esta forma se constató que las Cys de la *PtrPGKasa-1*, al menos las responsables de la pérdida de AE, fueran susceptibles a la metilación, la cual sería completa luego de una hora de incubación, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , con una concentración de 2 mM del agente metilante. Conocido esto, se decidió llevar a cabo la siguiente experiencia para titular las Cys susceptibles a la oxidación:

- 1) Oxidación de la *PtrPGKasa-1* con diamida 1 mM por 20 min.
- 2) Alquilación con IAA 2 mM durante 60 min: sólo se alquilarán las Cys que no se hayan oxidado.
- 3) Reducción con DTT 5 mM, 20 min: sólo se reducirán los tioles en estado oxidado. Las Cys metiladas quedarán como tales ya que esta modificación no es revertida por agentes reductores.
- 4) Titulación con DTNB de las Cys reducidas: en este paso sólo se titulan las Cys que hayan sido susceptibles a la oxidación en el primer paso.

Todas las incubaciones se realizaron en *buffer B*,  $[\text{PtrPGKasa-1}] = 12 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Luego de la incubación con cada reactivo, se lavó el exceso del mismo mediante ciclos de dilución-concentración, antes de agregar el agente siguiente.

La titulación final con DTNB mostró que 5 Cys son susceptibles a oxidación (Fig. 4.1.37 “Diam + IAA + DTT”), coherente con lo explicado anteriormente. La existencia de un número impar de tioles involucrados en la oxidación llevó a pensar en la probabilidad de que exista la formación de al menos un ácido sulfénico no transitorio, es decir, que no sea luego transformado a puente disulfuro.

Los -SOH son muy inestables por su elevada reactividad debida a su carácter electrofílico, lo que los hace muy susceptibles al ataque de nucleófilos. Sin embargo se han logrado cristalizar formas estables de este estado de oxidación en proteínas como la flavoproteína Npx (Yeh y col., 1996), tiofenotriptico (Ishii y col., 1996), 4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (Tripolt y col., 1993). Lui ha sugerido que la estabilidad del sulfénico se vería favorecida por un ambiente apolar además de, por supuesto, la ausencia de un tiol vecinal con quien reaccionar y formar un puente disulfuro de mayor estabilidad (Liu, 1977). Por otro lado, la ionización a sulfenato y la formación de puentes hidrógeno también resultarían estabilizantes. Por todo lo expuesto resulta de interés la visualización y detección de este estado de oxidación, para lo que se han propuesto varios métodos:

✓ Reducción con arsenito de sodio: arsenito reduce específicamente -SOH, y no puentes disulfuro (Radi y col., 1991; Saurin y col., 2004).

✓ Titulación con 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1, 3, diazole (NBD): este agente forma aductos con los -SH y con los -SOH que absorben a 420 nm y 347 nm, respectivamente (Ellis y Poole, 1997).

Se ensayó en primer lugar la reducción de -SOH mediante la incubación con arsenito. Para esto se oxidó la *Ptr*PGKasa-1 con diamida 1 mM (20 min), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM (5 min) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM (20 min). Para cada condición se titularon -SOH y Cys oxidables según:

A. Titulación de -SOH: se lavó el oxidante mediante ciclos de dilución-concentración, y se incubó con arsenito de sodio 10 mM durante 60 min. En este paso sólo se reducen los -SOH. Se volvió a lavar para quitar el arsenito y se titularon los tioles con DTNB. Cabe aclarar que el arsenito de sodio resulta inhibitorio de la *Ptr*PGKasa-1 por lo que este ensayo no puede realizarse midiendo recuperación de actividad enzimática de la forma en que se hizo para DTT o Trxs.

B. Titulación de tioles susceptibles a oxidación: igual procedimiento que el descrito en las páginas anteriores, pasos 2 a 4 (alquilación con IAA, reducción con DTT y titulación con DNTB).

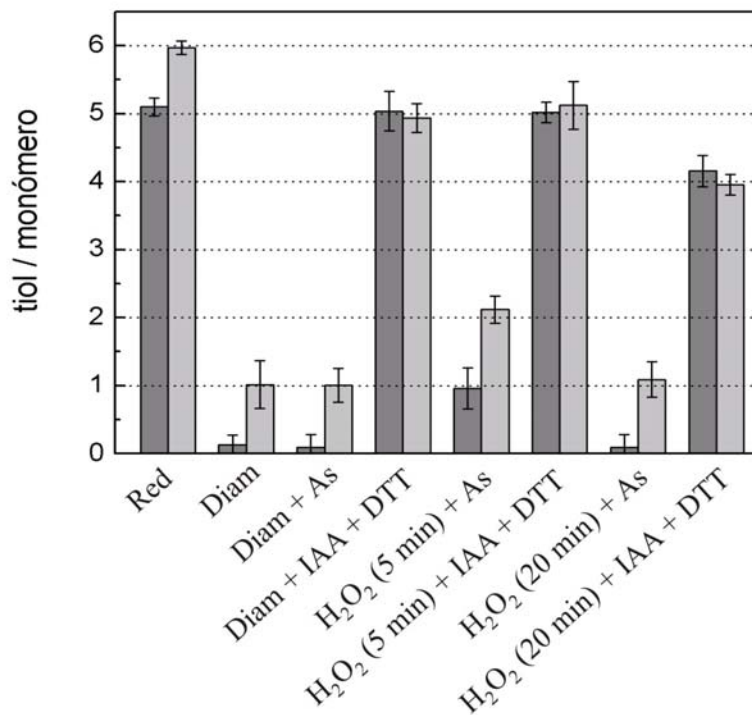
C. Titulación de tioles susceptibles a oxidación de la enzima desnaturalizada: igual procedimiento que el descrito en las páginas anteriores, pasos 2

a 4, pero con la adición de un tratamiento desnaturizante previo a la titulación con DTNB: alquilación con IAA, reducción con DTT, desnaturización de la *PtrPGKasa-1* con urea y titulación con DNTB de los tioles resultantes.

Todas las incubaciones se realizaron en *buffer* B, [*PtrPGKasa-1*] = 12  $\mu$ M, T = 25 °C.

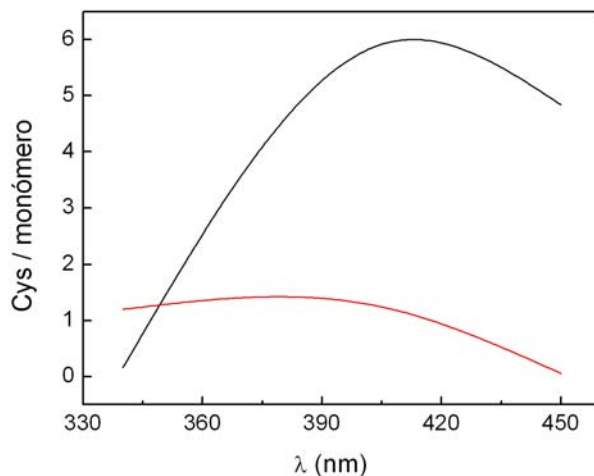
Los resultados obtenidos se observan en la Fig. 4.1.37. En cuanto a la oxidación con diamida, se observan 5 Cys oxidadas, las cuales serían revertidas por DTT (“Diam + IAA + DTT”) pero no por arsenito (“Diam + As”). Esto es coherente con el hecho de que no existiría un -SOH en este caso, sino la formación de un aducto PGKasa-SO-diamida, el cual no sería revertido por acción del arsenito de sodio. Al desnaturizar la *PtrPGKasa-1* resultante del tratamiento con diamida, la única Cys que se cuantifica sería la no susceptible a oxidación, ya sea con o sin posterior reducción con arsenito. Esta Cys sería sensible a la alquilación por IAA, pero no a la oxidación por diamida, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o DTNB. Se ha decripto este tipo de comportamiento para la albúmina de huevo, sugiriéndose que la Cys sería accesible al solvente, pero no reactiva frente a oxidantes (Anson, 1940). La oxidación causada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a tiempos cortos lleva a la titulación de 5 Cys oxidables [“H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 min) + IAA + DTT”], una de las cuales formaría un -SOH [“H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 min) + As”]. En cambio, al incubar la enzima con este agente durante un período más largo, sólo son cuantificadas 4 Cys y ningún ácido sulfénico, lo que podría deberse a la sobre-oxidación del -SOH a formas no revertidas por DTT ni arsenito [“H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 min) + IAA + DTT” y “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 min) + As”]. Los resultados de las enzimas desnaturizadas son equivalentes a los observados con diamida.

Resulta claro que, de las 6 Cys de la *PtrPGKasa-1*, una no se oxida y 5 son susceptibles a la oxidación. De estas últimas, una estaría oxidándose a -SOH y las restantes 4 serían responsables de la formación de dos puentes disulfuro.



**Fig. 4.1.37:** Titulación con DTNB de tioles susceptibles a la oxidación y de ácidos sulfénicos de la *PtrPGKasa-1* nativa y desnaturalizada. La oxidación se llevó a cabo con diamida 1 mM por 20 min (“Diam”) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM durante 5 min [“H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 min)”] y 20 min [“H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 min)”], [*PtrPGKasa-1*] = 12 μM. Dos métodos se aplicaron desde aquí: reducción con arsenito 10 mM, 60 min (“+ As”) o alquilación con IAA 2 mM, 60 min, seguido de reducción con DTT 5 mM por 20 min (“+ IAA + DTT”). Los tioles libres resultantes de ambas técnicas fueron cuantificados mediante incubación con DTNB (barras gris oscuro). También se trató la enzima con un agente desnaturalizante luego de cada tratamiento, con posterior titulación con DTNB (barras gris claro). Control sin oxidante titulado con DTNB: “Red”.

Como se mencionó previamente, los ácidos sulfénicos pueden también ser detectados y cuantificados mediante el uso del reactivo NBD (Ellis y Poole, 1997). Este agente forma aductos con -SH o -SOH que absorben a 420 nm y 347 nm, respectivamente. Utilizando como coeficiente de extinción 13.400 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para ambas longitudes de onda, es posible cuantificar SH-NBD o SOH-NBD (Ellis y Poole, 1997). Con este ensayo se confirmó la existencia de un -SOH (347 nm) y de un -SH no oxidado (420 nm) en la enzima tratada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM durante 5 min (Fig. 4.1.38). Como era de esperarse, las Cys de la *PtrPGKasa-1* reducida se encontraban todas en la forma de tiol.

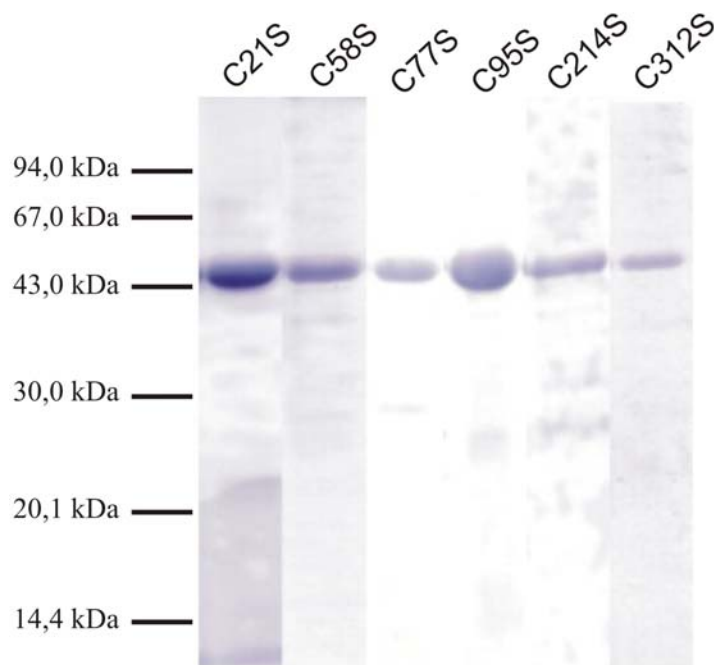


**Fig. 4.1.38:** Titulación de -SOH y tioles libres mediante cambios en las propiedades espectroscópicas de NBD. La *PtrPGKasa-1* (12  $\mu$ M) en sus formas oxidada ( $H_2O_2$  2 mM, 5 min, curva roja) o reducida (curva negra) fue tratada con NBD 0,8 mM durante 60 min.

#### 4.1.5.8 Producción, purificación y caracterización de mutantes simples de la *PtrPGKasa-1*.

Como se explicó, la *PtrPGKasa-1* tiene 6 Cys en las posiciones 21, 58, 77, 95, 214 y 312. Las cuatro primeras se encuentran muy cercanas al sitio de unión de 3PGA y las dos últimas se encuentran en el dominio de unión a ATP, pero lejanos del sitio de catálisis. Las distancias entre las Cys de cada dominio se muestran en la Tabla 4.1.8 (apartado 4.1.5). Teniendo en cuenta la flexibilidad de las cadenas laterales y el hecho de que el modelo pudiera no ser totalmente confiable en estas posiciones, ya que los templados no presentan Cys en las mismas, cualquier puente disulfuro dentro de cada dominio es factible. Sabiendo que la enzima cuenta con dos puentes disulfuro y un ácido sulfénico, se planteó como objetivo dilucidar cuáles son los aminoácidos responsables de cada forma de oxidación e inferir sobre el mecanismo por el cual la *PtrPGKasa-1* se inactivaría por oxidación. Para esto se obtuvieron mutantes simples en las que se cambió cada residuo Cys por una Ser utilizando la técnica *QuickChange PCR* (Wang y Malcolm, 1999): C21S, C58S, C77S, C95S, C214S y C312S. Para esto se utilizó como molde de la PCR el plásmido pET-19b/*PtrPGKasa-1* que permite la adición de His en el extremo N-terminal, y los pares de oligonucleótidos “CXS-1” y

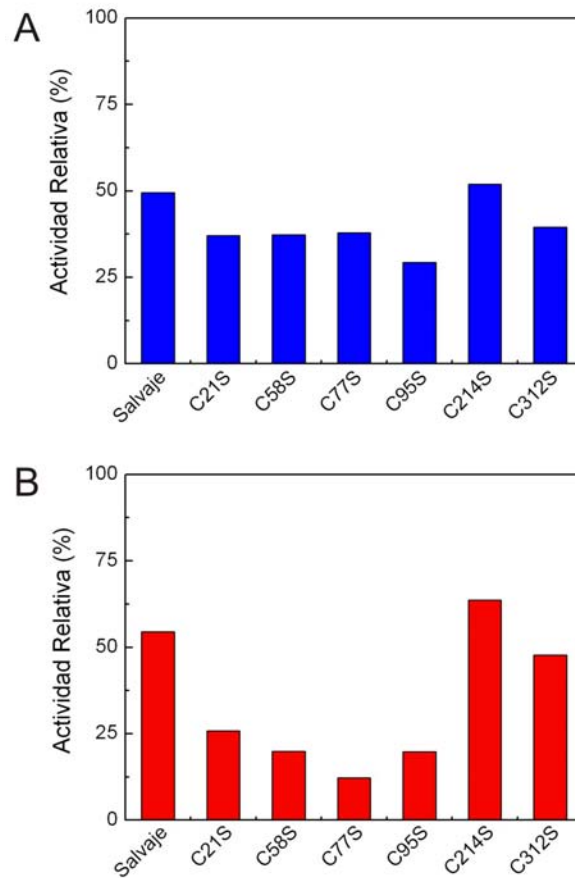
“CXS-2” donde X es la posición de la Cys a mutar, descritos en la Tabla 3.1 de Materiales y Métodos. Una vez confirmado mediante secuenciación completa que la única mutación que las proteínas contenían era la buscada, se transformaron células *E. coli* Rosetta (DE3) y se procedió a la expresión y purificación de las enzimas mediante IMAC, de idéntica manera que para la *PtrPGKasa-1-NHis*. Todas las enzimas se sobre-expresaron en forma soluble y activa. Como se observa en la Fig. 4.1.39, el grado de pureza alcanzado fue similar para todas las mutantes, superando en todos los casos el 90%, calculado con el programa *LabImage 2.7.0*.



**Fig. 4.1.39:** SDS-PAGE 12,5% de los extractos purificados de las mutantes de la *PtrPGKasa-1*.

Las *PtrPGKasas-1* purificadas fueron totalmente reducidas mediante la incubación con 2-ME 10 mM durante 30 min a 4 °C, luego de lo cual se quitó el reductor utilizando resinas de tamiz molecular y posterior concentrado de las enzimas. De esta forma se obtuvieron las proteínas totalmente reducidas y activas en *buffer B*, libres de reductor. Las actividades enzimáticas de todas las mutantes estuvieron en el orden de la encontrada para la enzima salvaje (~ 40 U/mg).

Para evaluar la afinidad de cada *Ptr*PGKasa-1 mutante por los sustratos se midió AE en presencia de concentraciones saturantes y no saturantes de cada uno. Así, en primer lugar se mantuvo 3PGA en concentración saturante (5 mM) y ATP 0,5 mM. Se calculó el porcentaje de AE en esta condición, siendo el 100% la AE obtenida cuando el medio de reacción contenía 5 mM de cada sustrato ( $V_M$ ). La misma experiencia se realizó con 3PGA 0,5 mM y ATP 5 mM. La concentración de  $Mg^{2+}$  se mantuvo siempre igual a 5 mM. Para el caso de la actividad en presencia de ATP no saturante (Fig. 4.1.40, A), las mutantes exhibieron un comportamiento similar al de la enzima salvaje, por lo que podría decirse que la afinidad por este sustrato no se vería afectada por las mutaciones. Sin embargo, al evaluar las velocidades obtenidas con concentraciones no saturantes de 3PGA, se observa un menor porcentaje de AE en las mutantes C21S, C58S, C77S y C95S, es decir en las enzimas cuyas mutaciones se encuentran cercanas al sitio de unión a este sustrato (Fig. 4.1.40, B), por lo que podría suponerse una disminución en la afinidad por 3PGA.





**Fig. 4.1.40:** Medida de Actividad Relativa (%) a concentraciones no saturantes de los sustratos ATP (A) y 3PGA (B), siendo el 100% la actividad enzimática de cada mutante a concentraciones saturantes de ambos sustratos (5 mM cada uno). (A) ATP 0,5 mM y 3PGA 5 mM. (B) ATP 5 mM y 3PGA 0,5 mM. En ambas,  $[\text{MgCl}_2] = 5 \text{ mM}$ .

Todas las medidas de actividad enzimática de los estudios redox que continúan fueron realizadas bajo concentraciones saturantes de sustratos:  $[\text{ATP}] = [\text{3PGA}] = [\text{MgCl}_2] = 5 \text{ mM}$ .

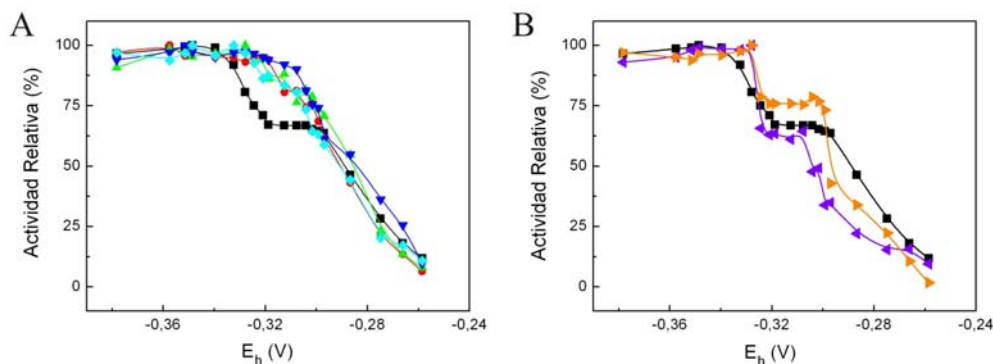
Se efectuaron los ensayos de óxido-reducción para obtener los valores de constantes cinéticas redox para las *Ptr*PGKasas-1 mutantes. Todas manifestaron el mismo mecanismo de oxidación de dos pasos que la enzima salvaje, descrito en el apartado 4.1.5.1 (A). Como se ve en la Tabla 4.1.11, ninguna mutante perdió la capacidad de inactivarse por agentes oxidantes. Por el contrario las C58S, C77S y C95S resultaron claramente más susceptibles a la oxidación por diamida, exhibiendo mayor afinidad por la misma (menor  $K_1$ ). Este efecto también fue observado cuando el agente oxidante fue  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pero en menor magnitud. En cambio, no se apreciaron modificaciones significativas en las constantes cinéticas de la oxidación con NPS.

	Salvaje	C21S	C58S	C77S	C95S	C214S	C312S
<b><u>DIAMIDA</u></b>							
$k'$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,24	0,17	1,20	0,95	0,68	0,18	0,27
$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )	82,0	52,0	10,3	7,11	6,05	144	50,0
$k''$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	49,0	55,0	1.940	2.220	1.860	21	89,0
<b><u>NPS</u></b>							
$k'$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,08	0,09	0,13	0,12	0,14	0,05	0,18
$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )	437	438	725	410	464	1.000	1.840
$k''$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	2,90	3,27	3,01	4,84	5,07	0,90	1,62
<b><u>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></u></b>							
$k'$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,16	0,10	1,22	0,40	0,25	0,08	0,15
$K_I$ ( $\mu\text{M}$ )	1.500	1.790	3.270	1.280	518	1.100	2.220
$k''$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	1,77	0,93	6,22	5,15	8,08	1,18	1,10

**Tabla 4.1.11:** Constantes cinéticas correspondientes a la oxidación de las mutantes de la *Ptr*PGKasa-1 con los oxidantes diamida, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NPS. La incubación de las enzimas se realizaron a 25 °C, [*Ptr*PGKasa-1] = 0,1  $\mu\text{M}$ , en *buffer* B desgasificado, pH 8,0.

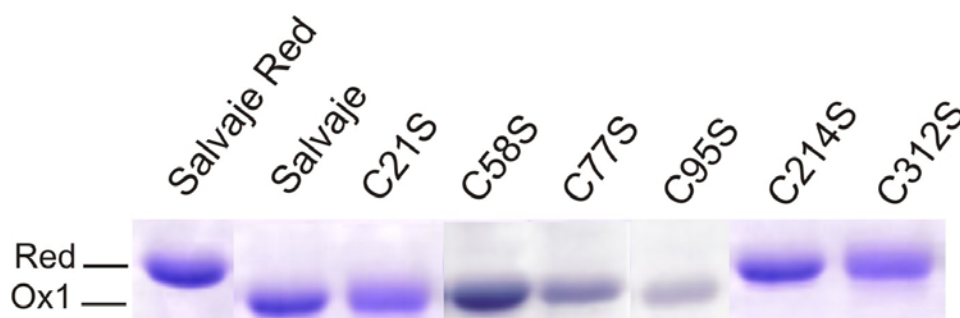
Al ensayar reducción por DTT de las *PtrPGKasa-1* oxidadas con diamida, se obtuvieron valores de constantes cinéticas similares a las de la enzima salvaje. Asimismo, todas las mutantes exhibieron el mismo mecanismo de reducción de un paso, descrito en el apartado 4.1.5.1 (B).

Se analizó el efecto de cada mutación sobre los valores de potenciales de reducción  $E_m$  de la *PtrPGKasa-1*, para lo cual se realizaron las titulaciones redox de igual manera que para la enzima salvaje (apartado 4.1.5.5). Como se observa en la Fig. 4.1.42 (B), dos mutantes exhiben el mismo comportamiento bifásico y manifiestan dos valores de  $E_m$  similares a los de la enzima salvaje: C214S ( $-0,325 \pm 0,001$  V y  $-0,297 \pm 0,001$  V) y C312S ( $-0,325 \pm 0,003$  V y  $-0,286 \pm 0,002$  V). Por otro lado, mutaciones en las Cys-21, 58, 77 y 95 tienen como consecuencia la pérdida del potencial redox más negativo, exhibiendo sólo un valor de  $E_m$ , como sigue: C21S ( $-0,290 \pm 0,001$  V), C58S ( $-0,287 \pm 0,001$  V), C77S ( $-0,284 \pm 0,001$  V) y C95S ( $-0,291 \pm 0,001$  V). Estos resultados indicarían que los cambios producidos en esta zona, cercana al sitio de unión a 3PGA, conllevarían modificaciones en la tendencia de adquirir electrones de la *PtrPGKasa-1*, en su electronegatividad. Esto sugiere un efecto “colaborativo” entre estas Cys en la aparición del primer centro redox, termodinámicamente más sensible a la oxidación.



**Fig. 4.1.42:** Titulación redox de mutantes de la *PtrPGKasa-1*. Gráfica de Actividad Relativa (%), siendo 100 % la máxima A<sub>Ee</sub> alcanzada por cada enzima (0,1 μM), en función del potencial redox. [2ME] + [HEDS] = 10 mM; pH 8,0; T = 25 °C; t de equilibrado = 30 min. Enzima salvaje (■). (A) C21S (●), C58S (▲), C77S (▼) y C95S (◆). (B) C214S (◀) y C312S (▶). Los valores experimentales fueron ajustados a la ecuación de Nerst para un sistema redox de dos electrones.

Se realizó un SDS-PAGE no reductor al 8,5% de las enzimas mutantes de la *PtrPGKasa-1* en sus formas oxidadas. Cabe aclarar que todas las enzimas mutantes reducidas migraron de la misma forma que la enzima salvaje. Las enzimas (2  $\mu\text{M}$  en *buffer* B) se trataron con diamida 1 mM durante 20 min a 25 °C y se sembraron 2  $\mu\text{g}$  en un SDS-PAGE en ausencia de agente reductor. Como se ve en la Fig. 4.1.43, sólo las mutantes C214S y C312S muestran ausencia de la banda “Ox1”, por lo que puede concluirse que las Cys-214 y 312 estarían formando un puente disulfuro. Estos dos residuos se encuentran distantes casi 100 aminoácidos uno del otro en la estructura primaria, por lo que un enlace entre ellos se vería reflejado en un cambio de movilidad electroforética apreciable en un SDS-PAGE. Sin embargo, este puente disulfuro no sería el responsable de la pérdida de AE ya que las constantes cinéticas del fenómeno de inactivación por oxidación para las mutantes C214S y C312S son similares a la de la enzima salvaje (Tabla 4.1.11) y los perfiles de potenciales redox también son coincidentes (Fig. 4.1.42). Las C21S, C58S, C77S y C95S no presentaron diferencias en la movilidad electroforética. Por lo tanto, la banda “Ox1” no sería la conformación de la enzima responsable de la pérdida de actividad por oxidación, ya que las C214S y C312S no la presentan y, aún así, son inactivadas. Los mismos resultados se obtuvieron oxidando las proteínas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a bajas concentraciones y tiempos cortos. Todas las oxidaciones fueron revertidas por DTT, recuperándose totalmente la banda “Red”.



**Fig. 4.1.43:** SDS-PAGE no reductor 8,5% de las formas oxidadas de la *PtrPGKasa-1* y simples mutantes. Las enzimas fueron oxidadas con diamida 1 mM durante 20 min a 25 °C, excepto por “Salvaje Red” que es la enzima salvaje reducida. “Red” indica la forma reducida de la enzima y “Ox1” la oxidada, de igual manera que en la Fig. 4.1.36. Se sembraron 2  $\mu\text{g}$  de enzima en cada carril.

Finalmente, se realizaron las titulaciones de -SOH y Cys oxidables con las mutantes, de forma de poder adjudicar a cada residuo una forma oxidada e inferir sobre el mecanismo de inactivación por oxidación sufrido por la *Pir*PGKasa-1. Para esto se realizaron los mismos estudios que para la enzima salvaje (apartado 4.1.5.7):

1. Oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM durante 10 min a 25 °C. Esta concentración de agente oxidante y tiempo de incubación fueron puestos a punto con el objetivo de detectar los -SOH antes de que se sobre-oxidaran.

2. Desde aquí se realizaron tres cuantificaciones:

A. Titulación de Cys oxidables.

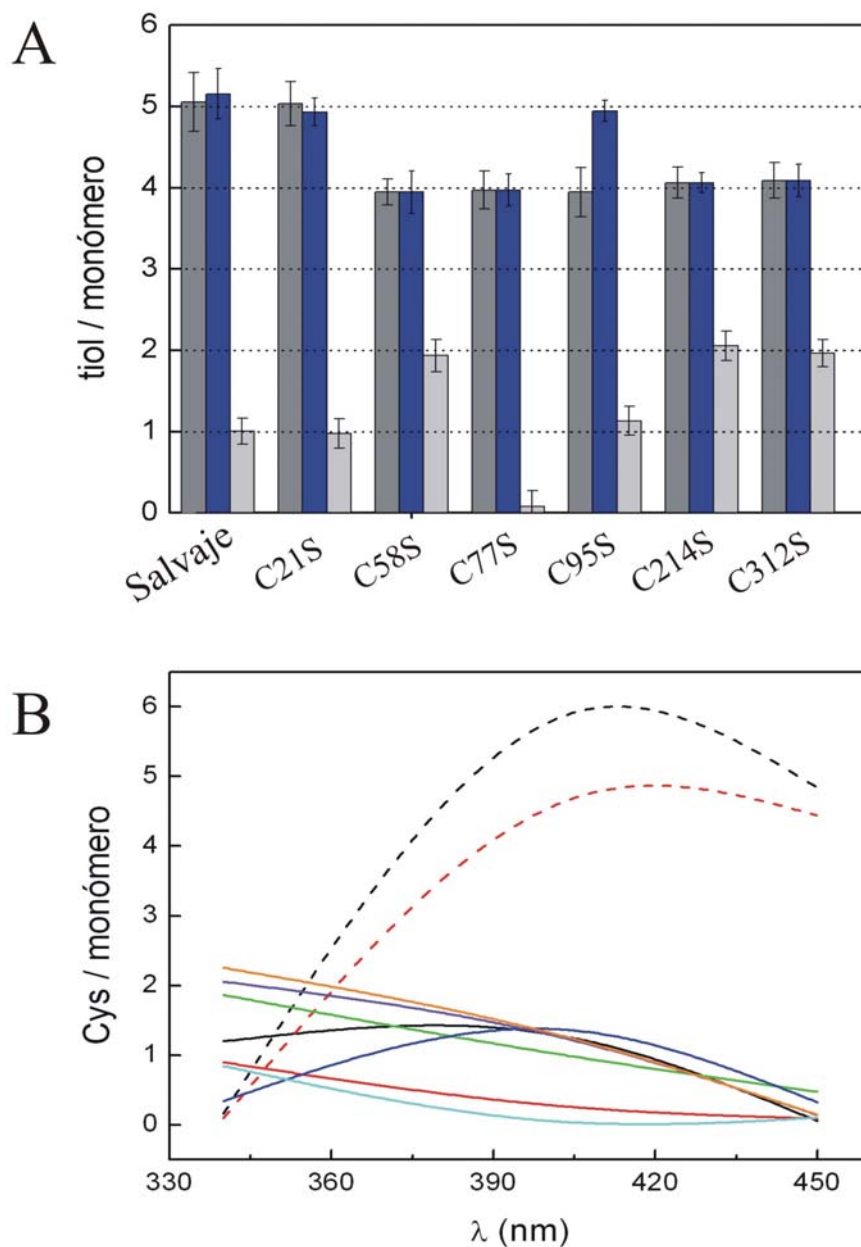
B. Titulación de Cys oxidables con desnaturalización previa de la enzima.

