

Tesis de Posgrado

Adenilato ciclasa en plantas superiores : caracterización y purificación de ésta enzima en rhizobium meliloti, nódulos radiculares y medicago sativa

Carricarte, Valentina

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Carricarte, Valentina. (1988). Adenilato ciclasa en plantas superiores : caracterización y purificación de ésta enzima en rhizobium meliloti, nódulos radiculares y medicago sativa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2150_Carricarte.pdf

Cita tipo Chicago:

Carricarte, Valentina. "Adenilato ciclasa en plantas superiores : caracterización y purificación de ésta enzima en rhizobium meliloti, nódulos radiculares y medicago sativa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2150_Carricarte.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ADENILATO CICLASA EN PLANTAS SUPERIORES
CARACTERIZACION Y PURIFICACION DE ESTA ENZIMA EN
Rhizobium meliloti, NODULOS RADICULARES Y Medicago sativa

Valentina Carricarte

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas

Director: Dra. Mirtha María Flawiá

1988

2 150
E.J. 2.

Instituto de Investigaciones en
Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)
CONICET

A mis padres
a Hebe, a Omi
y a Gustavo

Si, el hombre conseguirá someter al
aire mismo, aprenderá a volar como
los pájaros, y, emancipado de las le-
yes de la gravedad, volará como ellos
y como las estrellas hacia un fin que
ni el pensamiento humano puede aún
conjeturar ni suponer. Ah! Qué bello
es vivir! Qué infinita grandeza la de
la vida humana!

Pär Lagerkvist

Premio Nobel de Literatura, 1951

Agradecimientos

Mi agradecimiento a todas aquellas personas que contribuyeron al logro de esta tesis.

A la Dra. Mirtha M. Flawiá, por el gran apoyo que me brindó desde el primer día, por su permanente estímulo, sus enseñanzas, por inculcarme su espíritu crítico y por contagiarme su inagotable entusiasmo por el próximo experimento.

Al Dr. Héctor N. Torres por haberme permitido hacer mi trabajo de tesis en el INGEBI, por sus enseñanzas y por haber guiado mis primeros pasos en el campo de la purificación de proteínas.

Al Dr. Esteban Montuori por su estímulo y comprensión, por convertirse en un ejemplo para mí y por haberme dado la oportunidad de encontrar mi camino.

Al Dr. Jorge Balla y los Laboratorios Dr. Gador por el apoyo y la confianza depositados en mí.

A la Dra. Carmen Sánchez de Rivas por sus enseñanzas y guía en el campo de la microbiología, por sus oportunos y cálidos consejos y por su amistad.

A la Dra. María Teresa Téllez-Iñon por su generosa transmisión de conocimientos y su constante interés.

A mis compañeros Graciela Bianchini y Jorge Muschietti por su permanente apoyo y ayuda, que permitieron el éxito de muchos de los experimentos aquí presentados. Por el trabajo cotidiano, los buenos y malos momentos compartidos y por haberme soportado todos estos años.

A mis amigas Clarita Rubinstein, Alejandra Mandel y Rita Ulloa de la Serna por encontrar en ellas siempre una palabra de aliento y por haber convertido los buenos momentos en recuerdos imborrables.

A mis compañeros del 211 por crear el clima que los caracteriza, y a aquéllos miembros del INGEBI que de alguna manera colaboraron en la realización de esta tesis.

A Adriana Urman por su incondicional e invaluable labor mecanográfica.

Al Dr. Alejandro Mentaberry por su desinteresado trabajo fotográfico.

A Norberto Malarini por su dedicación en la confección de los gráficos.

A María Julia Alvarez, Leonor Acevedo y Norberto Contreras por la asistencia técnica proporcionada.

I N D I C E

| | |
|--|----|
| ABREVIATURAS EMPLEADAS..... | 1 |
| CAPITULO I: INTRODUCCION..... | 1 |
| I. <u>CONSIDERACIONES GENERALES. EL AMP CICLICO</u> | 2 |
| I.1. Control de la concentración de cAMP..... | 7 |
| II. <u>LA ADENILATO CICLASA</u> | 8 |
| II.1. Sustrato..... | 9 |
| II.2. Distribución y localización celular..... | 9 |
| III. <u>COMPONENTES PROTEICOS DEL SISTEMA ADENILATO CICLASA SENSIBLE A HORMONAS</u> | 10 |
| III.1. Regulación hormonal. El receptor..... | 12 |
| III.2. El componente catalítico..... | 13 |
| III.3. Componente regulatorio. Proteínas G..... | 14 |
| IV. <u>MECANISMO DE ESTIMULACION E INHIBICION MEDIADA POR RECEPTOR DE LA ADENILATO CICLASA</u> | 28 |
| V. <u>ADENILATO CICLASAS ESTIMULABLES POR CALMODULINA</u> | 30 |
| VI. <u>cAMP EN BACTERIAS</u> | 32 |
| VI.1. Rol del cAMP en la expresión de operones individuales..... | 34 |
| VI.2. Rol del cAMP en la terminación de la transcripción.... | 35 |
| VI.3. Otras funciones del cAMP en bacterias..... | 35 |
| VI.4. Regulación de la concentración intracelular de cAMP.... | 36 |
| VI.5. Nucleótidos cíclicos en bacterias distintas a <i>Escherichia coli</i> | 36 |
| VII. <u>ADENILATO CICLASA EN BACTERIAS</u> | 37 |
| VII.1. Regulación dependiente de CRP de la Adenilato ciclase..... | 37 |
| VII.2. Relación entre la adenilato ciclase y el sistema de transporte de carbohidratos dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS)..... | 38 |
| VII.3. Adenilato ciclase en bacterias distintas a <i>E. coli</i> y <i>S. Typhimuseum</i> | 40 |
| VIII. <u>ASOCIACION RHIZOBIUM LEGUMINOSA</u> | 42 |
| VIII.1. Bacterias fijadoras de N ₂ | 42 |
| VIII.2. Fijadores simbióticos de N ₂ <i>Rhizobium</i> | 46 |

| | | |
|--|---|-----------|
| IX. | <u>FORMACION DEL NODULO</u> | 47 |
| IX.1. | Reconocimiento y unión. Lectinas..... | 47 |
| IX.2. | El plásmido Sym..... | 48 |
| IX.3. | Enrulamiento de los pelos radiculares..... | 50 |
| IX.4. | Iniciación del nódulo. Canal de infección..... | 51 |
| IX.5. | Proteínas nodulares específicas del huésped..... | 52 |
| X. | <u>FISIOLOGIA Y METABOLISMO DEL NODULO</u> | 53 |
| X.1. | Formación de ATP y leghemoglobina..... | 55 |
| X.2. | Fijación de N ₂ . Movimiento de amonio y síntesis de compuestos nitrogenados..... | 55 |
| XI. | <u>BACTEROIDE</u> | 56 |
| XI.1. | Mecanismos de transporte y metabolismo..... | 58 |
| XII. | <u>cAMP EN PLANTAS SUPERIORES</u> | 61 |
| XII.1. | Papel del cAMP en plantas superiores..... | 62 |
| CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS | | 65 |
| MATERIALES | | 66 |
| I. | <u>RHIZOBIUM MELILOTI</u> | 67 |
| I.1. | Cepas utilizadas y condiciones de cultivo..... | 67 |
| I.2. | Fraccionamiento subcelular..... | 68 |
| II. | <u>MEDICAGO SATIVA (Alfalfa)</u> | 68 |
| II.1. | Condiciones de crecimiento..... | 68 |
| II.2. | Fraccionamiento subcelular..... | 71 |
| III. | <u>INOCULACION DE SEMILLAS</u> | 71 |
| IV. | <u> AISLAMIENTO DE RHIZOBIUM MELILOTI DE NODULOS DE MEDICAGO SATIVA</u> | 72 |
| V. | <u>FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE NODULOS</u> | 72 |
| VI. | <u>OBTENCION DE MUTANTES CYA- DE RHIZOBIUM MELILOTI</u> | 73 |
| VI.1. | Cepas utilizadas..... | 73 |
| VI.2. | Medios y antibióticos utilizados..... | 73 |
| VI.3. | Conjugación..... | 74 |
| VI.4. | Conservación de las mutantes cya-..... | 76 |
| VI.5. | Purificación de plásmidos..... | 76 |

| | | |
|--------|--|-----|
| VII. | <u>PREPARACION DEL SUSTRATO RADIOACTIVO DE LA ADENILATO CICLASA: [$\alpha^{32}P$] ATP</u> | 78 |
| | Procedimiento descrito por Flawiá y Torres..... | 79 |
| | Síntesis enzimática..... | 80 |
| | Purificación del [$\alpha^{32}P$] ATP..... | 81 |
| VIII. | <u>ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA</u> | 83 |
| IX. | <u>PURIFICACION PARCIAL DE LA ADENILATO CICLASA DE <i>RHIZOBIUM MELILOTL</i></u> | 84 |
| IX.1. | Cromatografía en DEAE celulosa..... | 84 |
| IX.2. | Filtración por geles..... | 85 |
| X. | <u>PURIFICACION PARCIAL DE LA ADENILATO CICLASA DE <i>MEDICAGO SATIVA</i></u> | 85 |
| X.1. | Cromatografía en DEAE celulosa..... | 85 |
| X.2. | Cromatografía en Hexilamina-sepharosa..... | 86 |
| X.3. | Filtración por geles..... | 86 |
| XI. | <u>CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA ADENILATO CICLASA</u> | 87 |
| XI.1. | Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa..... | 87 |
| XI.2. | Filtración en geles..... | 87 |
| XI.3. | Determinación de las proteínas marcadoras en los gradientes de sacarosa y en las columnas de Bio-Gel.... | 88 |
| XII. | <u>CALCULO DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS</u> | 89 |
| XII.1. | Volumen específico parcial..... | 89 |
| XII.2. | Radio de Stokes..... | 91 |
| XII.3. | Peso molecular..... | 92 |
| XII.4. | Coeficiente friccional..... | 92 |
| XII.5. | Parámetros de las proteínas marcadoras..... | 93 |
| XIII. | <u>ENSAYO DE CALMODULINA</u> | 93 |
| XIV. | <u>PURIFICACION DE CALMODULINA EN HOJAS DE ESPINACA</u> | 95 |
| XIV.1. | Cromatografía en DEAE-celulosa..... | 95 |
| XIV.2. | Cromatografía de afinidad..... | 97 |
| XV. | <u>ELECTROFORESIS ANALITICA EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA</u> | 99 |
| XVI. | <u>PROCEDIMIENTOS ANALITICOS</u> | 101 |
| XVI.1. | Determinación de proteínas..... | 101 |
| XVI.2. | Radioinmuno análisis para la determinación de los niveles de cAMP..... | 101 |

| | |
|---|-----|
| CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION..... | 103 |
| I. ESTUDIO DE LA ADENILATO CICLASA DE <u>R. MELILOTI</u> | 104 |
| I.1. Localización subcelular..... | 104 |
| I.2. Sustrato, cinética y efectores..... | 109 |
| II. PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA ADENILATO CICLASA DE <u>R. MELILOTI</u> | 115 |
| II.1. Cromatografía en DEAE-celulosa..... | 115 |
| II.2. Filtración por geles (Ultrogel Aca34)..... | 115 |
| II.3. Gradientes de sacarosa..... | 119 |
| III. OBTENCION DE MUTANTES <u>CYA-</u> DE <u>R. MELILOTI</u> | 121 |
| III.1. Recuento y frecuencia de mutación..... | 121 |
| III.2. Actividad adenilato ciclasa en las presuntas mutantes <u>cya-</u> | 124 |
| III.3. Prueba de infectividad de las mutantes <u>cya-</u> de <u>R. meliloti</u> | 126 |
| IV. ADENILATO CICLASA EN NODULOS SIMBIOTICOS DE <u>M. SATIVA</u> | 129 |
| V. ADENILATO CICLASA EN PLANTAS SUPERIORES. <u>M. SATIVA</u> | 135 |
| V.1. Localización subcelular..... | 135 |
| V.2. Sustrato, cinética y efectores..... | 137 |
| V.3. Niveles de cAMP..... | 140 |
| VI. ACTIVACION DE LA ADENILATO CICLASA DE <u>M. SATIVA</u> CON <u>Ca²⁺</u> | 143 |
| VII. ADENILATO CICLASA DE <u>M. SATIVA</u> Y CALMODULINA..... | 145 |
| VIII. PURIFICACION DE LA ADENILATO CICLASA DE <u>M. SATIVA</u> | 152 |
| VIII.1. Cromatografía en DEAE-celulosa..... | 152 |
| VIII.2. Cromatografía en Hexilamino-sepharosa..... | 152 |
| VIII.3. Filtración por geles (Ultrogel Aca34)..... | 155 |
| IX. CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA ADENILATO CICLASA DE <u>MEDICAGO SATIVA</u> | 155 |
| IX.1. Filtración por gel..... | 155 |
| IX.2. Gradientes de sacarosa..... | 160 |
| CONCLUSIONES..... | 163 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 168 |

ABREVIATURAS EMPLEADAS

| | |
|------------------------|--|
| 5' AMP..... | adenosina 5'-monofosfato |
| ACTH..... | Hormona adencorticotrofina |
| ADP..... | adenosina 5'-difosfato |
| AMPc..... | adenosina 3'-5' monofosfato cíclico |
| ATP..... | adenosina 5'-trifosfato |
| BSA..... | seroalbúmina bovina |
| CAP o CRP..... | proteína que une AMPc |
| cDNA..... | ácido deoxiribonucleico copia |
| CT..... | toxina del cólera |
| DEAE..... | dietil aminoetil |
| DG..... | diacilglicerol |
| DNA..... | ácido deoxiribonucleico |
| ED..... | Entner Doudoroff |
| EDTA..... | ácido etilenaminotetracético |
| EGTA..... | etilenglicol-bis-(β -aminoetil-éter)-tetraacetato |
| GA..... | giberelina |
| GDP..... | guanosina 5'-difosfato |
| GMPC..... | guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico |
| GMP..... | guanosina 5'-monofosfato |
| GPP(NH)P..... | 5'guanilil-imidodifosfato |
| GTP- γ S..... | guanosina 5'-O-(3-tiotrifosfato) |
| GTP..... | guanosina 5'-trifosfato |
| HB..... | β -hidroxibutirato |
| IAA..... | ácido indol acético |
| IP ₃ | inositol 3,4,5-trifosfato |
| Lb..... | leghemoglobina |
| Me ²⁺ | catión divalente |
| NAD..... | nicotinamida adenina dinucleótido |
| NADP..... | nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |

Abreviaturas

| | |
|------------------------|---|
| PDE..... | fosfodiesterasa |
| PEG..... | polietilen glicol |
| PEP..... | Fosfoenol piruvato |
| PHB..... | poli β -hidroxibutirato |
| Pi..... | ortofosfato inorgánico |
| PIP ₂ | fosfatidil inositol 4,5-difosfato |
| PLC..... | fosfolipasa C |
| PMSF..... | fluoruro de fenil metil sulfonato |
| PP..... | camino de las pentosas |
| PPi..... | pirofosfato inorgánico |
| RNA..... | ácido ribonucleico |
| SDS..... | dodecil-sulfato de sodio |
| TCA..... | ácidos tricarbónicos |
| TEMED..... | N,N,N',N' tetrametil etilendiamina |
| TP..... | toxina pertussis |
| TRIS..... | 2-amino-2(hidroximetil)-1,3 propanodiol |

CAPITULO I

INTRODUCCION

I. CONSIDERACIONES GENERALES. EL AMP CICLICO

En 1957, Sutherland y col. observaron que las hormonas glucogenolíticas como la adrenalina y el glucagon eran capaces de estimular la fosforilasa hepática en homogenatos de hígado (1-3). Fue ésta la primera vez que se encontró un efecto hormonal en un sistema libre de células.

Los autores observaron que la fracción de membranas purificadas en presencia de dichas hormonas y de ATP-Mg²⁺ sintetizaba un factor termoestable que llevaba a la activación de la fosforilasa b a su forma activa o fosforilasa a, la cual es responsable de la degradación del glucógeno con formación de glucosa-1'-fosfato.

La activación de la fosforilasa b implica la fosforilación de la enzima a partir de ATP por medio de una quinasa cuya actividad se manifiesta en presencia de cAMP (4).

El factor termoestable sintetizado por las membranas purificadas como respuesta a la acción hormonal fue identificado más adelante como 3'5' monofosfato cíclico (2) o AMP cíclico (cAMP)(5). Figura 1.

Sutherland propuso que el cAMP sería el mensajero intracelular o segundo mensajero y la hormona representaría la señal externa o primer mensajero (5)(6).

La actividad responsable de la síntesis de este nucleótido cíclico fue identificada como la enzima adenilato ciclasa (7). La unión de una hormona a un receptor específico en la cara externa de la membrana plasmática, daría como resultado la activación de la adenilato ciclasa ubicada en la cara interna de la membrana, traduciéndose ésto en una variación de la concentración intracelular de cAMP.

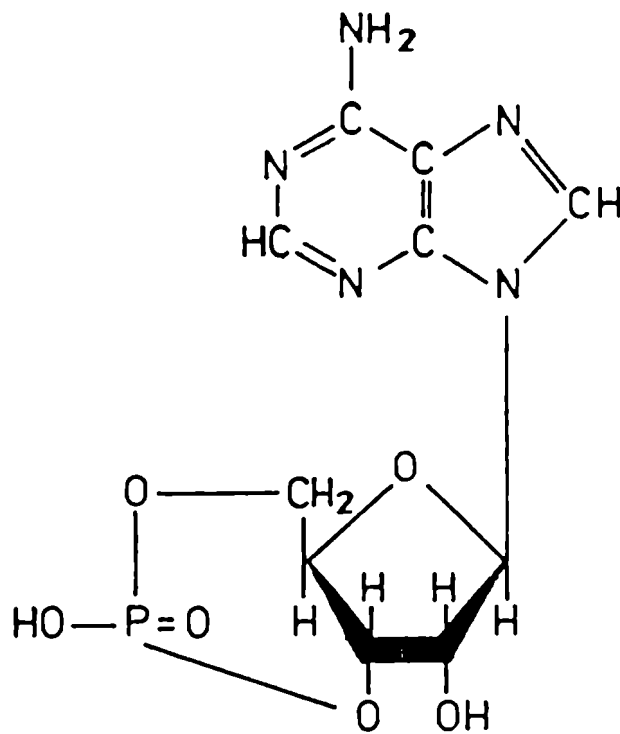


Figura 1: Estructura de la molécula de AMP cíclico.