C. Titulación de -SOH con arsenito.

3. Titulación de tioles libres con DTNB.

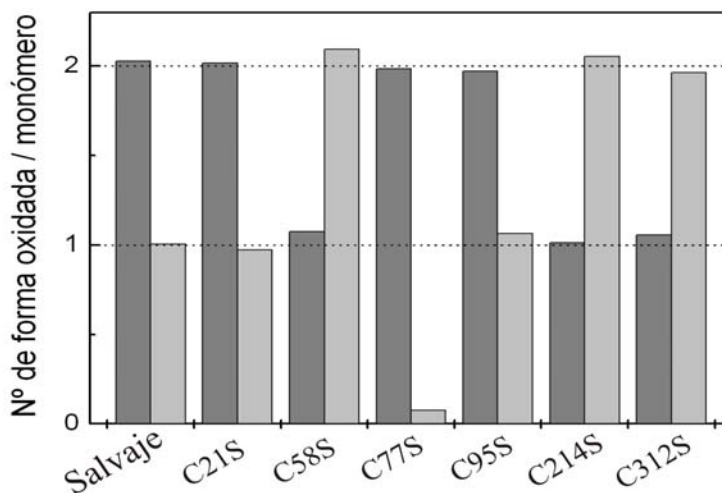
La cuantificación de -SOH se estudió también examinando los cambios en las propiedades espectroscópicas del reactivo NBD.

Los resultados obtenidos en ambas experiencias se muestran en la Fig. 4.1.44 (A) y (B).



**Fig. 4.1.44:** (A) Titulación con DTNB de tioles susceptibles a oxidación y de -SOH de las *PtrPGKasa-1* salvaje y mutantes. La oxidación se llevó a cabo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,5 mM durante 10 min a 25 °C,  $[\text{PtrPGKasa-1}] = 12 \mu\text{M}$ . Dos métodos se aplicaron desde aquí: alquilación con IAA 2 mM, 60 min, seguido de reducción con DTT 5 mM 20 min (titulación de Cys susceptibles a oxidación: barras gris oscuro) o reducción con arsenito 10 mM, 60 min (cuantificación de -SOH: barras gris claro). Los tioles libres resultantes de ambas técnicas fueron cuantificados mediante incubación con DTNB. También se trató la enzima con un agente desnaturante luego del tratamiento con IAA + DTT, con posterior titulación con DTNB (barras azules). (B) Cuantificación de -SOH mediante cambios de las propiedades espectroscópicas de NBD. NBD 0,8 mM reaccionó durante 60 min con las enzimas reducidas (línea de puntos) u oxidadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,5 mM por 10 min (línea sólida): *PtrPGKasa-1* salvaje (curva negra), C21S (roja), C58S (verde), C77S (azul), C95S (turqueza), C214S (violeta) y C312S (naranja).

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en la Fig. 4.1.44 se dedujo la cantidad de puentes disulfuro y de -SOH que presenta cada *PtrPGKasa-1*, descontando la Cys no susceptible a oxidación. Este resumen se muestra en la Fig. 4.1.45.



**Fig. 4.1.45:** Cantidad de puentes disulfuro (barras gris oscuro) y ácidos sulfénicos (barras gris claro), deducida a partir de los resultados de la Fig. 4.1.44 (A) y (B), para la *PtrPGKasa-1* salvaje y sus mutantes.

La primera conclusión que puede obtenerse es que, como se dijo, existe un puente disulfuro entre las Cys-214 y 312 (Fig. 4.1.46). Cuando la Cys-214 no está presente (mutante C214S), se observa la pérdida de un puente disulfuro y su reemplazo por un -SOH debido a la oxidación de la Cys-312 (Fig. 4.1.44 y Fig. 4.1.45). El mismo escenario se observa para la mutante C312S. Este puente disulfuro no estaría involucrado en la pérdida de AE por oxidación, ya que las constantes cinéticas de este mecanismo y la titulación redox se mantuvieron invariables con respecto a la enzima salvaje (Tabla 4.1.11 y Fig. 4.1.42).

La Cys-77 es el aminoácido responsable de la formación de un ácido sulfénico en la *PtrPGKasa-1* salvaje, el cual sería estabilizado por el ambiente apolar que lo rodea y, por supuesto, por la ausencia de otro tiol cercano con que reaccionar (Liu, 1977). Cuando este residuo está ausente (mutante C77S), la cuantificación mediante DTNB de los residuos reducidos por arsenito de sodio y NDB no detectan ningún tiol. La Cys-77 podría ser la primera barrera al ingreso del agente oxidante a la enzima, por lo que su

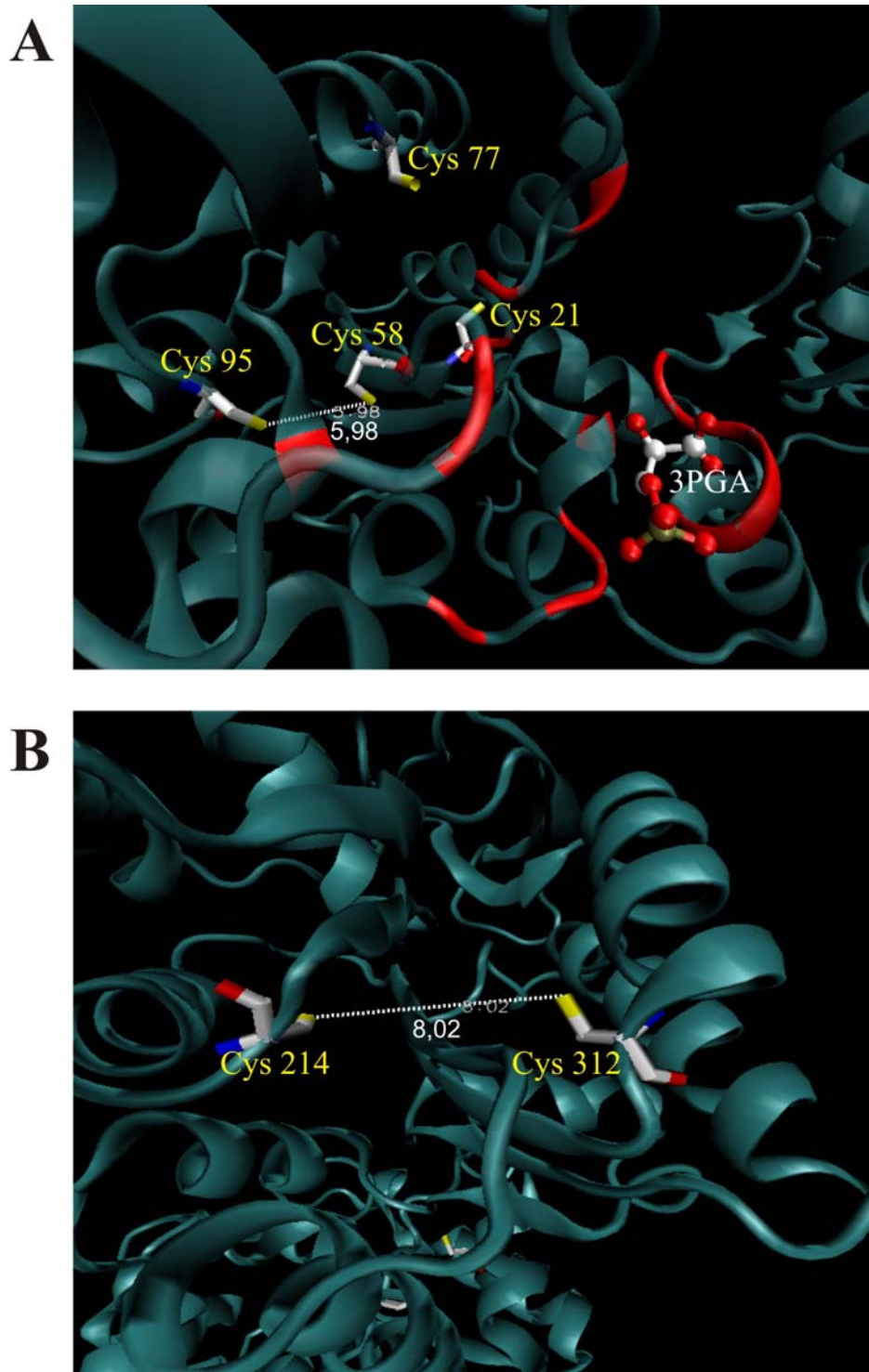
ausencia haría a la *Ptr*PGKasa-1 más susceptible a la inactivación. Aunque la oxidación de este residuo es inactivadora para la enzima, la C77S refleja constantes cinéticas de oxidación mayores que las de la enzima salvaje (Tabla 4.1.11). De hecho, el mayor cambio se observa con el agente oxidante diamida, lo que es coherente con la formación de un aducto enzima-SO-diamida en la Cys-77 que presentaría una barrera mayor que el ácido sulfénico resultante de la oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en lo que a la entrada del oxidante respecta. Este residuo se encuentra dentro de una  $\alpha$ -hélice y, al realizar un alineamiento con las PGKasas de diversos organismos, se observó que en lugar de esta Cys existe una Val altamente conservada en esta posición. La Arg-37, responsable de la unión del segundo fosfato de 1,3-bisPGA, se encuentra a 7 Å de la Cys-77, y la Asn-24, que une un OH de 3PGA, está a 6 Å de distancia (Fig. 4.1.46). Por todo esto, la oxidación de la Cys-77 podría acarrear cambios en la conformación de la enzima y de los aminoácidos adyacentes, altamente conservados e importantes para la unión de uno de los sustratos, que llevarían a inhibir la catálisis.

Por otro lado, la desaparición de un puente disulfuro y la aparición de un -SOH extra en la mutante C58S indican que este residuo estaría involucrado en la formación del segundo puente disulfuro. Por lo tanto, de las dos Cys restantes (21 y 95), una debe ser no susceptible a oxidación y la otra el par de Cys-58 en la *Ptr*PGKasa-1 salvaje. Los resultados de la cuantificación de las formas oxidadas de la mutante C21S indican que la Cys-21 sería el residuo no susceptible a la oxidación, ya que la ausencia de este aminoácido no lleva a cambios en la titulación de formas oxidadas con respecto a la enzima salvaje (Fig. 4.1.44). Esto es coherente con la ausencia de cambios en las constantes cinéticas de oxidación observadas para esta mutante en la Tabla 4.1.11.

Las Cys-58 y Cys-95 formarían el segundo puente disulfuro. Mutaciones en ambos residuos tienen como consecuencia una mayor sensibilidad de la *Ptr*PGKasa-1 a la oxidación. Cuando la Cys-58 está ausente (C58S), la Cys-95 forma un ácido sulfénico, como se observa en la Fig. 4.1.44. La Cys-58 podría ser responsable de proteger a la Cys-95 de inactivación irreversible, ya que si este último no puede formar un puente disulfuro reversible, aunque inactivador, sería susceptible a sobre-oxidarse a ácido sulfínico y sulfónico y la enzima sería inactivada irreversiblemente. La Cys-95 se encuentra a 7 Å de distancia de la Arg-119, aminoácido que forma puentes hidrógeno con el tercer fosfato de 3PGA (Fig. 4.1.46). La alteración en el tamaño, carga o

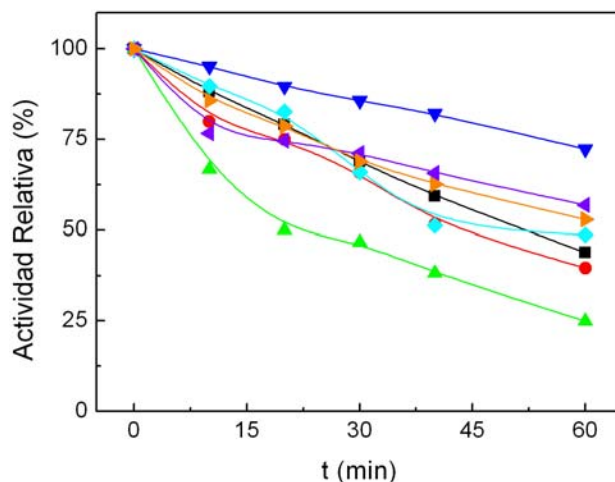


densidad electrónica de este residuo serían perjudiciales para el sitio de unión a este sustrato. De hecho, la mayor susceptibilidad de la C58S a la oxidación por diamida podría deberse a la formación de un aducto en la Cys-95 que alteraría la estructura de una forma mayor que el -SOH. Cuando el residuo ausente es la Cys-95, la Cys-58 se oxidaría en primer lugar a un -SOH altamente reactivo, el cual reaccionaría y formaría un puente disulfuro con la Cys-21 cercana (a  $\sim 8 \text{ \AA}$  de distancia) (Fig. 4.1.46). Es por esto que la C95S presenta dos puentes disulfuro y un ácido sulfénico, convirtiéndose Cys-21 en un residuo susceptible a la oxidación, sólo cuantificable en la enzima desnaturalizada (Fig. 4.1.44). El estado reducido de la Cys-21 parecería ser importante para mantener el sitio de unión a 3PGA en la conformación correcta para la catálisis, ya que es adyacente al Asp-22 (responsable de la unión de un OH de 3PGA) y cercano a la Arg-37 ( $7 \text{ \AA}$ ) y a la His-60 ( $6,5 \text{ \AA}$ ), que forma puentes hidrógeno con los fosfatos del sustrato (Fig. 4.1.46). Todo lo expuesto sería la causa de que la mutante C95S presente una  $k''$  mayor que la *Ptr*PGKasa-1 salvaje.



**Fig. 4.1.46:** Modelo tridimensional de la *PtrPGKasa-1* en su conformación abierta. La enzima se muestra en representación *Cartoon*, las Cys en *Bond* y coloreadas por elemento (C en blanco, N en azul, S en amarillo y O en rojo). (A) Zona de unión a 3PGA. Se muestran las Cys-21, 58, 77 y 95. La distancia entre las Cys-58 y 95 se indica en Å. Se colorean en rojo los residuos involucrados en la unión a 3PGA. 3PGA se representa como *ball and stick* y se colorea por elemento. (B) Ubicaciones de las Cys-214 y 312. La distancia entre ellas se encuentra en Å, indicando la posición del puente disulfuro.

Estas hipótesis fueron respaldadas al realizarse el ensayo de dependencia de la aparición de inactivación irreversible en función del tiempo de incubación con peróxido de hidrógeno. Las *PtrPGKasa-1* (0,1  $\mu\text{M}$ ) se incubaron con  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM a 25 °C, y a distintos tiempos se tomaron alícuotas y se las dejó en contacto con DTT 20 mM durante 15 min para asegurar reducción total de las Cys reversiblemente oxidadas. Los resultados de Actividad Relativa (%) medidos se muestran en la Fig. 4.1.47. Las mutantes C21S, C95S, C214S y C312S se comportan de forma similar a la *PtrPGKasa-1* salvaje. Sin embargo la aparición de formas oxidadas irreversibles es más rápida para la C58S, coherente con la formación de un nuevo ácido sulfénico en la Cys-95, el cual es atacado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  más rápidamente que los puentes disulfuros, por ser más inestable y reactivo. En cambio, cuando la Cys-77 está ausente (C77S), el grado de oxidación irreversible es menor, conforme con la desaparición de -SOH.



**Fig. 4.1.47:** Dependencia de la inactivación irreversible de la *PtrPGKasa-1* y sus mutantes en función del tiempo de oxidación. Las enzimas (0,1  $\mu\text{M}$ ) se incubaron con  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM a 25 °C, y a los tiempos indicados se tomaron alícuotas y se las redujo con DTT 20 mM durante 15 min. Se midió Actividad Relativa (%) recuperada luego de la reducción. Enzima salvaje (■), C21S (●), C58S (▲), C77S (▼), C95S (◆), C214S (▼) y C312S (▲).

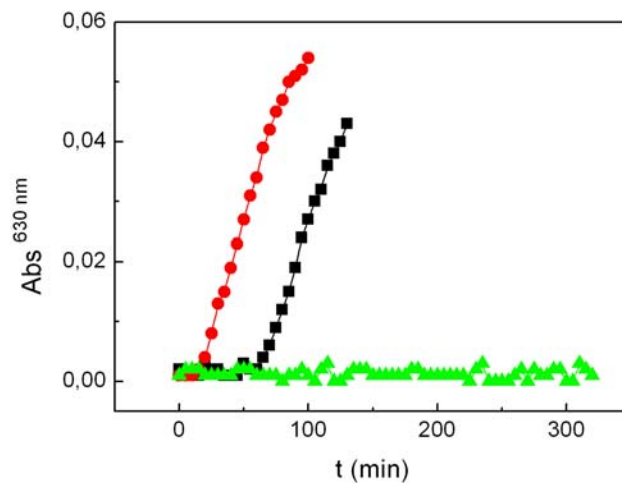
Aunque ninguna *PtrPGKasa-1* mutante simple perdió la susceptibilidad a oxidarse, resulta evidente que, aunque no son esenciales para la actividad enzimática, las conformaciones, tamaños y/o densidades electrónicas de las tres Cys-58, 77 y 95 son muy importantes para mantener la estructura catalíticamente correcta de la enzima. El

mecanismo oxidativo que llevaría a la pérdida de actividad enzimática involucra conjuntamente la oxidación de Cys-77 a ácido sulfénico y la formación de un puente disulfuro entre las Cys-58 y 95.

#### 4.1.6 Actividad enzimática chaperona de la PtrPGKasa-1.

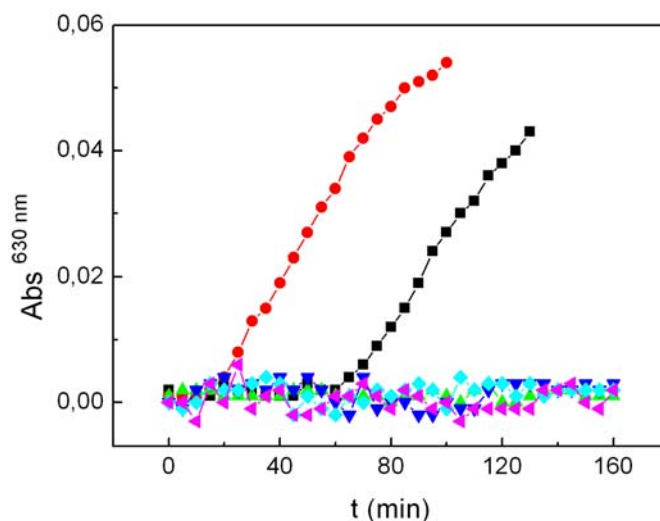
Con el fin de encontrar una razón para el fenómeno de óxido-reducción de la PtrPGKasa-1, se pensó la posibilidad de que esta enzima actuara sobre otras proteínas celulares oxidadas y las redujera, actuando como intercambiadora de tioles/disulfuro con sus proteínas blanco. Para evaluar esta hipótesis, se realizó el ensayo de reducción de insulina utilizado para medir actividad de Trx (Holmgren, 1979). La insulina está compuesta por dos cadenas, A y B, unidas por dos puentes disulfuro intercatenarios. La molécula entera es soluble pero la cadena B libre no lo es. La Trx cataliza la reducción de los puentes disulfuro de la insulina, en presencia de DTT, llevando a un aumento en la turbidez medible espectrofotométricamente a 630 nm (Holmgren, 1979). El DTT por sí sólo produce la reducción y precipitación de insulina, pero la presencia de la Trx incrementa considerablemente la velocidad del fenómeno.

Se analizó entonces la capacidad de la PtrPGKasa-1 de reducir la insulina a 30 °C en presencia DTT 0,5 mM. Contrariamente a lo esperado, no se observó aumento en la turbidez en el tubo que contenía la enzima, ni aún al tiempo al que el blanco con DTT comenzó a precipitar (Fig. 4.1.48), lo que llevó a pensar que la PtrPGKasa-1 ejercería un efecto protector contra la precipitación de la cadena B de la insulina.



**Fig. 4.1.48:** Ensayo de reducción de insulina por la *PtrPGKasa-1* (16  $\mu$ M, ▲). La reacción fue realizada a pH 7,5, 30 °C, en presencia de insulina 0,13 mM y DTT 0,5 mM. Control positivo: *EcoTrx* 4  $\mu$ M (●), blanco sin enzima (■).

Este ensayo es también utilizado para medir actividad chaperona, ya que la presencia de la misma inhibe la aparición de turbidez retardando la precipitación de la cadena B de la insulina (Vargas-Suarez y col., 2004), por lo que se decidió analizar si la enzima *PtrPGKasa-1* presentaba actividad chaperona. En primer lugar, se ensayó si la presencia de los sustratos modificaba la capacidad de la *PtrPGKasa-1* de inhibir la precipitación. Se ensayaron los efectos de ATP-Mg, 3PGA, y 3PGA + ATP (Fig. 4.1.49), ninguno de los cuales modificó la capacidad de la enzima de impedir la aparición de turbidez.



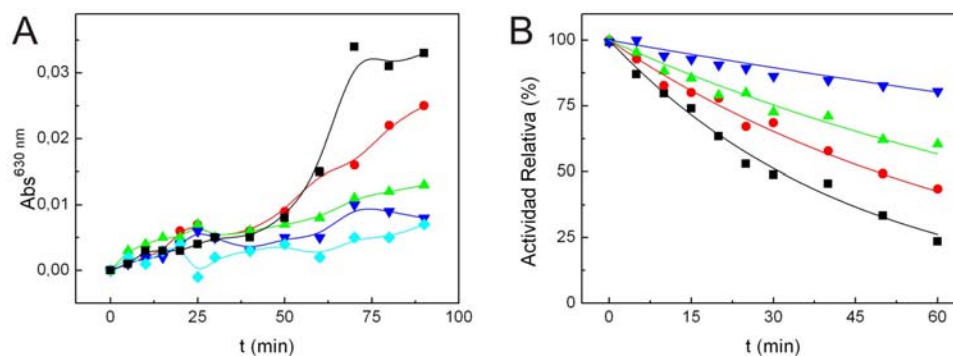
**Fig. 4.1.49:** Ensayo de reducción de la insulina por la *PtrPGKasa-1* (16  $\mu$ M) en presencia de sustratos (1 mM): ninguno ( $\blacktriangle$ ), ATP-Mg ( $\blacktriangledown$ ), 3PGA ( $\blacklozenge$ ), ATP + 3PGA ( $\blacktriangleleft$ ). La reacción fue realizada a pH 7,5, 30 °C, en presencia de insulina 0,13 mM y DTT 0,5 mM. Control positivo: *EcoTrx* 4  $\mu$ M ( $\bullet$ ), blanco sin enzima ( $\blacksquare$ ).

La Ga3PDHasa es una enzima que precipita a 43 °C. Por esta propiedad se la utiliza como sustrato para la medición de actividad biológica de chaperona de otras proteínas que pueden protegerla de tal agregación térmica (Lee y col., 1995). Para ensayar tal actividad de la *PtrPGKasa-1* se utilizó la Ga3PDHasa de *Triticum aestivum* (trigo), llamada *TaeGapC* (número de acceso: EF592180), una enzima homotetramérica de 36,6 kDa / monómero. Esta proteína fue sobre-expresada en pRSET-B (41 kDa / monómero) de forma activa y con la adición de 6 His en su extremo N-terminal, y purificada por IMAC, alcanzándose un alto grado de pureza. Se encontró que la *PtrPGKasa-1* era capaz de prevenir la agregación e inactivación térmicas de esta enzima, midiendo aumento en la absorbancia a 630 nm y actividad enzimática de la Ga3PDHasa, respectivamente (Fig. 4.1.50). En ambos casos, el efecto protector resultó mayor al aumentar la concentración de la *PtrPGKasa-1*. Para los ensayos de inactivación, los valores se ajustaron a la ecuación exponencial decreciente:

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

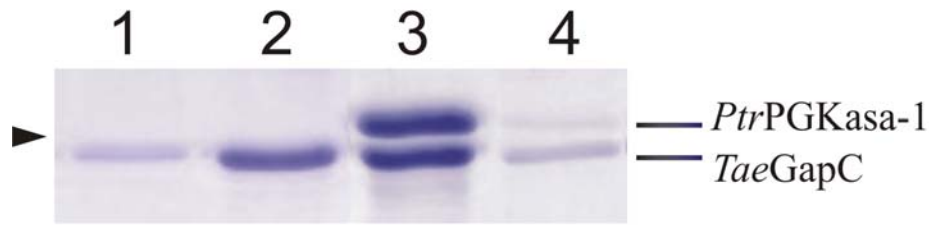
donde Actividad Relativa (%) es el porcentaje de AE remanente, siendo 100% la AE de la Ga3PDHasa inicial,  $\lambda$  es la constante de tiempo del proceso de inactivación y  $t$  el tiempo de incubación a 43 °C.

Cuando la *TaeGapC* (0,8  $\mu$ M en tetrámero, 3,2  $\mu$ M en monómero) fue incubada en ausencia de la *PtrPGKasa-1*, la vida media [ $t_{1/2} = (\ln 2) / \lambda$ ] fue de 31 min. Al ensayar tres concentraciones de la *PtrPGKasa-1*: 0,8; 3,2 y 6,4  $\mu$ M, se encontró que el efecto protector era dependiente de la relación GapC / PGKasa-1, siendo las  $t_{1/2}$  para cada condición 49; 86 y 189 min, respectivamente (Fig. 4.1.50, B).



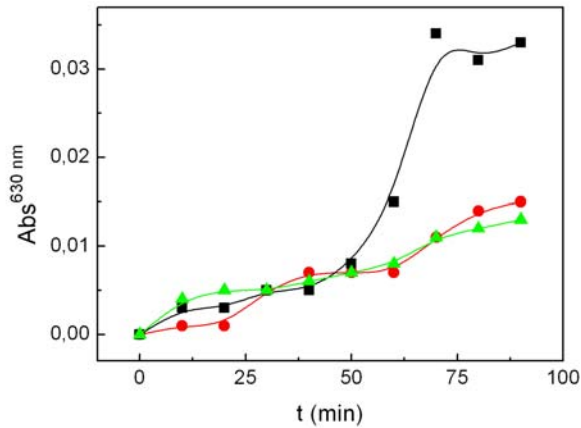
**Fig. 4.1.50:** Efecto de la *PtrPGKasa-1* en la agregación (A) e inactivación (B) térmicas de la *TaeGapC*. La *TaeGapC* (3,2  $\mu$ M en monómero) fue incubada a 43 °C en *buffer C* en presencia de la *PtrPGKasa-1*: 0 (■); 0,8  $\mu$ M (●); 3,2  $\mu$ M (▲); 6,4  $\mu$ M (▼). En (A) se incluyó un control sin la GapC para evaluar la precipitación de la *PtrPGKasa-1* 6,4  $\mu$ M a 43 °C (◆). En (B), Actividad Relativa (%) es el porcentaje de actividad enzimática de la *TaeGapC*, siendo el 100% la AE inicial.

Cuando se procesaron por SDS-PAGE los sobrenadantes y precipitados de los extractos obtenidos en esta experiencia, en concentraciones 3,2  $\mu$ M de ambas enzimas, se verificó que la turbidez se debía principalmente a la precipitación de la *TaeGapC* (Fig. 4.1.51).



**Fig. 4.1.51:** SDS-PAGE 12,5% de las fracciones recuperadas luego de la agregación térmica de la *TaeGapC*. La *TaeGapC* (3,2  $\mu$ M en monómero) fue incubada a 43 °C en *buffer C* durante 100 min. **1:** sobrenadante de la *TaeGapC* [■ en Fig. 4.1.50 (A)]; **2:** precipitado de la *TaeGapC* [■ en Fig. 4.1.50 (A)]; **3:** sobrenadante de *TaeGapC* + *PtrPGKasa-1* 3,2  $\mu$ M [▲ en Fig. 4.1.50 (A)]; **4:** precipitado de *GapC* + *PtrPGKasa-1* 3,2  $\mu$ M [▲ en Fig. 4.1.50 (A)]. “▶” indica la posición del MMM de 43,0 kDa.

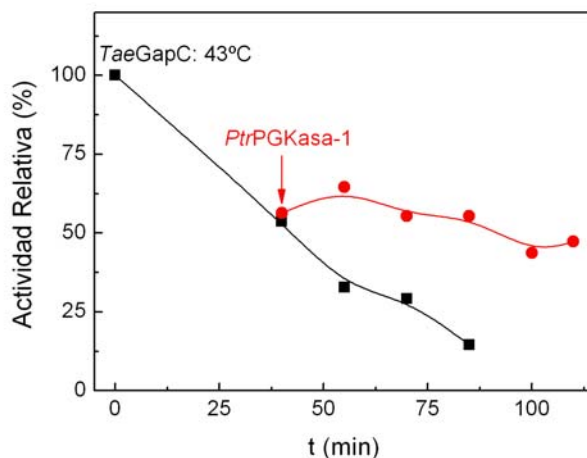
El estado redox de la enzima *PtrPGKasa-1* no afectó el efecto protector, evaluado por agregación térmica (Fig. 4.1.52).



**Fig. 4.1.52:** Efecto del estado redox de la *PtrPGKasa-1* en la agregación térmica de la *TaeGapC*. La *TaeGapC* (3,2  $\mu$ M en monómero) fue incubada a 43 °C en *buffer C*: sola (■) o en presencia de *PtrPGKasa-1* 3,2  $\mu$ M reducida (▲) y oxidada (●) (con diamida 1 mM, 10 min, luego de lo cual se lavó el agente oxidante por ciclos de dilución-concentración).

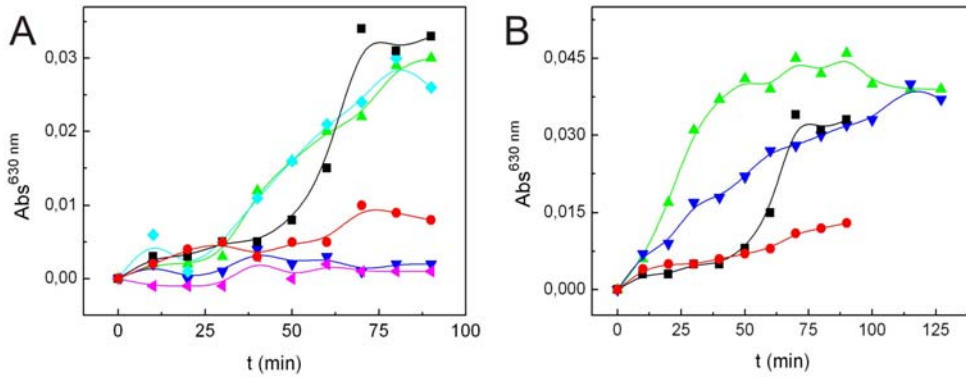
La *PtrPGKasa-1* no revierte la desnaturalización térmica de la *TaeGapC* una vez perdida la AE, sólo la previene y, en este caso, detiene su continuidad (Fig. 4.1.53).





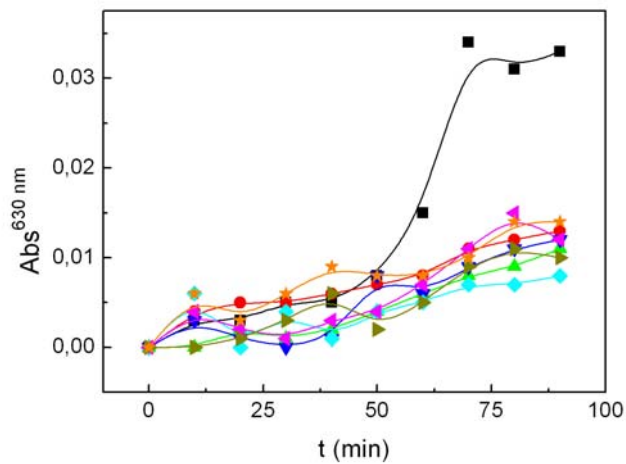
**Fig. 4.1.53:** Curva de Actividad Relativa (%) de la *TaeGapC*, siendo el 100% la AE inicial, en función del tiempo de incubación. La *TaeGapC* (3,2  $\mu\text{M}$  en monómero) fue incubada a 43 °C en *buffer C* (■). Transcurridos 40 min se adicionó la *PtrPGKasa-1* 6,4  $\mu\text{M}$  (●). A cada tiempo indicado se tomó una alícuota y se midió AE de Ga3PDHasa.

Se decidió evaluar si existía una especificidad de la actividad protectora de la *PtrPGKasa-1* hacia la *TaeGapC* y si ésta era recíproca. En primer lugar se evaluó el grado de protección ejercido sobre *TaeGapC* por otras proteínas. Como se observa en la Fig. 4.1.54 (A), la BSA y la *EcoTrx* no retardan la precipitación de la enzima, por lo que la interacción *PtrPGKasa-1-TaeGapC* podría ser específica. Por otro lado, se ensayó la capacidad protectora de la *PtrPGKasa-1* frente a otras proteínas. Como se observa en la Fig. 4.1.54 (B), en presencia de *PtrPGKasa-1* se produce un enlentecimiento de la precipitación térmica de la enzima alcohol deshidrogenasa, el cual ocurre en menor medida que el observado para la *TaeGapC*. Estos resultados, sumados a la protección contra la precipitación que la *PtrPGKasa-1* ejerce sobre la cadena B de la insulina, muestran que esta enzima presenta actividad enzimática chaperona sobre otras proteínas, sugiriendo una especificidad relativa hacia la *TaeGapC*.



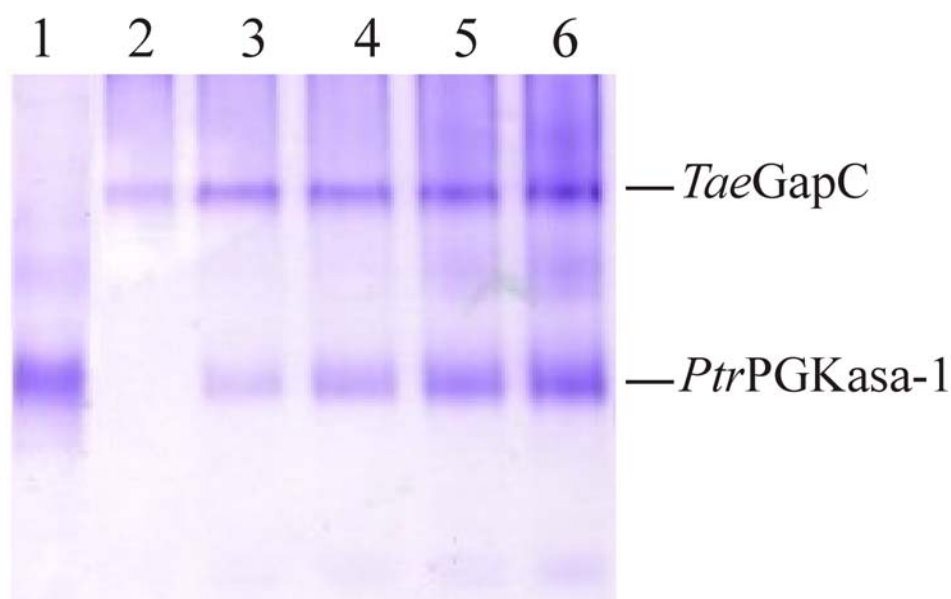
**Fig. 4.1.54:** Especificidad de la protección a la agregación térmica de la *TaeGapC* (A) y de la acción protectora de la *PtrPGKasa-1* (B). (A) La *TaeGapC* (3,2  $\mu\text{M}$  en monómero) fue incubada a 43 °C en *buffer C* sola (■) y en presencia de: *PtrPGKasa-1* 6,4  $\mu\text{M}$  (●), BSA 6,4  $\mu\text{M}$  (▲), *EcoTrx* 6,4  $\mu\text{M}$  (◆). Se incluyeron controles sin la *GapC* para evaluar la precipitación de la BSA (▼) y la *EcoTrx* (◀). (B) La alcohol deshidrogenasa de levadura (3,2  $\mu\text{M}$  en monómero = 0,8  $\mu\text{M}$  en tetrámero) fue incubada a 43 °C en *buffer C*, en presencia de: nada (▲), *PtrPGKasa-1* 3,2  $\mu\text{M}$  (▼). Se muestra también la agregación térmica de la *TaeGapC* 3,2  $\mu\text{M}$  en ausencia (■) y presencia (●) de la *PtrPGKasa-1* 3,2  $\mu\text{M}$ .

Se evaluó la protección contra la agregación térmica de la *TaeGapC* por parte de las mutantes simples Cys de la *PtrPGKasa-1*. En primer lugar se estudió la estabilidad de estas enzimas cuando eran incubadas a 43 °C, no observándose precipitación de las mismas. En la Fig. 4.1.55 puede observarse que el cambio de cada Cys por una Ser no modificó la capacidad de la *PtrPGKasa-1* de disminuir la precipitación de la *TaeGapC*.



**Fig. 4.1.55:** Efecto de las mutantes simples (Cys  $\rightarrow$  Ser) de la *PtrPGKasa-1* en la agregación térmica de la *TaeGapC*. La *TaeGapC* (3,2  $\mu\text{M}$  en monómero) fue incubada a 43 °C en *buffer C* en presencia de la *PtrPGKasa-1*: 0 (■), salvaje (3,2  $\mu\text{M}$ , ●), C21S (3,2  $\mu\text{M}$ , ▲), C58S (3,2  $\mu\text{M}$ , ▼), C77S (3,2  $\mu\text{M}$ , ◆), C95S (3,2  $\mu\text{M}$ , ◀), C214S (3,2  $\mu\text{M}$ , ►) y C312S (3,2  $\mu\text{M}$ , ★).

Finalmente, se intentó demostrar la existencia de interacción entre la *TaeGapC* y la *PtrPGKasa-1*, para lo que se utilizaron varios métodos. En primer lugar se realizó un PAGE nativo al 7,5% de ambas enzimas por separado, y de la *TaeGapC* en concentración fija y la *PtrPGKasa-1* en distintas proporciones molares con respecto a la primer enzima. En ningún carril se observó cambio en la movilidad electroforética que pudiera corresponderse con una asociación entre las proteínas. Con la hipótesis de que esta interacción ocurriera sólo a altas temperaturas a fin de proteger a la *TaeGapC* de la desnaturalización térmica, se incubaron las enzimas durante 40 min a 43 °C y toda la corrida electroforética se realizó a ~ 40 °C. Tampoco se observaron asociaciones entre la *TaeGapC* y la *PtrPGKasa-1* (Fig. 4.1.56). Podría ser que la interacción fuera muy débil y que la corriente eléctrica aplicada llevara a su disociación.



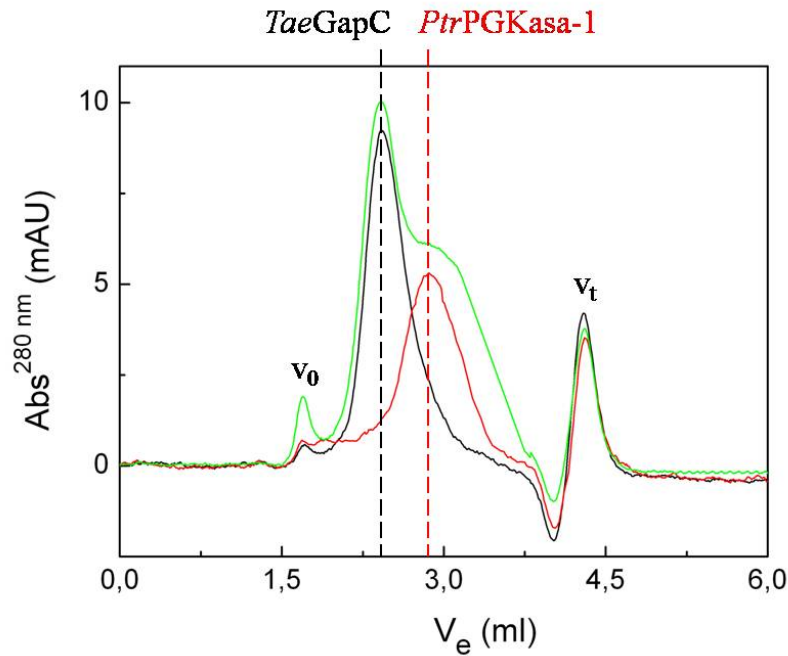
**Fig. 4.1.56:** PAGE nativo 7,5% de la interacción *TaeGapC* + *PtrPGKasa-1*. **1:** 0,07 nmol de la *PtrPGKasa-1*; **2:** 0,07 nmol de la *TaeGapC* (en monómero); **3-6:** 0,07 nmol de la *TaeGapC* (en monómero) incubada a 43 °C por 40 min con distintas cantidades de la *PtrPGKasa-1*: **3:** 0,018 nmol; **4:** 0,035 nmol; **5:** 0,07 nmol; **6:** 0,14 nmol.

Se decidió entonces llevar a cabo dos métodos que produjeran la formación de enlaces covalentes entre las proteínas, si éstas estuvieran en contacto cercano:

- Entrecruzamiento: si la interacción entre las enzimas involucrara Lys cercanas, el reactivo BS formaría un enlace covalente con ellas, llevando a un cambio en la movilidad electroforética en un SDS-PAGE reductor.
- Oxidación: si el contacto entre la *TaeGapC* y la *PtrPGKasa-1* se debiera a interacciones entre Cys de ambas moléculas, un agente oxidante podría formar un puente disulfuro entre ellas, teniendo como consecuencia una distinta migración en un SDS-PAGE no reductor.

Ninguna de las experiencias descritas reveló cambio alguno en la apariencia de los SDS-PAGEs. Descartando las hipótesis de contacto mediante Lys o Cys, se decidió realizar co-inmuno precipitación, ya que se contaba con anticuerpos específicos contra la *TaeGapC*. Se encontró que la enzima *PtrPGKasa-1* era afín a la proteína-G inmovilizada en la resina, por lo que el método no resultó aplicable en este caso.

Finalmente, se utilizó una columna de exclusión molecular (*Superdex 200*) para determinar si la *TaeGapC* y la *PtrPGKasa-1* interaccionaban y cambiaban el volumen de elución al estar en contacto durante 40 min a 43 °C en *buffer B*. La cromatografía se realizó a 4 °C en lugar de 40 °C, por la imposibilidad de termostatar el equipo de purificación. En la Fig. 4.1.57 se muestran los perfiles de elución de cada enzima, cuyos picos de absorbancia fueron confirmados por medida de AE. Las MM de la *PtrPGKasa-1* y la *TaeGapC*, calculadas a partir de sus volúmenes de elución y de una curva de calibrado con proteínas estándar, fueron 63 y 169 kDa respectivamente, coherentes con las masas esperadas para el monómero de la *PtrPGKasa* y tetrámero de la *TaeGapC*. Cabe aclarar que, como se describió en el apartado 4.1.2.2, la enzima *PtrPGKasa-1* eluye de la columna de tamiz molecular con una MM aparente mayor a la real, por corresponder a una estructura laxa en ausencia de los sustratos, lo que aumenta el radio de Stokes. Al incubar la *PtrPGKasa-1* y la *TaeGapC* durante 40 min a 43 °C y someterlas al tamiz molecular no se observó cambio en los volúmenes de elución de cada enzima, recuperándose en fracciones diferentes.



**Fig. 4.1.57:** Cromatografía de tamiz molecular en *Superdex 200*. La *PtrPGKasa-1* (12  $\mu$ M, curva roja), la *TaeGapC* (12  $\mu$ M, curva negra), y la incubación de la *PtrPGKasa-1* y la *TaeGapC* a 43  $^{\circ}$ C durante 40 min, ambas en concentración de monómero de 12  $\mu$ M (curva verde), fueron sembradas y eluidas de la columna con un flujo de 0,2 ml/min en *buffer* 25 mM Tris-HCl pH 8,0 y 0,1 M NaCl. Cada pico de Abs coincidió con el pico de AE de cada enzima. Se indican  $v_0$  y  $v_t$  de la columna usada.

Aunque no se logró demostrar la formación de un complejo entre la *TaeGapC* y la *PtrPGKasa-1*, esto podría deberse a que la interacción sea débil y por lo tanto se disociara el complejo por dilución, como se produce en la columna de exclusión molecular, o por acción del campo eléctrico aplicado en los PAGEs nativos. Ya que los estudios han sido realizados con una enzima heteróloga, existe la posibilidad de que esta interacción resultara más fuerte con la Ga3PDHasa cloroplastídica de *P. tricornutum* (*PtrGapC1*).

#### 4.1.7 Discusión.

*P. tricornutum* es uno de los modelos más ampliamente utilizados para el estudio de la ecología, fisiología, bioquímica y biología molecular de diatomeas (Scala y col., 2002). La dilucidación de su genoma completo ha sido un gran avance en el análisis metabólico pero, por el lugar clave que ocupan en la evolución y diferenciación entre

organismos autótrofos y heterótrofos, resulta ahora esencial realizar estudios de caracterización de enzimas para entender la ocurrencia y funcionalidad de estos escenarios metabólicos en *P. tricornutum*. Por otro lado, las diatomeas son organismos con un creciente valor biotecnológico, siendo utilizadas en procesos de biorremediación y para obtención de un amplio espectro de compuestos químicos de utilidad industrial y farmacéutica (Kroth, 2007; Grachev y col., 2008). En este capítulo se realizó la caracterización de la enzima PGKasa-1 de *P. tricornutum*. Es la primer PGKasa de diatomea en ser estudiada, pese a su importancia e incumbencia en vías metabólicas claves como el ciclo de Calvin, COPP y glicólisis. Por la gran relevancia económica-tecnológica que presentan, resulta fundamental el estudio de estas vías metabólicas en diatomeas, lo que incluye la caracterización funcional, estructural y especialmente regulatoria de las enzimas involucradas en las mismas.

La PGKasa es una enzima altamente conservada a lo largo de la evolución, por lo que las enzimas de distintos organismos comparten muchas características. Estructuralmente se trata de una proteína monomérica que presenta dos dominios, uno de unión a ATP-Mg y otro a 3PGA. Se encontró que en ausencia de los sustratos, la conformación de la proteína es la de un monómero laxo, cuyo radio de Stokes es mayor al que presentaría una proteína de igual masa y forma globular. El complejo ternario PGKasa-(ATP-Mg)-3PGA presenta una conformación conocida como cerrada, en la que se acercan los dominios y sustratos entre sí, permitiendo la catálisis (Banks y col., 1979).

Por otro lado, la caracterización cinética de la unión a los sustratos demostró velocidades máximas y valores de  $S_{0,5}$  y  $n_H$  similares a los reportados para las enzimas de bacterias (Nojima y col., 1979; Pawluk y col., 1986), cianobacterias (Kuntz y Krietsch, 1982), levaduras (Krietsch y Bucher, 1970; Kuntz y Krietsch, 1982), parásitos (Zomer y col., 1998), mamíferos (Krietsch y Bucher, 1970; Fritz y White, 1974; Krietsch y col., 1980) y plantas (Kuntz y Krietsch, 1982). El mecanismo de reacción fue secuencial al azar, también descripto para otros organismos, en el que la unión de un sustrato no alteraría la unión del otro (Krietsch y Bucher, 1970; Larsson-Raznikiewicz y Arvidsson, 1971).

En cuanto a las características regulatorias de la *Ptr*PGKasa-1, algunas fueron similares a enzimas de otros organismos, mientras que otras resultaron distintivas, como

se explica a continuación. ATP presenta dos sitios de unión a la *PtrPGKasa-1*. Cuando se encuentra acomplejado a  $Mg^{2+}$  se une al sitio catalítico, mientras que el sitio de unión para ATP libre se solapa, el menos en parte, con la zona de interacción con el 3PGA (Watson y col., 1982; Joao y Williams, 1993). Aparentemente, el orden en que se unen el ATP libre o el 3PGA a este sitio, es importante. No serían mutuamente excluyentes, sino que una vez unido el 3PGA, el ATP podría unirse en un sitio contiguo. Pero la unión del ATP en primer término impediría la del 3PGA, por lo que actuaría como inhibidor competitivo debido a impedimento estérico. Los complejos que se formarían cuando se une primero el ATP serían diferentes a los que se generan cuando el primero en unirse es el 3PGA. Cuando la enzima está saturada con 3PGA, el ATP libre se uniría a la *PtrPGKasa-1* en el sitio contiguo al de unión a 3PGA, resultando en un efecto activador. En cambio, a altas concentraciones de ATP y cantidades no saturantes de 3PGA el efecto observado es el de una ligera inhibición. Por otro lado el ADP, producto de la reacción inhibe a la *PtrPGKasa-1* competitivamente con respecto a ATP-Mg y no competitivamente en lo que a 3PGA respecta.

Una característica nunca antes informada para la enzima de diatomea es que la *PtrPGKasa-1* es susceptible a agentes modificadores de grupos tioles, siendo activa en su forma reducida, con constantes cinéticas de oxidación y reducción en el orden de las descritas para enzimas que son regulada *in vivo* (Ballicora y Wolosiuk, 1994; Geck y Hartman, 2000). Analizando el fenómeno de óxido-reducción más profundamente, se encontró que la *PtrPGKasa-1* presentaba dos potenciales de reducción (comportamiento bifásico), coherente con la existencia de dos centros redox con características diferenciales. Cabe aclarar que ambos valores estuvieron incluidos dentro del rango reportado para proteínas sensibles a cambios en el ambiente redox e importantes en la regulación del balance del estado celular (Hutchison y Ort, 1995; Hirasawa y col., 1999; Hutchison y col., 2000).

Está descrito que las PGKasas de mamíferos y otros organismos superiores serían inactivadas por DTNB y reactivos alquilantes (Krietsch y Bucher, 1970), comportamiento no observado en levaduras y algas (Markland y col., 1975). Organismos eucariotas como salmón, caballo, ratón, cerdo y el propio ser humano tienen PGKasas que cuentan con 7 residuos Cys, 2 de los cuales se encuentran adyacentes en la estructura primaria y serían los responsables de la inactivación de la

enzima (Cserpan y Vas, 1983). Sin embargo, alineamientos de secuencias demostraron, por un lado, la falta de conservación en la cantidad y posición de las Cys, y por otro la inexistencia de las Cys contiguas en la secuencia de la *Ptr*PGKasa-1. Por otro lado, la enzima de espinaca también se inactiva al modificarse una de sus dos Cys con DTNB, aún cuando no se encuentran adyacentes entre sí (Kuntz y Krietsch, 1982). Estos residuos están conservados con las Cys-21 y 214 de *P. tricornutum*. Es decir, los residuos involucrados en la regulación por modificación de los grupos tiol parecen no estar conservados en las PGKasas de los distintos organismos estudiados hasta la actualidad. Todos los trabajos citados fueron hechos con agentes modificadores de grupo tiol como DTNB y reactivos alquilantes, pero en ninguno se describe la susceptibilidad a agentes fisiológicos ni se realizan estudios en profundidad de este tipo de características de las enzimas, por lo que no se puede hablar de regulación redox de las PGKasas descritas, sino de inactivación por modificación de tioles. En cambio, la *Ptr*PGKasa-1 resulta susceptible a agentes oxidantes y reductores celulares, con valores de potenciales redox que podrían indicar una regulación por óxido-reducción *in vivo*.

Mediante análisis de mutantes simples (Cys → Ser) se observó que, aunque ninguna presentó pérdida de susceptibilidad a la oxidación, tres de las Cys: la 58, la 77 y la 95, en conjunto, parecen ser las responsables del fenómeno de inactivación por oxidación. La Cys-77 sería la primera barrera al ingreso del oxidante, siendo su forma oxidada un ácido sulfénico. Cys-95 y 58 formarían un puente disulfuro inactivador, aunque reversible, y la Cys-21 no sería susceptible a oxidación. Aunque ninguno de estos residuos resulta esencial para la actividad enzimática, las Cys-21, 58, 77 y 95 se encuentran cercanas a residuos importantes para la unión a 3PGA, por lo que su densidad electrónica, conformación y/o tamaño serían fundamentales para mantener la conformación correcta de la enzima, permitiendo así la catálisis. Las Cys-214 y 312 forman un segundo puente disulfuro, el cual no tendría influencia sobre la actividad de la enzima.

Como se explicó anteriormente, los cloroplastos de diatomeas presentan una estructura celular y vías metabólicas con características propias, algo distintas a las de plantas y de otros organismos fotosintéticos (Michels y col., 2005; Weber y col., 2009). En el ciclo de Calvin, una vez que el carbono es fijado por la enzima RuBisCO, la reducción a hidratos de carbono es catalizada por dos enzimas cloroplastídicas: la



PGKasa y la Ga3PDH. Ambas son parte también de la glucólisis, catalizando las reacciones inversas a las que llevan a cabo en el ciclo reductivo de las pentosas. Se ha descrito que todas las enzimas involucradas en glucólisis estarían presentes en cloroplastos de diatomeas, por lo que esta vía podría ser activa en este compartimento (Kroth y col., 2008). En *P. tricornutum* se encontró una isoforma de la Ga3PDH llamada GapC1, y una de la PGKasa: PGKasa-1, las cuales podrían ser activas tanto en el ciclo de Calvin como en las reacciones glicolíticas (Gruber y col., 2009). La glucólisis y el COPP producen ATP y poder reductor en la forma de NAD(P)H, mientras que el ciclo de Calvin consume ATP y NADPH para producir glucosa. Por lo tanto, si estas vías funcionaran simultáneamente llevarían a ciclos fútiles en los que la energía y los equivalentes de reducción se estarían produciendo y consumiendo al mismo tiempo. Ya que no hay COPP en cloroplastos de diatomeas (Gruber y col., 2009), resultaría necesaria una regulación estricta de glucólisis y ciclo de Calvin. En lo que refiere a las enzimas involucradas en estas vías metabólicas, es poco lo que se conoce con respecto a la modulación de sus actividades.

Se ha descrito que la GapC1 no sería afectada por oxidación o reducción (Michels y col., 2005; Kroth y col., 2008), a diferencia de lo observado en plantas. Las únicas enzimas que demostraron ser reguladas por el estado redox fueron la FBPasa y la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (Michels y col., 2005). La enzima PRKasa mostró inactivación por oxidación, pero con valores de potenciales redox muy positivos, lo que haría que la regulación fuera poco probable *in vivo* (Michels y col., 2005). Se han logrado identificar varios genes codificantes para las Trxs en *P. tricornutum*, incluyendo tres Trx h (dos localizadas en el RE/espacio periplástico y una en el citosol), una Trx o mitocondrial y cuatro cloroplastílicas: f, m y dos y (Weber y col., 2009). Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que la *Ptr*PGKasa sería un potencial blanco para la acción de la Trx y de agentes oxidantes y reductores fisiológicos. Por otro lado, como se esperaba por el principio de reversibilidad microscópica, la oxidación de la *Ptr*PGKasa-1 lleva a la pérdida de actividad enzimática en ambos sentidos de reacción, por lo que esta enzima no sería la responsable de direccionar las triosas-P a glucólisis o ciclo de Calvin para evitar ciclos fútiles.

La PGKasa ha sido identificada como blanco de las Trxs en plantas, algas y mamíferos (Fernando y col., 1992; Balmer y col., 2004; Rouhier y col., 2005; Michelet

y col., 2008) y como blanco de glutatiónilación en algas y mamíferos (Fratelli y col., 2002; Michelet y col., 2008), cuando son expuestos a la acción de un agente oxidante. Estos resultados sugieren que la oxidación podría afectar a la PGKasa bajo estrés oxidativo. Por esto, una explicación para los resultados expuestos en este capítulo podría ser que la regulación redox de la *Ptr*PGKasa-1 cobrara importancia en situaciones de estrés oxidativo celular. Bajo estas condiciones la oxidación de la PGKasa-1 llevaría a la inactivación tanto de la vía glicolítica como del ciclo de Calvin. De esta forma, las triosas-P exportadas del cloroplasto hacia el citosol, serían utilizadas en el COPP para producir poder reductor en forma de NADPH con la finalidad de contrarrestar los efectos de las EROs y ERNs. El NADPH actúa como dador de electrones para muchas enzimas involucradas en reparación y protección contra el daño oxidativo. Por ejemplo, cede electrones a la enzima glutatión reductasa, que mantiene el glutatión en su forma reducida (GSH) para mantener la homeostasis redox y proteger a las células de los efectos de este estrés (Forman y col., 2004; Banerjee, 2008). El GSH a su vez reduce la glutarredoxina responsable de reducir y reparar las proteínas oxidadas y glutatióniladas.

El NADPH está también involucrado en el sistema tiorredoxina, reduciendo la Trx oxidada a través de la acción de la Trx reductasa. La Trx reducida actúa como un agente reductor rápido y poderoso, por su bajo potencial de reducción (Banerjee, 2008). Un blanco fisiológico de la Trx es la enzima metionina sulfóxido reductasa, que repara las metioninas oxidadas (Krause y col., 1991). La peroxirredoxina es una proteína principalmente involucrada en la detoxificación de peróxidos, siendo el NADPH el dador de electrones de este proceso (Wood y col., 2003). De hecho, la glutatión reductasa, la Trx, la Trx reductasa y la metionina sulfóxido reductasa han resultado activas en extractos de la diatomea y detectadas por *Western blot* (Arias, 2009). La enzima glutatión reductasa de *P. tricornutum* mostró alta especificidad hacia el NADPH (Arias y col., 2010). Por lo tanto, el redireccionamiento de las triosas-P hacia el citosol y su uso para la producción del NADPH por el COPP citoplasmático podrían estar involucrados en todos estos procesos de prevención y reparación, contrarrestando así el estrés oxidativo.

Finalmente, se encontró que la *Ptr*PGKasa-1 protegería a la *Tae*GapC y a la alcohol deshidrogenasa de inactivación y agregación térmica e inhibiría la precipitación

de la cadena B de la inulina, indicios de actividad enzimática chaperona. Este efecto protector resultó mayor para la enzima *TaeGapC*, aunque no se logró demostrar la formación de complejos entre ambas enzimas. Siendo que los estudios fueron realizados con una Ga3PDHasa heteróloga, existe la posibilidad de que esta interacción fuera mayor con la Ga3PDHasa cloroplastídica de *P. tricornutum* (*PtrGapC1*), o que esta unión fuera demasiado débil como para ser detectada por los ensayos realizados.