Introducción

Butcher y Sutherland (8) purificaron y caracterizaron la actividad capaz de inactivar el cAMP. Esta inactivación produce 5' monofosfato (5'AMP) y a la enzima responsable se la denominó fosfodiesterasa (PDE), la cual es inhibible por metilxantinas.

La Figura 2 esquematiza lo dicho anteriormente. Cuando una hormona como el glucagon aumenta su concentración de 10^{-10} a 10^{-9} M se produce un aumento de la concentración intracelular de cAMP de 10^{-7} a 10^{-6} y provoca una variación de los niveles de glucosa-6-fosfato de 10^{-4} a 10^{-3} M que implica una amplificación de la señal del orden de un millón de veces.

Desde el descubrimiento del cAMP por Sutherland y su grupo (1), este metabolito ha sido implicado en un gran número de procesos celulares en una variedad de organismos que van desde las bacterias hasta los mamíferos.

En la Figura 3 puede observarse un esquema de los modos de acción del cAMP en diferentes organismos (9).

En procariotas, el cAMP controla la transcripción por unión a una proteína receptora conocida como CRP o CAP. En eucariotas, el cAMP controla una variedad de procesos por unión a la subunidad regulatoria de la proteína quinasa dependiente de cAMP. Los dos tipos de proteínas que interactúan con el cAMP muestran una significativa homología que lleva a pensar en un origen evolutivo común (10). Muchos de sus patrones de regulación también parecen estar conservados a lo largo de la evolución. Uno de ellos es el aumento de la concentración de cAMP en la fase G_1 del ciclo de crecimiento, la cual tiene lugar en procariotas y eucariotas (11).

Otro patrón conservado es el aumento en la concentración de cAMP en respuesta al stress o a la despolarización de membrana. El efecto final es en general la degradación de reservas que lleva a un aumento en la disponibilidad de ATP.

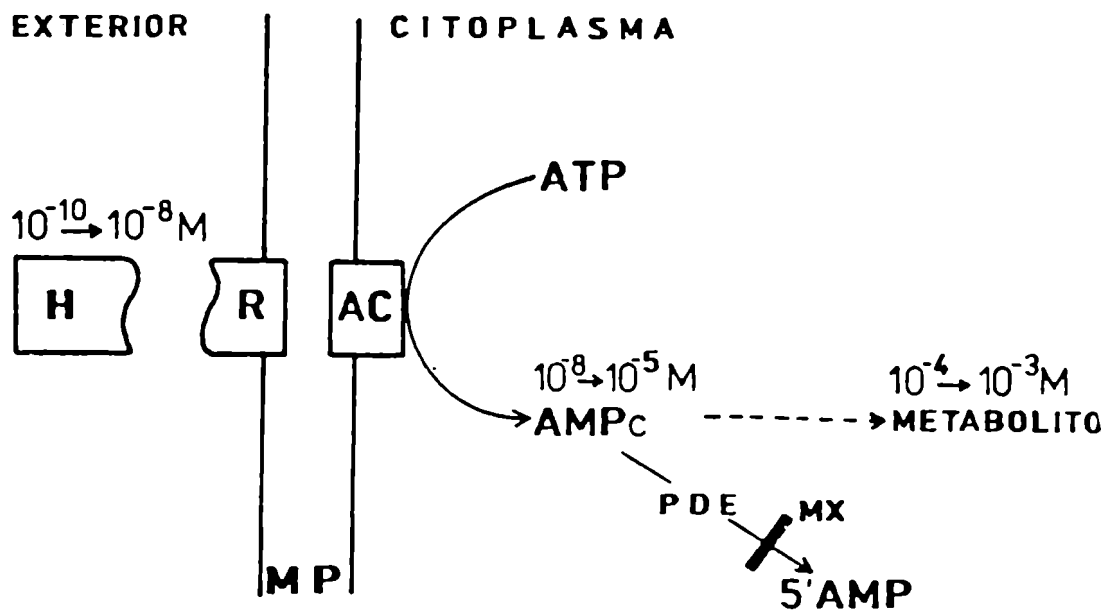


Figura 2: Modelo de los dos mensajeros

H = hormona; R = receptor; MP = membrana plasmática; AC = adenilato ciclasa; PDE = fosfodiesterasa de cAMP; MX = metilxantinas

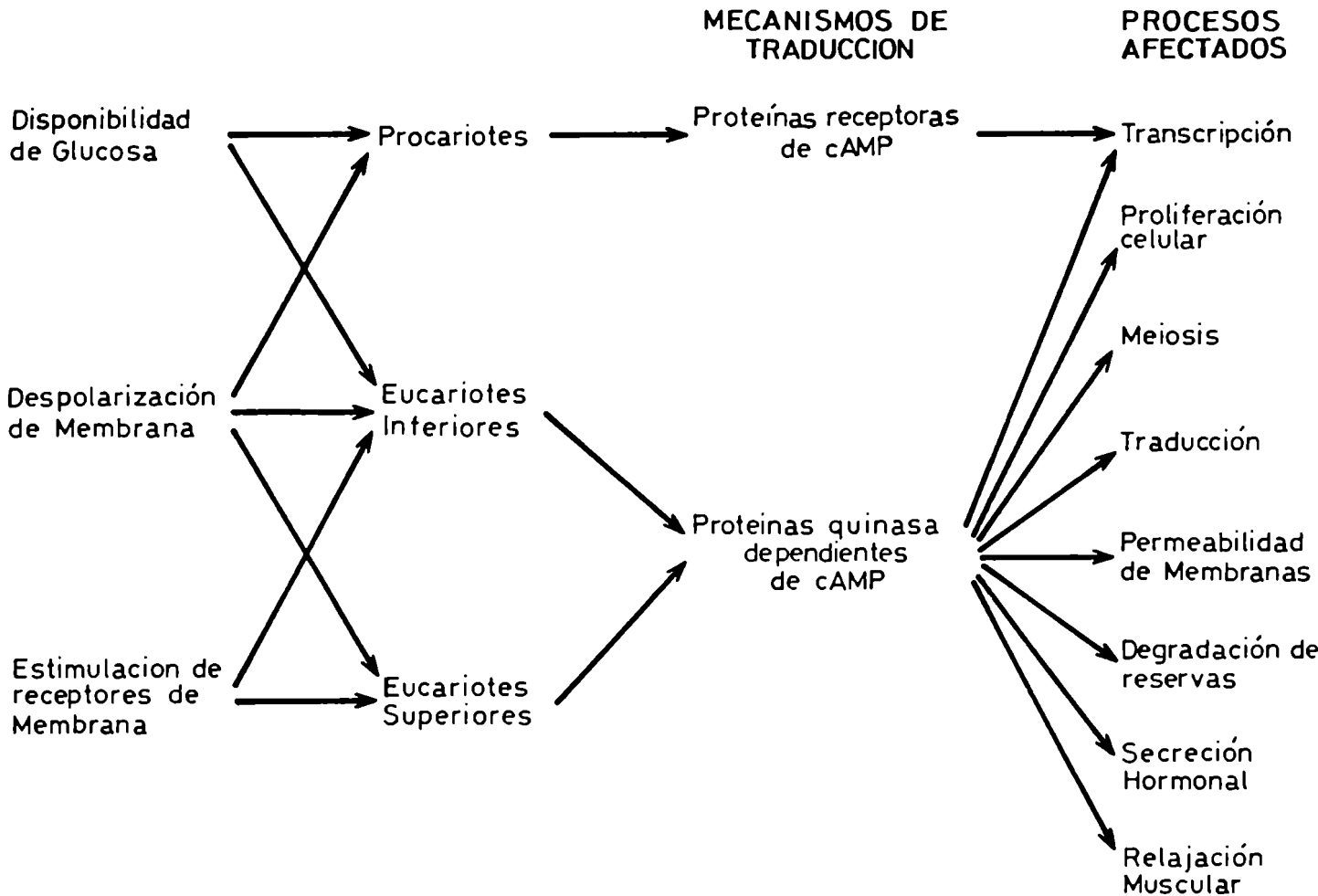


Figura 3: Modos de acción del AMP cíclico

Introducción

Si bien estos mecanismos regulatorios permanecen conservados a lo largo de la evolución, en muchos otros casos los patrones de regulación varían de un organismo a otro.

I.1. Control de la concentración de cAMP

La concentración intracelular de cAMP depende del balance entre las actividades de la adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa. Pall (12) ha postulado que variaciones en la concentración de proteínas capaces de unir el cAMP y cambios en su afinidad por el mismo, podrían ser también responsables de los niveles intracelulares de cAMP.

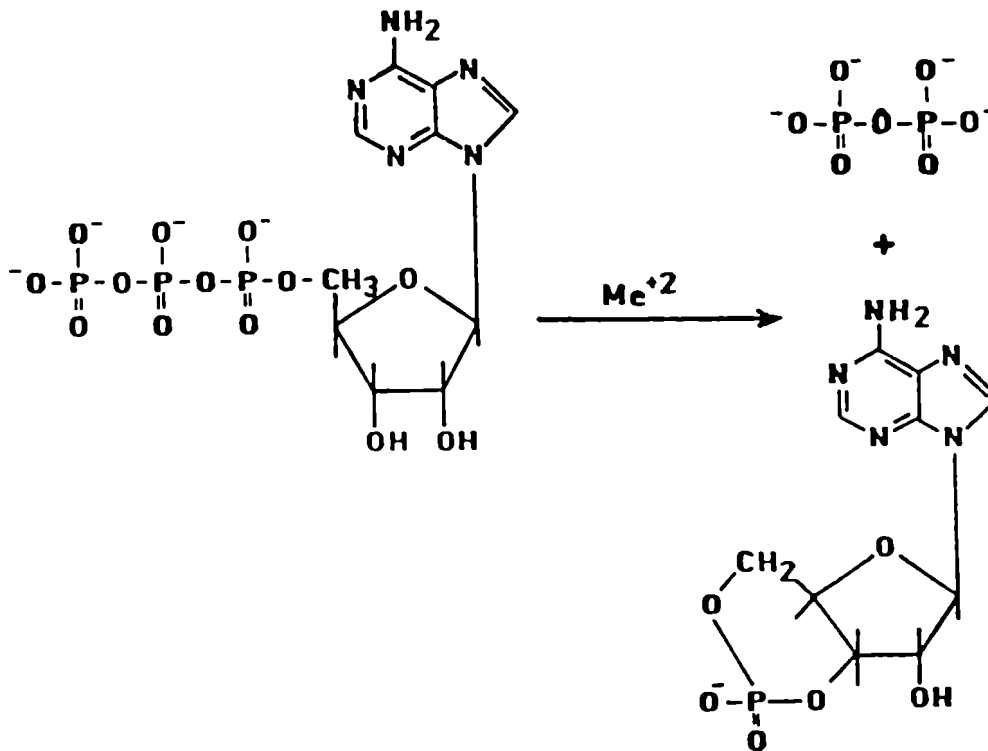
A pesar de que las bacterias y los animales pueden excretar cAMP, no hay evidencias hasta el momento que indiquen que esta excreción regula la concentración intracelular del nucleótido cíclico.

Los cambios en la actividad de la fosfodiesterasa pueden contribuir a las variaciones en la concentración de cAMP en eucariotas, pero no parece jugar un rol regulatorio en procariotas.

En la mayoría de los organismos, los cambios en la actividad de adenilato ciclasa parece ser el mayor punto de control.

II. LA ADENILATO CICLASA

La adenilato ciclasa (ATP pirofosfato liasa ciclante E. C.4.6.1.1.) es la enzima responsable de la síntesis del cAMP según la reacción.



II.1. Sustrato

Los sustratos de esta reacción pueden ser los complejos MgATP o MnATP, actuando los cationes divalentes Mg^{2+} o Mn^{2+} como activadores de la misma.

En el caso de algunas adenilato ciclasas como la de *Neurospora* (13), la de testículo (14) y la de muchas bacterias, la dependencia de Mn^{2+} es casi absoluta.

Esta dependencia exclusiva de Mn^{2+} para la expresión de la actividad catalítica de la adenilato ciclasa es, aparentemente, una consecuencia de la ausencia o disfuncionalidad del componente regulador de la enzima, ya que éste confiere a la unidad catalítica la capacidad de usar MgATP como sustrato (15).

Aunque la concentración de Mg^{2+} es aproximadamente diez veces mayor que la de Mn^{2+} , la mayor afinidad del ATP por este último podría explicar que la enzima actuase *in vivo* con ambos cationes (16).

II.2. Distribución y localización celular

Con excepción de las plantas superiores, donde hasta el momento no se han presentado evidencias concluyentes sobre la existencia de la adenilato ciclasa, la misma está presente en todos los organismos a lo largo de la evolución, desde bacterias (17), levaduras (18), protozoos (19), hongos (20)(21) a invertebrados y vertebrados (22).

En todas las células eucariotas estudiadas, la adenilato ciclasa se encuentra asociada a membrana, siendo excepción a esta regla, la adenilato ciclasa de los tubos seminíferos que tienen localización citoplasmática (23)(24).

Introducción

En organismos eucariotes inferiores y bacterias, la localización de la enzima varía de un organismo a otro. Por ejemplo, en bacterias como *E. coli*, la enzima se encuentra unida débilmente a membranas, en cianobacterios es citoplasmática, y en *B. pertussis* está presente en el periplasma bacteriano.

En hongos como la *Neurospora crassa*, la adenilato ciclasa también está asociada débilmente a la membrana, mientras que en protozoos como *Trypanosoma cruzi* está incluida en la misma.

III. COMPONENTES PROTEICOS DEL SISTEMA ADENILATO CICLASA SENSIBLE A HORMONAS

La adenilato ciclasa existe como muchas especies moleculares. En células de mamífero comprende como mínimo tres componentes (Figura 4).

Primero, un receptor hormonal responsable de la activación o inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa. Segundo, dos proteínas de acoplamiento, una estimuladora (G_s) y otra inhibitoria (G_i). Estas proteínas han sido purificadas a homogeneidad, a partir de distintos tejidos y ambas son heterotrímeros compuestos por las subunidades α , β y γ como se verá en detalle más adelante. El tercer componente es la subunidad catalítica, la cual cataliza la conversión de ATP a cAMP en presencia de cationes divalentes. En las próximas secciones de este capítulo nos referiremos en detalle a cada uno de los componentes del sistema adenilato ciclasa sensible a hormonas.

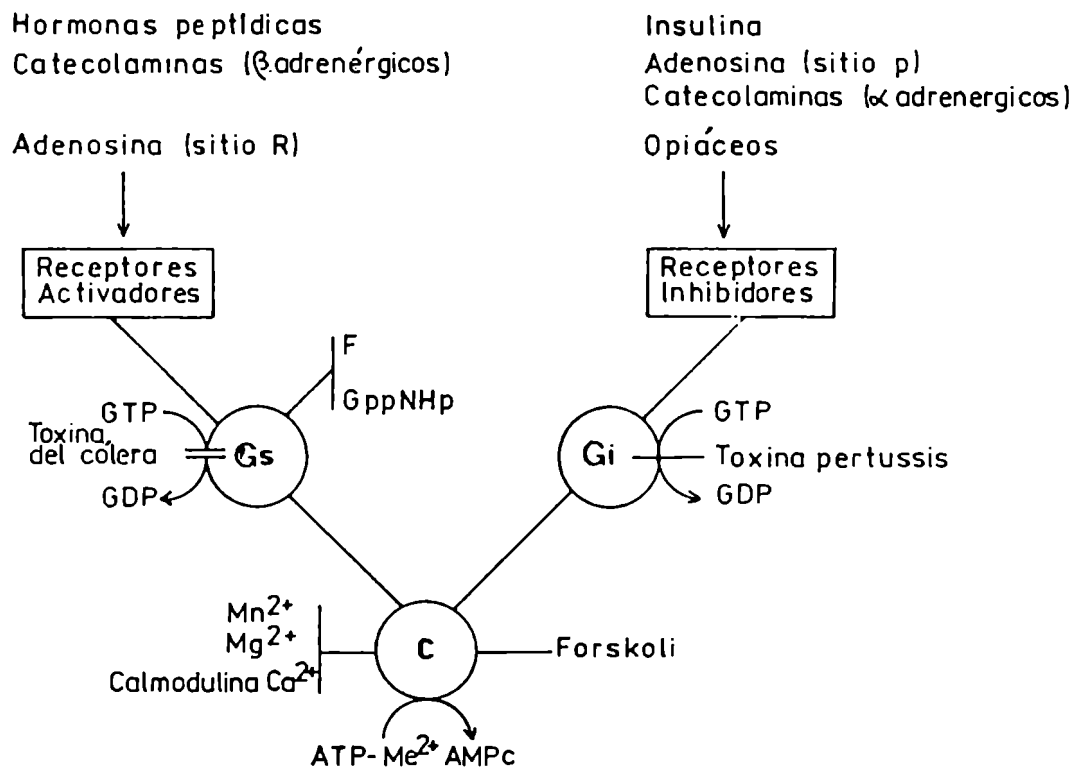


Figura 4: Representación esquemática de los componentes del sistema adenilato ciclasa y el probable sitio de acción de cada ligando.

III.1. Regulación hormonal. El receptor

Muchas hormonas ejercen su acción celular a través de una modificación de la actividad de la adenilato ciclasa (6); la mayoría de ellas ejerce un efecto activador, mientras que otras, como la insulina, ejercen un efecto inhibitorio sobre la enzima (30).

La función discriminante de los receptores desde la cara externa de la membrana, fue puesta de manifiesto por experiencias de Schimmer (31) y Rodbell (32). Este último demostró que el tratamiento con tripsina de adipocitos intactos, reducía la capacidad de respuesta del sistema adenilato ciclasa a diferentes hormonas, sin afectar la expresión de la actividad basal (33).

Los receptores son extremadamente específicos para las características estereoquímicas de las hormonas; esto es bien patente, por ejemplo, en las células grasas donde existen cinco tipos distintos de receptores, cada uno capaz de activar la adenilato ciclasa (28).

Las funciones discriminatorias de los receptores acoplados a la adenilato ciclasa y la consiguiente activación hormonal de la enzima, no requieren de la integridad celular. Así pues, los estudios concernientes a las propiedades de los receptores en sistemas libres de células, proporcionan una información válida y aplicable al comportamiento del receptor *in vivo* (31) (34).

La activación hormonal es un proceso rápido y reversible, es decir, desaparece al eliminar la hormona o al añadir un antagonista (35)(36).

Cada hormona estimula a la adenilato ciclasa en un rango de concentración que le es propio y la estimulación máxima que se consigue varía según la hormona. También existen antagonistas específicos que bloquean solamente los efectos de los agonistas correspondientes, y no los de otras hormonas.

III.2. El componente catalítico

El componente catalítico de la adenilato ciclasa es el encargado de catalizar la conversión de ATP a cAMP en presencia de cationes divalentes.

Ha habido muchos intentos de purificar el componente catalítico de la adenilato ciclasa.

Los primeros trabajos se basaron en la solubilidad de la enzima de testículo (24)(37). Se encontró así una adenilato ciclasa insensible a hormonas y dependiente de Mn^{2+} , la cual no interactúa con el componente regulatorio en sistemas reconstituídos. En otros casos, a partir de extractos solubilizados con detergentes, se usaron columnas de afinidad como, por ejemplo, forskolina-sepharosa (38) o calmodulina-sepharosa para enzimas que, como la adenilato ciclasa de cerebro, son sensibles a la estimulación por Ca^{2+} -calmodulina (39)(40)(41).

Stengel y col. (42) purificaron la adenilato ciclasa de esperma de carnero la cual es insensible a todos los agentes regulatorios. Los autores solubilizaron la enzima proteolíticamente, la purificaron 125.000 veces y llegaron a resolver un doblete polipeptídico en geles desnaturalizantes de poliacrilamida de 36 y 34 kDa.

Los pesos moleculares indicados para los componentes catalíticos dependen del origen de la enzima, el procedimiento empleado y el grado de purificación.

Así, por ejemplo, para la enzima purificada por afinidad con forskolina-Sepharosa, a partir de membranas de miocardio de conejo solubilizadas con lubrol, se obtuvo un peso molecular de 150 kDa.

Ross y colaboradores (43)(44) purificaron el componente catalítico a partir de membranas plasmáticas de una variante de linfoma S49 que carece de componente regulatorio. Los autores determinaron para el componente catalítico de dicha variante, un peso molecular de 190 kDa y observaron que la actividad adenilato ciclasa del mismo con ATP-Mg es menor del 10% de la actividad con ATP-Mn, que la misma no es estimulable por hormonas, ion fluoruro o nucleótidos de guanina, y es sensible al calentamiento suave y a agentes que reaccionan con grupos sulfhidrilos.

En general, y a menos que se usen detergentes en los procesos de purificación, la subunidad catalítica copurifica con la subunidad regulatoria Gsa.

III.3. Componente regulatorio. Proteínas G

Rodbell y col. sugirieron en 1971 (45) que entre el receptor hormonal y la adenilato ciclasa existía un elemento regulatorio que controlaba la actividad de la enzima.

El descubrimiento y posterior caracterización de proteínas regulatorias que unían nucleótidos de guanina (proteínas G) confirma dicha hipótesis.

Las investigaciones respecto del rol de las proteínas G en la regulación de la adenilato ciclasa (46)(47), unidas al estudio de la regulación mediada por GTP de una fosfodiesterasa específica de GMP cíclico en segmentos externos de los bastones de la retina (48)(49) han dado como resultado una vasta información sobre los mecanismos por los cuales los receptores de la superficie celular se comunican con sus respectivos efectores celulares.

La regulación de la actividad de la adenilato ciclasa en respuesta a varios agentes estimulatorios (ej. adrenalina, gonadotrofinas, ACTH), o agentes inhibitorios (ej. agonistas α_2 a-

Introducción

drenérgicos y muscarínicos) es mediado por distintas proteínas G, llamadas G_s y G_i (por estimulatorias e inhibitorias), respectivamente (Figura 5).

La concentración de GMP cíclico en los segmentos externos de los bastones de la retina, determinante crucial de la excitación visual, es regulada por otra proteína G (transducina o G_t), la cual activa la fosfodiesterasa específica de GMP cíclico en respuesta a la activación de la rodopsina (Figura 6).

Si bien aún no está totalmente demostrado, las proteínas G estarían también implicadas en la regulación de la degradación de fosfoinosítidos por una fosfolipasa C específica para el fosfatidol-inositol (Figura 7)(50).

Permanentemente surgen nuevas evidencias que indicarían un rol regulatorio de las proteínas G en sistemas como los receptores colinérgicos muscarínicos y canales potasio (51)(52); los canales neuronales de Ca^{2+} (53); eventos de exocitosis (54); transducción olfatoria (55); translocación de proteínas (56) y actividad fosfolipasa A_2 (57).

La familia de las proteínas G está formada por un número de proteínas relacionadas entre sí estructural y funcionalmente; ésto se resume en la Tabla 1 (58).

A continuación, veremos las características fundamentales de las distintas proteínas G y sus componentes proteicos, las subunidades α , β y γ .

G_s

La proteína G_s es el componente regulatorio estimulador de la adenilato ciclasa, la cual es requerida para la obtención de niveles significativos de actividad de adenilato ciclasa bajo condiciones fisiológicas (43).

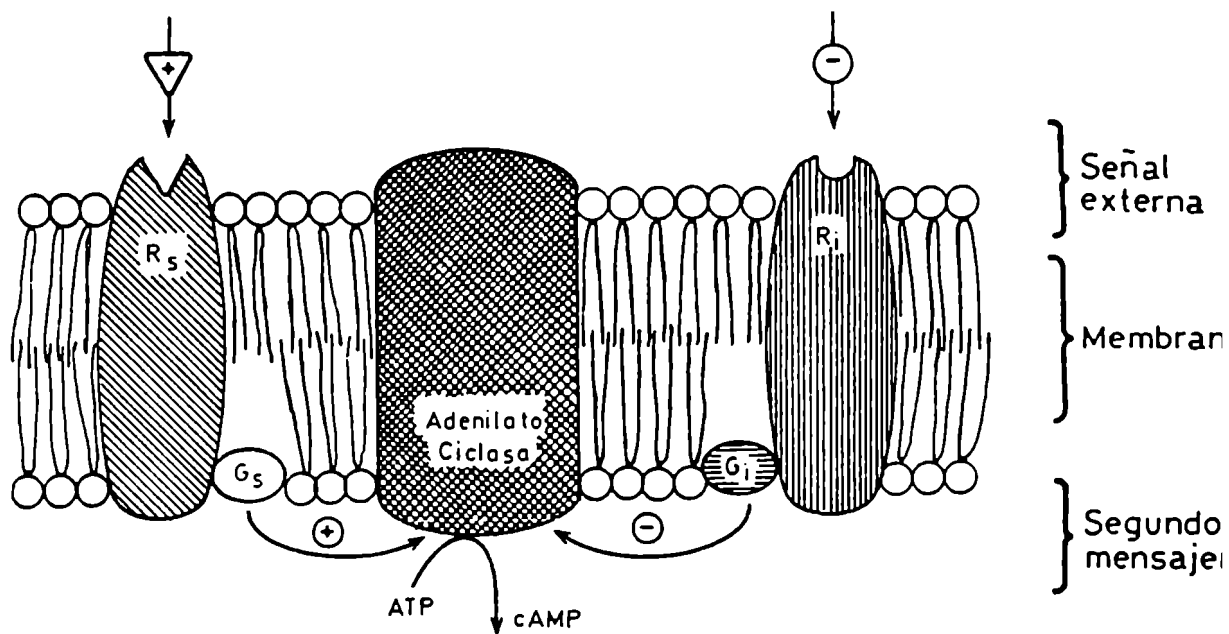


Figura 5: El sistema adenilato ciclasa posee dos tipos de proteínas G y dos receptores. Un tipo (R_s y G_s) estimula la adenilato ciclasa, mientras que el otro tipo (R_i y G_i) la inhiben.

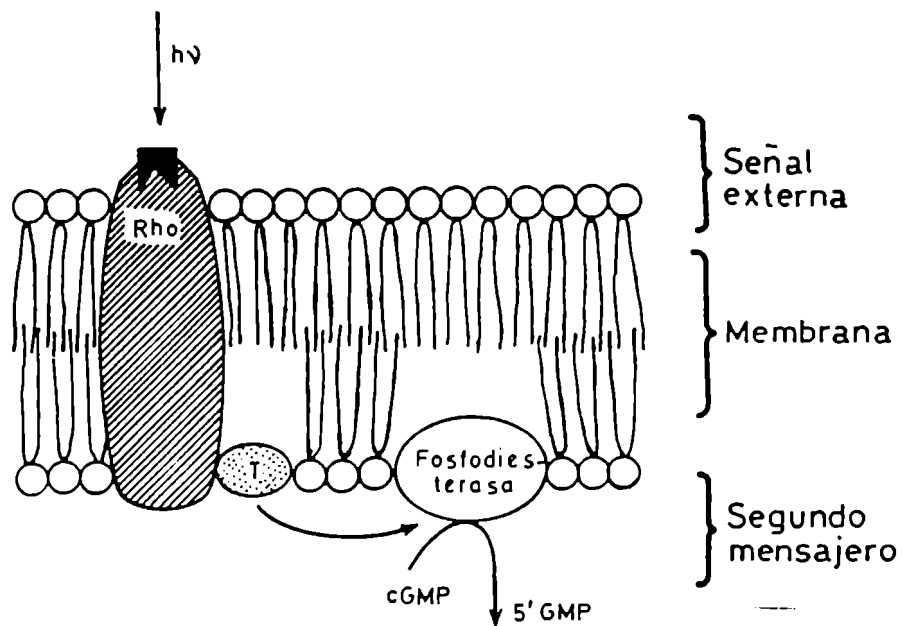


Figura 6: El receptor activado, rodopsina (Rho) induce a través de su proteína G, transducina (T), la activación de una fosfodiesterasa (PDE) que hidroliza cGMP.

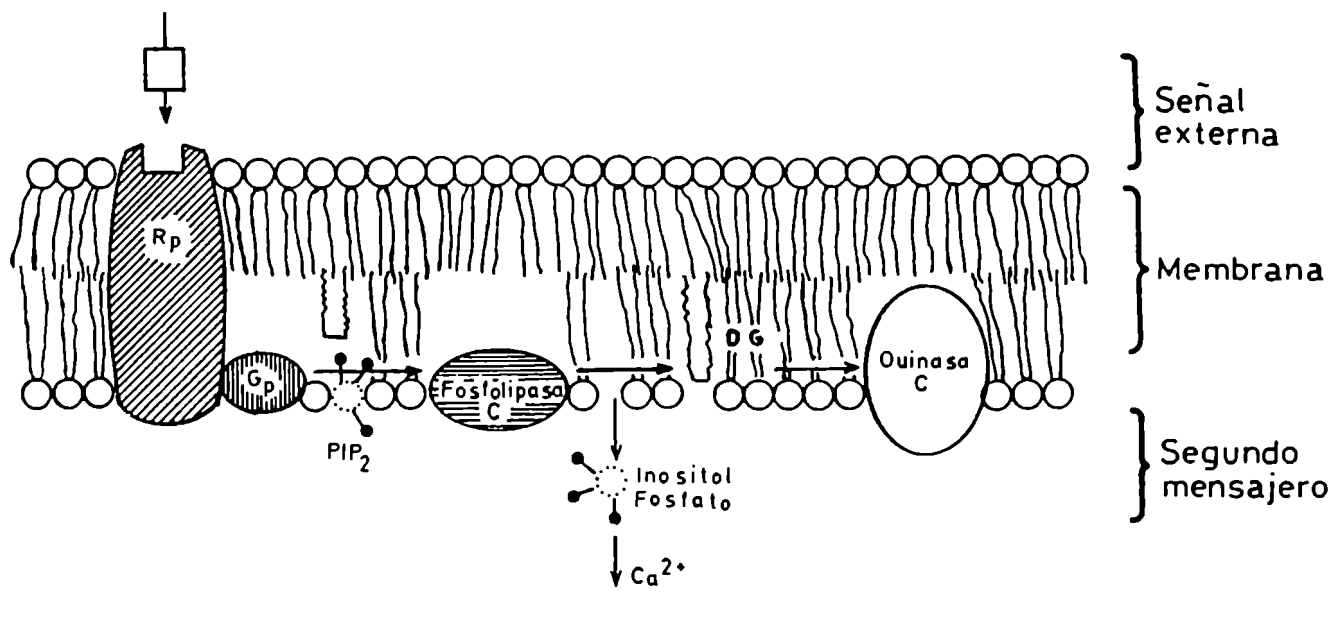


Figura 7: El receptor (Rp) y la proteína G (Gp) activan la fosfolipasa C, la cual hidroliza el fosfatidilinositol 4,5 difosfato (PIP₂) dando 1,2 diacilglicerol (DG) e inositol 1,4,5 trifosfato. El DG activa a una proteína quinasa de membrana, y el inositol trifosfato es liberado al citoplasma y libera calcio de los reservorios mitocondriales.

| Subunidad | Peso Molecular(10 ⁻³) | Toxina | Función |
|----------------------------|-----------------------------------|--------------|--|
| G _s α | 44.5-46 | Cólera | Activa A.C. |
| G _i α | 40.4-40.5 | Pertussis | Inactiva A.C. |
| G _o α | 39.9 | Pertussis | Eventos sensibles a TP |
| G _t α1 | 40 | Col + Pert | Activa PDE de cGMP en bastones retinales |
| G _t α2 | 40.5 | Col + Pert | Activa PDE de cGMP de |
| β | 37.4 | | βX desactiva Ga |
| γ | 8.10 | | |
| p21 ^{ras} | 21 | No descripta | Hidrólisis de fosfoinosítidos |
| Factor de ADP ribosilación | 21 | No descripta | ADP ribosilación de Gs por TC |
| Gp | 21 | No descripta | Desconocido |

TABLA 1: Propiedades de las subunidades de las proteínas G

AC = adenilato ciclasa; TP = toxina pertussis; TC = toxina de cólera;
PDE = fosfodiesterasa

Introducción

Una característica de esta proteína G es que su subunidad α es sustrato de la toxina de cólera. Esta toxina es producida por la bacteria *Vibrio cholerae*. Esta toxina es capaz de transferir una unidad de riboadenosina difosfato (ADP) de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) a la subunidad α de G_s . Esta modificación de la subunidad bloquea su capacidad de hidrolizar GTP unido a la misma, dando como resultado la sobreproducción de cAMP. Estos niveles elevados de cAMP estimulan por ejemplo, a las células de la mucosa intestinal a producir una excesiva secreción de agua y sales, lo que lleva a diarreas severas, que es lo que caracteriza al cólera.

La proteína G_s fue purificada por cromatografía de afinidad a través de GTP-Sepharosa (59). El rol estimulador de G_s sobre la adenilato ciclasa fue demostrado por su capacidad de reconstituir el sistema adenilato ciclasa con la concomitante reaparición de la capacidad de ADP ribosilación por toxina de cólera de células *cyc-* las cuales son derivadas del linfoma S49 y carecen de $G_{s\alpha}$ (44)(60)(61).

Las subunidades α y β de G_s son solubles en agua, mientras que la subunidad γ es fuertemente hidrofóbica. Desde el momento que el complejo $\alpha\beta\gamma$ es hidrofóbico, se supone que G_s es una proteína perisférica de membrana que está anclada a la cara interna de la misma a través de su subunidad γ .

La proteína G_s es una mezcla de dos oligómeros, que difieren en sus subunidades α ($G_{s\alpha 1}$ y $G_{s\alpha 2}$) con pesos moleculares aparentes en geles de poliacrilamida SDS de 52.000 y 45.000 dalton. Aparentemente, hay un solo tipo de subunidad β y γ en las proteínas G_s .

La existencia de dos formas de $G_{s\alpha}$ fue establecida cuando la proteína fue purificada. Las bases moleculares de esta heterogeneidad se vio más tarde que se debían a un *splicing* alternativo de un mRNA precursor (62)(63). Evidencias recientes in-

dican que en realidad podrían ser cuatro las $G_{s\alpha}$ que se obtendrían por este mecanismo (64), pero aún se desconoce si habría diferencias funcionales entre las distintas formas.

G_i

Es la proteína responsable de la inhibición mediada por receptor de la adenilato ciclasa. La misma difiere de G_s sólo en su subunidad α , mientras comparten las mismas subunidades β y γ . La subunidad α de G_i ($G_{i\alpha}$) posee la característica de ser sustrato de la toxina pertussis, la cual es producida por la bacteria *Bordetella pertussis*. Esta toxina transfiere una unidad de riboadenosina bifosfato (ADP-ribosa) del NAD a la subunidad $G_{i\alpha}$. Esta ADP-ribosilación se traduce en un desacoplamiento de la proteína del receptor. Considerando que G_i inhibe la adenilato ciclasa, al inactivar esta proteína G la actividad de la enzima se ve incrementada, lo cual produce una variedad de efectos clínicos.

El hallazgo de la toxina pertussis permitió contar con una herramienta selectiva que desacoplaba los receptores inhibitorios, mientras que al mismo tiempo ADP ribosilaba un polipéptido distinto de G_s ; esto demostró finalmente que G_s y G_i eran dos entidades separadas que mediaban las respuestas iniciadas por los receptores estimulatorios e inhibitorios de la adenilato ciclasa, respectivamente.

G_i fue purificada de eritrocitos humanos (65)(66) e hígado de conejo (67)(68), demostrándose que es un heterotrímero formado por las subunidades α_i , β y γ .

Nukada y colaboradores (69) purificaron la subunidad $G_{i\alpha}$ de cerebro bovino, determinaron su secuencia aminoacídica y observaron que esta secuencia se correlacionaba totalmente con aquéllas deducidas de los cDNA aislados a partir de una biblioteca

de cDNA de cerebro bovino. Los cDNAs codificaban para una proteína de 354 aminoácidos que correspondía a un peso molecular de 40400 d.

A su vez, Itoh y colaboradores (70), usando un oligonucleótido construido a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína purificada, rastrearon una biblioteca de cDNA de glioma de rata. Encontraron una proteína que difería en casi 11% con la encontrada por Nukada. Considerando la extrema similitud entre las proteínas G_{sa} de rata y bovina, es difícil suponer que la diferencia en las proteínas G_{ia} encontradas se deba a diferencias de especies. Este argumento no es concluyente y, por el momento, estas dos proteínas son conocidas como G_{ia1} , aquella encontrada por Nukada, y G_{ia2} la identificada por Itoh.

Más recientemente se encontró un nuevo cDNA que codifica para una nueva G_{ia} (71). La relación que existe entre estas proteínas está en estudio.

Gt

La fotoactivación de la rodopsina se traduce en una estimulación de la fosfodiesterasa dependiente de GMP cíclico de los segmentos externos de los bastones de la retina (Figura 6). Esta estimulación es dependiente de GTP. La proteína transductora denominada transducina (T o Gt) fue purificada y resultó poseer propiedades análogas a las de G_s y G_i : es un heterotrímero formado por las subunidades α , β y γ , hidroliza GTP y cuando se activa se disocia en las subunidades $G_{t\alpha}$ y $\beta\gamma$ (Tabla 1).