Ha sido demostrado que enzimas consecutivas en vías metabólicas forman complejos enzima-enzima mediante los cuales los metabolitos intermediarios son transferidos directamente de una enzima a otra sin ser liberados al ambiente acuoso celular (Srivastava y Bernhard, 1986b). Ya que la concentración de metabolitos intermediarios en la célula es usualmente menor que la de las enzimas, gran parte de las vías metabólicas podrían proceder por transferencia directa entre las proteínas, las que se encontrarían formando el complejo enzima-metabolito-enzima (Srivastava y Bernhard, 1986b). Se ha publicado que la unión enzima-enzima está determinada por interacciones específicas entre las superficies de las proteínas (Srivastava y Bernhard, 1986a). Este complejo dinámico ha sido difícil de demostrar por ser inestable: no puede aislarse. Sin embargo se han obtenido evidencias de la existencia del complejo PGKasa-Ga3PDHasa por estudios bioquímicos *in vitro*, como análisis de penetración de gel (Malhotra y col., 1995), inmovilización de la Ga3PDHasa en *CNBr-activated Sepharose* (Ashmarina y col., 1985), medición de cambios en la intensidad de fluorescencia de la PGKasa etiquetada con isotiocianato de fluoresceína (Sukhodolets y col., 1989), NMR (Srivastava y Bernhard, 1986b), y mediante la técnica de FRET-FLIM (Tomokuni y col., 2010).

En 1982, Weber y Bernhardt evidenciaron cinéticamente la “canalización” y transferencia del sustrato 1,3-bisPGA a través del complejo PGKasa-Ga3PDHasa (Weber y Bernhard, 1982). Esta unión es fácilmente dissociable con cambios en el pH y aumento en la concentración salina o de sustratos como el NADH (Malhotra y col., 1995). Sin embargo, la protección que la *PtrPGKasa-1* ejerce sobre la desnaturalización térmica de la *TaeGapC* se evidenció en *buffer* B, cuya concentración de NaCl es de 0,3 M. La finalidad de la formación de este complejo estaría dada, por un lado, por la baja estabilidad del metabolito 1,3-bisPGA, la que no sería mayor a los 30 min en solución acuosa a temperatura ambiente, mientras que unido a la PGKasa se mantiene estable por

varios días (Weber y Bernhard, 1982). Por otro lado, como se explicó anteriormente, la constante de disociación del 1,3-bisPGA de la PGKasa es muy baja, del orden de nM (Scopes, 1978a; Huskins y col., 1982). Se ha propuesto que este producto de la reacción de la PGKasa sería directamente transferido a la Ga3PDHase mediante la formación de un complejo PGKasa-(1,3-bisPGA)-Ga3PDHase, lo que permitiría la disociación del metabolito de la primer enzima, para procurar la continuación de la vía metabólica (Weber y Bernhard, 1982). Por otro lado, este tipo de canalización de sustratos aumentaría notablemente la eficiencia de los catalizadores ya que serían necesarias concentraciones menores de enzimas, lo que minimizaría el consumo de energía para la síntesis de proteínas excesiva (Srivastava y Bernhard, 1986b).

Como se dijo, la PGKasa y la Ga3PDHase son enzimas contiguas en el ciclo de Calvin y en la glucólisis. Por esto la protección contra la desnaturalización observada por la enzima de *P. tricornutum* podría ocurrir con el fin de procurar la continuación de la vía metabólica mediante la formación del complejo PGKasa-Ga3PDHase, el que favorecería la canalización y transferencia directa de los sustratos, y la producción de los metabolitos que la célula requiriera en ese momento del ciclo celular o para contrarrestar los efectos causados por este aumento en la temperatura.

## 4.2 Capítulo 2: Estudio del metabolismo de hidratos de carbono en *P. tricornutum*.

### 4.2.1 Crecimiento auto-, hetero- y mixotrófico de *P. tricornutum*.

Está descrito que la diatomea *P. tricornutum* crece en condiciones auto- y mixotróficas (Cooksey, 1974; Ukeles y Rose, 1976; Cerón García y col., 2000; Cerón García y col., 2005; Liu y col., 2009a). En cuanto al crecimiento en condiciones heterotróficas, en la bibliografía se encuentran resultados contradictorios: hay autores que aseguran la posibilidad de desarrollo celular en ausencia de luz (Flynn y Syrett, 1986; Pan y col., 1996) y hay quienes no han logrado que *P. tricornutum* crezca en oscuridad (Droop, 1974; Cerón García y col., 2006). El crecimiento heterotrófico de las diatomeas presenta ventajas con respecto al auto- y mixotrófico, ya que disminuye los costos de producción a gran escala, abaratando tanto en equipamiento como en energía. Además, la condición heterotrófica permite mayores rendimientos de biomasa, ya que la alta densidad celular limita el acceso de la luz al cultivo y enlentece el crecimiento autotrófico. Zaslavskaja ha logrado el crecimiento en ausencia de luz de *P. tricornutum* transformando las células con un gen que codifica para un transportador de glucosa, lo que permite el ingreso del azúcar en ausencia de luz (Zaslavskaja y col., 2001).

Existen numerosos estudios sobre cuáles serían las fuentes de C y N preferentemente utilizadas por la diatomea en el crecimiento mixotrófico: glicerol (Cerón García y col., 2000; Liu y col., 2009a), acetato, glucosa (Liu y col., 2009b), almidón, lactato, glicina (Cerón García y col., 2005) o fructosa (Cerón García y col., 2006).

En vista de lo descrito se decidió evaluar el crecimiento de la cepa de *P. tricornutum* LFF Pt 01. Para esto se estudiaron las tres condiciones de crecimiento: auto-, hetero- y mixotrófico, en cultivos estáticos de 5 ml, y se los dejó crecer durante 7 días antes del recuento de células. La densidad inicial fue de  $2,8 \pm 0,3$  cél/ml. En ausencia de fuente de C y N externa, el cultivo alcanzó una densidad celular de  $3,51 \cdot 10^7$  cél/ml. Se evaluaron dos concentraciones de las siguientes fuentes de C y N, en presencia y ausencia de luz ( $39 \pm 2 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ): glucosa (0 y 1 g/l), almidón (0 y 1 g/l), urea (0 y 0,01 M), glicerol (0 y 0,5 M), extracto de levadura (EL, 0 y 1 g/l), hidrolizado

ácido de caseína (HAC, 0 y 1,5 g/l) y lactosa (0 y 0,005 g/l), en las combinaciones resultantes del diseño Plackett-Burman (Plackett y Burman, 1946) (Tabla 4.2.1). No se logró obtener desarrollo celular en oscuridad, es decir no fue posible crecer las células en condiciones heterotróficas, con ninguna de las fuentes de C y N ensayadas. En lo que al desarrollo mixotrófico se refiere, en la Tabla 4.2.1 se muestran los valores de crecimiento, es decir la densidad celular final alcanzada menos la del inóculo inicial, para cada combinación evaluada. La tabla ANOVA descompone la variabilidad de densidad celular en las contribuciones debida a varios factores, por lo que se realizó el análisis de la varianza (Tabla 4.2.2 y Fig. 4.2.1) y se encontró que las fuentes que mayor repercusión tenían sobre el crecimiento celular (efecto positivo) eran urea 0,01 M, almidón 1 g/l, glicerol 0,5 M e HAC 1,5 g/l. La significancia de los resultados fue determinada mediante el p-valor, que es la probabilidad de que la magnitud de el parámetro estimado sea debida a un proceso aleatorio (Box y col., 1978). Tomando un intervalo de confianza del 94%, se tuvieron en cuenta las fuentes con p-valor menor a 0,06. Así, los efectos estadísticamente significativos resultaron ser los expuestos por glicerol 0,5 M e HAC 1,5 g/l.

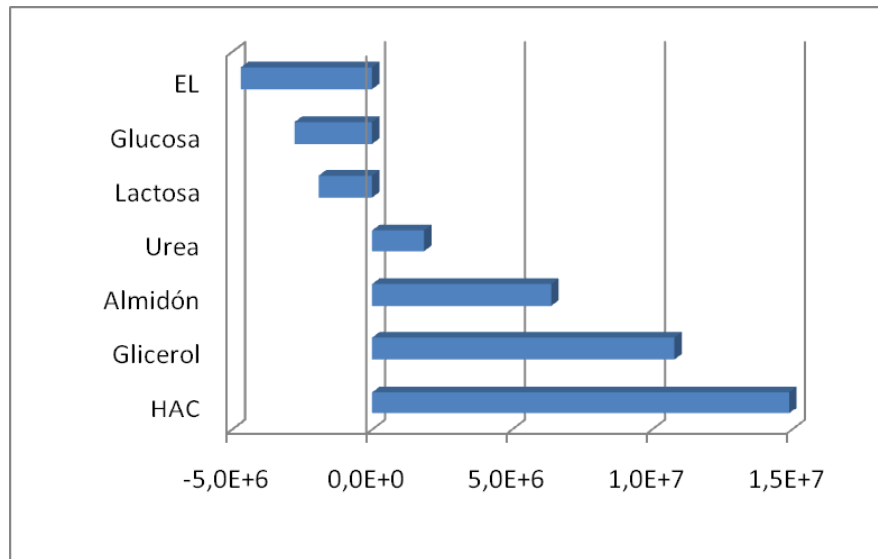
<b>Glucosa (g/l)</b>	<b>Almidón (g/l)</b>	<b>Urea (M)</b>	<b>Glicerol (M)</b>	<b>EL (g/l)</b>	<b>HAC (g/l)</b>	<b>Lactosa (g/l)</b>	<b>Densidad celular (ml<sup>-1</sup>)</b>
0	0	0	0,5	0	0	0,005	4,37 10 <sup>7</sup>
0	0	0,01	0	0	1,5	0	6,03 10 <sup>7</sup>
0	0	0,01	0	1	1,5	0,005	5,19 10 <sup>7</sup>
0	1	0	0	1	0	0,005	4,85 10 <sup>7</sup>
0	1	0	0,5	1	1,5	0	6,86 10 <sup>7</sup>
0	1	0,01	0,5	0	0	0	6,48 10 <sup>7</sup>
1	0	0	0	1	0	0	3,31 10 <sup>7</sup>
1	0	0	0,5	0	1,5	0,005	7,14 10 <sup>7</sup>
1	0	0,01	0,5	1	0	0	4,99 10 <sup>7</sup>

1	1	0	0	0	1,5	0	5,85 10 <sup>7</sup>
1	1	0,01	0	0	0	0,005	4,48 10 <sup>7</sup>
1	1	0,01	0,5	1	1,5	0,005	6,34 10 <sup>7</sup>

**Tabla 4.2.1:** Resultados del diseño de Placket-Burman para los ensayos de crecimiento mixotrófico de *P. tricornutum*. Intensidad luminosa =  $(39 \pm 2) \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , T =  $(22 \pm 3) ^\circ\text{C}$ , cultivo estático de 5 ml.

Metabolito	Efecto	p-valor
Glucosa	-2,77 10 <sup>6</sup>	0,5379
Almidón	6,40 10 <sup>6</sup>	0,1949
Urea	1,86 10 <sup>6</sup>	0,6743
Glicerol	1,08 10 <sup>7</sup>	0,0584
EL	-4,69 10 <sup>6</sup>	0,3182
HAC	1,49 10 <sup>7</sup>	0,0225
Lactosa	-1,91 10 <sup>6</sup>	0,6665

**Tabla 4.2.2:** Efecto y p-valor obtenido para cada fuente de C y N evaluada, para el crecimiento mixotrófico de *P. tricornutum*. Intensidad luminosa =  $(39 \pm 2) \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , T =  $(22 \pm 3) ^\circ\text{C}$ , cultivo estático de 5 ml.



**Fig. 4.2.1:** Gráfico de los efectos obtenidos para cada fuente de C y N evaluada, para el crecimiento mixotrófico de *P. tricorutum*. Intensidad luminosa =  $(39 \pm 2) \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $T = (22 \pm 3) ^\circ\text{C}$ , cultivo estático de 5 ml.

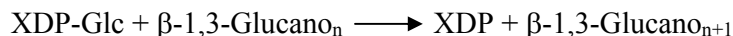
Por lo descripto, cuando se hable de células crecidas bajo condiciones mixotróficas de cultivo, se estará haciendo referencia al medio agua de mar artificial suplementado con glicerol 0,5 M e HAC 1,5 g/l.

#### 4.2.2 Estudio de la especificidad por sustrato de la enzima crisolaminarón sintasa.

El principal polisacárido de almacenamiento de energía en diatomeas es un  $\beta$ -1,3-D-glucano llamado crisolaminarón. Ha sido demostrado que este polisacárido se encuentra en vacuolas mediante tinción con azul de anilina (Waterkeyn y Bienfait, 1987) y por inmuno-localización con anticuerpos monoclonales anti- $\beta$ -1,3-glucano (Chiovitti y col., 2004). Las vías metabólicas que llevan a su síntesis o degradación no han sido todavía dilucidadas. En cuanto al sustrato glucosídico, se cree que UDP-Glc sería el responsable de ceder glucosas para la elongación del glucano, por estudios de actividades enzimáticas en crudo de las pirofosforilasas de *Cyclotella Cryptica* (Roessler, 1987). Por otro lado no se han encontrado secuencias de genes que codifique para ADP-Glc PPasas en *P. tricorutum* (Kroth y col., 2008).



Se ha hallado un gen que codificaría para la enzima crisolaminarón sintasa (CSasa), cuya secuencia aminoacídica deducida cuenta con 2100 aa y posee 20 dominios transmembrana y un péptido señal (Kroth y col., 2008). La reacción que cataliza esta enzima es:



siendo XDP equivalente a ATP o UTP.

No se conoce aún si la localización de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa sería en la membrana de la vacuola o en el REC (región del retículo endoplasmático conectada con el plástido). La enzima presenta alta similitud con la callosa sintasa de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*. Se cree que el mecanismo de elongación del polisacárido sería la adición de residuos glucosídicos, utilizando UDP-Glc como sustrato, desde el lado citoplasmático de la membrana a la que estaría anclada la CSasa, hacia el extremo no reductor del glucano en crecimiento que sobresaldría de la enzima del lado opuesto de la membrana, como ocurre para la quitín sintasa de *Thalassiosira* (Sugiyama y col., 1999) y la celulosa sintasa de plantas terrestres y algas multicelulares (Tsekos, 1999; Brett, 2000).

Por todo lo expuesto resultó de importancia encontrar el verdadero sustrato de la enzima CSasa para aportar conocimiento a la vía sintética del polisacárido de reserva en diatomeas. Para esto se midió actividad enzimática CSasa en extractos de diatomea, evaluando la incorporación de glucosa marcada a un glucano en presencia de los sustratos ADP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc y UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]Glc. Se utilizaron células crecidas en condiciones mixotróficas, ya que se encontró que la producción del polisacárido de reserva sería mayor en presencia de fuentes de C y N externas (ver apartado 4.2.4). Se evaluaron distintas condiciones de medida para poner a punto el método de detección de la actividad de la CSasa:

- como sustrato polisacárido se utilizó glucógeno y almidón ya que, al no contar con crisolaminarón, existía la posibilidad de distintas afinidades por estos sustratos;
- como extracto enzimático se usó, por un lado, el extracto crudo (soluble) luego de sonidadas las células de *P. tricornutum* en el *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, glicerol 10% y 2-ME 1 mM; por otro lado el extracto insoluble (*pellet*:

membranas y ditritos celulares); y finalmente el extracto total (soluble e insoluble) de la disrupción celular, ya que es altamente probable que la enzima CSasa esté anclada a membrana y no se solubilice al sonicar las células;

- se midió actividad enzimática a 37 °C durante varios lapsos de tiempo, entre 15 y 60 min.

Ninguna de las condiciones ensayadas demostró incorporación de marca radioactiva al glucano. Esto puede deberse a varias razones, por ejemplo a que la AE de la CSasa esté siendo medida con sustratos que no sean reconocidos por la misma: glucógeno o almidón, en lugar de crisolaminarón. Otra razón podría ser que el extracto enzimático contenga enzimas que degraden el glucano en crecimiento, por lo que la incorporación de la glucosa marcada sería conjunta con su escisión. Mediante estudios *in silico* de secuencias, se han encontrado varios genes que codificarían para endo- y exo-1,3- $\beta$ -glucanasas y  $\beta$ -glucosidasas en *P. tricornutum*, enzimas involucradas en la digestión del crisolaminarón (Kroth y col., 2008). En total han sido predichas al menos 10 enzimas que degradarían  $\beta$ -1,3-D-glucanos. Los productos de la degradación eficiente del mismo serían glucosa libre y pequeñas cantidades de glucosil oligosacáridos con enlaces  $\beta$ -1,6 (por ejemplo gentobiosa) derivados de los puntos ramificados del polisacárido. La enzima  $\beta$ -glucosidasa hidrolizaría estos oligosacáridos a glucosa libre (Kroth y col., 2008). Por otro lado, los resultados negativos en la medida de actividad enzimática CSasa podrían deberse a la dilución sufrida por la enzima del microorganismo al sonicarse en el *buffer* de extracción, que además podría no ser el óptimo para la actividad CSasa o causar la desestabilización o desnaturalización, o la no detección de la actividad enzimática por encontrarse por debajo del límite de detección del método.

Ha sido reportado un método de permeabilización de células de *P. tricornutum* y la medida de actividad de la enzima glutamina sintasa *in vivo* (Rees y col., 1995). La evaluación de AE dentro del microorganismo presenta varias ventajas, entre las que se destacan el sorteo de los problemas mencionados (uso de un sustrato inadecuado y de un *buffer* no óptimo para la actividad de la enzima, y el efecto de dilución) y la medida de AE real dentro del metabolismo del microorganismo. En primer lugar se evaluó la eficiencia de la permeabilización de las células de la diatomea mediante el uso del

colorante *Evans Blue*, que penetra en células cuyas membranas no se encuentren intactas. De esta forma, se encontró que la eficiencia era cercana al 80%.

Al medir actividad de la enzima glucano sintasa *in vivo* en células permeabilizadas de *P. tricornutum* en presencia de ADP-[<sup>14</sup>C]Glc o UDP-[<sup>14</sup>C]Glc, se encontró que la enzima CSasa no incorporaba ADP-Glc al polisacárido en crecimiento, sino UDP-Glc, (Tabla 4.2.3). Debe tenerse en cuenta que no se adicionó a la mezcla de reacción ningún polisacárido que sirva como sustrato para la elongación, por lo que los bajos valores de actividad pueden deberse a que la concentración de crisolaminarón celular fuera muy baja, con respecto al método utilizado para la detección. Las razones de la falta de agregado de glucano externo fueron la imposibilidad de ingreso del mismo a las células permeables debido al gran tamaño de esta molécula y el probable no reconocimiento de la CSasa como sustrato. Es decir, la velocidad medida correspondería a la de la reacción ocurrente dentro de la diatomea, con el glucano específico que actúa como sustrato de la enzima

Sustrato	AE ( $10^{-2}$ fmol cél <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
ADP-[ <sup>14</sup> C]Glc	0,001
UDP-[ <sup>14</sup> C]Glc	6,250

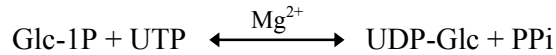
**Tabla 4.2.3:** AE de la CSasa (fmol cél<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) medida a 37 °C durante 15 min, en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, BSA 0,2 mg/ml, A/UDP-[<sup>14</sup>C]Glc 2 mM, citrato de sodio 0,12 M, Glc-6P 10 mM, y 10<sup>9</sup> células permeabilizadas.

Con estos resultados se infiere que el dador de residuos glucosídicos para la síntesis de crisolaminarón es UDP-Glc, por lo que la enzima CSasa sería una UDP-Glc-β-1,3-glucano β-3-glicosiltransferasa.

#### 4.2.3 Purificación parcial de la enzima UDP-Glc PPasa de fuente.

En vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior y para aportar más conocimientos a la vía de síntesis del crisolaminarón, se decidió intentar purificar la

enzima UDP-Glc pirofosforilasa de *P. tricornutum* (*Ptr*UDP-Glc PPasa, EC 2.7.7.9) a partir de células de la diatomea. Esta enzima cataliza la transformación de Glc-1P y UTP en UDP-Glc con la liberación de PPi, en presencia de su cofactor esencial: el catión magnesio ( $Mg^{2+}$ ), mediante la siguiente reacción:



Se han reportado dos secuencias que podrían ser las responsables de codificar para UDP-Glc PPasas en este microorganismo:

➤ *Protein ID* (P. ID.) 23630: presenta secuencia de localización cloroplastídica, lo que sugeriría que la UDP-Glc sería usada para la síntesis de crisolaminarón dentro del REC, en tránsito hacia la vacuola citoplasmática de almacenamiento del polisacárido.

➤ P. ID. 50444: proteína de fusión UDP-Glc PPasa/PGMasa (fosfoglucomutasa), localizada en el citosol (Kroth y col., 2008). Existen en *P. tricornutum* tres ejemplos de enzimas de fusión: triosa-P-isomerasa/Ga3PDHasa mitocondrial (TPI/GapC3, 25308), UDP-Glc PPasa/PGMasa (50444) y Glc-6PDHasa/6P-gluconato deshidrogenasa citosólica (54663). Cada uno de estos pares de enzimas catalizan reacciones contiguas por lo que su fusión podría ser una estrategia de aumento de eficiencia de catálisis. Sin embargo existe evidencia de que, al menos parte de TPI/GapC3 podría ser cortada post-traduccionalmente en la mitocondria, encontrándose las dos enzimas por separado y como fusión (Liaud y col., 2000). No se ha estudiado lo que ocurre con las dos proteínas de fusión restantes. La UDP-Glc PPasa citosólica podría suministrar UDP-Glc a la CSasa anclada a la membrana de la vacuola, siguiendo el mecanismo de elongación del polisacárido descrito en el apartado anterior (Kroth y col., 2008).

No se conoce todavía la localización celular de la enzima  $\beta$ -1,3-glucano sintasa, la cual podría estar anclada a la membrana de la vacuola donde se almacena el crisolaminarón o a la membrana del REC (Kroth y col., 2008). El conocimiento de la localización celular de la síntesis del sustrato UDP-Glc, es decir de la enzima responsable de su producción, podría ayudar a determinar si la UDP-Glc sería obtenida desde el citosol o desde el REC, y por ende la localización de la crisolaminarón sintasa.

Con el objetivo de identificar la UDP-Glc PPasa funcional en *P. tricornutum*, se intentó purificar la enzima a partir de un cultivo mixotrófico de la diatomea, ya que se observó en extractos celulares que la actividad de esta enzima era mayor cuando se adicionaba al medio de cultivo fuentes de C y N (ver apartado 4.2.4). Para su purificación, se siguió la siguiente estrategia:

1. Disrupción celular mediante sonicado de las células en *buffer* D [MOPS-NaOH 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, sacarosa 5% (p/v)].

2. Fraccionamiento salino con sulfato de amonio en un corte 30-80 % de saturación.

3. Desalado de las proteínas precipitadas y resuspendidas en *buffer* D por cromatografía de tamiz molecular en columnas de *BioGel Fast Desalting*.

4. Purificación por cromatografía de intercambio iónico utilizando la resina *DEAE-Sepharose*. Elusión: gradiente salino con NaCl 0-0,4 M.

5. Desalado de las fracciones que presentaron AE de UDP-Glc PPasa, por cromatografía de tamiz molecular en columnas de *BioGel Fast Desalting*.

6. Cromatografía de pseudo-afinidad a colorantes, utilizando la resina *Red A Sepharose*. Elusión: gradiente de NaCl 0-1,5 M.

7. Concentración de las fracciones que presentaron AE por ultracentrifugación.

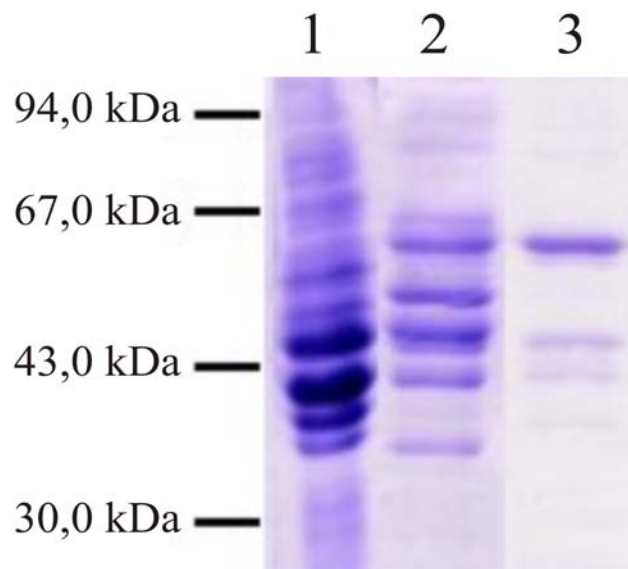
8. Purificación mediante cromatografía de exclusión molecular en resina *Superdex 200 Prep Grade*, en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,1 M, EDTA 0,1 mM.

9. Concentración de las fracciones que presentaron AE por ultracentrifugación y almacenamiento a -80 °C, con la adición de glicerol 10%.

La Tabla 4.2.4 muestra la tabla de purificación obtenida a lo largo del proceso. El extracto enzimático así obtenido se encontraba todavía impuro, no pudiéndose asegurar cuál de las bandas observadas en el PAGE (Fig. 4.2.2) era la correspondiente a la enzima UDP-Glc PPasa.

Paso	Volumen (ml)	Proteínas (mg/ml)	AEe (U/mg)	AE total (U)	Recup. (%)	Purif. (veces)
Extracto Crudo	120	17,0	0,4	816,0	100	1
<i>DEAE-Sepharose</i>	20	10,6	3,8	805,6	98,7	9,5
<i>Red A Sepharose</i>	3,2	8,0	8,9	227,8	27,9	22,3
<i>Superdex</i> concentrado	0,1	4,1	10,1	3,7	0,5	25,3

**Tabla 4.2.4:** Tabla de purificación de la *P<sub>tr</sub>*UDP-Glc PPasa a lo largo del proceso de purificación descrito en el texto.



**Fig. 4.2.2:** SDS-PAGE 12,5% de los extractos que presentaron AE de UDP-Glc PPasa en los pasos de purificación que se indican a continuación: **1:** *DEAE-Sepharose*; **2:** *Red A Sepharose*; **3:** *Superdex* concentrado.

En todos los pasos de purificación se midió también AE de ADP-Glc PPasa. Ninguna de las fracciones presentó actividad frente al sustrato ATP, por lo que se corroboró la ausencia de esta enzima. Por otro lado, las fracciones que presentaron actividad de UDP-Glc PPasa también resultaron positivas en el ensayo de AE de PGMasa. Más aún, existía una constante de proporcionalidad entre ambas AE en cada fracción evaluada. PGMasa es la enzima responsable de la transformación reversible de Glc-6P en Glc-1P. Este último resulta sustrato de la enzima UDP-Glc PPasa para la producción de UDP-Glc. Existen cinco genes en *P. tricornutum* que codificarían para esta enzima: dos plastídicos (48819 y 50718) y tres citosólicos (51225, 50118 y el componente PGM de la proteína de fusión 50444) (Kroth y col., 2008).

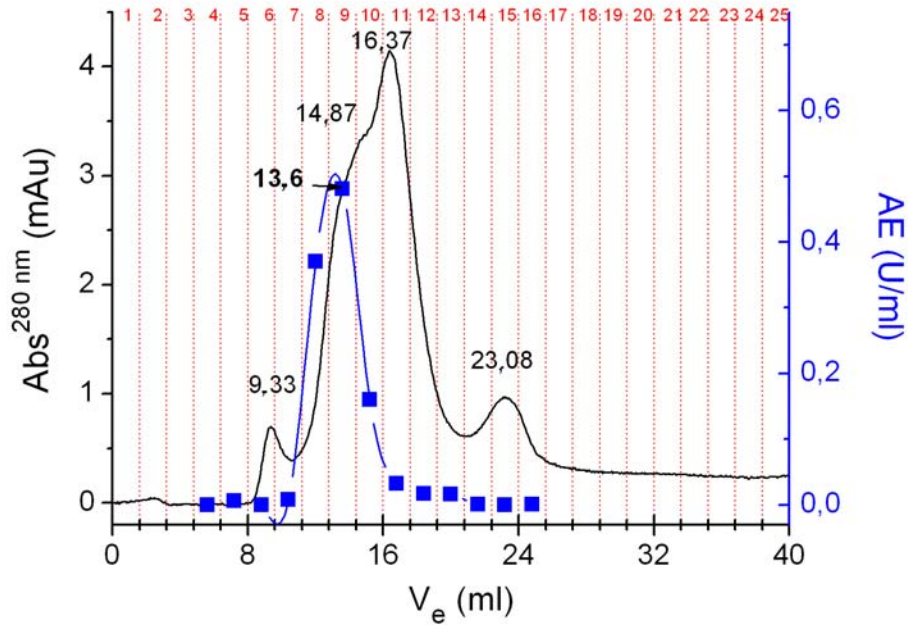
En la Tabla 4.2.5 se muestran las MM de las proteínas que resultan de la traducción de cada gen encontrado para la UDP-Glc PPasa y la PGMasa, y sus localizaciones celulares presuntas según la presencia o no de péptidos tránsito en las secuencias.

Enzima	P. ID.	MM (kDa)	Localización
UDP-Glc PPasa	23639	75,7	Cloroplasto
	50444	49,9	Citosol
PGMasa	48819	70,9	Cloroplasto
	50118	70,8	Citosol
	50444	60,7	Citosol
	50718	66,8	Cloroplasto
	51225	68,7	Citosol
UDP-Glc PPasa/PGMasa	50444	114,6	Citosol

**Tabla 4.2.5:** P. ID., MM y localización celular de las proteínas resultantes de la traducción de los genes codificantes para la UDP-Glc PPasa y la PGMasa en *P. tricornutum*.

A lo largo de la purificación descrita no se logró alcanzar un grado de pureza de la UDP-Glc PPasa suficiente para identificar la enzima. Además, en la Fig. 4.2.2 se observa que existen bandas correspondientes a todas las MM descritas en la Tabla 4.2.5.

Si observamos el cromatograma resultante de la purificación por tamiz molecular en *Superdex* (Fig. 4.2.3), vemos que la fracción que presenta AE de UDP-Glc PPasa, y coincidentemente de PGMasa, abarca masas moleculares entre 75 y 160 kDa. Al no conocer la estructura cuaternaria de las enzimas, estos resultados no son suficientes para determinar la identidad de la UDP-Glc PPasa medida.



**Fig. 4.2.3:** Cromatograma resultante de la purificación de la UDP-Glc PPasa en resina de *Superdex*. La curva negra representa la Abs<sup>280 nm</sup> (presencia de proteínas) y la curva azul (■) muestra la AE de UDP-Glc PPasa en U/ml. Se marcan con línea punteada en rojo las fracciones colectadas. Los números sobre los picos muestran los volúmenes de elución de cada uno, en ml.



Para conocer la identidad de las bandas observadas en el SDS-PAGE 12,5%, se cortaron las correspondientes a proteínas de masa molecular superior a 40 kDa y las siete bandas resultantes se enviaron al Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay, para someterlas a espectrometría de masa (EM, mapeo peptídico con tripsina y medida por MALDI-TOF). Los resultados se muestran en la Tabla 4.2.6.

Rótulo de la muestra	MM en el gel (kDa)	Proteína identificada por EM	MM teórica (kDa)	P. ID.	% de cobertura
MBB1	110	UDP-Glc PPasa/PGMasa	114,6	50444	15
MBB2	100	glicina decarboxilasa p	108,3	22187	16
MBB3	83	esterasa	74,3	17427	15
MBB4	70	TPI/GapC3	65,3	25308	28
MBB5	63	aldehído deshidrogenasa	60,6	31906	16
MBB6	46	PRKasa	43,3	50773	37
MBB7	42	GapC1	40,1	22122	38

**Tabla 4.2.6:** Resultados de EM de las bandas de más de 40 kDa visualizadas en un PAGE-SDS 12,5% del extracto parcialmente purificado de la *Ptr*UDP-Glc PPasa. Se muestran las MM aproximadas según visualización del gel y teóricas de la enzima identificada. “% de cobertura” es el porcentaje de la secuencia completa que ha sido cubierto por EM.

Todas las proteínas predichas presentaron un valor de confiabilidad estadísticamente significativo, aún cuando el porcentaje de cobertura de la secuencia fuera bajo. En la Tabla 4.2.7 y Fig. 4.2.4 se muestran los resultados obtenidos para la muestra MBB1, que fue identificada de forma significativa como la enzima de fusión UDP-Glc PPasa/PGMasa (50444), con un 15% de cobertura. Es importante destacar que se han logrado identificar péptidos tanto de la porción de la proteína que corresponde a

la UDP-Glc PPasa como la que pertenece a la PGMasa, demostrando así la presencia de la enzima de fusión 50444. Por otro lado, también se ha encontrado una banda correspondiente a la proteína de fusión TPI/GapC3 (25308), presentando evidencia adicional de su existencia como proteína de fusión en la célula (Liaud y col., 2000).

Masa exp.	Masa calc.	Delta	Inicio - Fin	Secuencia
1263,6957	1263,6467	0,0490	1045 - 1057	K.GFLGTEEPTVIT
1302,4523	1302,4978	-0,0455	1012 - 1023	R.MYIEQYEPTK.I
1940,1634	1940,1139	0,0495	925 - 941	R.NYYSRWDFENMNATK.A
1994,0521	1994,0833	-0,0312	261 - 280	R.ESAMCAEEDAFSDISK.H
2211,0803	2211,0308	0,0495	138 - 158	K.YPDLASEEGLEMMQNKVPK.L
2250,6142	2250,6411	-0,0269	534 - 555	R.YFNPEAIQILIQMGVANGVR.R
2842,2413	2842,2139	0,0274	203 - 229	K.YMFVSNSDNLGASLDLEILTYFAEK.N
3093,4829	3093,4431	0,0398	111 - 139	K.EYGLNVKFMLMNSFSTDDTLSFLSSK.Y

**Tabla 4.2.7:** Masas de los péptidos resultantes de EM (“Masa exp.”, Da), masas teórica de los péptidos de UDP-Glc PPasa/PGMasa (“Masa calc.”, Da), diferencia entre ambas (“Delta”), secuencia de los mismos y ubicación en la secuencia aminoacídica de la proteína de fusión (“Inicio – Fin”). Se muestran sólo los péptidos cuyos Delta fueron menores o iguales a 0,05 Da y son, por lo tanto, estadísticamente significativos.

1	<u>MPSFDPIRAK MEAGGCAPSA IAAFESTYGS LVSGDSGMIL EDSIAPVPQL</u>
51	<u>DKTAELEDIAP NATLLAETVV LKLNGLGTG MGLDKAKSL L PVKGD DTF LD</u>
101	<u>LTAKQVIQMR <b>KEYGLNVKFM LMNSFSTSDD TLSFLSSKYP DLASEEGLEM</b></u>
151	<u><b>MQNKVPKL</b>NA ETLEPASCES DPENEWCPPG HGDLYAALVG SGR LDALLKE</u>
201	<u><b>GFKYM FVSNS DNLGASLDLE ILTYFAEKNV</b> PFLMECCERT ENDKKGH LA</u>
251	<u>VRKSDGQLIL <b>RESAMCAEED EDAFS DISKH</b> RFFNTNNLWV RLDKLKEIID</u>
301	<u>RNGGF I PLPM IKNKKT VDPK DDSSTPVLQL ETAMGAAIEC FEGASAVVVP</u>
351	<u>RTRFAPVKKC SDLLLLRSDA YLLVDHKPVL NPACNGSAPV INLDSKLYKL</u>
401	<u>VGALEEATQD GIPSLVKCDK LTIKGLVRMS KKTKFVGDVK IVNSSAESKF</u>
451	<u>VPTGEVTGEH DLTSNAGLGK LKPTSVSTAP IAGQKPGTSG LRKKVAEFKK</u>
501	<u>ENYLN NFVQA AFDAIKASGT <i>DISKGS</i>LVIG GDG<b>RYFNPEA IQILIQMGVA</b></u>
551	<u><b>NGVRR</b>FWIGQ DGLLSTPAVS AIIREGGPRW QKAFGAFILT ASHNPGGPTE</u>
601	<u>DFGIKYNCEH GEPAPERMTD EIYANTTTIK SYKICKEFPN IDIGAAGH SK</u>
651	<u>IMSDDGSAEV NIEVIDSTEA HVKLLKSIFD FSAIRGLLDR PDFSMVYDAM</u>
701	<u>HGVNGPYVKK VFCDILGQDL SVTLNCVPKD DFNGGHADPN LTYAKELVAV</u>
751	<u>MGLNRKGEKI DMGGRPIPSF GAAADGDGDR NMILGTQFFV SPSDSLAVIV</u>
801	<u>ANADTI PFFR TQGGLKGVAR SMPTSGAVDL VAKDLNYSLF ETPTGWKYFG</u>

**Fig. 4.2.4:** Cobertura de la secuencia de la UDP-Glc PPasa/PGMasa de los péptidos estadísticamente significativos resultantes de EM ( $\Delta \leq 0,05$  Da). Los péptidos identificados se muestran en **rojo y negrita**. En subrayado se señala la porción de la proteína de fusión que corresponde a la UDP-Glc PPasa y en *itálicas* la que pertenece a la PGMasa. El porcentaje de cobertura fue del 15%.

Como se mencionó, no se conoce todavía la localización celular de la enzima  $\beta$ -1,3-glucano sintasa, la cual podría estar anclada a la membrana de la vacuola donde se almacena el crisolaminarón o a la membrana del REC (Kroth y col., 2008). Los resultados demostrados en este trabajo indican que la producción de UDP-Glc, sustrato en la síntesis de crisolaminarón, sería citoplasmática, ya que la enzima UDP-Glc PPasa encontrada es la 50444, de localización citosólica. Por lo expuesto se podría suponer que la UDP-Glc sería obtenida desde el citosol por la enzima CSasa, anclada a la

membrana de la vacuola de almacenamiento del polisacárido, que añadiría los residuos glucosídicos al extremo no reductor del glucano en crecimiento que sobresaldría de la enzima del lado opuesto de la membrana, directamente en la vacuola. Esto da soporte a la hipótesis de que el metabolismo de crisolaminarón evolucionó por relocalización de las enzimas involucradas en la síntesis y procesamiento de polisacáridos extracelulares a la vacuola (Kroth y col., 2008).

Por otro lado, se midió AE de la UDP-Glc PPasa del extracto parcialmente purificado en ambos sentidos de reacción, obteniéndose una velocidad 16 veces menor en el sentido de pirofosforólisis que en el de síntesis de UDP-Glc (Tabla 4.2.8).

En plantas, la síntesis de almidón involucra ADP-Glc como sustrato y ocurre en el cloroplasto. La enzima ADP-Glc PPasa resulta considerablemente activada por 3PGA y fuertemente inhibida por Pi (Preiss, 1982). Sin embargo, la *Ptr*UDP-Glc PPasa no resultó regulada por ninguno de estos metabolitos, al medirse en el sentido de reacción de pirofosforólisis de UDP-Glc (Tabla 4.2.8).

Reacción	AEe (U/mg)
$\text{Glc-1P} + \text{UTP} \xrightarrow{\text{Mg}^{2+}} \text{UDP-Glc} + \text{PPi}$	10,12
$\text{UDP-Glc} + \text{PPi} \xrightarrow{\text{Mg}^{2+}} \text{Glc-1P} + \text{UTP}$	0,63
$\text{UDP-Glc} + \text{PPi} \xrightarrow{\text{Mg}^{2+}, 3\text{PGA}} \text{Glc-1P} + \text{UTP}$	0,69
$\text{UDP-Glc} + \text{PPi} \xrightarrow{\text{Mg}^{2+}, \text{Pi}} \text{Glc-1P} + \text{UTP}$	0,64

**Tabla 4.2.8:** Actividad enzimática específica de la *Ptr*UDP-Glc PPasa medida en sentido de pirofosforólisis y en sentido de síntesis, en presencia y ausencia de 3PGA y Pi, en dos concentraciones: 2 y 10 mM, obteniéndose los mismos resultados. [UDP-Glc] = [PPi] = [Glc-1P] = [UTP] = 1 mM, [MgCl<sub>2</sub>] = 5 mM.

#### 4.2.4 Metabolismo de hidratos de carbono en *P. tricornutum*. Comparación en las condiciones de crecimiento auto- y mixotróficas.

Como se explicó en la introducción, las diatomeas son quimeras eucariotas que derivaron de una célula eucariota heterotrófica que endocitó una célula eucariota

fotosintética, filogenéticamente cercana a algas rojas. Finalmente, esta segunda célula fue reducida a un plástido que retuvo una pequeña parte del genoma plástidico, pero perdió los genomas mitocondrial y nuclear como entidades distintas. Estos eventos causaron una gran reorganización genómica y transferencia de genes, y un aumento en la complejidad de la estructura celular de diatomeas fisiológica y bioquímicamente (Kroth y col., 2008). La única enzima cloroplastídica codificada en el mismo plástido es la responsable de la fijación de C, RuBisCO, mientras que el resto de las proteínas son codificadas por el genoma nuclear.

Un ejemplo de esta complejidad metabólica es la presencia de varias copias de algunas enzimas involucradas en el metabolismo del carbono, como por ejemplo la fructosa-1,6-bisP aldolasa (FBPAldasa), enzima encargada de la condensación aldólica reversible de gliceraldehído-3P (Ga3P) y dihidroxiacetona-P (DHAP) a fructosa-1,6-bisP (FBP). Existen dos clases de FBPAldasa: I y II, que presentan distintos mecanismos de acción y estructura cuaternaria. Por un lado, las enzimas clase II necesitan un catión divalente como cofactor, generalmente  $Zn^{2+}$ , y son inhibidas por EDTA (Kroth y col., 2005). Por el otro, las FBPAldasas clase I son homotetrámeros mientras que las clase II son homodímeros. Las enzimas clase I y II no están relacionados filogenéticamente, es decir evolucionaron de forma convergente (Kroth y col., 2005). Las plantas, algas verdes y rojas presentan FBPAldasas clase I en sus cloroplastos y en el citosol. Los hongos sólo contienen clase II, y arquea, sólo clase I, mientras que las cianobacterias presentan ambos tipos de FBPAldasas. *P. tricornutum* tiene dos FBPAldasas clase II en cloroplasto (FBPAldasaC1 y FBPAldasaC2) y una en citosol (FBPAldasa3), además de dos FBPAldasas clase I, una citosólica (FBPAldasa4) y una plástídica (FBPAldasaC5) (Kroth y col., 2005). Se ha demostrado que la FBPAldasa clase II sería minoritaria en estos microorganismos, ya que la AE de FBPAldasa en extractos de diatomeas no resultaba inhibida considerablemente por EDTA (Kroth y col., 2005). Estos resultados fueron secundados por la menor representación de aldadas clase I hallada al analizar la base de datos de ESTs (Kroth y col., 2005). Se desconoce por qué las diatomeas presentan altas cantidades de aldadas, si son redundantes o se expresan bajo distintas condiciones ambientales, o si cada una de ellas estaría involucrada en diferentes metabolismos.

FBPasa también está presente en varias copias: cuatro cloroplastídicas y una citosólica, y es la única enzima del ciclo de Calvin para la que existe evidencia de regulación redox por Trx (Michels y col., 2005). De las seis Ga3PDHasas que posee *P. tricornutum*, dos son mitocondriales, una cloroplastídica y tres citosólicas, dos de las cuales son las dos copias de GapC2. Las más representadas son: la GapC1, enzima cloroplastídica que tendría especificidad dual para el co-sustrato  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$  y no sería regulada por óxido-reducción (Kroth y col., 2008); la GapC2, citosólica y específica de  $\text{NAD}^+$ ; y la GapC3, enzima mitocondrial fusionada a la triosa-P isomerasa (TPI) con especificidad por el co-sustrato  $\text{NAD}^+$  (Liaud y col., 2000). En diatomeas, la clásica Ga3PDHasa involucrada en ciclo de Calvin, de origen cianobacterial y localización cloroplastídica, conocida como GapAB en plantas, está ausente y fue funcionalmente reemplazada por GapC1, de origen proteobacterial. Por otro lado, la enzima citosólica involucrada en glucólisis en plantas, conocida como GapC es distinta a la GapC2 de diatomeas, la que presenta grandes similitudes con la Ga3PDHasa animal (Liaud y col., 1997). En cuanto a la enzima PGKasa, existen tres isoformas: una cloroplastídica (PGKasa-1), una mitocondrial (PGKasa-2) y una citosólica (PGKasa-51125). Hay cinco isoformas de la PGMasa, dos plastídicas, y el resto citosólicas. En los cloroplastos existe una sola isoforma de las enzimas involucradas en la fijación de C y reducción de 3PGA del ciclo de Calvin, mientras que se han encontrado múltiples isoenzimas involucradas en la regeneración de ribulosa-1,5-bisP (Gruber y col., 2009).

Las enzimas mencionadas están involucradas en varias rutas metabólicas, que incluyen el COPP, el ciclo de Calvin, la glucólisis y la gluconeogénesis. Como se dijo, en diatomeas no existe un COPP completo en los cloroplastos, por lo que esta vía ocurriría exclusivamente en el citosol (Gruber y col., 2009). Por otro lado, todas las enzimas involucradas en glucólisis se encuentran en el plástido, por lo que esta ruta metabólica podría ser activa en este compartimiento, así como también en el citosol. Se han encontrado en la mitocondria de *P. tricornutum* enzimas involucradas en los pasos glucolíticos responsables de la transformación de triosas-P en piruvato, por lo que se cree que existiría un flujo fotosintético de triosas-P desde el citosol o el cloroplasto hacia la mitocondria, mediante traslocadores específicos, que llevaría a una conexión directa entre el ciclo de Calvin y el ciclo del ácido tricarbóxico (CAT). Entonces, las

isoenzimas citosólicas podrían estar jugando distintos roles, como por ejemplo gluconeogénesis y COPP (Liaud y col., 2000; Ginger y col., 2010).

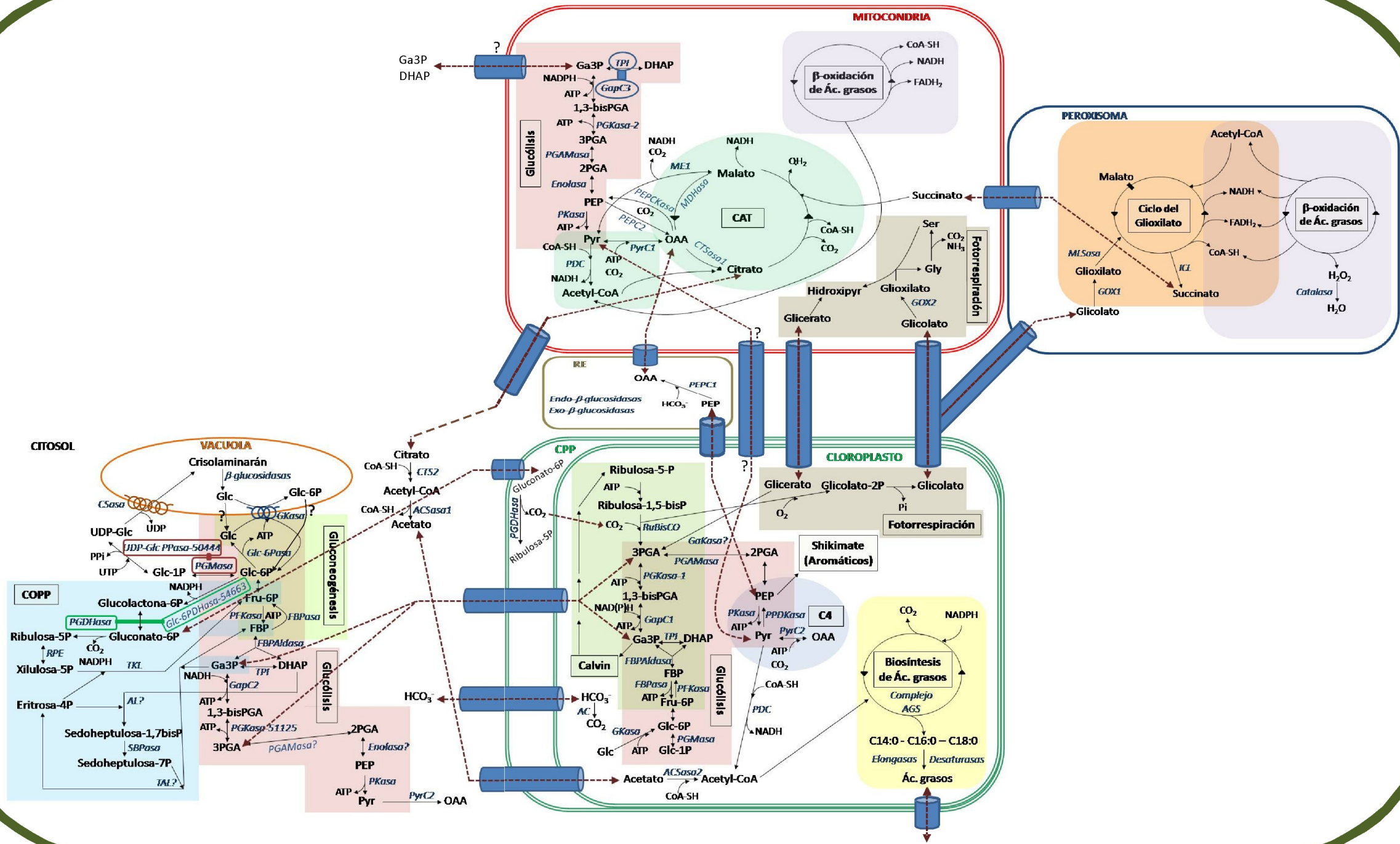
Las diatomeas poseen crisolaminarón como polisacárido de reserva, el cual sería almacenado en vacuolas. Se ha encontrado en el genoma de *P. tricornutum* una secuencia que codificaría para una glucoquinasa citosólica, que contiene en su extremo C-terminal un dominio transmembrana, por lo que esta enzima podría encontrarse anclada a membrana, similar a lo encontrado para hexoquinasas de plantas (Wiese y col., 1999). También se ha reportado que existirían  $\beta$ -glucosidasas con dominios transmembrana, por lo que se postula que tanto las enzimas involucradas en digerir el glucano como la glucoquinasa se encontrarían ancladas por su extremo C-terminal a membranas citosólicas, como por ejemplo la de la vacuola de almacenamiento de crisolaminarón, ya sea con orientación hacia el interior de la misma o hacia el citosol (Kroth y col., 2008). En el apartado anterior se encontró que la producción de UDP-Glc, sustrato en la síntesis de crisolaminarón, podría ser citoplasmática y que la UDP-Glc sería obtenida desde el citosol por la enzima CSasa, anclada a la membrana de la vacuola de almacenamiento del polisacárido, que adicionaría los residuos glucosídicos al extremo no reductor del glucano en crecimiento que sobresaldría de la enzima del lado opuesto de la membrana, directamente en la vacuola.



En cuanto al almacenamiento de C a largo plazo, las diatomeas producen grandes cantidades de lípidos, incluyendo una gran proporción de poliinsaturados. La biosíntesis de los mismos se realiza por acción del complejo ácido graso sintasa (AGS) tipo II, presente en los cloroplastos (Waller y col., 1998; Armbrust y col., 2004; Kroth y col., 2008), mientras que la  $\beta$ -oxidación sería llevada a cabo tanto en la mitocondria como en los peroxisomas, donde una catalasa eliminaría el exceso de peróxido formado en el proceso (Wilhelm y col., 2006). Los ácidos grasos sintetizados en los cloroplastos serían luego exportados al citosol donde, en ocasiones, se almacenan en vacuolas (Wilhelm y col., 2006). Se han identificado elongasas y desaturasas tanto en el citosol como en los cloroplastos de diatomeas (Domergue y col., 2003; Armbrust y col., 2004).

En la Fig. 4.2.5 se muestra un esquema de las vías metabólicas de hidratos de carbono y lípidos encontradas en cada compartimiento mediante estudio de secuencias y por fusión de los péptidos tránsito a la proteína verde fluorescente y expresión de las mismas en *P. tricornutum* (Domergue y col., 2003; Armbrust y col., 2004; Wilhelm y

col., 2006; Kroth y col., 2008; Gruber y col., 2009). Este esquema no está completo, ya que todavía falta dilucidar parte de estos metabolismos y los mecanismos de transporte entre las distintas organelas, pero incluye lo que se ha publicado hasta la actualidad.





**Fig. 4.2.5:** Modelo del metabolismo del C en *P. tricornutum*. Abreviaturas: CPP: compartimiento periplastídico, CAT: ciclo del ácido tricarboxílico; Metabolitos (letras negras): 1,3-bisPGA: 1,3-bisfosfoglicerato, 2PGA: 2-fosfoglicerato, 3PGA: 3-fosfoglicerato, DHAP: dihidroxiacetona-P, F-6P: fructosa-6-P, FBP: fructosa-1,6-bisP, Ga3P: gliceraldehído-3-P, Glc: glucosa, Glc-1P: glucosa-1-P, Glc-6P: glucosa-6-P, HidroxiPyr: hidroxipiruvato, OAA: ácido oxalacético, PEP: fosfoenolpiruvato, Pyr: Piruvato, UDP-Glc: UDP-glucosa; Enzimas (letras azules): AC: anhidrasa carbónica, ACSasa: acetyl-CoA sintasa, AL: aldolasas, CSasa: crisolaminarán sintasa, Complejo AGS: complejo ácido graso sintasa, CTSasa: citrato sintasa, FBPAldasa: FBP aldolasa, FBPasa: fructosa bisfosfatasa, Glc-6Pasa: Glc-6fosfatasa, Glc-6PDHasa: Glc-6P deshidrogenasa, GaKasa: glicerato quinasa, GapC: Ga3P deshidrogenasa, GKasa: glucoquinasa, GOX: glicolato oxidasa, ICL: isocitrato liasa, MDHasa: malato deshidrogenasa, ME: enzima málica-NAD, MLSasa: malatosintasa, PDC: complejo piruvato deshidrogenasa, PEPC: PEP carboxilasa, PEPCKasa: PEP carboxiquinasa, PGAMasa: fosfoglicerato mutasa, PGKasa: fosfoglicerato quinasa, PGDHasa: 6P-glucolactona deshidrogenasa, PGMasa: fosfoglucomutasa, PFKasa: fosfofructoquinasa, PKasa: piruvato quinasa, PPKasa: piruvato-P diquinasa, PyrC: piruvato carboxilasa, TPI: triosa-P isomerasa, UDP-Glc PPasa: UDP-Glc pirofosforilasa, RPE: ribulosa-P epimerasa, RuBisCO: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa, SBPasa: sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, TAL: transaldolasa, TKL: transquetolasa. Los nombres de las vías metabólicas se encuentran recuadrados; “?” representa enzimas y transportadores cuyos genes no han sido encontrados aún en el genoma; con líneas de puntos se simbolizan los flujos de intercambio de metabolitos entre los compartimientos celulares; “” representa enzimas ancladas a membrana; “” simboliza proteínas de fusión. Recopilación de los metabolismos descritos en (Domergue y col., 2003; Armbrust y col., 2004; Wilhelm y col., 2006; Kroth y col., 2008; Gruber y col., 2009).

Con el objeto de dilucidar las diferencias entre las rutas metabólicas puestas en marcha por *P. tricornutum* durante el crecimiento mixotrófico con respecto al autotrófico, se realizaron experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real y medidas de actividad en extractos de la diatomea de algunas enzimas involucradas en estas vías. Para esto se llevó a cabo el crecimiento de *P. tricornutum* en medio agua de mar artificial con y sin la adición de HAC 1,5 g/l y glicerina 0,5 M, para obtener los extractos mixo- y autotrófico, respectivamente. La cosecha de las células se realizó al alcanzar la densidad celular de  $(6 \pm 1) 10^6$  cél/ml, es decir durante la fase exponencial de crecimiento. Esta densidad fue alcanzada al cabo de 7 días en el caso del crecimiento mixotrófico y 10-12 días para el autotrófico, a una temperatura de  $(22 \pm 3)$  °C, bajo régimen de ciclos de luz:oscuridad 16:8 ( $15 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Para la medición de la AE, las células fueron sonicadas en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, glicerol 10%, con y sin la adición de 2-ME 10 mM. Los resultados de AE, obtenidos por triplicados biológicos, se expresaron en valores de U/cél y se muestran en la Tabla 4.2.9.

Enzima	AE Autotrófico ( $10^{-9}$ U/cél)		AE Mixotrófico ( $10^{-9}$ U/cél)	
	- 2-ME	+ 2-ME	- 2-ME	+ 2-ME
Ga3PDHasa (NAD <sup>+</sup> + As)	0,26	0,98	1,08	4,36
Ga3PDHasa (NADP <sup>+</sup> + As)	1,02	1,14	2,55	2,91
Ga3PDHasa (NADP <sup>+</sup> - As)	0	0	0	0
FBPAldasa	1,41	n.d. <sup>a</sup>	1,58	n.d.
FBPAldasa + EDTA	1,12	n.d.	1,30	n.d.
FBPAldasa + Mg <sup>2+</sup> o Mn <sup>2+</sup>	1,64	n.d.	1,91	n.d.
PGMasa	0,17	0,20	0,09	0,19
PGKasa	10,20	11,80	131	158
UDP-Glc PPasa (Pirofosforólisis)	1,42	1,32	5,03	4,82
ADP-Glc PPasa	0	0	0	0

**Tabla 4.2.9:** AE (U/cél) de las enzimas involucradas en el metabolismo del C medidas en extractos enzimáticos de *P. tricornutum* crecida bajo dos condiciones: auto- y mixotrófica. <sup>a</sup> n.d., no determinado.

Como se observa en la Tabla 4.2.9, no hay indicios de existencia de una enzima Ga3PDHasa no fosforilante (np-Ga3PDHasa, EC 1.2.1.9), a diferencia de lo que ocurre en plantas (Arnon y col., 1954; Iglesias y col., 1987). Por otro lado, se volvió a verificar la ausencia de la enzima ADP-Glc PPasa en *P. tricornutum* advertida en el apartado 4.2.3. La actividad enzimática Ga3PDHasa es mayor con el sustrato NADP<sup>+</sup>, actividad de la que sería exclusivamente responsable la enzima cloroplastídica GapC1 (Liaud y col., 2000). Se observa que todos los valores de actividad se encuentran en el mismo orden, a excepción de PGMasa y Ga3PDHasa (NAD<sup>+</sup>), que son un orden de magnitud menores, y de PGKasa que presenta AE de un orden de magnitud superior a las demás enzimas. Por otro lado, la actividad FBPAldasa no se ve considerablemente afectada por la adición de EDTA o catión divalente, por lo que se puede decir que sería FBPAldasa

de clase I en mayor proporción (cercana al 80%), como ya se ha descrito (Kroth y col., 2005). La única actividad que parece ser afectada por la adición de un agente reductor es la Ga3PDHasa con especificidad  $\text{NAD}^+$  con un aumento en la catálisis de 4 veces, pero que incluye todas las Ga3PDHasas presentes en la diatomea, por lo que no se puede adjudicar este efecto a la regulación redox de ninguna en particular. Como se dijo, se ha descrito que la GapC1 no sería afectada por agentes modificadores de grupos tiol (Kroth y col., 2008), resultado coincidente con lo observado al medir AE de Ga3PDHasa en presencia de  $\text{NADP}^+$ . En cuanto al crecimiento mixotrófico, se observa un aumento en la actividad de la Ga3PDHasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  de alrededor de 4 veces, de 2,5 para la GapC1, de 3,5 para la UDP-Glc PPasa y de un orden de magnitud para el caso de la PGKasa, con respecto al autotrófico. En cambio la actividad de la PGMasa se mantiene al comparar los extractos reducidos, pero para el caso del cultivo mixotrófico, esta enzima pareciera estar en un 50% oxidada.