Al disponerse de anticuerpos monoclonales contra la proteína $G_{t\alpha}$ y de la secuencia parcial de aminoácidos, se pudo clonar los cDNAs correspondientes a $G_{t\alpha}$ (72)(73)(74). Se encontraron dos secuencias que presentaban un 80% de homología en su secuencia de aminoácidos, las que fueron llamadas $G_{t\alpha1}$ y $G_{t\alpha2}$.

Introducción

Se obtuvieron, además, anticuerpos específicos contra secuencias peptídicas sintéticas de cada proteína y así se pudo determinar que la proteína Gt1 está localizada exclusivamente en los segmentos externos de los bastones de la retina, mientras que Gt2 está presente sólo en los conos (75). Ambas proteínas difieren en su subunidad α (Gta1 y Gta2) y son activadoras de la fosfodiesterasa dependiente de cGMP en estas células.

En nuestro laboratorio se llevaron a cabo experimentos en los que se fusionaron con detergentes membranas de *Neurospora crassa* (que aportó el componente catalítico de la adenilato ciclasa) a membranas de retina bovina, cuya adenilato ciclasa había sido inactivada con un agente que reacciona con grupos sulfhidrilos como el NBM. Como resultado se obtuvo un sistema adenilato ciclasa sensible a la luz (76).

G_o

Sternweiss y Robishaw (77) observaron que el cerebro contenía además de G_i, otro sustrato para la toxina pertussis. Esta nueva proteína denominada G_o es sustrato de la toxina pertussis, posee una subunidad α capaz de unir GTP y subunidades β y γ aparentemente idénticas a aquéllas de G_s y G_i. Esta proteína G_o no es un producto de proteólisis de G_i.

Itoh y colaboradores (70) clonaron y secuenciaron la proteína G_o α , que demostró tener un peso molecular de 39.9 Kd.

La función de G_o queda aún por ser establecida.

G_p

Evans y su grupo (78) descubrieron una nueva proteína G en placenta, a la que llamaron G_p. Esta proteína también está presente en plaqueta. G_p fue purificada, presenta un polipéptido capaz de unir GTP_{γs} y un peso molecular de 21000 d.

No se pudo demostrar que G_p sea sustrato de las toxinas de cólera o pertussis, como tampoco es clara su actividad GTPasica, ni tampoco es reconocida por anticuerpos específicos contra zonas altamente conservadas de la subunidad α.

Su bajo peso molecular y su baja afinidad por βγ la convierten en la proteína G que más se asemeja al producto del oncogen RAS. La función de G_p es desconocida.

Otras proteínas G

Existen proteínas que si bien unen nucleótidos de guanina, no reúnen todas las características que definen a las proteínas G.

Estas incluyen la proteína G_p ya mencionada, al factor de ADP ribosilación el cual es requerido para la modificación covalente de G_s por parte de la toxina del cólera, y al producto de los oncogenes ras (79).

Estas proteínas de peso molecular de aproximadamente 21000, poseen un sitio de alta afinidad para los nucleótidos de guanina y, algunas de ellas poseen actividad GTPasica. Por otro lado, no se ha demostrado que puedan ser ADP ribosiladas por las toxinas del cólera o pertussis, y parecen poseer muy baja afinidad por el complejo βγ.

Introducción

La más estudiada de estas proteínas es el producto del gen ras. Las mutaciones que inhiben la actividad GTPasa se presume que activarían la proteína y estarían asociadas a los procesos de transformación celular.

Existen evidencias preliminares que indicarían que estas proteínas pueden acoplar los receptores a sus efectores, particularmente los receptores de factores de crecimiento a la fosfolipasa C específica para fosfatidil inositol (80).

Análisis comparativo de las distintas subunidades α

El análisis de la secuencia de aminoácidos de una serie de subunidades α de proteína G, reveló que existe un 95% de homología entre las proteínas $G_{\alpha 1}$ y $G_{\alpha 2}$ (95% de residuos idénticos u homólogos). Las dos proteínas G_{α} son también similares, presentando un 88% de homología.

La comparación de las secuencias de las proteínas $G_{\alpha 1}$; $G_{\alpha 2}$; $G_{\alpha 1}$; $G_{\alpha 2}$ y G_{α} , revela un 80% de homología entre ellas, mientras que G_{α} difiere en un 50% con las otras subunidades α .

Su mayor peso molecular se debe a dos inserciones (residuos 72-86 y 324-336) y a un residuo adicional en el amino terminal.

Por estudios de complementación se han identificado en las subunidades α de las proteínas G, cinco regiones de homología caracterizada cada una por una secuencia consenso conocida como A, C, E, G e I, a partir de la nomenclatura de Halliday (80). Estas son críticas para la interacción con nucleótidos de guanina, ya que mutaciones en las mismas reducen la unión a GTP y la actividad GTPasa.

La variabilidad entre las distintas subunidades α está concentrada en tres puntos fundamentales: la región amino terminal (residuos 1-40) y las zonas entre los aminoácidos 120-150 y 340-360.

Introducción

En base a estos resultados, es razonable suponer que las subunidades α de las distintas proteínas G derivan de un gen ancestral común.

Subunidad β

La purificación de G_s , G_t y G_i reveló la presencia de polipéptidos similares de 35 Kd asociados a la subunidad α . Estos polipéptidos conocidos como las subunidades β y γ de las proteínas G están fuertemente asociados entre sí, y pueden ser separados únicamente en condiciones desnaturalizantes.

La secuencia de aminoácidos de las subunidades β preparadas a partir de G_s , G_i o G_t , no mostraron diferencias. El complejo $\beta\gamma$ puede ser intercambiado, es decir que el complejo $\beta\gamma$ derivado de G_i o G_s puede interaccionar con $G_s\alpha$ (81)(82); o bien que $\beta\gamma$ de G_i o G_t pueden interactuar con $G_i\alpha$ o $G_t\alpha$ para reconstituir la actividad GTPasa estimulada por la luz a través de la rodopsina (83).

A pesar de que la subunidad β de la proteína G_t se visualiza en un gel desnaturalizante de poliacrilamida como una simple banda de 36 Kd, la subunidad β de otras proteínas G es un doblete de dos proteínas de peso molecular aparente de 36 y 35 Kd. Los cDNA que codifican para estas dos formas de la subunidad β han sido aisladas (84)(85) y las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de ellas poseen un 90% de homología.

Existe en ambas una secuencia líder no traducible en el extremo 5', que precede a la región codificante del mRNA de β y que es específica de tejido (86). Tanto β_{36} como β_{35} poseen la capacidad de inhibir la actividad de adenilato ciclasa, probablemente interaccionando con $G_s\alpha$.

Subunidad γ

La subunidad γ de G_s no se detectó en los primeros geles desnaturalizantes de poliacrilamida, debido a que el material era precipitado con ácido tricloroacético al 10%, y dicha subunidad es soluble en esas condiciones.

Recién pudo ser detectada cuando las preparaciones se hacían precipitando las proteínas G_i y G_s con acetona.

Si bien los geles bidimensionales de las subunidades γ derivadas de G_i y G_s son indistinguibles entre sí, difieren marcadamente de los derivados de $G_{t\alpha}$ (87). A su vez, anticuerpos dirigidos contra $G_{t\gamma}$ no reaccionan con las subunidades γ derivadas de G_i o G_s (88).

Han sido clonados los cDNA correspondientes a la proteína $G_{t\alpha}$ (89)(90), pero no ha sido reportado aún el clonado de las subunidades γ correspondientes a otras proteínas G.

Recientemente aparecieron evidencias electroforéticas e inmunológicas que indicarían que existen más de una subunidad γ no derivada de G_t (91).

Por lo tanto, la heterogeneidad de cada subunidad sugiere que cada receptor podría reconocer una estructura $\alpha\beta\gamma$ específica.

IV. MECANISMO DE ESTIMULACION E INHIBICION MEDIADA POR RECEPTOR DE LA ADENILATO CICLASA

En la medida en que los distintos componentes del sistema adenilato ciclasa fueron purificados y reconstituídos en vesículas lipídicas, se pudo obtener información con respecto a la forma en que estos componentes interaccionaban entre sí para llegar a un complejo sistema de regulación de la adenilato ciclasa (Figura 8).

En estado basal, las proteínas G están en su forma oligomérica con GDP fuertemente unidas a $G_{s\alpha}$.

Cuando el complejo hormona-receptor (H-R) interactúa con la proteína G, hay un cambio conformacional que lleva a la disociación del GDP. El complejo H-R-G es estable en ausencia de GTP (92)(93), pero en presencia de concentraciones celulares relativamente altas de GTP, el sitio de unión a nucleótidos de guanina es ocupado por el nucleótido. Como consecuencia de ello, la afinidad de H por R y de R por G-GTP, disminuye. Por otro lado, la unión de GTP "activaría" la proteína G reduciendo la afinidad de la subunidad α ahora unida a GTP por el complejo $\beta\gamma$. La presencia de Mg^{2+} favorece esta disociación. El complejo $G_{s\alpha}$ -GTP se une a la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa, incrementando manifiestamente su actividad con el sustrato MgATP.

En relación a esto, el uso de análogos no hidrolizables del GTP permite separar, cromatográficamente, el complejo $G_{s\alpha}$ -GTP de $\beta\gamma$. Este complejo $G_{s\alpha}$ -GTP es capaz de activar la adenilato ciclasa de la misma manera que la proteína G_s (47)(49)(58).

En lo que respecta a la inhibición del sistema, se ha observado que la activación de G_i por análogos no hidrolizables del GTP lleva a la separación de $G_{i\alpha}$ de $\beta\gamma$, que la inhibición depende de la presencia de G_s (94) y que la mayor capacidad inhibitoria recae sobre el complejo $\beta\gamma$.

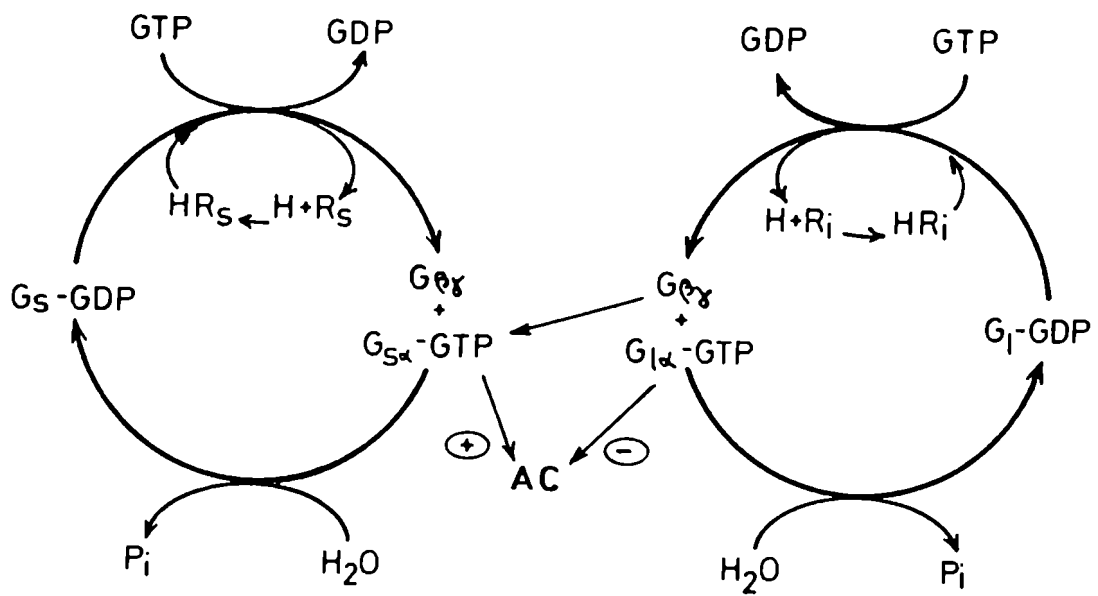


Figura 8: Mecanismo de estimulación e inhibición mediada por receptor de la adenilato ciclasa.

AC = adenilato ciclasa; H = hormona; R_s, R_i = receptor estimulador e inhibitorio.

En base a los datos obtenidos, se ha formulado una hipótesis, según la cual la activación hormonal de G_i lleva a la disociación de sus subunidades, el complejo $\beta\gamma$ liberado se une a $G_{s\alpha}$ llevando a la inactivación de la adenilato ciclasa. En apoyo de esta hipótesis, se observó que el complejo $\beta\gamma$ derivado de G_s , G_i y G_o son equipotentes en su capacidad de desactivar a $G_{s\alpha}$.

Es importante señalar que, si bien pequeña, se ha observado cierta inhibición de la actividad adenilato ciclasa por parte del complejo $G_{i\alpha}.GTP\gamma\delta$ (95), lo que lleva a algunos autores a suponer que $G_{i\alpha}$ tendría algún rol más directo en la inhibición de la adenilato ciclasa (96).

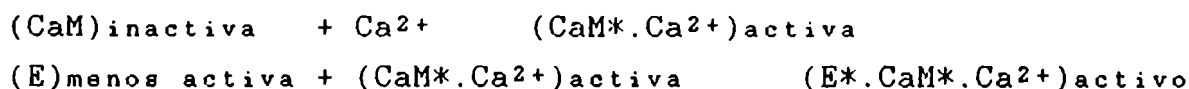
La desactivación de la proteína G, es decir la terminación de la señal, se debe a la actividad GTPasa dependiente de Mg^{2+} del complejo $G_{s\alpha}.GTP$, lo cual llevaría a la reasociación de $G_{s\alpha}.GDP$ con $\beta\gamma$ para formar G_s-GDP , quedando de esta manera completo el ciclo.

V. ADENILATO CICLASAS ESTIMULABLES POR CALMODULINA

El ion calcio ejerce una fuerte influencia en muchos procesos biológicos, como la movilidad celular, la contracción muscular, el flujo axonal, movimientos citoplasmáticos y cromosómicos, liberación de neurotransmisores, endocitosis y exocitosis.

En un gran número de tejidos de mamíferos, el Ca^{2+} participa en la regulación de los niveles de cAMP a través de una proteína moduladora capaz de unir Ca^{2+} . Esta proteína, conocida como calmodulina (CaM) modula la actividad de enzimas regulatorias claves, activando a la enzima correspondiente de la siguiente forma:

Introducción



La síntesis y degradación del cAMP están sujetos a la modulación por Ca^{2+} a través de la actividad de la adenilato ciclasa y de fosfodiesterasas dependientes de nucleótidos cíclicos sensibles a CaM.

La estimulación de la adenilato ciclasa por CaM fue indicada por primera vez por Bostrom (97) y Cheung (98).

Hoy en día se conocen muchas adenilato ciclasas de mamíferos que son estimulables por CaM, como por ejemplo, las de cerebro, plaquetas, esperma, tiroides, corazón, etc. Esta propiedad fue usada para purificar la enzima a través de columnas de afinidad de calmodulina-sepharosa (39)(41)(38)(40)(99).

Algunas adenilato ciclasas presentan un comportamiento bifásico frente al Ca^{2+} . Esto es, altas concentraciones del catión inhiben la actividad enzimática, mientras que la misma es estimulada por bajas concentraciones de Ca^{2+} . Esta estimulación es mediada por la CaM y antagonizada por inhibidores competitivos de la misma, como derivados de las fenotiazinas. Asimismo, la CaM disminuye la sensibilidad de la adenilato ciclasa al efecto inhibitorio producido por altas concentraciones de Ca^{2+} (100)(101).

No sólo se han encontrado adenilato ciclasas de mamíferos estimulables por CaM, sino que una propiedad similar fue descrita en la enzima del hongo *Neurospora crassa* (102), del protozoo Paramecium (103) y en las bacterias *Bordetella pertussis* y *Bacillus anthracis* (104).

En el caso de la *B. pertussis*, la misma secreta una serie de factores que estarían relacionados a la virulencia de la bacteria. Uno de los factores sería la adenilato ciclasa sensible a la estimulación por la CaM eucariota. En la medida que la CaM

no ha sido encontrada en procariotas, se ha formulado la hipótesis de que la adenilato ciclasa de esta bacteria pudo originarse a partir de una adenilato ciclasa eucariota que fue tomada por la bacteria a lo largo de su evolución (105). De hecho, Monneron y colaboradores encontraron que anticuerpos específicos contra la adenilato ciclasa de *B. pertussis* y de cerebro bovino dan reacción cruzada, lo que sugiere que la enzima de *B. pertussis* y su contraparte eucariota estarían relacionadas evolutivamente.

VI. cAMP EN BACTERIAS

La comprensión de la acción de los nucleótidos cíclicos en bacterias es una cuestión fundamental en biología. Los mecanismos y muchas de las consecuencias fisiológicas debidas a variaciones en los niveles de cAMP aún no son conocidos.

Se sabe desde hace muchos años que la capacidad de *E. coli* de fermentar la lactosa se inhibe cuando la glucosa se encuentra en el medio de cultivo (106). Este monosacárido determina la inhibición de la síntesis de las enzimas que intervienen en el catabolismo bacteriano. Esta capacidad de la glucosa de inhibir la síntesis de una variedad de enzimas se denomina "efecto glucosa". Southerland y col. (107) demostraron la presencia de cAMP en *E. coli* y observaron que su nivel variaba de acuerdo a la fuente de carbono disponible para la célula. Cuando la bacteria crece en un medio suplementado con glucosa, los niveles de cAMP están sensiblemente disminuidos, sin embargo, al agotarse la misma en el medio, los niveles de cAMP aumentan considerablemente. La readición de la glucosa vuelve a hacer descender los niveles del nucleótido.

Introducción

De estas observaciones surgió la idea de que la glucosa podría reprimir la síntesis de la β galactosidasa y otras enzimas catabólicas inducibles a través de una disminución en los niveles de cAMP.

El modelo aceptado hasta el momento para el mecanismo de acción del cAMP en *E. coli* y otras bacterias entericas coliformes fue propuesto por primera vez por Pastan y Perlman (108). Este modelo fue desarrollado para el operón lac.

La existencia de una mutante incapaz de sintetizar las enzimas sujetas al control de la glucosa, aún en presencia de cAMP, sugirió que el nucleótido cíclico requería de otra molécula intracelular para estimular la expresión génica (109)

Zubay y colaboradores (110), demostraron que extractos de esta mutante, denominada crp, no podían sintetizar β galactosidasa aún en presencia de cAMP, pero cuando dichos extractos se suplementaban con los de células normales, el defecto se corregía. Este grupo demostró que el factor ausente en crp era de naturaleza proteica. Posteriormente, Emmer y colaboradores (111), usando [3 H]cAMP, observaron que dicha proteína era capaz de unir el nucleótido cíclico y se denominó CRP o CAP (Proteína Receptora de cAMP).