Paralelamente, se realizó la cuantificación de transcritos. Se extrajo ARN de las células de *P. tricornutum* crecidas bajo condiciones auto- y mixotróficas, luego se realizó RT-PCR y, utilizando el ADNc resultante, se llevaron a cabo las PCR cuantitativas en tiempo real de las siguientes enzimas: GapC1, GapC2, TPI-GapC3, PGKasa-1, PGKasa-2, FBPAldasaC1, FBPAldasa3, para las que se contaba con los oligonucleótidos específicos (Tabla 3.1 y Tabla 3.2). Cabe destacar que sólo se compararán los niveles obtenidos para cada enzima en ambas condiciones de crecimiento, y no las cantidades relativas entre distintas enzimas, por encontrarse diferentes eficiencias para las PCR al utilizar distintos oligonucleótidos y obtener variados tamaños de fragmentos amplificados. En la Tabla 4.2.10 se muestran las concentraciones relativas de los transcritos mencionados, con respecto a las concentraciones halladas para el cultivo autotrófico.

Enzima	Localización celular	Concentración Relativa Mixotrófico/Autotrófico
GapC1 (NADP <sup>+</sup> y NAD <sup>+</sup> )	Cloroplasto	23,2
GapC2 (NAD <sup>+</sup> )	Citosol	1,3
TPI-GapC3	Mitocondria	42,5
PGKasa-1	Cloroplasto	2,9
PGKasa-2	Mitocondria	2,7
FBPAldasaC1 (Tipo II)	Cloroplasto	35,2
FBPAldasa3 (Tipo II)	Citosol	1,2

**Tabla 4.2.10:** Concentración relativa de transcritos de las enzimas involucradas en el metabolismo del C de *P. tricornutum* crecida bajo condiciones mixotróficas, con respecto a los valores obtenidos para el crecimiento autotrófico.

Como se observa, la transcripción de los genes GapC1, TPI-GapC3, y FBPAldasaC1 se encuentra más de un orden de magnitud aumentada en el cultivo mixotrófico. Por otro lado, la PGKasa-1 y la PGKasa-2 están incrementadas poco menos de 3 veces, mientras que la GapC2 y la FBPAldasa3 no modificaron su nivel de ARNm.

Los resultados de actividades enzimáticas y de niveles de transcritos pueden no ser coincidentes por varias razones. Por un lado, los ARNm pueden no ser traducidos a proteínas, por lo que los niveles enzimáticos serían menores a los de los transcritos, por ejemplo por degradación de los mismos. Por otro lado, las proteínas expresadas podrían ser blanco de proteasas, llevando a menores niveles que los correspondientes a los ARNm cuantificados. Finalmente es posible que las condiciones de medida de las actividades enzimáticas no sean las óptimas o que las enzimas se inestabilicen en el *buffer* de sonicado, obteniéndose menor cantidad de enzima activa que el que correspondería al ARNm medido.

Al comparar los resultados obtenidos en la Tabla 4.2.9 y Tabla 4.2.10, vemos que en ambos se observa un aumento en la GapC1 en el cultivo mixotrófico, aunque el

medido por AE (2,5 veces) no es tan significativo como el observado en la PCR cuantitativa (23,2 veces). Por otro lado, la actividad de la Ga3PDHasa con especificidad por el sustrato NAD<sup>+</sup> incluye a la GapC1, la GapC2 y la TPI-GapC3 y resultó 4 veces aumentada en presencia de fuente externa de C y N, mientras que sumando los incrementos en los transcritos de cada enzima, el aumento debería ser de 67 veces. Como se dijo, existen 5 isoformas de la enzima FBPAldasa, cuyas actividades, globalmente, resultaron similares en ambos crecimientos. Por esto, si por ejemplo el aumento de 35 veces del transcripto de la FBPAldasa3 estuviera acompañado por una disminución en los niveles de ARNm de otra FBPAldasa, no cuantificada por PCR en tiempo real, esto conduciría a una compensación de los niveles al medir AE. Con respecto a la PGKasa, las dos enzimas cuyos niveles de transcritos fueron medidos suman un aumento de alrededor de 6 veces en las células crecidas de forma mixotrófica, mientras que el incremento en actividad enzimática fue de 10 veces. Los resultados obtenidos en ambas experiencias llevan a pensar en un aumento en la actividad de la PGKasa en la mitocondria y el cloroplasto. Teniendo en cuenta que no se midió la PGKasa-51125, no se sabe qué ocurre con esta isoforma citosólica.

Por otro lado, se midió la concentración de crisolaminarón en células crecidas en presencia y ausencia de fuentes de C y N externas, observándose casi 2,5 veces mayor concentración del polisacárido en el cultivo mixotrófico (Tabla 4.2.11).

Condición de crecimiento	[Crisolaminarón] (10 <sup>-8</sup> µg/cél)
Autotrófico	9,5
Mixotrófico	22,6

**Tabla 4.2.11:** Concentración de crisolaminarón determinado en células de *P. tricornutum* crecidas bajo las condiciones auto- y mixotróficas.

Durante el crecimiento autotrófico, la única contribuyente para la generación de poder reductor y ATP en *P. tricornutum* es la luz, mediante las reacciones fotosintéticas que ocurren en el cloroplasto, por lo que se cree que el metabolismo respiratorio en la mitocondria se encontraría disminuido (Yang y col., 2000). Sin embargo, el ciclo de

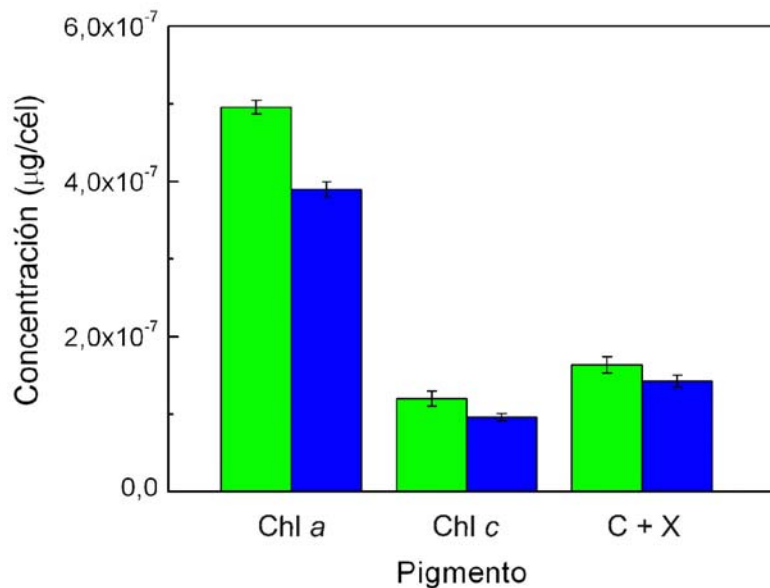
Calvin requiere grandes cantidades de ATP para la fijación de C, por lo que el rendimiento energético final disminuye considerablemente.

Durante el crecimiento mixotrófico, *P. tricornutum* puede usar tanto las reacciones fotosintéticas como las fuentes externas de C para obtener energía, por lo que los funcionamientos relativos de las diferentes vías metabólicas celulares no son tan fáciles de predecir. En vista de los resultados obtenidos, el crecimiento mixotrófico lleva acarreado, por un lado, un aumento en los pasos glucolíticos responsables de la transformación de triosas-P en piruvato (Pyr) en la mitocondria. El Pyr resultante entraría luego en el CAT que, ligado a la cadena de electrones mitocondrial, generaría energía para el desarrollo y crecimiento celular. De esta forma, el rendimiento energético alcanzado sería mayor que el obtenido mediante las reacciones fotosintéticas ligadas al ciclo de Calvin. Obviamente, una porción de la energía generada y del C fijado proviene de estas vías cloroplastídicas, pero lo que se destaca como diferencia con respecto al crecimiento autotrófico es que aumentan los flujos metabólicos mitocondriales mencionados.

Por otro lado, se observó también un incremento en las enzimas cloroplastídicas involucradas en la glucólisis, de las cuales algunas son también parte del ciclo de Calvin. Es de esperarse que el metabolismo en realidad aumentado sea el glicolítico por dos razones: por un lado, las triosas-P generadas podrían dirigirse a la mitocondria, lo que llevarían a una conexión directa entre el ciclo de Calvin y el CAT para la generación de energía, como se mencionó. La otra razón sería un aumento en la producción de Pyr, que se convertiría en Acetyl-CoA por la acción del PDC (complejo Pyr deshidrogenasa), que serviría de sustrato para la biosíntesis de ácidos grasos. Así, se aumentaría esta forma de reserva de C a largo plazo. También se observó un aumento en la actividad de la UDP-Glc PPasa, lo que significaría un incremento en la producción del sustrato de la enzima CSasa y finalmente, una mayor concentración de crisolaminarón, comprobado experimentalmente (Tabla 4.2.11). Las enzimas citosólicas medidas por PCR cuantitativa no mostraron diferencias con el crecimiento autotrófico.

Resumiendo, en presencia de luz y fuentes de C y N externas, *P. tricornutum* utilizaría el CAT mitocondrial para la producción de la energía necesaria para el desarrollo y mantenimiento celular en mayor medida que en el crecimiento autotrófico, y aumentaría las reservas de C y energía en forma de crisolaminarón y de ácidos grasos.

Como se dijo en la Introducción, *P. tricornutum* presenta Chl *a* y los pigmentos accesorios Chl *c* ( $c_1 + c_2$ ) y carotenoides, entre los que se encuentran mayoritariamente fucoxantina, y cantidades significativas de  $\beta$ -caroteno, diadinoxantina y diatoxantina (Cavalier-Smith, 1981; Pennington y col., 1988; Stauber y Jeffrey, 1988). La Chl *c* y los carotenoides son conocidos como pigmentos antena, que absorben los fotones de la luz y los transfieren al centro de reacción de la Chl *a*. Así los electrones son transferidos a través de los componentes de la cadena de transporte de electrones, lo que causa un gradiente de protones a través de la membrana tilacoide y finalmente la producción enzimática de ATP, proceso conocido como fotofosforilación. La fucoxantina es un carotenoide que deriva del  $\beta$ -caroteno y absorbe en el rango azul del espectro de luz, por lo que es el responsable de el color marrón que presenta *P. tricornutum*. Para completar el estudio comparativo entre los crecimientos auto- y mixotrófico, se midieron espectrométricamente las concentraciones de los pigmentos Chl *a*, Chl *c* y Carotenos + Xantófilas (C + X) (Fig. 4.2.6).



**Fig. 4.2.6:** Concentraciones de Chl *a*, Chl *c* y Carotenos + Xantófilas (C+X) determinados en células de *P. tricornutum* crecidas bajo las condiciones auto- (verde) y mixotróficas (azul).



Se observa una disminución en el contenido pigmentario en las células crecidas en presencia de fuentes de C y N externas, lo que es consistente con la conclusión obtenida en los párrafos anteriores, en los que se determinó que la actividad fotosintética sería menor en crecimiento mixotrófico. Los pigmentos antena (Chl *c* y carotenoides) sufren una disminución menor que la Chl *a*, correspondiente a una reducción en las reacciones fotosintéticas en mayor medida que en la captación y absorción de luz.

4.2.5 Metabolismo de hidratos de carbono en *P. tricornutum*. Comparación en las condiciones de crecimiento autotróficas y bajo condiciones oxidantes.

Teniendo en cuenta la regulación redox que fue observada para la enzima *Ptr*-PGKasa-1 en el Capítulo 1 de Resultados, se decidió estudiar los cambios en los flujos metabólicos que ocurren luego de incubar el cultivo de la diatomea con un agente oxidante. Para esto se llevó a cabo el crecimiento de *P. tricornutum* en medio agua de mar artificial a una temperatura de  $(22 \pm 3)$  °C, bajo régimen de ciclos de luz:oscuridad 16:8 ( $15 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), hasta alcanzar una densidad celular de  $(6 \pm 1) 10^6$  cél/ml, es decir durante la fase exponencial de crecimiento. En este momento se adicionó al cultivo “oxidado” peróxido de hidrógeno 0,1 mM, y se lo incubó durante 5 h, en las mismas condiciones de temperatura e iluminación descriptas.

Se realizaron idénticos estudios descriptos en el apartado 4.2.4, es decir PCR cuantitativa en tiempo real y medidas de AE en extractos de la diatomea. Para la medición de AE, las células fueron también sonicadas en *buffer* Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, glicerol 10%, con y sin la adición de 2-ME 10 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.2.12 y Tabla 4.2.13. También se determinó el contenido pigmentario, con los resultados expuestos en la Fig. 4.2.7.

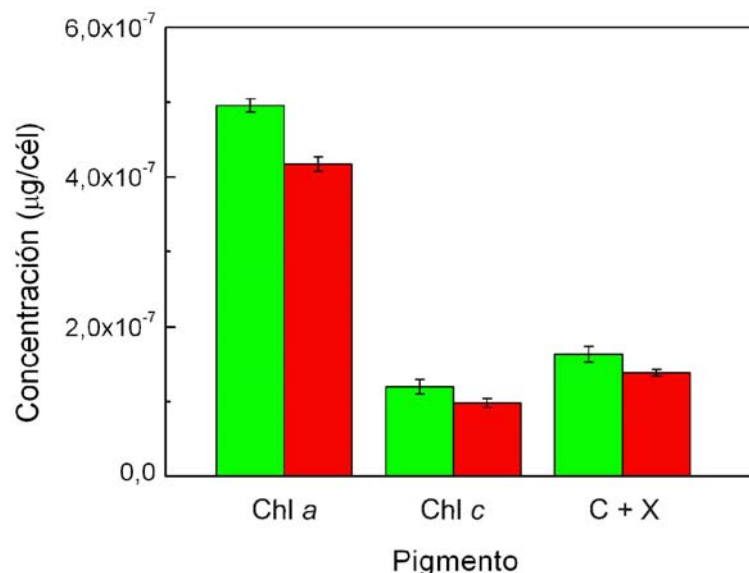
Cabe destacar que, al no contar con un marcador de estrés oxidativo, no se puede afirmar que el tratamiento con el agente oxidante (tiempo y concentración) haya sido suficiente para causar la totalidad de efectos desencadenados por las EROs. Sin embargo, se sacaron conclusiones con los resultados obtenidos bajo las condiciones especificadas.

Enzima	AE Autotrófico ( $10^{-9}$ U/cél)		AE Oxidado ( $10^{-9}$ U/cél)	
	- 2-ME	+ 2-ME	- 2-ME	+ 2-ME
Ga3PDHasa (NAD <sup>+</sup> + As)	0,26	0,98	1,04	3,96
Ga3PDHasa (NADP <sup>+</sup> + As)	1,02	1,14	0,37	0,39
PGMasa	0,17	0,20	0,25	0,25
PGKasa	10,20	11,80	5,35	12,70
UDP-Glc PPasa (Pirofosforólisis)	1,42	1,32	1,47	1,22

**Tabla 4.2.12:** AE (U/cél) de las enzimas involucradas en el metabolismo del C medidas en extractos enzimáticos de *P. tricornutum* crecida bajo dos condiciones: autotrófica y autotrófica + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (“Oxidado”).

Enzima	Localización celular	Concentración Relativa – Oxidado
GapC1 (NADP <sup>+</sup> y NAD <sup>+</sup> )	Cloroplasto	0,6
GapC2 (NAD <sup>+</sup> )	Citosol	0,9
TPI-GapC3	Mitocondria	4,2
PGKasa-1	Cloroplasto	1,0
PGKasa-2	Mitocondria	2,4
FBPAldasaC1 (Tipo II)	Cloroplasto	1,3
FBPAldasa3 (Tipo II)	Citosol	5,2

**Tabla 4.2.13:** Concentración relativa de transcritos de las enzimas involucradas en el metabolismo del C de *P. tricornutum* crecida bajo condiciones oxidantes (“Oxidado”), con respecto a los valores obtenidos para el crecimiento autotrófico.



**Fig. 4.2.7:** Concentraciones de Chl *a*, Chl *c* y Carotenos + Xantófilas (C+X) determinados en células de *P. tricornutum* crecidas bajo las condiciones autotróficas (verde) y autotróficas oxidantes (rojo).

En primer lugar, se observa una disminución en el contenido pigmentario en las células crecidas en presencia del agente oxidante, especialmente de la Chl *a* que corresponde a una disminución en las reacciones fotosintéticas y, en menor medida, en la captación y absorción de luz (Chl *c* y carotenos + xantófilas). Ya que durante la fotosíntesis hay gran producción de EROs, esta reducción en los pigmentos podría responder a la necesidad de no producir aún más cantidad de estas especies que la que aporta el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionada al cultivo, por lo que la fotosíntesis se vería relativamente disminuida. Obviamente, la célula no puede mantenerse sin fotosíntesis en ausencia de fuentes de C externas, por lo que no estaría totalmente inhibida, sino reducida.

Las enzimas mitocondriales TPI-GapC3 y PGKasa-2 se encuentran aumentadas, por lo que se puede suponer un aumento en el flujo de las triosas-P desde el cloroplasto y el citosol hacia la mitocondria, donde entrarían en el CAT produciendo finalmente energía y poder reductor. De esta forma, el rendimiento energético es mayor que el logrado si la producción de energía fuera mayoritariamente en los cloroplastos, por el mencionado consumo de ATP que conlleva el ciclo de Calvin. Además, el poder reductor producido por el CAT es necesario para contrarrestar el estrés oxidativo

sufrido. En cuanto a las enzimas cloroplastídicas, en primer lugar se observa que los niveles de transcritos de la PGKasa-1 son iguales a los del crecimiento autotrófico. La AE de la PGKasa está disminuida en el cultivo incubado con el agente oxidante, pero al agregar reductor al extracto celular, se recupera la misma actividad que en el crecimiento sin peróxido de hidrógeno. Es decir, la cantidad de enzima sería la misma, pero la actividad estaría disminuida por encontrarse oxidada.

Como se demostró en el Capítulo 1 de Resultados de este trabajo de tesis, la PGKasa-1 cloroplastídica es una enzima sensible a los estados redox. No existen estudios sobre la PGKasa-2 y la PGKasa-51125 pero, mediante alineamientos de secuencias, se observa que la PGKasa-2 tiene las mismas Cys que la PGKasa-1 excepto por la Cys-21, por lo que es posible que sufra efectos similares a la PGKasa-1 al enfrentarse con un agente oxidante. En cambio, las 6 Cys presentes en la PGKasa-51125 no son conservadas con respecto a las de la PGKasa-1, lo que no significa que esta enzima sea insensible a la oxidación. Por lo tanto, se puede decir que la actividad global de la PGKasa se ve afectada por el estado redox celular, pero no se puede atribuir la responsabilidad de este efecto a ninguna enzima en particular. La PGKasa-2 presenta 2,4 veces más ARNm en condiciones oxidantes, tal vez para contrarrestar este efecto causado en su actividad y mantener los niveles de la vía metabólica de la que forma parte con la finalidad de aumentar el flujo metabólico hacia el CAT, como se dijo al comienzo de este párrafo.

La FBPAldasaC1 no parece presentar cambios en los niveles de ARNm. La AE de la Ga3PDHasa con especificidad por  $\text{NAD}^+$  está aumentada en el cultivo oxidado y es además sensible a la adición del agente reductor al extracto. Por un lado la TPI-GapC3 presenta mayores niveles de transcritos, no así la GapC1 que está ligeramente disminuida y la GapC2 que se encuentra inalterada. La actividad enzimática de la Ga3PDHasa ( $\text{NADP}^+$ ), de la cual la GapC1 es responsable, disminuyó 2,8 veces y su actividad no se vio alterada por la adición de 2-ME al extracto enzimático, coherente con lo que se ha descrito en cuanto a la ausencia de regulación redox de esta enzima (Michels y col., 2005).

Entonces, en cuanto a las enzimas cloroplastídicas, la GapC1 estaría disminuida a nivel transcripcional, mientras que la regulación de la PGKasa-1 sería a nivel post-traducciona, por oxidación de la enzima. Esto resulta coherente con lo explicado

anteriormente: el ciclo de Calvin estaría disminuido a fin de que las triosas-P migren a la mitocondria para la producción de energía y la obtención de un mejor rendimiento en ATP, y para evitar el consumo de poder reductor que trae aparejado el ciclo de Calvin. Por otro lado, como se dijo en el Capítulo 1 de Resultados, estas triosas-P podrían abandonar el cloroplasto hacia el citosol e ingresar en el COPP a fin de producir NADPH, necesario para poner en marcha todos los sistemas antioxidantes y de reparación del estrés oxidativo. El aumento en los niveles de transcritos de la enzima citosólica FBPAldasa3 podría estar contribuyendo a esta redirección de las triosas-P al COPP. Finalmente, las actividades enzimáticas PGMasa y UDP-Glc PPasa no se vieron modificadas.

#### 4.2.6 Discusión.

Numerosos estudios han sido realizados sobre las distintas condiciones de crecimiento de diatomeas, pero prestando especial importancia a los aspectos morfológicos, fisiológicos y ecológicos. Sin embargo, son pocos los estudios a nivel molecular sobre las vías metabólicas afectadas bajo estas condiciones. En general, se han realizado estudios *in silico* sobre las mismas, pero quedan todavía muchos interrogantes al hablar del metabolismo del C en estas microalgas.

En el presente capítulo se ha puesto a punto el crecimiento de la cepa de *P. tricornutum* LFF Pt 01, encontrándose resultados similares a los descriptos para otras diatomeas. No fue posible, por otro lado, el crecimiento heterotrófico de esta microalga. Se profundizó en el estudio de la vía de síntesis del polisacárido de reserva crisolaminarín. Así, se constató que el dador de glucosas sería la UDP-Glc, que sería producida en el citosol por acción de la enzima UDP-Glc PPasa, fusionada a la PGMasa. Por esto se podría suponer que la UDP-Glc sería obtenida desde el citosol por la enzima CSasa, anclada a la membrana de la vacuola de almacenamiento del polisacárido, que adicionaría los residuos glucosídicos al extremo no reductor del glucano en crecimiento, el cual sobresaldría de la enzima del lado opuesto de la membrana, directamente en la vacuola. Además, en diatomeas estarían ausentes las enzimas ADP-Glc PPasa y Ga3PDHasa no fosforilante.

Por otro lado, se realizó un esquema metabólico global de las vías principales involucradas en la metabolización del C en *P. tricornutum*, teniendo en cuenta todos los conocimientos publicados hasta el momento de escritura de este trabajo de tesis. Mediante la medida de actividades enzimáticas, contenido pigmentario, concentración de crisolaminarón y niveles de ARNm, se logró tener una idea general de los metabolismos operativos bajo condiciones de crecimiento mixotróficas o en condiciones de estrés oxidativo. Así, se observó que, al tener exceso de fuente de C y N externa, *P. tricornutum* aumentaría sus reservas de C en forma de crisolaminarón y de ácidos grasos. Además, la vía mayormente responsable de suministro de energía para el desarrollo celular sería el CAT mitocondrial, resultado coherente con la disminución en la concentración de los pigmentos y, por lo tanto, de la fotosíntesis. Cuando el cultivo está en contacto con agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, disminuirían los flujos metabólicos que consumen poder reductor, como el ciclo de Calvin, de manera de dirigir las triosas-P hacia la mitocondria para el ingreso al CAT, que daría como resultado la producción de ATP y de poder reductor, necesario para contrarrestar los efectos causados por las EROs. La fotosíntesis también se vería disminuida, para no contribuir a la producción de especies oxidantes, tóxicas para las células.

## 5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo de tesis, se pueden enunciar las siguientes conclusiones:

**a.** Respecto a la enzima PGKasa-1 de *P. tricornutum*:

Se realizó el clonado molecular de la enzima *Ptr*PGKasa-1 y se logró su expresión en forma activa y soluble, con y sin la adición de una etiqueta de His en su extremo N-term, sin cambios en las propiedades cinéticas de la misma. Se alcanzó un alto grado de pureza en ambos casos.

Se caracterizó su estructura cuaternaria, encontrándose que se trata de una enzima monomérica que adopta una conformación laxa en ausencia de sus sustratos, como se ha descrito para enzimas de otros organismos. Se logró construir un modelo molecular de la *Ptr*PGKasa-1.

Se hallaron el pH y la temperatura óptimos de reacción, obteniéndose dos valores de energía de activación. Los parámetros cinéticos hallados y el mecanismo de reacción de la *Ptr*PGKasa-1 son similares a otras PGKasas.

Se encontró que la enzima sería inhibida por el sustrato ATP cuando las concentraciones de 3PGA no son saturantes, comportándose como un inhibidor competitivo. En cambio, si la enzima está saturada con 3PGA, el ATP se uniría de una forma distinta actuando como activador al favorecer la liberación del producto 1,3-bisPGA.

La *Ptr*PGKasa-1 resultó inhibida por agentes oxidantes sintéticos y fisiológicos, efecto revertido por la incubación con agentes reductores químicos y celulares. La enzima presentó dos potenciales de reducción que indicarían que existen dos centros redox distintos, los cuales pueden ser sensibles a óxido-reducción *in vivo*. Se produjeron, en forma soluble y activa, mutantes simples Cys → Ser y se purificaron. Se encontró que el mecanismo de inhibición seguido por la *Ptr*PGKasa-1 por agentes oxidantes es causado por la oxidación de la Cys-77 a ácido sulfénico y la formación de un puente disulfuro entre las Cys-58 y 95. Aunque ninguno de estos residuos es esencial

para la catálisis, su modificación llevaría a cambios en la conformación que inhibirían la actividad de la enzima.

La *PtrPGKasa-1* presenta también actividad chaperona, protegiendo de desnaturalización a la cadena B de la insulina, a la *TaeGapC* y a la alcohol deshidrogenasa de levaduras. Este efecto no se ve modificado por el estado redox de la enzima ni por la presencia de sus sustratos, y es dependiente de la relación molar entre las proteínas.

**b.** Respecto al metabolismo de hidratos de carbono en *P. tricornutum*:

Se puso a punto el crecimiento mixotrófico de la cepa de *P. tricornutum* LFF *Pt 01*, adicionando al medio agua de mar glicerol 0,5 M e HAC 1,5 g/l.

Se midió actividad enzimática de la CSasa *in vivo*, encontrándose que la misma tiene especificidad por el sustrato UDP-Glc.

Se intentó purificar de fuente la enzima UDP-Glc PPasa de *P. tricornutum*, no alcanzándose un grado de pureza suficiente como para identificar y caracterizar la enzima. Por espectrometría de masa se encontró que se trataría de la proteína citosólica de fusión UDP-Glc PPasa/PGMasa (P. ID. 50444), por lo que la síntesis de crisolaminarón ocurriría en el citoplasma y el almacenamiento del glucano sería en vacuolas.

Se estudiaron las vías metabólicas operativas al crecer células de *P. tricornutum* en condiciones mixotróficas. Comparativamente con el cultivo autotrófico, en presencia de fuentes externas de C y N, se vio favorecido el CAT mitocondrial para la producción de energía y disminuidos los procesos cloroplastídicos ciclo de Calvin y fotosíntesis. Por otro lado aumentaron las reservas de C y energía en la diatomea, en forma de crisolaminarón y lípidos.

Cuando *P. tricornutum* es crecido en condiciones oxidantes, se observa una disminución en la fotosíntesis y en el ciclo de Calvin para disminuir la producción de EROs en la célula. Por otro lado, hay un aumento del flujo metabólico hacia el CAT mitocondrial, que produciría ATP y NADPH, necesario para contrarrestar los daños causados por el agente oxidante.



En base a los resultados obtenidos en la presente tesis y haciendo una revisión de lo publicado para diatomeas en general y para *P. tricornutum* en particular, se presenta un escenario metabólico ocurrente en estos microorganismos. Tal panorama representa un aporte para plantear futuros estudios que permitan una mayor comprensión de las diatomeas a nivel metabólico y molecular. Tales futuros estudios deben establecer especialmente comparaciones con lo encontrado en otros organismos fotosintéticos y/o heterotróficos relacionados, dada la particular ubicación de las diatomeas en el contexto evolutivo.

## 6 RESUMEN

La fotosíntesis eucariota comienza con la captación endosimbiótica de una cianobacteria (procariotas que realizan fotosíntesis oxigénica) por parte de un eucariota unicelular heterotrófico. De esto derivan los llamados plástidos primarios (fotosintéticos) encontrados en algas verdes y rojas y en plantas. En este proceso evolutivo, las algas, algunos protozoos y las diatomeas ocupan una posición de relevancia. En este sentido, las diatomeas son producto de lo que se conoce como endosimbiosis secundaria, en la que un eucariota no fotosintético captó por endocitosis a un eucariota fotosintético con un cloroplasto primario, lo que involucró una transferencia masiva de genes desde el núcleo de la célula fagocitada hacia el de la célula huésped. Esto hizo que en los diferentes organismos se encuentren enzimas que catalizan reacciones similares pero que están reguladas según el contexto metabólico particular al cual son funcionales. A partir de esto, es de importancia estudiar las relaciones de estructura proteica a función y regulación de estas proteínas. Sin embargo, son marcadamente escasos los trabajos de caracterización de enzimas de diatomeas, ya sea purificadas directamente de extractos del alga o luego de la expresión recombinante de los genes respectivos, por lo que mayoritariamente las propiedades de las proteínas (y las rutas metabólicas en las que están involucradas) sólo han podido ser inferidas parcialmente a partir de comparaciones de secuencias por métodos informáticos.

Las diatomeas son un grupo de algas cromófitas capaces de crecer en agua salada y dulce, aún bajo condiciones extremas de temperatura y salinidad, en forma autótrofa, heterotrófica o mixta. Se cree que son el grupo eucariótico más importante del fitoplancton, contribuyendo en un 20-25% a la producción primaria global. Además, juegan un papel clave en los ciclos biogeoquímicos del silicio y del carbono. Pese a la relevancia evolutiva, ecológica y productiva, los estudios sobre la biología de las diatomeas, a nivel molecular, están relativamente poco desarrollados. El modelo experimental dentro de las diatomeas es la especie *Phaeodactylum tricorutum*, la cual tiene un genoma relativamente pequeño, un tiempo de generación corto y es factible de ser transformada genéticamente. En el presente trabajo de tesis se realizaron estudios a nivel enzimático que permitieron obtener información acerca de la ocurrencia y

regulación del metabolismo de hidratos de carbono y de la síntesis del polisacárido de reserva (crisolaminarón).

Se clonó el gen que codifica para la enzima cloroplastídica fosfoglicerato quinasa-1 de *P. tricornutum* (*PtrPGKasa-1*), la cual fue expresada en *E. coli*. La proteína recombinante se obtuvo en forma soluble y activa y fue purificada y caracterizada estructural, cinética y regulatoriamente. Las propiedades estructurales y cinéticas resultaron similares a las obtenidas para PGKasas de otros organismos, mientras que las características regulatorias resultaron distintivas. En este aspecto, *PtrPGKasa-1* resultó regulada por el entorno redox, determinado por compuestos sintéticos y fisiológicos, siendo activa en su forma reducida. Mediante la realización de estudios cinéticos y químicos y la construcción de mutantes simples Cys → Ser, se logró determinar el rol de cada una de las 6 Cys que presenta *PtrPGKasa-1* y el mecanismo de inhibición por oxidación sufrido por la enzima. Los resultados obtenidos sugieren que la regulación redox de la enzima de la *P. tricornutum* podría ocurrir *in vivo* y ser relevante para el funcionamiento del metabolismo fotosintético en diatomeas. Además, *PtrPGKasa-1* presentó actividad enzimática de chaperona, protegiendo a otras proteínas de desnaturalización.

Por otra parte, se optimizó el crecimiento mixotrófico de *P. tricornutum*, hallando que las fuentes de carbono y nitrógeno preferentemente utilizadas por la cepa LFF *Pt* 01 eran glicerol e hidrolizado ácido de caseína. Se realizaron medidas de actividad enzimática en extractos celulares y de niveles de transcritos por PCR cuantitativa en tiempo real de la diatomea crecida en presencia y ausencia de las fuentes de carbono y nitrógeno mencionadas. Al analizar comparativamente los metabolismos de hidratos de carbono operativos bajo estas condiciones, se encontró que el cultivo mixotrófico presentaba un aumento en el flujo metabólico hacia el ciclo del ácido tricarbónico mitocondrial y una disminución en los procesos cloroplastídicos de fotosíntesis y ciclo de Calvin, mejorando así el rendimiento energético. Además, se vieron aumentadas las reservas de energía en forma de crisolaminarón y lípidos.

Se ahondó en la caracterización de la vía de síntesis del polisacárido de reserva. Por un lado, se midió la actividad enzimática *in vivo* de la enzima crisolaminarón sintasa, hallándose que tiene especificidad por el sustrato glucosídico UDP-Glc. Por otro lado, se identificó una UDP-Glc pirofosforilasa funcional en *P. tricornutum*: la

proteína de fusión UDP-Glc pirofosforilasa/fosfoglucomutasa (P. ID. 50444), lo que sugeriría que la síntesis de crisolaminarón ocurriría en el citoplasma y el almacenamiento del glucano sería en vacuolas.

Finalmente, se realizaron estudios comparativos de actividades enzimáticas y de niveles de transcritos de células de *P. tricornutum* crecidas bajo condiciones oxidantes y no oxidantes. En contacto con peróxido de hidrógeno se vieron disminuidos la fotosíntesis y el ciclo de Calvin, responsables de generar especies reactivas del oxígeno y consumir el poder reductor de la célula, respectivamente. Esto hizo que cobrara importancia el ciclo del ácido tricarbóxico en la mitocondria, generando el ATP y el NADPH necesarios para permitir la supervivencia celular y contrarrestar los efectos causados por las especies oxidantes.

En base a los resultados obtenidos en la presente tesis y haciendo una revisión de lo publicado para diatomeas en general y para *P. tricornutum* en particular, se presenta un escenario metabólico ocuente en estos microorganismos. Tal panorama representa un aporte para plantear futuros estudios que permitan una mayor comprensión de las diatomeas a nivel metabólico y molecular.

## 7 ABSTRACT

Eukaryotic photosynthesis began when a nonphotosynthetic unicellular eukaryote engulfed a cyanobacterium by endosymbiosis, which ultimately resulted in a photosynthetic plastid, found in green and red algae and in land plants. Algae, some protozoa and diatoms take a key position in this evolutionary process. Diatoms evolved by secondary endosymbiosis in which a nonphotosynthetic eukaryote engulfed a photosynthetic eukaryote, resulting in a massive transference of genes from the engulfed cell to the host one. As a result, different organisms have enzymes that catalyze similar reactions but are regulated according to the particular metabolic context in which they are active. Consequently, it is important to study the relationships between protein structure to protein function and regulation. However, there is scarce information about the characterization of diatom enzymes, either purified from diatom cells or after recombinant expression of the respective genes, so protein properties (and metabolic pathways they are involved in) were only partially inferred from sequence comparisons using *in silico* methods.

Diatoms are a group of chromophyte algae capable of growing autotrophically, heterotrophically and mixotrophically in sweet and salty water, even under extreme temperature and salinity conditions. Diatoms are important components of marine phytoplankton, responsible for 20-25% global primary production. They are particularly important for biogeochemical cycling of silica and carbon. Despite their evolutionary and ecologic relevance, very little is known about the biology of these microorganisms at the molecular level. *Phaeodactylum tricornerutum* is the most widely used model system for studying diatoms because of its small genome, short generation time and ease of genetic transformation. In the present thesis, enzymatic studies were made that contributed to the knowledge of: i) carbohydrates metabolisms regulation and occurrence, and ii) the biosynthesis of the energy storage polysaccharide (chrysolaminaran).

We cloned the gene encoding chloroplastidic phosphoglycerate kinase-1 from *P. tricornerutum* (*Ptr*PGKase-1) and expressed it in *E. coli*. The recombinant enzyme was active and further purified and characterized respect to its structure, kinetics and

regulation. Afterward, it showed similar structural and kinetic properties as the enzyme from other organisms, although the diatom PGKase displayed distinctive regulatory characteristics. The activity of the enzyme was found dependent on the redox status in the environment determined by different compounds, including some of physiological function, *Ptr*PGKase-1 being active in its reduced form. The roles of the six Cys residues found in the diatom enzyme were analyzed by site-directed mutagenesis and the oxidation inhibition mechanism was elucidated. Results suggested key regulatory properties for *P. tricornutum* PGKase-1, which could be relevant for the functioning of carbon photosynthetic metabolism in diatoms. On the other hand, *Ptr*PGKase-1 displayed chaperone activity, protecting other proteins from denaturation.

Mixotrophic *P. tricornutum* growth was optimized and preferred carbon and nitrogen sources of strain LFF *Pt* 01 were found to be glycerol and casein acid hydrolysate. Enzymatic activity in cellular extracts and transcript levels of autotrophic and mixotrophic diatom cells were measured. Comparative analysis of carbohydrates metabolisms operative in presence or absence of carbon and nitrogen sources showed that the mixotrophic culture displayed an increased mitochondrial tricarboxylic acid cycle and a decrease in chloroplastidic pathways as photosynthesis and Calvin cycle, thus improving the energetic yield. Besides, energetic storage products, as chrysolaminaran and lipids, were raised.

In order to contribute to the knowlledge of chrysolaminaran synthesis pathway, enzymatic activity of chrysolaminaran synthase was measured *in vivo* and found to be specific to UDP-Glc as glycosidic substrate. On the other hand, a functional UDP-Glc pyrophosphorylase was identified in *P. tricornutum* as the fusion protein UDP-Glc pyrophosphorylase/phosphoglucomutase (P. ID. 50444), which suggests that chrysolaminaran synthesis takes place in the cytosol and the glucan storage is in vacuoles.

Finally, enzymatic activities and transcript levels of cells grown under oxidative conditions were analyzed. When hydrogen peroxide was added to the culture, cell photosynthesis and Calvin cycle decreased both pathways responsible of oxygen reactive species generation and reducing power consumption, respectively. As a consequence, the tricarboxylic acid cycle was increased and generated ATP and NADPH, necessary to grow and to counteract the effects caused by the oxidant species.

The results obtained in this thesis and the bibliographic revision of diatom (in general) and *P. tricornutum* (in particular) present a metabolic scenery active in these microorganisms. This backdrop represents a contribution for future studies that will allow a bigger comprehension of diatoms at the metabolic and molecular levels.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlgren, G.; Lundstedt, L.; Brett, M. y Forsberg, C. (1990) *Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters*. J Plankton Res. 12: 809-818.
- Akcha, F.; Arzul, G.; Rousseau, S. y Bardouil, M. (2008) *Comet assay in phytoplankton as biomarker of genotoxic effects of environmental pollution*. Mar Environ Res. 66: 59-61.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J. (1996) *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega, Barcelona.
- Aleryani, S.; Milo, E. y Kostka, P. (1999) *Formation of peroxyxynitrite during thiol-mediated reduction of sodium nitroprusside*. Biochim Biophys Acta. 1472: 181-190.
- Allen, A. E.; Vardi, A. y Bowler, C. (2006) *An ecological and evolutionary context for integrated nitrogen metabolism and related signaling pathways in marine diatoms*. Curr Opin Plant Biol. 9: 264-273.
- Anson, M. L. (1940) *The Reactions of Iodine and Iodoacetamide with Native Egg Albumin*. J Gen Physiol. 23: 321-331.
- Apt, K. E.; Kroth-Pancic, P. G. y Grossman, A. R. (1997) *Stable nuclear transformation of the diatom Phaeodactylum tricornutum*. Mol Gen Genet. 252: 572-579.
- Arias, D. (2009) *Estudio comparativo de proteínas involucradas en el balance de óxido-reducción en diferentes organismos. Caracterización del sistema de tiorredoxina en protozoos y algas eucariotas*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe
- Arias, D. G.; Marquez, V. E.; Beccaria, A. J.; Guerrero, S. A. y Iglesias, A. A. (2010) *Purification and characterization of a glutathione reductase from Phaeodactylum tricornutum*. Protist. 161: 91-101.
- Armbrust, E. V.; Berges, J. A.; Bowler, C.; Green, B. R.; Martinez, D.; Putnam, N. H.; Zhou, S.; Allen, A. E.; Apt, K. E.; Bechner, M.; Brzezinski, M. A.; Chaal, B. K.; Chiovitti, A.; Davis, A. K.; Demarest, M. S.; Detter, J. C.; Glavina, T.; Goodstein, D.; Hadi, M. Z.; Hellsten, U.; Hildebrand, M.; Jenkins, B. D.; Jurka, J.; Kapitonov, V. V.; Kroger, N.; Lau, W. W.; Lane, T. W.; Larimer, F. W.;



- Lippmeier, J. C.; Lucas, S.; Medina, M.; Montsant, A.; Obornik, M.; Parker, M. S.; Palenik, B.; Pazour, G. J.; Richardson, P. M.; Rynearson, T. A.; Saito, M. A.; Schwartz, D. C.; Thamatrakoln, K.; Valentin, K.; Vardi, A.; Wilkerson, F. P. y Rokhsar, D. S. (2004) *The genome of the diatom Thalassiosira pseudonana: ecology, evolution, and metabolism*. Science (New York, N.Y. 306: 79-86.
- Arnon, D. I.; Rosenberg, L. L. y Whatley, F. R. (1954) *A new glyceraldehyde phosphate dehydrogenase from photosynthetic tissues*. Nature. 173: 1132-1134.
- Ashmarina, L. I.; Muronetz, V. I. y Nagradova, N. K. (1985) *Yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Evidence that subunit cooperativity in catalysis can be controlled by the formation of a complex with phosphoglycerate kinase*. European journal of biochemistry / FEBS. 149: 67-72.
- Ast, M.; Gruber, A.; Schmitz-Esser, S.; Neuhaus, H. E.; Kroth, P. G.; Horn, M. y Haferkamp, I. (2009) *Diatom plastids depend on nucleotide import from the cytosol*. Proc Natl Acad Sci U S A. 106: 3621-3626.
- Balmer, Y.; Koller, A.; Val, G. D.; Schurmann, P. y Buchanan, B. B. (2004) *Proteomics uncovers proteins interacting electrostatically with thioredoxin in chloroplasts*. Photosynth Res. 79: 275-280.
- Ballicora, M. A. y Wolosiuk, R. A. (1994) *Enhancement of the reductive activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by modulators and protein perturbants*. European journal of biochemistry / FEBS. 222: 467-474.
- Banerjee, A.; Sharma, R.; Chisti, Y. y Banerjee, U. C. (2002) *Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals*. Crit Rev Biotechnol. 22: 245-279.
- Banerjee, R. (2008) *Redox Biochemistry*. Interscience
- Banks, R. D.; Blake, C. C.; Evans, P. R.; Haser, R.; Rice, D. W.; Hardy, G. W.; Merrett, M. y Phillips, A. W. (1979) *Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme*. Nature. 279: 773-777.
- Beattie, A.; Hirst, E. L. y Percival, E. (1961) *Studies on the metabolism of the Chrysophyceae. Comparative structural investigations on leucosin (chrysolaminarin) separated from diatoms and laminarin from the brown algae*. The Biochemical journal. 79: 531-537.

- Bernstein, B. E. y Hol, W. G. (1998) *Crystal structures of substrates and products bound to the phosphoglycerate kinase active site reveal the catalytic mechanism.* Biochemistry. 37: 4429-4436.
- Besendahl, A.; Qiu, Y. L.; Lee, J.; Palmer, J. D. y Bhattacharya, D. (2000) *The cyanobacterial origin and vertical transmission of the plastid tRNA(Leu) group-I intron.* Curr Genet. 37: 12-23.
- Bhaya, D. y Grossman, A. (1991) *Targeting proteins to diatom plastids involves transport through an endoplasmic reticulum.* Mol Gen Genet. 229: 400-404.
- Bindoli, A.; Fukuto, J. M. y Forman, H. J. (2008) *Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling.* Antioxidants & redox signaling. 10: 1549-1564.
- Blostein, R. y Rutter, W. J. (1963) *Comparative Studies of Liver and Muscle Aldolase. Ii. Immunochemical and Chromatographic Differentiation.* The Journal of biological chemistry. 238: 3280-3285.
- Borowitzka, M. A. y Volcani, B. E. (1978) *The polymorphic diatom Phaeodactylum tricorutum: ultrastructure of its morphotypes.* J Phycol. 14: 10-21.
- Bowie, J. U.; Luthy, R. y Eisenberg, D. (1991) *A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure.* Science (New York, N.Y. 253: 164-170.
- Bowler, C.; Allen, A. E.; Badger, J. H.; Grimwood, J.; Jabbari, K.; Kuo, A.; Maheswari, U.; Martens, C.; Maumus, F.; Otilar, R. P.; Rayko, E.; Salamov, A.; Vandepoele, K.; Beszteri, B.; Gruber, A.; Heijde, M.; Katinka, M.; Mock, T.; Valentin, K.; Verret, F.; Berges, J. A.; Brownlee, C.; Cadoret, J. P.; Chiovitti, A.; Choi, C. J.; Coesel, S.; De Martino, A.; Detter, J. C.; Durkin, C.; Falciatore, A.; Fournet, J.; Haruta, M.; Huysman, M. J.; Jenkins, B. D.; Jiroutova, K.; Jorgensen, R. E.; Joubert, Y.; Kaplan, A.; Kroger, N.; Kroth, P. G.; La Roche, J.; Lindquist, E.; Lommer, M.; Martin-Jezequel, V.; Lopez, P. J.; Lucas, S.; Mangogna, M.; McGinnis, K.; Medlin, L. K.; Montsant, A.; Oudot-Le Secq, M. P.; Napoli, C.; Obornik, M.; Parker, M. S.; Petit, J. L.; Porcel, B. M.; Poulsen, N.; Robison, M.; Rychlewski, L.; Rynearson, T. A.; Schmutz, J.; Shapiro, H.; Siaut, M.; Stanley, M.; Sussman, M. R.; Taylor, A. R.; Vardi, A.; von Dassow, P.; Vyverman, W.; Willis, A.; Wyrwicz, L. S.; Rokhsar, D. S.; Weissenbach, J.; Armbrust, E. V.; Green, B. R.; Van de Peer, Y. y Grigoriev, I. V. (2008) *The*

- Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. Nature. 456: 239-244.
- Box, G. E.; Hunter, W. G. y Hunter, J. S. (1978) *Statistics for experiments*. N. Y., New York.
- Bradbury, J. (2004) *Nature's nanotechnologists: unveiling the secrets of diatoms*. PLoS Biol. 2: e306.
- Bradford, M. M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 72: 248-254.
- Brett, C. T. (2000) *Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall*. Int Rev Cytol. 199: 161-199.
- Bücher, T. (1955) *Phosphoglycerate kinase from Brewer's yeast*. Methods Enzymol. 1: 415-422.
- Cavalier-Smith, T. (1981) *Eukaryote kingdoms: seven or nine?* Biosystems. 14: 461-481.
- Cavalier-Smith, T. (2004) *Only six kingdoms of life*. Proc Biol Sci. 271: 1251-1262.
- Cerón García, M. C.; Fernández Sevilla, J. M.; Acien Fernández, F. G.; Molina Grima, E. y García Camacho, F. (2000) *Mixotrophic growth of Phaeodactylum tricorutum on glycerol: growth rate and fatty acid profile*. Journal of Applied Phycology. 12: 239-248.
- Cerón García, M. C.; García Camacho, F.; Sánchez Mirón, A.; Fernández Sevilla, J. M.; Chisti, Y. y Molina Grima, E. (2006) *Mixotrophic Production of Marine Microalga Phaeodactylum tricorutum on Various Carbon Sources*. J Microbiol Biotechnol. 16: 689-694.
- Cerón García, M. C.; Sánchez Mirón, A.; Fernández Sevilla, J. M.; Molina Grima, E. y García Camacho, F. (2005) *Mixotrophic growth of the microalga Phaeodactylum tricorutum Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition*. Process Biochemistry. 40: 297-305.
- Cleland, W. W. (1963) *The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations*. Biochim Biophys Acta. 67: 104-137.

- Cooksey, K. E. (1974) *Acetate metabolism by whole cells of Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. J Phycol. 10: 253-257.
- Copeland, R. A. (2005) *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists*. Methods of biochemical analysis. 46: 1-265.
- Crippen, R. W. y Perrier, J. L. (1974) *The use of neutral red and Evans blue for live-dead determinations of marine plankton (with comments on the use of rotenone for inhibition of grazing)*. Stain technology. 49: 97-104.
- Cserpan, I. y Vas, M. (1983) *Effects of substrates on the heat stability and on the reactivities of thiol groups of 3-phosphoglycerate kinase*. European journal of biochemistry / FEBS. 131: 157-162.
- Curtis, H. y Barnes, S. (2004) *Biología*, 6ta edn. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Chepurnov, V. A.; Mann, D. G.; Sabbe, K. y Vyverman, W. (2004) *Experimental studies on sexual reproduction in diatoms*. Int Rev Cytol. 237: 91-154.
- Chiovitti, A.; Molino, P.; Crawford, S. A.; Teng, R.; Spurck, T. y Wetherbee, R. (2004) *The glucans extracted with warm water from diatoms are mainly derived from intracellular chrysolaminaran and not extracellular polysaccharides*. Eur J Phycol. 39: 117-128.
- Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Colombo, R. y Milzani, A. (2007) *S-glutathionylation in protein redox regulation*. Free radical biology & medicine. 43: 883-898.
- De Riso, V.; Raniello, R.; Maumus, F.; Rogato, A.; Bowler, C. y Falciatore, A. (2009) *Gene silencing in the marine diatom Phaeodactylum tricornutum*. Nucleic Acids Res. 37: e96.
- Decho, A. W. (1990) *Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes*. Oceanogr Mar Biol Annu Rev. 28: 73-153.
- Desbois, A. P.; Mearns-Spragg, A. y Smith, V. J. (2009) *A fatty acid from the diatom Phaeodactylum tricornutum is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Mar Biotechnol (NY). 11: 45-52.

- Domergue, F.; Lerchl, J.; Zahringer, U. y Heinz, E. (2002) *Cloning and functional characterization of Phaeodactylum tricornutum front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis*. European journal of biochemistry / FEBS. 269: 4105-4113.
- Domergue, F.; Spiekermann, P.; Lerchl, J.; Beckmann, C.; Kilian, O.; Kroth, P. G.; Boland, W.; Zahringer, U. y Heinz, E. (2003) *New insight into Phaeodactylum tricornutum fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal delta12-fatty acid desaturases*. Plant physiology. 131: 1648-1660.
- Dortch, Q.; Roberts, T. L.; Clayton, J. R. y Ashmed, S. I. (1983) *RNA/DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth rate and biomass in planktonic marine organisms*. Mar Ecol Prog Ser. 13: 61-71.
- Droop, M. R. (1974) *Algal Physiology and Biochemistry*. University of California Press, Berkeley.
- Dryden, D. T.; Varley, P. G. y Pain, R. H. (1992) *A study of the hinge-bending mechanism of yeast 3-phosphoglycerate kinase*. European journal of biochemistry / FEBS. 208: 115-123.
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A. y Smith, F. (1956) *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. 28: 350-356.
- Elgán, T. H. (2009) *Structure-function studies of glutaredoxins and related oxidoreductases*. Department of Biosciences and Nutrition. Karolinska Institutet, Stockholm
- Ellis, H. R. y Poole, L. B. (1997) *Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase*. Biochemistry. 36: 15013-15018.
- Ellman, G. L. (1959) *Tissue sulfhydryl groups*. Arch Biochem Biophys. 82: 70-77.
- Erales, J.; Lignon, S. y Gontero, B. (2009) *CP12 from Chlamydomonas reinhardtii, a permanent specific "chaperone-like" protein of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. The Journal of biological chemistry. 284: 12735-12744.
- Falciatore, A. y Bowler, C. (2002) *Revealing the molecular secrets of marine diatoms*. Annu Rev Plant Biol. 53: 109-130.

- Falciatore, A.; Casotti, R.; Leblanc, C.; Abrescia, C. y Bowler, C. (1999) *Transformation of Nonselectable Reporter Genes in Marine Diatoms*. Mar Biotechnol (NY). 1: 239-251.
- Falkowski, P. G. (1994) *The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles*. Photosynth Res. 39: 235-258.
- Falkowski, P. G.; Barber, R. T. y Smetacek, V. V. (1998) *Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production*. Science (New York, N.Y. 281: 200-207.
- Falkowski, P. G. y La Roche, J. (1991) *Acclimation to spectral irradiance in algae*. J Phycol. 27: 8-14.
- Fenton, H. J. H. (1894) *Oxidation of tartaric acid in the presence of iron*. J Chem Soc. 65: 899-910.
- Ferguson, K. A. (1964) *Starch-Gel Electrophoresis--Application to the Classification of Pituitary Proteins and Polypeptides*. Metabolism. 13: SUPPL:985-1002.
- Fernando, M. R.; Nanri, H.; Yoshitake, S.; Nagata-Kuno, K. y Minakami, S. (1992) *Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells*. European journal of biochemistry / FEBS. 209: 917-922.
- Fey, V.; Wagner, R.; Brautigam, K. y Pfannschmidt, T. (2005) *Photosynthetic redox control of nuclear gene expression*. J Exp Bot. 56: 1491-1498.
- Fifis, T. y Scopes, R. K. (1978) *Purification of 3-phosphoglycerate kinase from diverse sources by affinity elution chromatography*. The Biochemical journal. 175: 311-319.
- Flynn, K. J. y Syrett, P. J. (1986) *Utilization of L-lysine and L-arginine by the diatom Phaeodactylum tricornutum*. Mar Biol. 90: 159-163.
- Ford, C. W. y Percival, E. (1965a) *The carbohydrates of Phaeodactylum tricornutum. Part I. Preliminary examination of the organism, and characterisation of low molecular weight material and of a glucan*. J Chem Soc. 1298: 7035-7041.
- Ford, C. W. y Percival, E. (1965b) *The carbohydrates of Phaeodactylum tricornutum. Part II. A sulphated glucuronomannan*. J Chem Soc. 1299: 7042-7046.
- Forman, H.; Fukuto, J. y Torres, M. (2004) *Signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species: Pathways and chemical principles*. Kluwer Academic Publisher

- Fratelli, M.; Demol, H.; Puype, M.; Casagrande, S.; Eberini, I.; Salmona, M.; Bonetto, V.; Mengozzi, M.; Duffieux, F.; Miclet, E.; Bachi, A.; Vandekerckhove, J.; Gianazza, E. y Ghezzi, P. (2002) *Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A. 99: 3505-3510.
- Fritz, P. J. y White, E. L. (1974) *3-Phosphoglycerate kinase from rat tissues. Further characterization and developmental studies*. Biochemistry. 13: 444-449.
- Fusari, C.; Demonte, A. M.; Figueroa, C. M.; Aleanzi, M. y Iglesias, A. A. (2006) *A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase*. Anal Biochem. 352: 145-147.
- Geck, M. K. y Hartman, F. C. (2000) *Kinetic and mutational analyses of the regulation of phosphoribulokinase by thioredoxins*. The Journal of biological chemistry. 275: 18034-18039.
- Ghosh, H. P. y Preiss, J. (1966) *Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase. A regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts*. The Journal of biological chemistry. 241: 4491-4504.
- Gibbs, S. P. (1978) *The chloroplasts of Euglena may have evolved from symbiotic green alga*. Can J Bot. 56: 2883-2889.
- Ginger, M. L.; McFadden, G. I. y Michels, P. A. (2010) *Rewiring and regulation of cross-compartmentalized metabolism in protists*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 365: 831-845.
- Gomez Casati, D. F.; Sesma, J. I. y Iglesias, A. A. (2000) *Structural and kinetic characterization of NADP-dependent, non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from celery leaves*. Plant Sci. 154: 107-115.
- Grachev, M. A.; Annenkov, V. V. y Likhoshway, Y. V. (2008) *Silicon nanotechnologies of pigmented heterokonts*. Bioessays. 30: 328-337.
- Graham, H. C. y Williams, R. J. (1991) *The roles of ADP2- and Mg2+ in control steps of phosphoglycerate kinase*. European journal of biochemistry / FEBS. 197: 81-91.
- Granum, E. (2002) *Metabolism and function of  $\beta$ -1,3-glucan in marine diatoms*. Department of Biotechnology, Faculty of Natural Sciences and Technology, Doktor ingenior. Norwegian University of Science and Technology (NTNU), Trondheim, Norway, pp 48.

- Granum, E. y Myklestad, S. (2002) *A simple combined method for determination of  $\beta$ -1,3-glucan and cell wall polysaccharides in diatoms*. *Hydrobiologia*. 477: 155-161.
- Gruber, A. (2008) *Molecular Characterisation of Diatom Plastids*. Konstanzer Online-Publikations-System, Konstanz
- Gruber, A.; Vugrinec, S.; Hempel, F.; Gould, S. B.; Maier, U. G. y Kroth, P. G. (2007) *Protein targeting into complex diatom plastids: functional characterisation of a specific targeting motif*. *Plant Mol Biol*. 64: 519-530.
- Gruber, A.; Weber, T.; Bartulos, C. R.; Vugrinec, S. y Kroth, P. G. (2009) *Intracellular distribution of the reductive and oxidative pentose phosphate pathways in two diatoms*. *J Basic Microbiol*. 49: 58-72.
- Handa, N. (1969) *Carbohydrate metabolism in the marine diatom Skeletonema costatum*. *Mar Biol*. 4: 208-214.
- Haug, A. y Myklestad, S. (1976) *Polysaccharides of marine diatoms with special reference to Chaetoceros species*. *Mar Biol*. 34: 217-222.
- Hayashi, T.; Suitani, Y.; Murakami, M.; Yamaguchi, K.; Konosu, S. y Noda, H. (1986) *Protein and amino acid compositions of five species of marine phytoplankton*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 52: 337-343.
- Hayward, S. y Berendsen, H. J. (1998) *Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change: new results on citrate synthase and T4 lysozyme*. *Proteins*. 30: 144-154.
- Hayward, S.; Kitao, A. y Berendsen, H. J. (1997) *Model-free methods of analyzing domain motions in proteins from simulation: a comparison of normal mode analysis and molecular dynamics simulation of lysozyme*. *Proteins*. 27: 425-437.
- Hecky, R. E.; Mopper, K.; Kilham, P. y Degens, E. T. (1973) *The amino acid and sugar composition of diatom cell-walls*. *Mar Biol*. 19: 323-331.
- Hicks, L. M.; Cahoon, R. E.; Bonner, E. R.; Rivard, R. S.; Sheffield, J. y Jez, J. M. (2007) *Thiol-based regulation of redox-active glutamate-cysteine ligase from Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*. 19: 2653-2661.
- Hirasawa, M.; Schurmann, P.; Jacquot, J. P.; Manieri, W.; Jacquot, P.; Keryer, E.; Hartman, F. C. y Knaff, D. B. (1999) *Oxidation-reduction properties of chloroplast thioredoxins, ferredoxin:thioredoxin reductase, and thioredoxin f-regulated enzymes*. *Biochemistry*. 38: 5200-5205.