Esta proteína es un dímero que tiene un peso molecular de 45.000 y está constituida por dos subunidades idénticas que unen una molécula de cAMP cada una de ellas. La proteína CRP tiene dos dominios: la porción NH₂ terminal que une cAMP y la COOH-terminal que se une al DNA. En presencia de cAMP, la proteína sufre un cambio alostérico. En esta conformación activa, la proteína CRP reconoce a zonas específicas del DNA, permitiendo ahora que la RNA polimerasa se una y comience la transcripción en un segundo sitio localizado a 30-50 nucleótidos del sitio de unión del CRP.

Introducción

Esta región del DNA a la que se une la RNA polimerasa está constituida por una zona rica en adenina y timina (A-T), la cual está flanqueada por zonas ricas en guanina y citosina (G-C). La zona de doble cadena rica en A-T, debido a su menor estabilidad produce la separación de las cadenas de DNA. Dickson y colaboradores (112) sugirieron que subsecuentemente la unión del complejo cAMP-CRP al DNA desestabiliza las regiones G-C adyacentes a la zona de interacción de la RNA polimerasa, favoreciendo la asociación de ésta al promotor y, por consiguiente, a la iniciación de la transcripción.

Las zonas promotoras de los operones lac, ara y gal fueron secuenciadas y se encontró una secuencia consenso que corresponde a la zona de unión del CRP al DNA.

VI.1. Rol del cAMP en la expresión de operones individuales

El papel fisiológico del cAMP en bacterias consiste en la estimulación del proceso de iniciación de la transcripción de los operones sensibles a glucosa a través de un control positivo mediado por cAMP vía su proteína receptora.

Entre los operones cuya regulación está mediada por los niveles de cAMP podemos citar al operón lactosa (113-116); el operón galactosa (117)(118); el triptofanasa (119); el operón deo (120); el regulón arabinosa (121)(122); el regulón maltosa (123) y el sistema D serina deaminasa (124).

VI.2. Rol del cAMP en la terminación de la transcripción.
Relación con Rho

En *E. coli*, los genes de los operones policistrónicos se expresan coordinadamente, pero parecería existir un control fino de la expresión de los genes distales con respecto a los proximales. Esto generalmente se refleja en el hecho de que los genes distales se expresan en menor grado que los proximales. Este fenómeno, conocido como polaridad, parecería ser general en operones policistrónicos (125)(126).

La polaridad tiene lugar a través del acoplamiento entre la traducción de los mensajeros policistrónicos y la terminación prematura de su transcripción, mediada por un factor de terminación, Rho.

Midiendo la velocidad de síntesis de los productos de genes proximales y distales de los operones lactosa y galactosa, se demostró que el cAMP, vía su proteína receptora CRP actuaría como modulador de la polaridad (127)(128)(129)(130).

Guidi-Rontani y colaboradores (131) demostraron que el efecto de polaridad es esencialmente transcripcional y que el complejo cAMP-CRP disminuye la polaridad interfiriendo con la terminación prematura de la transcripción.

VI.3. Otras funciones del cAMP en bacterias

Además del rol bien conocido del cAMP y CRP en la iniciación de la transcripción de operones catabólicos inducibles, el complejo regulatorio cAMP-CRP parece afectar otras funciones tales como la lisogenia de bacteriófagos, la replicación de plásmidos, la regulación de la síntesis de flagelos, fimbrias y pilis, la regulación de una variedad de enzimas asociadas a la membrana y la susceptibilidad a antibióticos. (132)(133)(134).

VI.4. Regulación de la concentración intracelular de cAMP

En bacterias, las concentraciones intracelulares de cAMP pueden ser reguladas de tres formas:

- a) El nucleótido puede ser excretado: los azúcares metabolizables estimulan el eflujo de cAMP en un proceso dependiente de energía (135).
- b) Degradación del cAMP: el cAMP puede ser degradado por la enzima cAMP fosfodiesterasa (PDE). En las mutantes de *E. coli* y *S. typhimurium* que carecen de la actividad PDE, el cAMP se acumula más que en cepas que poseen dicha actividad. El significado de esta enzima es desconocido y no hay evidencia que haga suponer que la misma cumple algún papel regulatorio de los niveles de cAMP.
- c) Regulación de la actividad de adenilato ciclasa: aparentemente, la actividad de adenilato ciclasa estaría regulada por interacciones con proteínas de transporte. Sobre esta regulación volveremos más adelante.

VI.5. Nucleótidos cíclicos en bacterias distintas a *Escherichia coli*

La presencia de cAMP ha sido detectada en muchas bacterias, como por ejemplo, *Myxococcus xanthus* (136)(137); *Streptomyces* (138)(139); *Nocardia* (140); cianobacterias (141-143); *Benevea (Vibrio) harveyi* (144); *Bordetella pertussis* (105)(145-147) y *Aspergillus niger* (148), entre otras.

Por otro lado, a pesar de la intensiva búsqueda del nucleótido cíclico, en muchas especies de *Bacillus*, así como en *Bacteroides frágiles* y en *Lactobacillus plantarum*, el cAMP no pudo ser medido.

VII. ADENILATO CICLASA EN BACTERIAS

La presencia de adenilato ciclasa en *E. coli* fue documentada en 1969 por diversos laboratorios (149)(150).

Los primeros trabajos indicaban que la enzima estaba localizada en la membrana citoplasmática (151). Yang y Epstein (152) han encontrado actividad adenilato ciclasa en la fracción citoplasmática y han demostrado que la enzima asociada a membrana puede ser extraída en forma soluble sin el uso de detergentes.

El peso molecular de esta enzima es de 95.000 dalton, el cual es coincidente con el peso molecular del producto del gen *cya* (153). La enzima funciona tanto con Mg^{++} como con Mn^{++} , siendo este último preferido a bajas concentraciones del catión.

VII.1. Regulación dependiente de CRP de la Adenilato ciclasa

Este tipo de regulación ha sido bien documentada, si bien el mecanismo por el cual el CRP regula la expresión o la actividad de la adenilato ciclasa aún no se conoce bien. Ha sido sugerido que el CRP actúa directamente sobre la transcripción del gen *cya* actuando como un represor (154)(155).

Majerfeld y colaboradores (155) han demostrado que el CRP regularía la adenilato ciclasa no sólo a nivel de la expresión génica sino también la actividad enzimática. Más recientemente, Joseph y colaboradores (156) trabajando con mutantes que carecían o producían en gran cantidad CRP, llegaron a la conclusión de que el CRP controla la actividad de la adenilato ciclasa más que la síntesis de la enzima.

VII.2. Relación entre la adenilato ciclasa y el sistema de transporte de carbohidratos dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS)

Peterkofsky (157) ha sugerido que un posible control de la actividad de la adenilato ciclasa se podría verificar a través de los sistemas de transporte de azúcares al interior de la bacteria.

Los azúcares como la glucosa, fructosa, manosa, sorbitol, manitol, etc., se transportan al interior de la célula como derivados fosforilados a través de un sistema de transporte específico que usa la energía derivada del fosfoenolpiruvato (PEP).

La descripción del sistema se observa en la figura 9. Una proteína citoplasmática, enzima I, es fosforilada por el PEP y a su vez, ésta fosforila a una pequeña proteína termoestable, también soluble, conocida como Hpr. Estas dos proteínas no presentan especificidad en cuanto al azúcar a transportar (158).

El transporte específico de azúcares requiere de otras dos proteínas unidas a membrana, la enzima II y en algunos casos, la enzima III. Estas enzimas son específicas para cada azúcar. La enzima III es fosforilada por el HPr \approx P y así, a su vez, ésta ahora fosforila al azúcar que es transportado a través de la membrana por la enzima II.

La enzima III específica para glucosa (Enz III Glu) parece controlar la actividad de la adenilato ciclasa. Según Postman y colaboradores (159) la Enz III(Glu) en su forma defosforilada actuaría como inhibidor de la actividad adenilato ciclasa (160)(161). Además, cuando la fuente de carbono es otra que la glucosa, la enz III(Glu) se acumula en su forma fosforilada y actuaría ahora estimulando la actividad de adenilato ciclasa.

Como puede apreciarse, el sistema PTS y el CRP participan en la regulación de la actividad de adenilato ciclasa. Los mecanismos de control de actividad de esta enzima, no son obser-

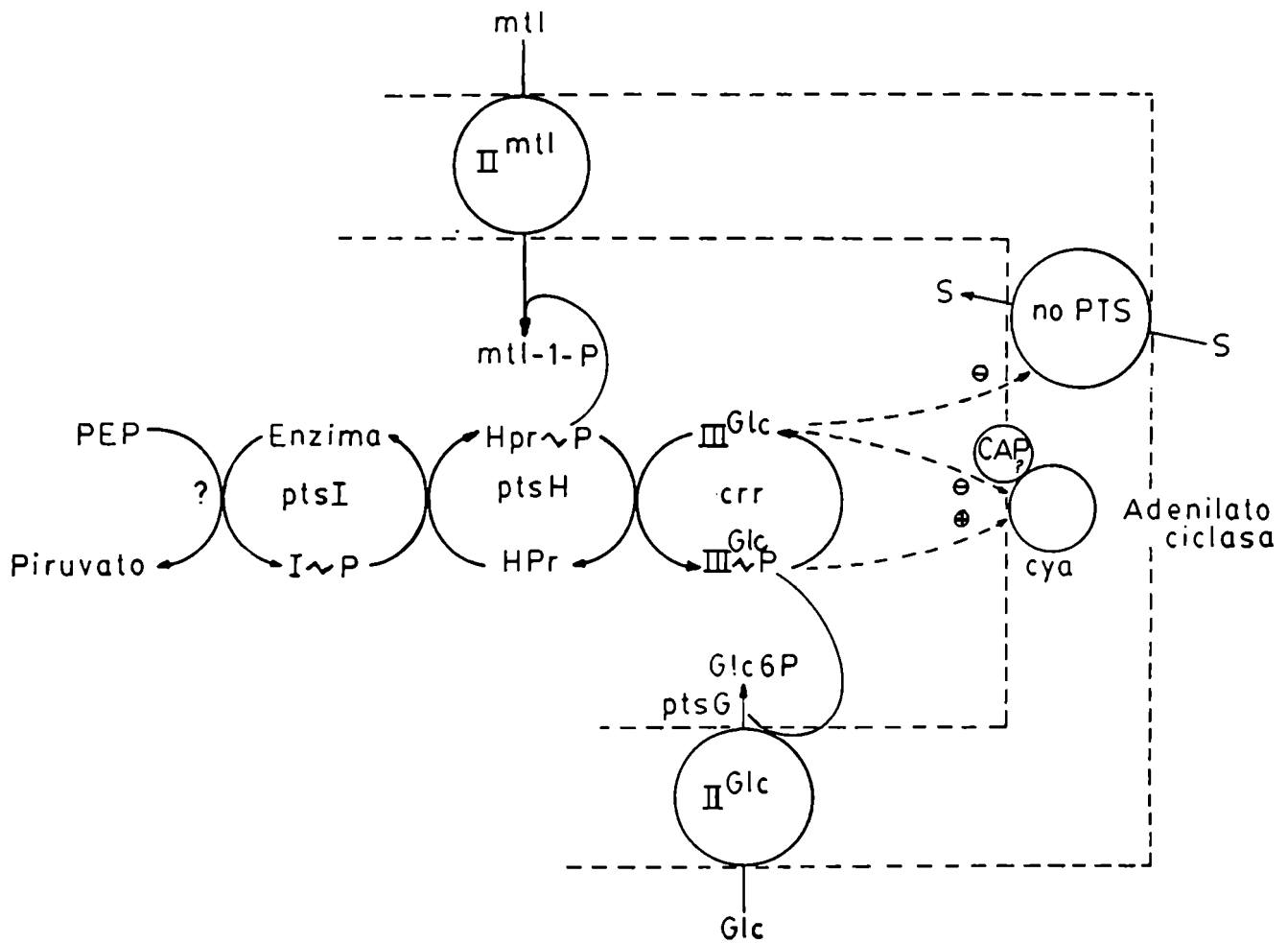


Figura 9: Sistema de transporte de carbohidratos dependiente de fosfoerolpiruvato (PTS).

vables en preparados libres de células. En este sentido, Peterkofsky y Gazdar (162) sugirieron que el gradiente electroquímico de protones contribuiría también a la regulación de la actividad de la adenilato ciclasa.

VII.3. Adenilato ciclasa en bacterias distintas a *E. coli* y *S. typhimurium*

Si bien los estudios presentados se realizaron en *E. coli* y parte de ellos se corroboraron en *S. typhimurium* la existencia de la adenilato ciclasa en bacterias fue primeramente puesta de manifiesto en *Brevibacterium liquefaciens*, en 1967 (163). Esta enzima fue posteriormente purificada, y se determinó para la misma un peso molecular de 175.000 D, por filtración en geles (164).

Más adelante, la existencia de la adenilato ciclasa fue indicada en otras bacterias, entre las que podemos citar: *Micrococcus lysdeikticus*, *Arthrobacter crystallopoietes*, *globiformis* y *citrens*, *Micrococcus flavus*, *Nocardia erythropolis*, *Corinebacterium equi*, *Bordetella pertussis*, *Nostoc moscorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* y *Aspergillus niger*, entre otras.

Teniendo en cuenta que el cAMP está involucrado en la regulación del catabolismo en bacterias entéricas coliformes, parece posible que este nucleótido cíclico regule la fijación de nitrógeno en respuesta a la energía metabólica.

En *Rhizobium japonicum*, el cAMP reprime la síntesis de tres enzimas involucradas en la fijación de amonio: glutamina sintetasa, glutamato sintetasa y glutamato deshidrogenasa. Esto podría afectar la regulación de la fijación de nitrógeno en estas células (165).

Introducción

El *Rhizobium japonicum* tiene una hidrogenasa catabólica, cuya actividad es inhibida por el malato. El agregado de cAMP revierte esta inhibición. Este efecto requiere síntesis *de novo* de proteínas, indicando que estaría involucrada la síntesis de algún tipo de activador proteico. Cuando las bacterias son cultivadas en presencia de malato, se observan niveles bajos de cAMP. Por otro lado, cuando las células crecen con glutamato como fuente de carbono, que permite altos niveles de hidrogenasa, la concentración de cAMP es alta. Se ha propuesto que los niveles de cAMP varían en respuesta a la disponibilidad de una fuente de carbono oxidable y que el cAMP también regula la síntesis de una proteína que activa la hidrogenasa (166)(167).

Ditta y col. construyeron en 1980 (168) una biblioteca genómica de *Rhizobium meliloti* en el vector de amplio rango de huésped pRK290.

Haciendo uso de esta biblioteca, Kiely y col. en 1983 (169) complementaron con fragmentos de DNA de *R. meliloti* clonados en pRK290 mutantes de *E. coli* que tenían una delección en el locus de la adenilato ciclasa (*cya*).

Las transconjugantes que habían recibido dicho plásmido híbrido fueron cultivadas en distintos medios selectivos permitiendo identificar de esta manera bacterias que habían recuperado las funciones del gen *cya*.

Desde el momento que se conoce que la expresión del operon *lac* de *E. coli* está bajo el control del cAMP y su proteína receptora (CRP), las mutantes *cya* resultan fenotípicamente Lac-. Asimismo, estas mutantes *cya*, tampoco fueron capaces de crecer en presencia de azúcares como maltosa y manitol, cuya utilización también está regulada positivamente por el cAMP. En consecuencia, los autores seleccionaron aquellas bacterias, transconjugantes capaces de utilizar la lactosa, la manosa y el manitol como fuente de carbono.

Introducción

Como se ve en la Tabla 2, se obtuvieron tres revertantes del fenotipo *cya* capaces de utilizar los tres azúcares como fuente de carbono.

Los niveles de cAMP y de actividad β galactosidasa obtenidos en las tres cepas revertantes fueron inferiores a los que presentaba la cepa *cya*⁺ (Tabla 3). Esto es explicable por el hecho de que el gen *cya* en el plásmido pRK290 se encuentra bajo el control de su propio promotor, que es de *R. meliloti*, el cual puede no ser tan eficiente en *E. coli*.

Estos autores no identificaron el producto de la secuencia clonada, y hasta el momento no hay ningún estudio respecto de la estructura, parámetros moleculares e hidrodinámicos o cinética de la adenilato ciclasa de *R. meliloti*.

VIII. ASOCIACION *RHIZOBIUM* LEGUMINOSA

El N₂ atmosférico es la principal fuente de nitrógeno de los seres vivos a través del proceso de la fijación biológica de dicho gas. Esta fijación de N₂ está restringida a algunos procariones, los cuales cuentan con un sistema apropiado que les permite reducir el N₂ atmosférico a NH₃. El NH₃ es ulteriormente asimilado a través de la síntesis de compuestos fundamentales para la vida.

VIII.1. Bacterias fijadoras de N₂

Las bacterias que poseen la capacidad de fijar el N₂ atmosférico pueden dividirse en dos grandes grupos: los fijadores libres y los simbióticos.

| Cepa | Fuente de Carbono | | |
|--|-------------------|---------|---------|
| | Lactosa | Maltosa | Manitol |
| <i>E. coli</i> CAA8306-41(cya ⁺) | ++++ | ++++ | ++++ |
| (cya) | | | |
| pRK290.214 | +++ | ++ | ++ |
| pRK290.2046 | +++ | ++ | ++ |
| pRK290.265 | ++ | + | |

TABLA 2: Crecimiento de los clones transcojugantes cya en presencia de distintas fuentes de carbono

| Cepa | cAMP (pmoles/ mg proteína) | Actividad β -galacto- sidasas (nmoles/min/ mg/proteína) |
|---------------------------------|----------------------------------|---|
| <i>E. coli</i> CAA8306-41(cya+) | 146.00 | 1965 |
| (cya) | 1.28 | 118 |
| pRK290.214 | 21.42 | 854 |
| pRK290.2046 | 20.00 | 873 |
| pRK290.265 | 15.40 | 536 |

TABLA 3: Niveles de cAMP y actividad β galactosidasas en las cepas revertantes

Bacterias fijadoras libres de N₂

| <u>Aeróbicos</u> | <u>Anaeróbicos</u> |
|--|---|
| <i>Azotobacter spp., Azotomonas, Pseudomonas spp., Klebsiella spp., Nocardia spp., Nostoc, Calothrix, Anabaena, Fischerella, Stigonema, etc.</i> | <i>Clostridium spp., Aerobacter aerogenes, Desulfobibria desulfuricans, Rhodospirillum rubrum, Rhodopseudomonas spp., Chromatium, Rhodomicrobium vanielli, etc.</i> |

Bacterias simbióticas fijadoras de N₂

| <u>En plantas leguminosas</u> | <u>Plantas no leguminosas</u> |
|---------------------------------------|--|
| Bacterias del género <i>Rhizobium</i> | Klebsiella en asociación a un actinomicete. Cianófitas en asociación con líquenes |

Nos ocuparemos de los fijadores simbióticos de N₂; en especial de los que establecen dicha relación con plantas leguminosas.

VIII.2. Fijadores simbióticos de N₂. El género *Rhizobium*

Las bacterias del género *Rhizobium* pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*. Son bastones y cocos aeróbicos, Gram negativos, capaces de infectar las raíces de determinadas leguminosas y desarrollar la formación de nódulos radiculares.

Se establece entonces, una relación simbiótica entre la bacteria y la planta, en la que la leguminosa le aporta a la bacteria (que ahora se encuentra en forma de bacteroide) los nutrientes que éste necesita, y el bacteroide es capaz de fijar el N₂ atmosférico, transformándolo en compuestos de NH₄⁺ asimilables por la planta.

La mayoría de los *Rhizobium* son específicos en su asociación con las leguminosas (170).

| <u><i>Rhizobium</i></u> | <u>Huésped preferido</u> |
|---|--|
| Crecimiento rápido | |
| <i>R. meliloti</i> | <i>Meliloti, Melilotus, Trigonella</i> |
| <i>R. leguminosarum</i> | <i>Pisum Viciam Luthyrus, Lens</i> |
| <i>R. trifolii</i> | <i>Trifolium</i> |
| <i>R. phaseoli</i> | <i>Phaseolus</i> |
| <i>R. japonicum</i> | <i>Vigna, Glyceria</i> |
| Crecimiento lento (<i>Bradyrhizobium</i>) | |
| <i>R. japonicum</i> | <i>Glycine</i> |
| <i>R. lupini</i> | <i>Lipinus</i> |

IX. FORMACION DEL NODULO

IX.1. Reconocimiento y unión. Lectinas

Se ha demostrado en soja que la nodulación de las raíces está restringida al área comprendida entre la punta de la raíz (RT) y el pelo radicular emergente más pequeño (SERH).

Las células radiculares se hacen progresivamente menos susceptibles a la nodulación, a medida que éstas se diferencian, dando lugar a pelos radiculares maduros (171)(172)(173). En el caso de la alfalfa, la infección y la nodulación pueden ocurrir en cualquier zona del pelo radicular, pero la frecuencia de nodulación en las zonas maduras es mucho menor (174).

Aparentemente, el huésped posee un mecanismo rápido de respuesta, el cual inhibe una subsecuente nodulación del tejido radicular joven, lo cual parecería ser causado por la terminación del proceso de infección.

Esta inhibición es específica para el tipo de *Rhizobium* que infectó en primera instancia. Una segunda infección con otro tipo de *Rhizobium* compatible, presenta una frecuencia de nodulación comparable a la encontrada inoculando únicamente con el segundo tipo de *Rhizobium* (175).

La disponibilidad de nitrógeno puede reducir el número de canales de infección iniciados (176)(177), así como inducir la senescencia prematura de nódulos efectivos (178)(179).

Albersheim y Anderson-Prouty (180), propusieron que las lectinas de la planta huésped interactúan selectivamente con los polisacáridos de la superficie celular del *Rhizobium* compatible.

Muchos trabajos han demostrado una unión específica entre las lectinas de la planta huésped a un rhizobio específico (181)(182), así como una alta correlación entre dicha unión y el grado de infectividad en la simbiosis entre el *R. trifolii* y el trébol (183).

Las cepas infectivas de *R. trifolii* poseen polisacáridos que dan reacción cruzada con la superficie celular de los pelos radiculares del trébol. Estos antígenos que dan reacción cruzada, se unen a lectina purificada del trébol o trifolina A (184). Por lo tanto, las lectinas de las raíces del trébol actúan como puente entre el *R. trifolii* y el pelo radicular (183).

La unión del rhizobio a lectinas de la planta se ve afectada por la edad del cultivo de *Rhizobium*, por el pH del medio y la concentración salina (185)(186)(187).

La unión del *Rhizobium* a los pelos radiculares de la planta se realizaría en dos etapas: la primera, cuando el rhizobio se une a las lectinas de la planta, y la segunda etapa, caracterizada por la adherencia del *Rhizobium* a la superficie del pelo radicular a través de fibrillas extracelulares (188)(189). El *Rhizobium* sintetizaría estas fibrillas de celulosa para unirse firmemente a la superficie radicular (190).

De hecho, mutantes con un número reducido de fibrillas o anticuerpos contra las mismas, dan como resultado un número menor de bacterias unidas a las raíces y una reducción en la formación de nódulos. Esta segunda etapa es prácticamente irreversible, y sería importante para el intercambio de señales moleculares entre el huésped y la bacteria que podrían ser la señal para inducir respuestas fisiológicas, las cuales llevarían al desarrollo del proceso de simbiosis.

IX.2. El plásmido Sym

En *Rhizobium meliloti* se observa la presencia del megaplásmido Sym que lleva los genes que confieren la capacidad de nodular la planta huésped. Los genes de nodulación (nod) están localizados en la vecindad de los genes de fijación de nitrógeno (nif)(191)(192)(193).

Introducción

En *R. meliloti*, los genes esenciales para la nodulación están organizados en dos *clusters*, uno de los cuales consiste en cuatro genes (194)(genes nod comunes), que están conservados en un amplio rango de rhizobios en lo que respecta a la secuencia nucleotídica (195)(196)(197)(198), y a su función, lo cual se demostró en experimentos donde genes nod comunes de una especie de *Rhizobium* pueden complementar los genes equivalentes en *R. meliloti* (191)(194).

Los genes comunes nod (nod ABC y D) están organizados en dos unidades transcripcionales (195)(199). El gen nod D, en conjunción con el exudado de la planta, controla la expresión de la transcripción de los genes nod ABC (199).

Horvath y col. (200) identificaron una segunda región nod localizada entre la región de los genes comunes nod y los genes nif, cuyos genes (hsn) están involucrados en la especificidad de la nodulación con respecto al huésped. Las mutantes en los genes hsn no pueden ser complementados por plásmidos que tienen como insertos genes de nodulación de otros rhizobios como *R. leguminosarum*.

Esta región está formada por cuatro genes designados hsn A B C y D. Estos genes codifican para cuatro proteínas y están organizados en dos unidades transcripcionales.

El gen hsn D es requerido para el enrulamiento de los pelos radiculares del huésped específico y la iniciación del nódulo, mientras que los genes hsn A B C controlan el crecimiento del canal de infección de los pelos radiculares.

La transferencia de genes del plásmido Sym de *R. meliloti* a *Agrobacterium tumefaciens* permite a la bacteria inducir la formación de nódulos en alfalfa, pero no en trébol, lo cual demuestra nuevamente que los genes hsn están involucrados en la especificidad de huésped.

IX.3. Enrulamiento de los pelos radiculares

Uno de los primeros pasos visibles en el proceso de infección de leguminosas por un rhizobio compatible, es el enrulamiento de los pelos radiculares, proceso a través del cual, el rhizobio queda atrapado por el "rulo" radicular. El proceso es inducido por una señal molecular, ya que los medios filtrados de cultivos de *Rhizobium* lo inducen (201)(202)(203).

Los medios de cultivo libres de células, exopolisacáridos y polisacáridos capsulares han sido implicados, como el o los factores responsables del enrulamiento radicular. Aparentemente, sería necesaria la presencia de al menos, dos factores; uno dializable y termoestable que tiene actividad biológica (203)(204), y otro no dializable y termolábil, el cual podría contener enzimas que modifican la superficie celular del *Rhizobium* desde el momento que el factor no produce por sí mismo enrulamiento de los pelos radiculares (201)(205).

Se han aislado mutantes de *R. trifolii*, *R. meliloti* y *R. leguminosarum* defectivos en el enrulamiento de los pelos radiculares. Estas mutantes mapean en el plásmido simbiótico Sym de cada cepa. Cuando se transfiere el plásmido Sym heterólogo a una mutante, se recupera la capacidad de enrulamiento y nodulación (206).

Esto implica que los genes involucrados (hac) no son específicos de un tipo de *Rhizobium*, y que los mismos están conservados en una variedad de *Rhizobia*. La expresión de los genes hac está aparentemente controlada por la presencia de la planta. Estos genes no se expresan en rhizobios en vida libre o en su forma de bacteroide.

En presencia de exudados de alfalfa se ha demostrado (199) la expresión de fusiones nod C:lac Z. El o los factores en el exudado esencial para la inducción de este gen hac es termoestable y de bajo peso molecular.

Introducción

Un segundo gen *hac*, *nod D*, es necesario para la inducción de *nod C* y, probablemente, se trata de un gen regulador. Se ha indicado la inducción de la expresión de *nod* (207) en *R. trifolii* por un compuesto de bajo peso molecular en los exudados radiculares. Este factor que fue identificado como la luteolina, es una flavona y se sintetiza normalmente en plantas. Es aceptado en este momento, que la activación del promotor de *nod ABC* está mediada por el producto del gen regulatorio *nod D*, y que requiere inductores flavonoides (208)(209)(210)(211)(212)(213).

IX.4. Iniciación del nódulo. Canal de infección

Se ha demostrado la presencia de un principio de origen bacteriano que induce la organogénesis del nódulo. La naturaleza química de dicho principio no ha sido aún identificada (214).

La organogénesis puede ser disparada a distancia por esta señal química y es independiente de la formación del canal de infección (215)(216)(217).

El canal de infección es una estructura tubular de origen vegetal en el cual el rhizobio cruza el pelo radicular, y pasa a través de las células corticales. Una vez liberado del canal de infección, es encapsulado en una membrana derivada del huésped (membrana peribacteroide), y el rhizobio se diferencia a bacteroide.

La célula vegetal infectada continúa diferenciándose en un nódulo efectivo para la fijación de nitrógeno. La formación del nódulo es iniciada en un punto donde el rulo del pelo radicular rodea al rhizobio (218)(219). Luego de ello, el material de las paredes celulares del huésped es depositado internamente en el punto donde el rhizobio es atrapado. Esto sugiere que la pared

de la célula del huésped es degradada en este punto, y que una nueva capa de pared celular es depositada con la formación del canal de infección.

Los polisacáridos de la superficie celular del *Rhizobium* (polisacáridos capsulares, Lipopolisacáridos, β -2 glucanos y exopolisacáridos) funcionan como señales moleculares que inducen las enzimas del huésped necesarias para la degradación de la pared vegetal con la consiguiente formación del canal de infección (220)(221).

De hecho, el pretratamiento de semillas de trébol y *cowpea* con bajas concentraciones de polisacáridos de la superficie celular del *Rhizobium* da lugar a un incremento en el número de canales de infección y de nódulos (222)(223)(224)(225).

Una vez que el canal de infección ha atravesado el pelo radicular hacia zonas corticales, la bacteria es liberada por un proceso activo al meristema del nódulo. Las bacterias son recubiertas con la membrana peribacteroide derivada del plasmalema. Las mutantes de *R. japonicum* que no son liberadas del canal de infección son degradadas dentro del mismo (226)(227).

IX.5. Proteínas nodulares específicas del huésped

El huésped sintetiza proteínas específicas (leghemoglobina, nodulinas) las cuales se inducen en estadios tempranos de infección.

Las nodulinas son proteínas específicas del nódulo que están codificadas por la planta. Se las ha aislado de nódulos de arveja (228), alfalfa (229) y soja (230)(231).

Hay dos tipos de nodulinas c-nodulinas y s-nodulinas (232).

c-nodulinas o nodulinas comunes:

se llaman así porque son comunes a todos los nódulos y están involucradas en la manutención del proceso de fijación de nitrógeno.

s-nodulinas:

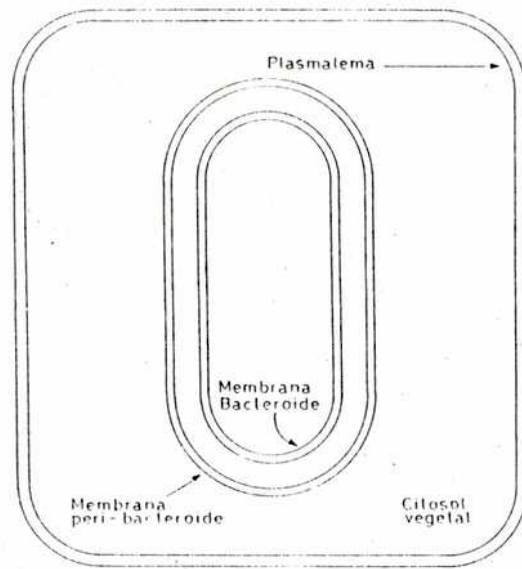
están involucradas en el metabolismo del carbono y nitrógeno en los nódulos. Estas son específicas de cada especie. Por ejemplo, el número y tipo de nodulinas aisladas en nódulos de alfalfa es diferente al de aquellas aisladas en arveja o soja (228)(229)(230), si bien algunas de ellas dan reacción antigénica cruzada indicando que las mismas podrían compartir propiedades fisiológicas.

Nos ocuparemos de la leghemoglobina en la próxima sección.

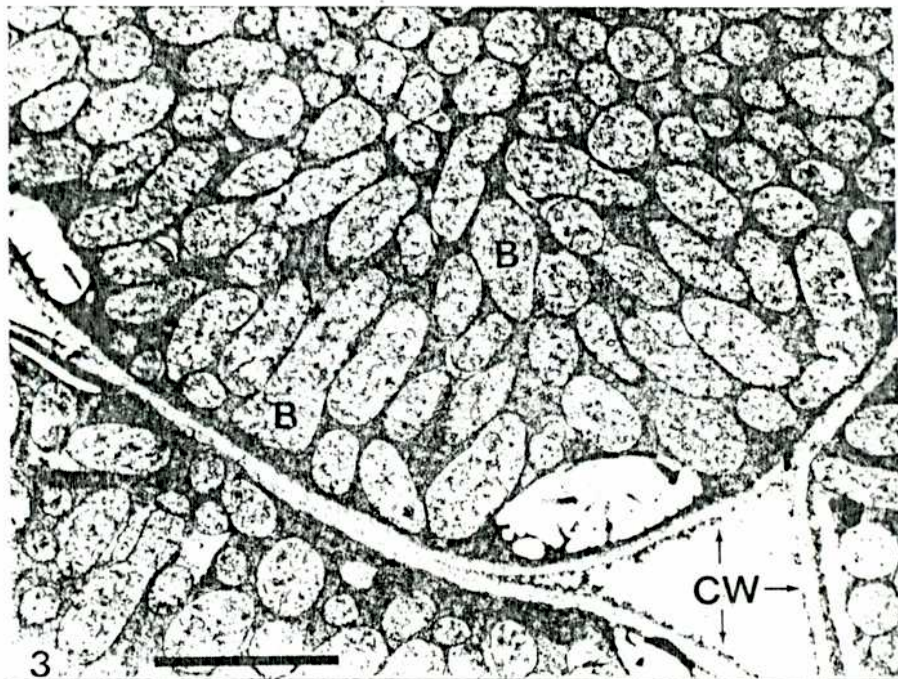
X. FISILOGIA Y METABOLISMO DEL NODULO

Los nódulos radiculares consisten en estructuras altamente especializadas dentro de las cuales las condiciones son tales que las células derivadas de los rhizobios (bacteroides) fijan el N_2 atmosférico y las células de la planta asimilan el N_2 fijado.

En un nódulo, los bacteroides están incluidos, individualmente o en grupos por la membrana peribacteroide, la cual deriva del plasmalema de la planta y está en orientación invertida de tal forma que el bacteroide queda en contacto con la superficie externa de dicha membrana (Figura 10 a y b).



a



b

Figura 10a: Esquema de distribución de las membranas en el nódulo radicular.

10b: Fotografía de un nódulo radicular donde se pueden observar los bacteroides (b) embebidos en citoplasma vegetal. CW = pared celular.

X.1. Formación de ATP y leghemoglobina

En el nódulo, el bacteroide recibe los hidratos de carbono necesarios para la formación de ATP desde el citoplasma vegetal.

En el bacteroide, la generación de ATP es un proceso aeróbico, es decir que requiere O₂. El bacteroide, debido a la alta densidad bacteriana, tiene problemas en recibir la suficiente concentración de O₂. Pero, por otro lado, una concentración alta de O₂ libre inactivaría a la nitrogenasa y reprimiría su síntesis (233).

El pigmento rojo, leghemoglobina (Lb), resuelve este inconveniente. La misma es capaz de formar un complejo con el O₂ (Lb.O₂) y transportarlo, de esta forma, con un alto flujo pero no permitiendo que la concentración de O₂ libre en el bacteroide sea tal que inactive a la nitrogenasa o reprima su síntesis (234).

La apoproteína de la Lb está codificada por el genoma de la planta (235). La situación no es tan clara respecto al origen del grupo hemo. Mutantes de *Rhizobium* deficientes en la biosíntesis del hemo, dieron como resultado nódulos blancos (falta de leghemoglobina libre), pequeños y deficientes en la fijación de N₂ (236)(237)(238). Por otro lado, Guerinot y col. en 1986 (239) obtuvieron mutantes de *Bradyrhizobium japonicum* deficientes en la síntesis del grupo hemo, las cuales fueron capaces de formar nódulos normales capaces de reducir el acetileno. Evidentemente, la planta de soja fue capaz de contrarrestar la falta de δ -aminolevulinico sintetasa del *B. japonicum*.

X.2. Fijación de N₂. Movimiento de amonio y síntesis de compuestos nitrogenados

La fijación de N₂ es un proceso en el cual el N₂ atmosférico en presencia de H⁺ es reducido a 2NH₃ por el aporte de 8e-



Existe una hidrogenasa, producto del gen *hup*, la cual oxida al H_2 producido por la nitrogenasa, reduciendo el O_2 y produciendo ATP (240). La expresión del *hup* está controlada por la planta desde el momento que una determinada cepa de *Rhizobium* puede expresar la enzima en una leguminosa y en otras no (241).

Como vemos, el producto final de la nitrogenasa es el NH_4^+ , y la asimilación del mismo en compuestos orgánicos es llevada a cabo por la planta. El NH_4^+ pasa por difusión simple (242) al citosol de la planta, donde la alta actividad de la glutamina sintetasa (243) mantiene un gradiente de concentración para el movimiento del NH_4^+ desde el bacteroide a la planta.

A partir del producto de la actividad de la glutamina sintetasa, en el citoplasma del nódulo, se sintetizan una serie de compuestos nitrogenados que luego son transportados por el xilema a toda la planta, como se puede ver en la Figura 11.