- Hoagland, K. D.; Rosowski, J. R.; Gretz, M. R. y Roemer, S. C. (1993) *Diatom extracellular polymeric substances-function, fine-structure, chemistry, and physiology*. J Phycol. 29: 537-566.
- Holmgren, A. (1979) *Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide*. The Journal of biological chemistry. 254: 9627-9632.
- Hurth, C.; Tassius, C.; Talbot, J. C.; Maali, A.; Moskalenko, C.; Minard, P.; Aime, J. P. y Argoul, F. (2007) *Enzymatic activity of immobilized yeast phosphoglycerate kinase*. Biosens Bioelectron. 22: 2449-2455.
- Huskins, K. R.; Bernhard, S. A. y Dahlquist, F. W. (1982) *Halibut muscle 3-phosphoglycerate kinase. Chemical and physical properties of the enzyme and its substrate complexes*. Biochemistry. 21: 4180-4188.
- Hutchison, R. S.; Groom, Q. y Ort, D. R. (2000) *Differential effects of chilling-induced photooxidation on the redox regulation of photosynthetic enzymes*. Biochemistry. 39: 6679-6688.
- Hutchison, R. S. y Ort, D. R. (1995) *Measurement of equilibrium midpoint potentials of thiol/disulfide regulatory groups on thioredoxin-activated chloroplast enzymes*. Methods Enzymol. 252: 220-228.
- Iglesias, A. A. y Podestá, F. E. (2005) *Photosynthate Formation and Partitioning in Crop Plants*. In: Pessaraki, M. (ed) Handbook of Photosynthesis, Second edn. Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp 525-545.
- Iglesias, A. A.; Serrano, A.; Guerrero, M. G. y Losada, M. (1987) *Purification and properties of NADP-dependent non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Biochim Biophys Acta. 925: 1-10.
- Ishii, A.; Komiya, K. y Nakayama, J. (1996) *Synthesis of a stable sulfenic acid by oxidation of a sterically hindered thiol (Thiophenetriptycene-8-thiol) and Its characterization*. J. Am. Chem. Soc. 118: 12836-12837.
- Jeffrey, S. W. y Haxo, F. T. (1968) *Photosynthetic pigments of dinoflagellates (Zooxanthellae) from corals and clams*. Biol Bull. 135: 149-165.
- Joao, H. C. y Williams, R. J. (1993) *The anatomy of a kinase and the control of phosphate transfer*. European journal of biochemistry / FEBS. 216: 1-18.

- Kang, J. G.; Paget, M. S.; Seok, Y. J.; Hahn, M. Y.; Bae, J. B.; Hahn, J. S.; Kleanthous, C.; Buttner, M. J. y Roe, J. H. (1999) *RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change*. *Embo J.* 18: 4292-4298.
- Kiene, R. P. (2008) *Marine biology: Genes in the glass house*. *Nature.* 456: 179-181.
- Kilian, O. (2004) *Investigations on functional aspects of secondary endocytobiosis using the diatom Phaeodactylum tricorutum as a model organism*. Konstanz, F. B. d. U. (ed), Konstanz
- Krause, G.; Lundstrom, J.; Barea, J. L.; Pueyo de la Cuesta, C. y Holmgren, A. (1991) *Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in Escherichia coli thioredoxin*. *The Journal of biological chemistry.* 266: 9494-9500.
- Krietsch, W. K. y Bucher, T. (1970) *3-phosphoglycerate kinase from rabbit skeletal muscle and yeast*. *European journal of biochemistry / FEBS.* 17: 568-580.
- Krietsch, W. K.; Eber, S. W.; Haas, B.; Ruppelt, W. y Kuntz, G. W. (1980) *Characterization of a phosphoglycerate kinase deficiency variants not associated with hemolytic anemia*. *American journal of human genetics.* 32: 364-373.
- Krimm, I.; Lemaire, S.; Ruelland, E.; Miginiac-Maslow, M.; Jaquot, J. P.; Hirasawa, M.; Knaff, D. B. y Lancelin, J. M. (1998) *The single mutation Trp35-->Ala in the 35-40 redox site of Chlamydomonas reinhardtii thioredoxin h affects its biochemical activity and the pH dependence of C36-C39 1H-13C NMR*. *European journal of biochemistry / FEBS.* 255: 185-195.
- Kroth, P. (2007) *Molecular biology and the biotechnological potential of diatoms*. *Advances in experimental medicine and biology.* 616: 23-33.
- Kroth, P. G.; Chiovitti, A.; Gruber, A.; Martin-Jezequel, V.; Mock, T.; Parker, M. S.; Stanley, M. S.; Kaplan, A.; Caron, L.; Weber, T.; Maheswari, U.; Armbrust, E. V. y Bowler, C. (2008) *A model for carbohydrate metabolism in the diatom Phaeodactylum tricorutum deduced from comparative whole genome analysis*. *PLoS ONE.* 3: e1426.
- Kroth, P. G.; Schroers, Y. y Kilian, O. (2005) *The peculiar distribution of class I and class II aldolases in diatoms and in red algae*. *Curr Genet.* 48: 389-400.
- Kuntz, G. W. y Krietsch, W. K. (1982) *Phosphoglycerate kinase from spinach, blue-green algae, and yeast*. *Methods Enzymol.* 90 Pt E: 110-114.

- Laemmli, U. K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. 227: 680-685.
- Lang, M.; Apt, K. E. y Kroth, P. G. (1998) *Protein transport into "complex" diatom plastids utilizes two different targeting signals*. The Journal of biological chemistry. 273: 30973-30978.
- Larsson-Raznikiewicz, M. y Arvidsson, L. (1971) *Inhibition of phosphoglycerate kinase by products and product homologues*. European journal of biochemistry / FEBS. 22: 506-512.
- Lavaud, J.; Rousseau, B. y Etienne, A. L. (2003) *Enrichment of the light-harvesting complex in diadinoxanthin and implications for the nonphotochemical fluorescence quenching in diatoms*. Biochemistry. 42: 5802-5808.
- Lechl, J.; Heinz, E. y Zank, T. (2007) *Elongase gene and method for producing polyunsaturated fatty acids*. BASF Plant Science GmbH (DE), United States
- Lee, G. J.; Pokala, N. y Vierling, E. (1995) *Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea*. The Journal of biological chemistry. 270: 10432-10438.
- Lee, J. H.; Im, Y. J.; Bae, J.; Kim, D.; Kim, M. K.; Kang, G. B.; Lee, D. S. y Eom, S. H. (2006) *Crystal structure of Thermus caldophilus phosphoglycerate kinase in the open conformation*. Biochem Biophys Res Commun. 350: 1044-1049.
- Lees, W. J. y Whitesides, G. M. (1993) *Equilibrium Constants for Thiol-Disulfide Interchange Reactions: A Coherent, Corrected Set*. J Org Chem. 58: 642-647.
- Liaud, M. F.; Brandt, U.; Scherzinger, M. y Cerff, R. (1997) *Evolutionary origin of cryptomonad microalgae: two novel chloroplast/cytosol-specific GAPDH genes as potential markers of ancestral endosymbiont and host cell components*. J Mol Evol. 44 Suppl 1: S28-37.
- Liaud, M. F.; Lichtle, C.; Apt, K.; Martin, W. y Cerff, R. (2000) *Compartment-specific isoforms of TPI and GAPDH are imported into diatom mitochondria as a fusion protein: evidence in favor of a mitochondrial origin of the eukaryotic glycolytic pathway*. Mol Biol Evol. 17: 213-223.
- Liu, T. (1977) In: Neurath, H. y Hill, R. L. (eds) The Proteins, vol 3, 3rd edn. Academic Press, New York, pp 239-402.

- Liu, X. J.; Duan, S. S.; Li, A. F. y Sun, K. F. (2009a) *Effects of glycerol on the fluorescence spectra and chloroplast ultrastructure of Phaeodactylum tricorutum (Bacillariophyta)*. J Integr Plant Biol. 51: 272-278.
- Liu, X. J.; Duan, S. S.; Li, A. F.; Xu, N.; Cai, Z. y Hu, Z. (2009b) *Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of Phaeodactylum tricorutum*. J Appl Phycol. 21: 239-246.
- Lodi, A.; Binaghi, L.; Solisio, C.; Converti, A. y Del Borghi, M. (2003) *Nitrate and phosphate removal by Spirulina platensis*. J Ind Microbiol Biotechnol. 30: 656-660.
- Loferer, H.; Wunderlich, M.; Hennecke, H. y Glockshuber, R. (1995) *A bacterial thioredoxin-like protein that is exposed to the periplasm has redox properties comparable with those of cytoplasmic thioredoxins*. The Journal of biological chemistry. 270: 26178-26183.
- Losic, D.; Rosengarten, G.; Mitchell, J. G. y Voelcker, N. H. (2006) *Pore architecture of diatom frustules: potential nanostructured membranes for molecular and particle separations*. J Nanosci Nanotechnol. 6: 982-989.
- Lou, J.; Dawson, K. A. y Strobel, H. J. (1997) *Glycogen biosynthesis via UDP-glucose in the ruminal bacterium Prevotella bryantii B1(4)*. Applied and environmental microbiology. 63: 4355-4359.
- Luthy, R.; Bowie, J. U. y Eisenberg, D. (1992) *Assessment of protein models with three-dimensional profiles*. Nature. 356: 83-85.
- Maheswari, U.; Jabbari, K.; Petit, J. L.; Porcel, B. M.; Allen, A. E.; Cadoret, J. P.; De Martino, A.; Heijde, M.; Kaas, R.; La Roche, J.; Lopez, P. J.; Martin-Jezequel, V.; Meichenin, A.; Mock, T.; Schnitzler Parker, M.; Vardi, A.; Armbrust, E. V.; Weissenbach, J.; Katinka, M. y Bowler, C. (2010) *Digital expression profiling of novel diatom transcripts provides insight into their biological functions*. Genome Biol. 11: R85.
- Maheswari, U.; Mock, T.; Armbrust, E. V. y Bowler, C. (2009) *Update of the Diatom EST Database: a new tool for digital transcriptomics*. Nucleic Acids Res. 37: D1001-1005.
- Maheswari, U.; Montsant, A.; Goll, J.; Krishnasamy, S.; Rajyashri, K. R.; Patell, V. M. y Bowler, C. (2005) *The Diatom EST Database*. Nucleic Acids Res. 33: D344-347.

- Malhotra, O. P.; Prabhakar, P.; Sen Gupta, T. y Kayastha, A. M. (1995) *Phosphoglycerate-kinase-glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase interaction. Molecular mass studies. European journal of biochemistry / FEBS.* 227: 556-562.
- Markland, F. S.; Bacharach, A. D.; Weber, B. H.; O'Grady, T. C.; Saunders, G. C. y Umemura, N. (1975) *Chemical modification of yeast 3-phosphoglycerate kinase. The Journal of biological chemistry.* 250: 1301-1310.
- Martin, W.; Scheibe, R. y Schnarrenberger, C. (2004) *The Calvin cycle and its regulation.* In: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism.* Kluwer Academic Publishers, New York, pp 9-51.
- McConville, M. J.; Bacic, A. E. y Clarke, A. E. (1986) *Structural studies of chrysolaminaran from the ice diatom Stauroneis amphioxys (Gregory).* Carbohydr Res. 153:
- McGinnis, K.; Dempster, T. A. y Sommerfeld, M. R. (1997) *Characterization of the growth and lipid content of the diatom Chaetoceros muelleri.* J Appl Phycol. 9: 19-24.
- Michelet, L.; Zaffagnini, M.; Vanacker, H.; Le Marechal, P.; Marchand, C.; Schroda, M.; Lemaire, S. D. y Decottignies, P. (2008) *In vivo targets of S-thiolation in Chlamydomonas reinhardtii.* The Journal of biological chemistry. 283: 21571-21578.
- Michels, A. K.; Wedel, N. y Kroth, P. G. (2005) *Diatom plastids possess a phosphoribulokinase with an altered regulation and no oxidative pentose phosphate pathway.* Plant physiology. 137: 911-920.
- Mildvan, A. S. y Leigh, R. A. (1964) *Determination of Co-Factor Dissociation Constants from the Kinetics of Inhibition of Enzymes.* Biochim Biophys Acta. 89: 393-397.
- Minard, P.; Desmadril, M.; Ballery, N.; Perahia, D.; Mouawad, L.; Hall, L. y Yon, J. M. (1989) *Study of the fast-reacting cysteines in phosphoglycerate kinase using chemical modification and site-directed mutagenesis.* European journal of biochemistry / FEBS. 185: 419-423.
- Montero, O.; Sobrino, C.; Parés, G. y Lubián, L. M. (2002) *Photoinhibition and recovery after selective short-term exposure to solar radiation of five chlorophyll c-containing marine microalgae.* Ciencias Marinas 28: 223-236.

- Morrison, J. F.; O'Sullivan, W. J. y Ogston, A. G. (1961) *Kinetic studies of the activation of creatine-phosphoryltransferase by magnesium*. Biochim Biophys Acta. 52: 82-96.
- Myklestad, S. (1974) *Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture*. J Exp Mar Biol Ecol. 15: 261-274.
- Napier, J.; Lazarus, C.; Qi, B. y Lerchl, J. (2009) *Elongase gene and production of  $\Delta^9$ -polyunsaturated fatty acids*. United States
- Nojima, H.; Oshima, T. y Noda, H. (1979) *Purification and properties of phosphoglycerate kinase from Thermus thermophilus strain HB8*. Journal of biochemistry. 85: 1509-1517.
- Ocheretina, O.; Haferkamp, I.; Tellioglu, H. y Scheibe, R. (2000) *Light-modulated NADP-malate dehydrogenases from mosses and green algae: insights into evolution of the enzyme's regulation*. Gene. 258: 147-154.
- Olaizola, M. (2003) *Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace*. Biomol Eng. 20: 459-466.
- Olaizola, M.; La Roche, J.; Kolber, Z. y Falkowski, P. G. (1994) *Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom*. Photosynth Res. 41: 357-370.
- Pan, Y.; Subba Rao, D. V. y Mann, K. H. (1996) *Acclimation to low light intensity in photosynthesis and growth of Pseudo-nitzschia multiseries Hasle, a neurotoxic diatom*. J of Plankton Research. 18: 1427-1438.
- Pancic, P. G. y Strotmann, H. (1993) *Structure of the nuclear encoded gamma subunit of CF0CF1 of the diatom Odontella sinensis including its presequence*. FEBS letters. 320: 61-66.
- Parker, M. S.; Mock, T. y Armbrust, E. V. (2008) *Genomic insights into marine microalgae*. Annu Rev Genet. 42: 619-645.
- Parkinson, J. y Gordon, R. (1999) *Beyond micromachining: the potential of diatoms*. Trends Biotechnol. 17: 190-196.
- Paul, J. S. y Volcani, B. E. (1976) *Photorespiration in diatoms. IV. Two pathways of glycolate metabolism in synchronized cultures of Cyndrotheca fusiformis*. Arch Microbiol. 110: 247-252.

- Paulsen, B. S. y Myklestad, H. (1978) *Structural studies of the reserve glucan produced by the marine diatom Skeletonema costatum (Grev.) Cleve.* Carbohydr Res. 62: 386-388.
- Pawluk, A.; Scopes, R. K. y Griffiths-Smith, K. (1986) *Isolation and properties of the glycolytic enzymes from Zymomonas mobilis. The five enzymes from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase through to pyruvate kinase.* The Biochemical journal. 238: 275-281.
- Pennington, F.; Guillard, R. R. L. y Liaaen-Jensen, S. (1988) *Carotenoid distribution patterns in Bacillariophyceae (diatoms).* Biochem Syst Ecol. 16: 589-592.
- Percival, E.; Rahman, M. A. y Weigel, H. (1980) *Chemistry of the polysaccharides of the diatom Coscinodiscus nobilis.* Phytochemistry. 19: 809-811.
- Pereira, S. L.; Leonard, A. E.; Huang, Y. S.; Chuang, L. T. y Mukerji, P. (2004) *Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid.* The Biochemical journal. 384: 357-366.
- Pinto, E.; Sigaud-Kutner, T.; Leitao, M.; Okamoto, O. y Colepicolo, P. (2003) *Heavy metal-induced oxidative stress in algae.* J Phycol. 39: 1008-1018.
- Plackett, R. L. y Burman, J. P. (1946) *The design of optimum multifactorial experiments.* Biometrika. 33: 305-325.
- Poole, C. P. y Owens, F. J. (2003) *Introduction to Nanotechnology.* Wiley-Interscience, New York.
- Poulsen, N.; Berne, C.; Spain, J. y Kroger, N. (2007) *Silica immobilization of an enzyme through genetic engineering of the diatom Thalassiosira pseudonana.* Angew Chem Int Ed Engl. 46: 1843-1846.
- Preiss, J. (1982) *Regulation of the Biosynthesis and Degradation of Starch.* Ann Rev Plant Physiol. 33: 431-454.
- Qian, N.; Stanley, G. A.; Hahn-Hagerdal, B. y Radstrom, P. (1994) *Purification and characterization of two phosphoglucomutases from Lactococcus lactis subsp. lactis and their regulation in maltose- and glucose-utilizing cells.* Journal of bacteriology. 176: 5304-5311.
- Radakovits, R.; Jinkerson, R. E.; Darzins, A. y Posewitz, M. C. (2010) *Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production.* Eukaryot Cell. 9: 486-501.

- Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M. y Freeman, B. A. (1991) *Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. The Journal of biological chemistry. 266: 4244-4250.
- Raja, R.; Hemaiswarya, S. y Rengasamy, R. (2007) *Exploitation of Dunaliella for beta-carotene production*. Appl Microbiol Biotechnol. 74: 517-523.
- Rees, T.; Larson, T. R.; Heldens, J. y Huning, F. (1995) *In Situ Glutamine Synthetase Activity in a Marine Unicellular Alga (Development of a Sensitive Colorimetric Assay and the Effects of Nitrogen Status on Enzyme Activity)*. Plant physiology. 109: 1405-1410.
- Reinfelder, J. R.; Kraepiel, A. M. y Morel, F. M. (2000) *Unicellular C4 photosynthesis in a marine diatom*. Nature. 407: 996-999.
- Roessler, P. G. (1987) *UDP-Glucose Pyrophosphorylase activity in the diatom Cyclotella cryptica. Pathway of Chrysolaminarin synthesis*. J Phycol. 23: 494-498.
- Rouhier, N.; Gelhaye, E.; Gualberto, J. M.; Jordy, M. N.; De Fay, E.; Hirasawa, M.; Duplessis, S.; Lemaire, S. D.; Frey, P.; Martin, F.; Manieri, W.; Knaff, D. B. y Jacquot, J. P. (2004) *Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense*. Plant physiology. 134: 1027-1038.
- Rouhier, N.; Villarejo, A.; Srivastava, M.; Gelhaye, E.; Keech, O.; Droux, M.; Finkemeier, I.; Samuelsson, G.; Dietz, K. J.; Jacquot, J. P. y Wingsle, G. (2005) *Identification of plant glutaredoxin targets*. Antioxidants & redox signaling. 7: 919-929.
- Round, F. E.; Crawford, R. M. y Mann, D. G. (1990) *The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press, New York.
- Ruban, A.; Lavaud, J.; Rousseau, B.; Guglielmi, G.; Horton, P. y Etienne, A. L. (2004) *The super-excess energy dissipation in diatom algae: comparative analysis with higher plants*. Photosynth Res. 82: 165-175.
- Sali, A. y Blundell, T. L. (1993) *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints*. Journal of molecular biology. 234: 779-815.
- Saurin, A. T.; Neubert, H.; Brennan, J. P. y Eaton, P. (2004) *Widespread sulfenic acid formation in tissues in response to hydrogen peroxide*. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 17982-17987.



- Scala, S.; Carels, N.; Falciatore, A.; Chiusano, M. L. y Bowler, C. (2002) *Genome properties of the diatom Phaeodactylum tricornutum*. Plant physiology. 129: 993-1002.
- Scopes, R. K. (1978a) *Binding of substrates and other anions to yeast phosphoglycerate kinase*. European journal of biochemistry / FEBS. 91: 119-129.
- Scopes, R. K. (1978b) *The steady-state kinetics of yeast phosphoglycerate kinase. Anomalous kinetic plots and the effects of salts on activity*. European journal of biochemistry / FEBS. 85: 503-516.
- Segel, I. H. (1993) *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems* Wiley Interscience, New York.
- Siaut, M.; Heijde, M.; Mangogna, M.; Montsant, A.; Coesel, S.; Allen, A.; Manfredonia, A.; Falciatore, A. y Bowler, C. (2007) *Molecular toolbox for studying diatom biology in Phaeodactylum tricornutum*. Gene. 406: 23-35.
- Sims, P. A.; Mann, D. G. y Medlin, L. K. (2006) *Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data*. Phycologia. 45: 361-402.
- Siron, R.; Giusti, G. y Berland, B. (1989) *Changes in the fatty acid composition of Phaeodactylum tricornutum and Dunaliella tertiolecta during growth and under phosphorus deficiency*. Mar Ecol Prog Ser. 55: 95-100.
- Smestad, B.; Haug, A. y Myklestad, S. (1975) *Structural studies of the extracellular polysaccharide produced by the diatom chaetoceros curvisetus cleve*. Acta Chem Scand B. 29: 337-340.
- Sohn, J. y Rudolph, J. (2003) *Catalytic and chemical competence of regulation of cdc25 phosphatase by oxidation/reduction*. Biochemistry. 42: 10060-10070.
- Srivastava, D. K. y Bernhard, S. A. (1986a) *Enzyme-enzyme interactions and the regulation of metabolic reaction pathways*. Current topics in cellular regulation. 28: 1-68.
- Srivastava, D. K. y Bernhard, S. A. (1986b) *Metabolite transfer via enzyme-enzyme complexes*. Science (New York, N.Y. 234: 1081-1086.
- Staros, J. V. (1982) *N-hydroxysulfosuccinimide active esters: bis(N-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers*. Biochemistry. 21: 3950-3955.
- Stauber, J. L. y Jeffrey, S. W. (1988) *Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms*. J Phycol. 24: 158-172.

- Stewart, A. A. y Scopes, R. K. (1978) *Phosphoglycerate kinase B from ram testis. Purification, characterisation and comparison with the muscle isoenzyme.* European journal of biochemistry / FEBS. 85: 89-95.
- Sugiyama, J.; Boisset, C.; Hashimoto, M. y Watanabe, T. (1999) *Molecular directionality of beta-chitin biosynthesis.* Journal of molecular biology. 286: 247-255.
- Sukhodolets, M. V.; Muronetz, V. I. y Nagradova, N. K. (1989) *Interaction between D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase labeled by fluorescein-5'-isothiocyanate: evidence that the dye participates in the interaction.* Biochem Biophys Res Commun. 161: 187-196.
- Sun, N.; Ma, L.; Pan, D.; Zhao, H. y Deng, X. W. (2003) *Evaluation of light regulatory potential of Calvin cycle steps based on large-scale gene expression profiling data.* Plant Mol Biol. 53: 467-478.
- Tomokuni, Y.; Goryo, K.; Katsura, A.; Torii, S.; Yasumoto, K.; Kemnitz, K.; Takada, M.; Fukumura, H. y Sogawa, K. (2010) *Loose interaction between glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphoglycerate kinase revealed by fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells.* The FEBS journal. 277: 1310-1318.
- Treguer, P.; Nelson, D. M.; Van Bennekom, A. J.; Demaster, D. J.; Leynaert, A. y Queguiner, B. (1995) *The silica balance in the world ocean: a reestimate.* Science (New York, N.Y. 268: 375-379.
- Tripolt, R.; Belaj, F. y Nachbaur, E. (1993) *Eine unerwartet stabile Sulfensäure: 4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-sulfensäure; Synthese, Eigenschaften, Molekül- und Kristallstruktur.* Z. Naturforsch. 48b: 1212-1222.
- Tsekos, I. (1999) *The sites of cellulose synthesis in algae: diversity and evolution of cellulose-synthesizing enzyme complexes.* J Phycol. 35: 635-655.
- Ukeles, R. y Rose, W. E. (1976) *Observations on organic carbon utilisation by photosynthetic marine microalgae.* Mar Biol. 37: 11-28.
- Van Den Hoek, C.; Mann, D. G. y Jahns, H. M. (1995) *Algae: an Introduction to Phycology.* Cambridge University Press, New York.
- Vargas-Suarez, M.; Ayala-Ochoa, A.; Lozano-Franco, J.; Garcia-Torres, I.; Diaz-Quinonez, A.; Ortiz-Navarrete, V. F. y Sanchez-de-Jimenez, E. (2004) *Rubisco*

- activase chaperone activity is regulated by a post-translational mechanism in maize leaves*. J Exp Bot. 55: 2533-2539.
- Vrieling, E. G.; Sun, Q.; Beelen, T. P.; Hazelaar, S.; Gieskes, W. W.; van Santen, R. A. y Sommerdijk, N. A. (2005) *Controlled silica synthesis inspired by diatom silicon biomineralization*. J Nanosci Nanotechnol. 5: 68-78.
- Waller, R. F.; Keeling, P. J.; Donald, R. G.; Striepen, B.; Handman, E.; Lang-Unnasch, N.; Cowman, A. F.; Besra, G. S.; Roos, D. S. y McFadden, G. I. (1998) *Nuclear-encoded proteins target to the plastid in Toxoplasma gondii and Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A. 95: 12352-12357.
- Wang, W. y Malcolm, B. A. (1999) *Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis*. Biotechniques. 26: 680-682.
- Waterkeyn, L. y Bienfait, A. (1987) *Localisation et role des b-1,3-glucanes (callose et chrysolaminarine) dans le genre Pinnularia (Diatomées)*. La Cellule. 74: 198-226.
- Watson, H. C.; Walker, N. P.; Shaw, P. J.; Bryant, T. N.; Wendell, P. L.; Fothergill, L. A.; Perkins, R. E.; Conroy, S. C.; Dobson, M. J.; Tuite, M. F. y et al. (1982) *Sequence and structure of yeast phosphoglycerate kinase*. Embo J. 1: 1635-1640.
- Weber, J. P. y Bernhard, S. A. (1982) *Transfer of 1,3-diphosphoglycerate between glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase via an enzyme-substrate-enzyme complex*. Biochemistry. 21: 4189-4194.
- Weber, T.; Gruber, A. y Kroth, P. G. (2009) *The presence and localization of thioredoxins in diatoms, unicellular algae of secondary endosymbiotic origin*. Molecular plant. 2: 468-477.
- Wiese, A.; Groner, F.; Sonnwald, U.; Deppner, H.; Lerchl, J.; Hebbeker, U.; Flugge, U. y Weber, A. (1999) *Spinach hexokinase I is located in the outer envelope membrane of plastids*. FEBS letters. 461: 13-18.
- Wilhelm, C.; Buchel, C.; Fisahn, J.; Goss, R.; Jakob, T.; Laroche, J.; Lavaud, J.; Lohr, M.; Riebesell, U.; Stehfest, K.; Valentin, K. y Kroth, P. G. (2006) *The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae*. Protist. 157: 91-124.

- Wood, Z. A.; Schroder, E.; Robin Harris, J. y Poole, L. B. (2003) *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. Trends in biochemical sciences. 28: 32-40.
- Yang, C.; Hua, Q. y Shimizu, K. (2000) *Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions*. Biochem Eng J. 6: 87-102.
- Yeh, J. I.; Claiborne, A. y Hol, W. G. (1996) *Structure of the native cysteine-sulfenic acid redox center of enterococcal NADH peroxidase refined at 2.8 Å resolution*. Biochemistry. 35: 9951-9957.
- Yep, A.; Bejar, C. M.; Ballicora, M. A.; Dubay, J. R.; Iglesias, A. A. y Preiss, J. (2004) *An assay for adenosine 5'-diphosphate (ADP)-glucose pyrophosphorylase that measures the synthesis of radioactive ADP-glucose with glycogen synthase*. Anal Biochem. 324: 52-59.
- Yongmanitchai, W. y Ward, O. P. (1991) *Growth of and omega-3 fatty acid production by Phaeodactylum tricornutum under different culture conditions*. Applied and environmental microbiology. 57: 419-425.
- Zander, T.; Phadke, N. D. y Bardwell, J. C. (1998) *Disulfide bond catalysts in Escherichia coli*. Methods Enzymol. 290: 59-74.
- Zaslavskaja, L. A.; Lippmeier, J. C.; Kroth, P. G.; Grossman, A. G. y Apt, K. E. (2000) *Transformation of the diatom Phaeodactylum tricornutum (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes*. J Phycol. 36: 379-386.
- Zaslavskaja, L. A.; Lippmeier, J. C.; Shih, C.; Ehrhardt, D.; Grossman, A. R. y Apt, K. E. (2001) *Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering*. Science (New York, N.Y. 292: 2073-2075.
- Zhang, X. (2010) *Regulation of protein function by residue oxidation*. Prot Insights. 3: 17-24.
- Zomer, A. W.; Allert, S.; Chevalier, N.; Callens, M.; Opperdoes, F. R. y Michels, P. A. (1998) *Purification and characterisation of the phosphoglycerate kinase isoenzymes of Trypanosoma brucei expressed in Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta. 1386: 179-188.
- Zrenner, R.; Stitt, M.; Sonnewald, U. y Boldt, R. (2006) *Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants*. Annu Rev Plant Biol. 57: 805-836.