XI. BACTEROIDE

Como vimos, el proceso de formación del nódulo es complejo, dando como resultado una célula vegetal que contiene células rhizobiales pleomórficas denominadas bacteroides, las cuales poseen diferencias bioquímicas respecto del rhizobio que les dio origen.

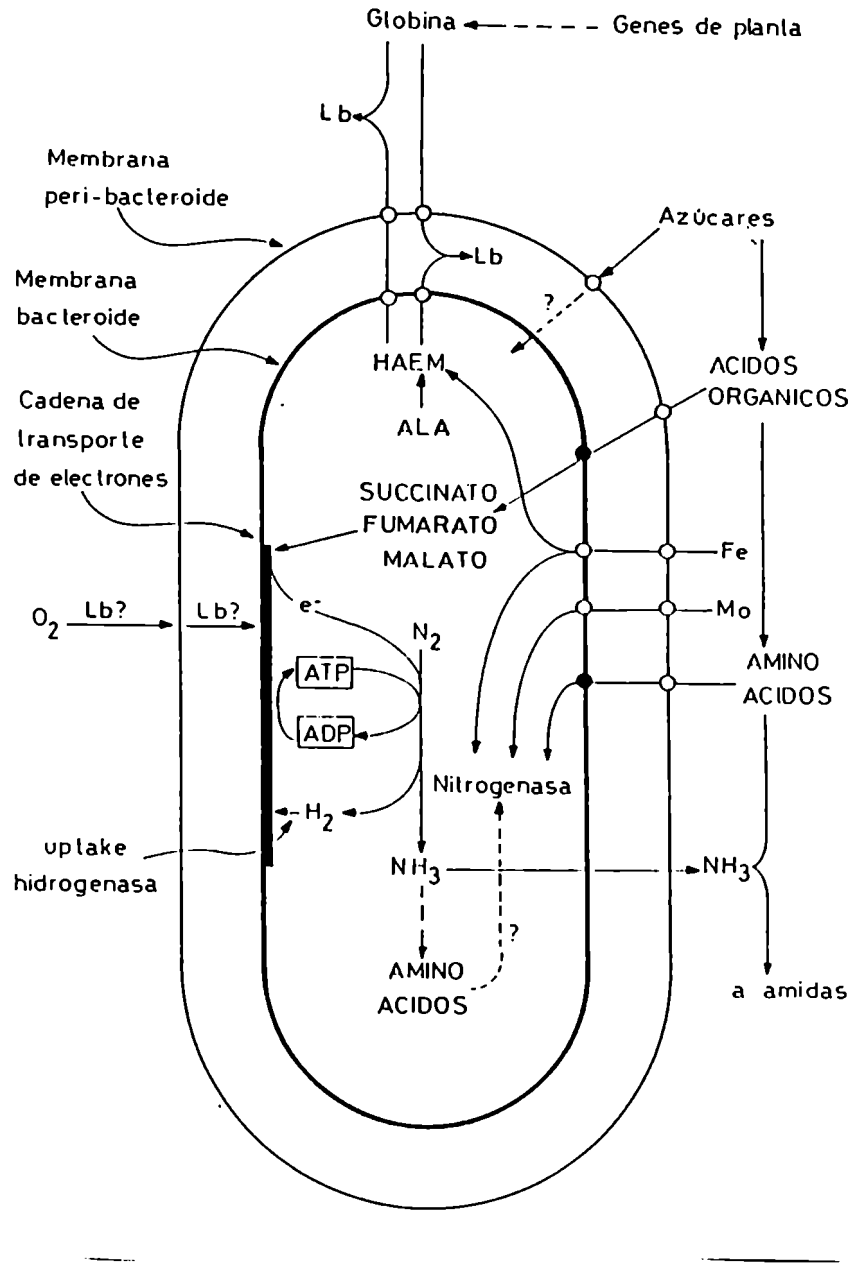


Figura 11: Diagrama de los intercambios metabólicos entre la planta y el bacteroide en nódulos fijadores de N₂.

● Sistema de transporte conocido; ○ Sistema de transporte potencial; Lb: leghemoglobina; ALA: ácido δ-aminolevulínico.

XI.1. Mecanismos de transporte y metabolismo

La esencia del sistema simbiótico radica en la comunicación metabólica entre los dos organismos (244). Si bien hay una gran variedad de compuestos accesibles en el citosol vegetal, los bacteroides son capaces de usar un limitado número de los mismos como fuente de carbono.

En bacteroides de *R. japonicum*, la glucosa, al igual que la lactosa, la sacarosa, el malonato, la glucosa-6-fosfato, y el mio-inositol, no son transportados activamente (245)(246), mientras que sí lo son en *R. japonicum* en vida libre (247).

En *R. courpea*, el sistema de transporte de fructosa y la fructoquinasa son inducibles por la presencia de fructosa o sacarosa, mientras que la invertasa se induce al crecer las bacterias en presencia de sacarosa. Los bacteroides aislados de nódulos de *Vigna unguiculata* no transportan fructosa ni sacarosa y carecen de invertasa y fructoquinasa.

El transporte de ácidos orgánicos reviste un particular interés, ya que se ha demostrado que los mismos son oxidados en bacteroides y que proveen, por lo tanto, la energía necesaria para el proceso de fijación de N₂ (248).

El succinato se transporta al bacteroide en forma activa a través del sistema de transporte de los ácidos dicarboxídicos (Dct). Este sistema transporta también fumarato, malato y otros análogos del succinato (246)(249)(250)(251). Mutantes defectivas en el sistema Dct son capaces de nodular (Nod⁺), pero no fijan N₂ (Fix⁻)(252). Una situación similar se da en mutantes de la succinato deshidrogenasa (250). Esto sugiere un rol fundamental para el succinato, fumarato y malato en la fijación de N₂.

Las mutantes defectivas en el transporte o metabolismo de otros azúcares no mostraron alteraciones en los mecanismos de simbiosis (252)(253)(250)(254). Aún mutantes que carecen de la

actividad piruvato deshidrogenasa (255), donde la utilización de azúcares C₆ y C₁₂ está impedida resultan ser Fix⁺; esto está indicando la importancia de los ácidos dicarboxílicos en la fijación de N₂.

En la Figura 12 vemos esquematizado un diagrama de los intercambios que tienen lugar entre el bacteroide y la célula vegetal.

Los azúcares en general no son metabolizados por los bacteroides de *Rhizobium* (256)(257), a pesar de que algunas enzimas de los mecanismos de E.D. y P.P. están presentes en los bacteroides de *R. leguminosarum* (255), si bien la actividad de las enzimas encontradas es mucho menor que la presente en el *R. leguminosarum* en vida libre. Por el contrario, los bacteroides del *R. japonicum* carecen de las enzimas para los mencionados caminos metabólicos.

En general es aceptado que la utilización de las hexosas no es la fuente primaria de energía en bacteroides.

Las mutantes que carecen de las enzimas para el catabolismo de las hexosas, como la glucoquinasa, fructoquinasa, fosfoglucoisomerasa y la piruvato deshidrogenasa pueden formar nódulos fijadores de N₂, si bien el proceso de nodulación puede ser algo más lento (255)(258).

Los ácidos orgánicos son considerados la fuente de energía primaria en los bacteroides (252)(253)(256). Los bacteroides poseen un ciclo de los TCA funcional para la oxidación de los ácidos orgánicos. El buen funcionamiento de este ciclo es fundamental para que tenga lugar la fijación de N₂.

Las mutantes que carecen de succinato deshidrogenasa o de α -cetoglutarato deshidrogenasa (259)(260) son incapaces de formar nódulos efectivos para la fijación de N₂.

Se ha observado en bacteroides la presencia de enzimas requeridas para la producción de los intermediarios biosintéticos para el ciclo de los TCA. Se detectaron carboxilasas y malato

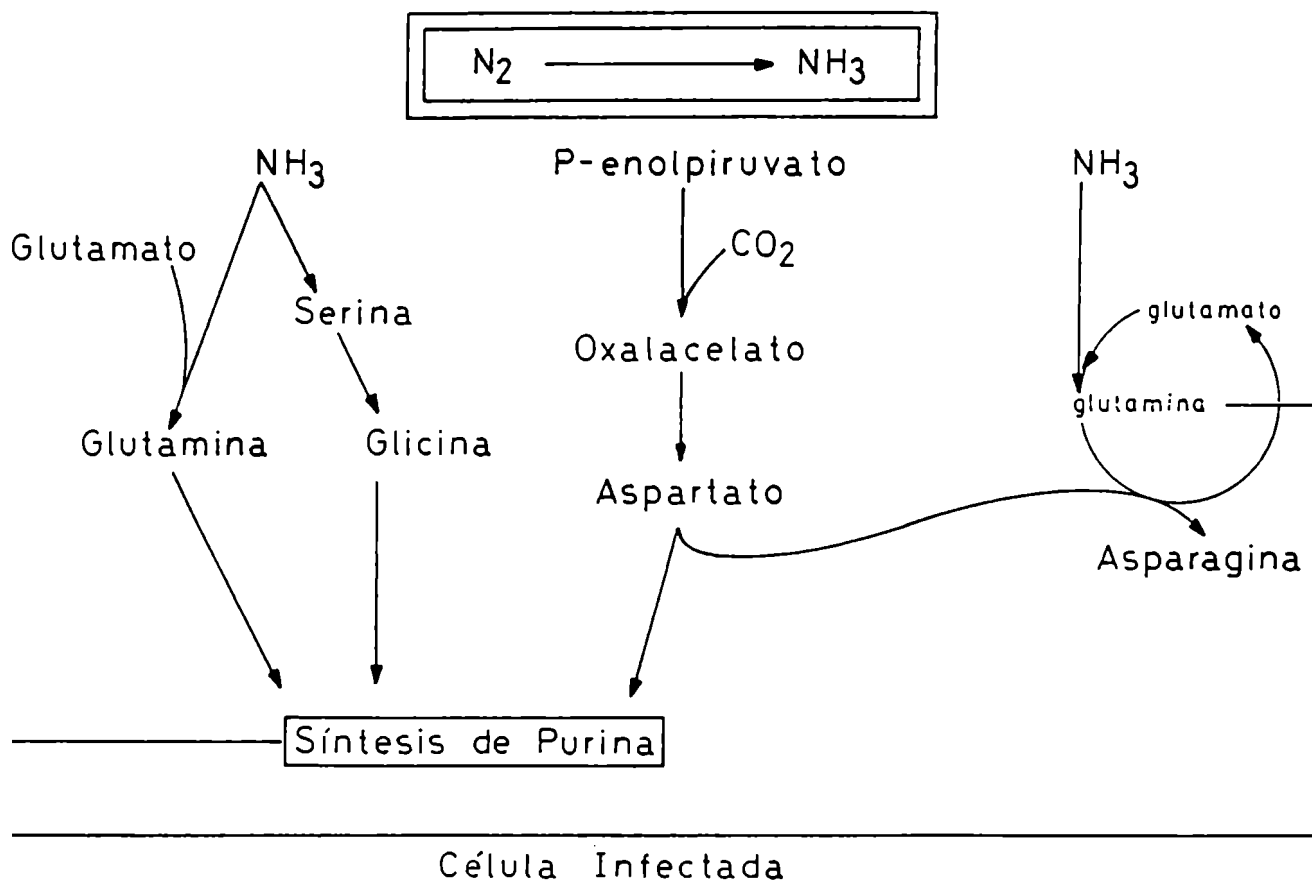


Figura 12: Asimilación de nitrógeno en nódulos de leguminosae.

deshidrogenasas en bacteroides (261)(262). Además, la PEP sintetasas, la PEP carboxilasa, la OAA dicarboxilasa y la piruvato quinasa no fueron observadas en células de *R. meliloti* en vida libre (259).

Los bacteroides almacenan los hidratos de carbono como poli β hidroxibutirato (PHB), el cual puede representar hasta el 50% de peso seco del bacteroide (263). El PHB es depolimerizado a β hidroxibutirato (HB), el cual, luego de pasar a acetoacetato es finalmente oxidado a través del ciclo de los TCA (263)(264). La dehidrogenación del HB puede proveer el suficiente poder reductor como para llevar a cabo la fijación de N_2 (265).

El metabolismo del acetato vía el ciclo de los TCA provee de poder reductor adicional y de ATP para la fijación de N_2 . Se ha indicado la existencia, al menos parcial, del ciclo del glioxalato en bacteroides de *R. japonicum* (266), si bien no pudo demostrarse la existencia del mismo en bacteroides de *R. meliloti* y *R. japonicum* (267).

XII. cAMP EN PLANTAS SUPERIORES

En 1970 por primera vez, se indicó la presencia de cAMP en tejidos de plantas superiores (268)(269). Estos trabajos fueron duramente criticados, basándose en el hecho de que los mismos presentaban una evidencia indirecta derivada de la observación de efectos fisiológicos por el agregado de cAMP exógeno o bien por utilizar métodos cromatográficos que mostraban un alto margen de error, ya que los mismos no podían distinguir entre el 3'-5'cAMP y su isomero 2'-5'cAMP.

Recién en 1980, haciendo uso de la espectrometría de masa, Newton y col. (270) pudieron demostrar la presencia inequívoca de cAMP en *Phaseolus vulgaris*.

La concentración de cAMP en plantas varía drásticamente de especie a especie, en valores que oscilan entre 1 y 1000 pmoles cAMP por gramo de tejido seco.

Se ha indicado la presencia de fosfodiesterasas de cAMP y proteínas que unen cAMP en tejidos vegetales (271). A partir de 1970 surgieron una serie de trabajos en los que aparentemente se medía la actividad adenilato ciclasa en plantas superiores (268) (271).

Los principales problemas que se presentaban en el ensayo de esta actividad enzimática estaban relacionados a la cuantificación e identificación del producto final de la reacción. La fosfodiesterasa de cAMP generalmente contamina las preparaciones enzimáticas, la cual, sumada a las ATPasas del medio hacían muy difícil la cuantificación del producto final.

Por otro lado, la mayoría de los trabajos mencionados usaban [^{14}C] o [^3H] adenosina, para que, a partir de éste se sintetizase [^{14}C] o [^3H] ATP, el cual luego se convertía a cAMP, es decir, que no se medía la conversión directa de ATP a cAMP.

Lamentablemente, todos estos inconvenientes, sumados al hecho de que muchos intentos por medir dicha actividad enzimática fueron infructuosos, llevaron a muchos autores a dudar de la existencia de la adenilato ciclasa en plantas superiores.

XII.1. Papel del cAMP en plantas superiores

El papel que cumple el cAMP como segundo mensajero en tejidos animales, llevó a la especulación de que este nucleótido podía jugar un rol similar mediando el efecto de las fitohormonas.

Galsky y Lippincott (272) mostraron que, al igual que la giberelina GA_3 , el cAMP promueve la síntesis de α -amilasa. Kessler y Kaplan () vieron que, tanto GA_3 como el cAMP podrían inducir la síntesis de la enzima, pero que inhibidores de la síntesis de DNA bloqueaban el efecto del cAMP y no el de GA_3 . Por otro lado, la glucosa inhibía la síntesis de α -amilasa inducida por GA_3 , pero no tenía efecto sobre la inducida por cAMP.

La síntesis de α -amilasa inducida por cAMP o GA_3 es bloqueada por ácido abscísico, si bien la concentración de ácido abscísico necesaria para obtener este efecto resultó ser menor para el caso del cAMP que para la GA_3 (274). Se concluyó entonces, que los efectos del ácido abscísico sobre la inducción de la síntesis de α -amilasa por cAMP y GA_3 son independientes e indirectos.

El cAMP mostró tener efectos estimulatorios esencialmente similares a los de GA_3 sobre la síntesis de ATPasa, fosfatasa ácida, proteasa e isocitrato liasa. El ácido abscísico, la cicloheximida y la 6-metil purina, inhiben estos efectos estimulatorios.

El cAMP también estimula la síntesis de RNA heterogéneo nuclear y pre-ribosomal citoplasmático en protoplastos de maíz sensibles a giberclinas (275).

Los efectos inhibitorios del cAMP fueron vistos sobre la 5'(3') ribonucleótido fosforilasa de semillas de trigo y la 5' nucleotidasa de papa (276)(277).

Tanto el cAMP como el GA_3 son capaces de promover la germinación de semillas (278), siendo este efecto bloqueado por el ácido abscísico y la cicloheximida.

La elongación de los coleóptelos de la avena es estimulada por GA_3 en presencia de glucosa y fructosa, e incrementa el efecto estimulatorio del ácido indol acético (IAA). Iguales efectos pueden ser obtenidos con cAMP (279).

Introducción

Rao y colaboradores (280) observaron que el cAMP medía el aumento de la formación de polirribosomas debidos al GA₃.

El cAMP parecería estar implicado en procesos patológicos de la planta. La concentración del nucleótido en tejidos de *Nicotiana glutinosa* infectados con virus del mosaico del tabaco, son significativamente mayores que las de tejidos no infectados (281).

Se ha observado que la luz podría influenciar la concentración de cAMP, ya que luego de 2 horas de iluminación con luz blanca, se estimulan los niveles del nucleótido en etioplastos aislados (282).

La posible relación entre las auxinas y el cAMP ha sido estudiada por una serie de laboratorios. Se ha visto que el tratamiento de coleóptilos de avena y de *Cicer arietinum* con IAA incrementa la síntesis de cAMP (283)(284).

El cAMP por sí mismo es capaz de incrementar la elongación de segmentos apicales de coleóptilos etiolados de trigo (285), estimular el crecimiento de coleóptilos de maíz en forma similar al IAA (), potenciar los efectos de la auxina sintética ácido 2-4 dicloro fenoxi acético o 2,4D (286), y aumentar la transcripción en núcleos aislados de habas.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

La creatina quinasa, piruvato quinasa, mioquinasa, lactato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa fueron provistos por Boehringer (Mannheim, Alemania). El ATP, cAMP, fosfocreatina, EDTA, EGTA, citocromo c, hormonas vegetales, fluoruro de fenilmetansulfonilo (PMSF), catalasa, 2H₂O, hexilamino sepharosa, Tris, manitol, glucosa y los aminoácidos serina, metionina, glicina y leucina fueron provistos por Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA). La sacarosa se obtuvo de Schwartz-Mann (Orangeburg, NY, USA); forskolina de Calbiochem (San Diego, CA, USA); DEAE celulosa (DE-52) de Whatman (Clifton, NJ, USA); 3 isobutil-1-metilxantina de Aldrich (Milwaukee, WI, USA); Trazylol de Bayer (Leverkusen, Alemania), Ultrogel AcA34 de LKB-Produkter (Bromma, Suecia); Alúmina neutra de Merk (Aarmstadt, Alemania); AG50W-X4 (200-400 mesh) de Bio-Rad (Richmond, CA, USA); extracto de levadura, agar y triptona de Difco Laboratories (Detroit, MI, USA) y [α ³²P]ATP y c[³H]AMP de New England Nuclear. Todas las otras drogas fueron de grado analítico.

I. *RHIZOBIUM MELILOTI*

I.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Como material biológico se utilizaron las siguientes cepas de *Rhizobium meliloti*: Rm102F51 (cepa salvaje); WL131 (nod-) y WL149 (fix-).

Las mutantes WL131 y WL149 fueron obtenidas por el Dr. Walter en la Universidad estatal de Michigan. La WL131 es incapaz de formar nódulos y la WL149 produce nódulos inactivos.

Las distintas cepas fueron cultivadas en medio YM (287).

| | | |
|---------------------------------------|-----|-------------------------------|
| Manitol | 10 | g |
| Extracto de levadura | 1 | g |
| MgSO ₄ .7 H ₂ O | 0.2 | g |
| NaCl | 0.2 | g |
| KHPO ₄ | 0.5 | g |
| FeCl ₃ | 1 | ml de una solución 4.88g/l |

Para un litro de medio de cultivo.

Los cultivos se crecieron con agitación rotatoria (200 cpm) a 30°C en frascos de Erlenmeyer manteniendo una relación aire:líquido de 5:1.

Los cultivos se cosecharon por centrifugación. Los sedimentos bacterianos se guardaron a -70°C

Las cepas se conservaron en medio sólido en pico de flauta conteniendo medio YM más 1.5% de agar y rojo congo 10 ml de una solución 1:400(P/V) en H₂O por litro de YM.

I.2. Fraccionamiento subcelular

El precipitado correspondiente a 100 ml de cultivos congelados a -70°C , se lavó 2 veces con 30 ml de NaHCO_3 1mM, centrifugando cada vez 10 minutos ($10.000 \times g$) a 4°C . El precipitado obtenido se resuspendió en 3 ml de buffer Tris-HCl 25 mM pH8 conteniendo lisozima 2 mg/ml. Se incubó media hora a 37°C con agitación. Se centrifugó 10 minutos a $10.000 \times g$, se resuspendió el precipitado en 3 ml de NaHCO_3 y se sonicó 4 veces durante 30 segundos con intervalos de 15 segundos cada vez.

El extracto obtenido fracción cruda se centrifugó a $3000 \times g$ durante 10 minutos (4°C) obteniéndose un precipitado P_3 y un sobrenadante, el cual se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 15 minutos. El sedimento P_{10} se conservó a 4°C y el sobrenadante se centrifugó a $100.000 \times g$ durante 120 minutos, obteniéndose un sobrenadante que constituye la fracción soluble S_{100} , y un precipitado P_{100} que corresponde a la fracción particulada (Figura 13).

II. MEDICAGO SATIVA(Alfalfa)

II.1. Condiciones de crecimiento

- a) *Medicago sativa* L. no inoculada fue cultivada en campos ricos en nitrógeno por 1 a 2 años. Después de extraerlas del suelo, las raíces fueron lavadas con H_2O y cortadas aproximadamente 10 cm por encima de la confluencia raíz-tallo. Las plantas fueron transferidas a macetas conteniendo tierra estéril rica en nitrógeno y se las cultivó por el término de 1 a 3 meses con abundante riego.

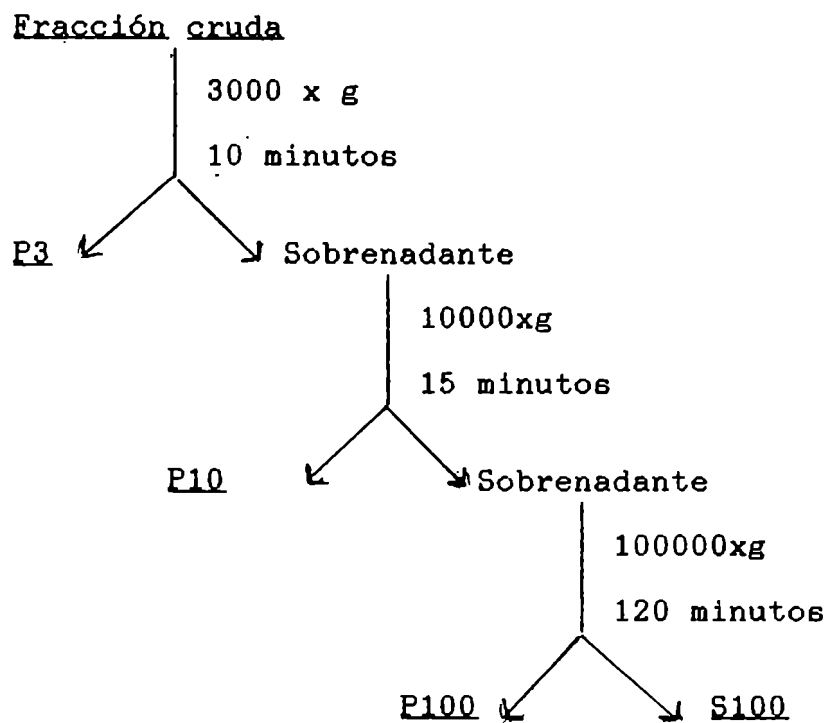


Figura 13: Esquema de fraccionamiento subcelular seguido con fracciones crudas de *R. meliloti*, *M. sativa* o nódulos radiculares

Materiales y Métodos

- b) Semillas de *Medicago sativa* esterilizadas con etanol al 95% durante 2 minutos y HgCl₂ al 0.2% acidificado con 5 cc/l de HCl concentrado durante 3 minutos. Las semillas se lavaron con 10 cambios de H₂O estéril y se las colocó en tubos (200x20 mm) con 8 ml de medio de cultivo agarizado (4 semillas por tubo).

Medio agarizado para plántulas:

| | |
|--------------------------------------|-------|
| CaHPO ₄ | 1.0 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0.2 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.2 g |
| NaCl | 0.2 g |
| FeCl ₃ | 0.1 g |
| Agar | 8 g |
| H ₂ O | 1.0 l |

Se agregó 1 ml/l de oligoelementos a partir de una solución madre que contenía (288)

| | |
|----|--------|
| Bo | 0.05 % |
| Mn | 0.05 % |
| Zn | 0.005% |
| Mo | 0.005% |
| Cu | 0.002% |

En todos los casos las semillas fueron directamente sembradas en macetas con vermiculita o tierra estéril. Las plantas fueron regadas 3 veces por semana.

En todos los casos las plantas fueron mantenidas a 25°C y se las iluminó durante 12 horas con lámparas Sylvania GroLux (40 watts, 120 cm) a una distancia de 120 cm.

II.2. Fraccionamiento subcelular

Las plantas fueron lavadas con H₂O corriente y H₂O destilada. Se separaron las hojas, los tallos y las raíces, haciendo un corte 1 cm por debajo de la unión entre las mismas.

Cada una de las partes por separado fueron cortadas con tijeras y molidas en un mortero en presencia de buffer Tris-Cl 50 mM pH7.4 conteniendo 1 mM 2-mercaptoetanol y glicerol 5% (Buffer A). Se filtró por gasa y al líquido filtrado se lo denominó fracción cruda, la cual fue centrifugada a 30.000 x g durante 10 minutos, como se indica en la figura 13 se obtuvo un sobrenadante S₁₀, el cual fue centrifugado a 100.000 x g durante 120 minutos. Al último sobrenadante obtenido luego de centrifugar 120 minutos a 100.000 x g, se lo denominó S₁₀₀ y al precipitado P₁₀₀, correspondiendo a la fracción soluble y particulada, respectivamente.

III. INOCULACION DE SEMILLAS

Se desinfectaron semillas de *Medicago sativa* como se indicó en la sección II.1 y se colocaron las mismas en una placa de petri estéril conteniendo 10 ml de una suspensión en solución fisiológica de un cultivo de *Rhizobium meliloti* en pico de flauta.

Se dejaron reposar por el término de 15 minutos y luego las semillas fueron sembradas como se indicó en la sección II.1.

IV. AISLAMIENTO DE *RHIZOBIUM MELILOTI* DE NODULOS DE *MEDICAGO SATIVA*

Los nódulos fueron separados de las raíces con pinzas teniendo cuidado de no dañarlos. Se lavaron con agua destilada estéril y se los desinfectó de la misma manera que se indicó para las semillas de *M. sativa* en la sección II.1.

Los nódulos así lavados y desinfectados, se disgregaron haciendo uso de una espátula en forma aséptica en una caja de Petri conteniendo 5 ml de solución fisiológica.

Esta suspensión se extendió en placas de Petri conteniendo medio YMA e YMA más rojo congo que se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias.

V. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE NODULOS

Se separaron los nódulos, se desinfectaron y se disgregaron como se indica en la sección IV.

El contenido de la caja de Petri fue volcado en un homogeneizador de vidrio tipo "Downce" y se aplicaron 10 golpes de pistón. Esta fracción fue denominada "fracción cruda" la cual se centrifugó 10 minutos a 3000 x g, como se indica en la figura 13.

El precipitado fue llamado P₃ y el sobrenadante fue centrifugado 15 minutos a 10.000 x g. Se obtuvo así un precipitado P₁₀ y un sobrenadante al que se centrifugó a 100.000 x g por el término de 120 minutos. Se obtuvieron así la fracción soluble o S₁₀₀ y la fracción correspondiente al pellet de membranas o fracción P₁₀₀.

VI. OBTENCION DE MUTANTES CYA- DE *RHIZOBIUM MELILOTI*

El crecimiento de ciertas cepas de *E. coli* K12 es inhibido por el aminoácido serina o una mezcla de metionina y glicina. Daniel y Danchin (289) obtuvieron mutantes deficientes en las funciones de los genes *cya* o *crp* y observaron que las mismas presentaban un fenotipo resistente al efecto inhibitorio de dichos aminoácidos. A partir de estas observaciones, decidimos mutagenizar una cepa salvaje de *Rhizobium meliloti* y seleccionar aquellas mutantes deficientes en la síntesis de cAMP adaptando la composición de los medios de cultivo utilizados por Daniel y Danchin hasta conseguir inhibición del crecimiento de la cepa salvaje (Rm102F51).

VI.1. Cepas utilizadas

Se utilizaron las siguientes cepas: *R. meliloti* Rm102 F51 y *Escherichia coli* 1830 NaI^RPro^RMet⁻ (pJB4J1). El plásmido es portador del genotipo Gm, Km::Mu::Tn5 y le confiere resistencia a gentamicina y a kanamicina debido al trasposón Tn5 contenido en el fago Mu. Asimismo, el plásmido posee un sistema de replicación termosensible.

VI.2. Medios y antibióticos utilizados

Antibióticos:

Acido malidixico 20 µg/ml; Gentamicina 25 µg/ml; Kanamicina 30 µg/ml; Estreptomycin 100 µg/ml.

Medios de cultivo:

LB: triptona, 10 g; Extracto de levadura, 5 g; NaCl, 10 g, para un litro de medio de cultivo.

YM: este medio fue preparado como se describió en la sección I.1 de este capítulo.

M9: Na_2HPO_4 , 6g; K_2HPO_4 , 3g; NaCl, 0.5 g; NH_4Cl , 1g. Se llevó a 1 litro con agua destilada y después de autoclavar, se ajustó el pH a 7.4 y se agregaron estérilmente las siguientes soluciones: MgSO_4 , 2 ml de una solución 1M; manitol, 10ml de una solución 20% y CaCl_2 , 10 ml de una solución 0.01% P/V.

En todos los casos, los medios agarizados contenían 1.5% de agar en el medio de cultivo correspondiente.

Medio selectivo o SMGL (serina, metionina, glicina, leucina): El medio selectivo fue preparado a partir del medio M9 conteniendo MgSO_4 ; CaCl_2 ; manitol y biotina, 0.1%; deoxicolato 0.04%; al cual se agregó los siguientes aminoácidos: serina, metionina, glicina y leucina, cada uno de ellos en una concentración final de 0.13%. La concentración de agar en el medio sólido fue de 1.2%.

En estas condiciones la cepa Rm102F51 no creció aún después de 96 horas de cultivo a 30°C.

VI.3. Coniugación

La conjugación se efectuó en filtros de nitrocelulosa como se observa en el esquema de la figura 14.

Para ello, la cepa Rm102F51 fue cultivada a 30°C en medio YM hasta alcanzar un crecimiento exponencial. De este cultivo se tomaron 10 ml y se filtraron en un filtro marca Millipore

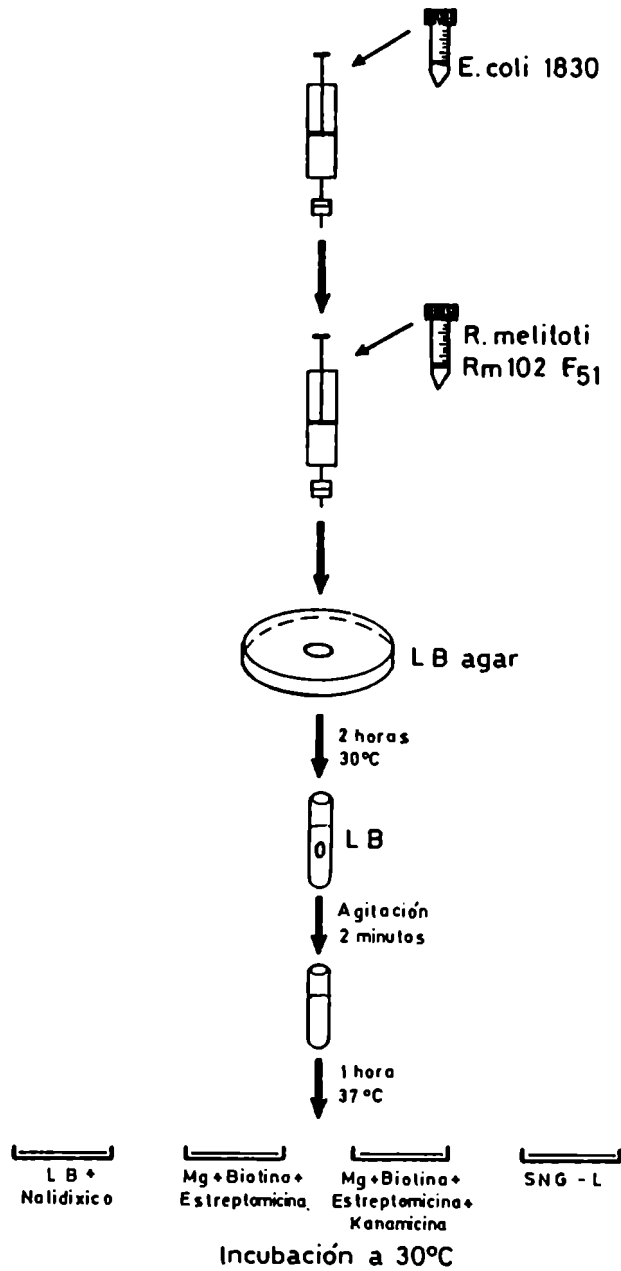


Figura 14: Esquema de mutagenización. La conjugación se efectuó entre *E. coli* 1830 y *R. meliloti* Rm102F51.

Materiales y Métodos

(45 μm de poro) quedando las bacterias retenidas en la superficie del mismo. A continuación se filtró 1 ml de un cultivo de *E. coli* 1830 que había alcanzado la fase logarítmica a 30°C en medio LB.

El filtro se colocó sobre una placa de LB agar y se dejó a 30°C durante 2 horas; luego se lo colocó en 10 ml de LB y se agitó enérgicamente para interrumpir la conjugación y desprender las bacterias del filtro. Esta suspensión bacteriana se incubó a 37°C durante 1 hora, luego de lo cual el cultivo fue plaqueado y cultivado a 30°C en los distintos medios para permitir el recuento de bacterias y la selección de transconjugantes y presuntas mutantes *cya*⁻.

VI.4. Conservación de las mutantes *cya*⁻

Las mutantes fueron cultivadas en medio SMGL en presencia de cAMP 2 mM y Kanamicina 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 24 horas.

Para conservarlas se agregó glicerol 15% y se fraccionó en alícuotas de 1 ml en criotubos que fueron guardados a -70°C.

VI.5. Purificación de plásmidos

Se cultivó *E. coli* 1830 portadora del plásmido pJB4J1 en 10 ml de medio LB conteniendo Kanamicina 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y gentamicina 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 30°C.

El cultivo se agitó en un incubador rotatorio a 200 rpm hasta alcanzar una DO a 700 nm de 0.8 luego de lo cual fueron centrifugados a 10.000 x g durante 10 minutos. Los pellets se conservaron a -70°C.

Materiales y Métodos

La cepa salvaje RM102F51 y las 6 mutantes fueron cultivadas en 10 ml de medio YM conteniendo Kanamicina 30 $\mu\text{g/ml}$ a 30°C con una agitación de 200 rpm hasta alcanzar una DO de 0.8 a 700 nm. Los cultivos fueron centrifugados a 15.000 x g durante 20 min y los pellets conservados a -70°C.

Para *E. coli* 1830 la extracción de plásmidos se realizó según el método de Birboim *et al.* (290). Se resuspendieron los pellets provenientes de 10 ml de cultivo de 1 ml de una solución de glucosa 50 mM y EDTA 10 mM en buffer Tris-HCl 25 mM pH8 (TEG). Las bacterias fueron centrifugadas durante 2 minutos en una microcentrífuga Beckman y resuspendidas en 100 μl de TEG a los que se agregaron 200 μl de una solución de NaOH 2 M y doedecil sulfato de sodio (SDS) para una concentración final de 0.01%.

Se dejó en baño de hielo 5 minutos y luego se adicionaron 150 μl de una solución 3M pH 5.2 de acetato de sodio. Se agitó suavemente y se mantuvo en baño de hielo 10 minutos. Se centrifugó durante 5 minutos y el sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo de Eppendorf y se agregaron 400 μl de una solución de fenol cloroformo alcohol isoamílico (PCA) en una proporción 25:24:1. Se centrifugó 2 minutos y se guardó la fase superior a la cual se le adicionaron 400 μl de una solución de cloroformo alcohol isoamílico (CA) en proporción 24:1.

Luego de centrifugar nuevamente durante 2 minutos, se guardó la fase superior. A ésta se le agregó 1 ml de etanol absoluto, se agitó suavemente y se guardó durante 10 minutos a -70°C para permitir la precipitación del DNA. Se centrifugó 5 minutos, se descartó el sobrenadante, y el pellet fue resuspendido en 20 μl de H₂O a la que se agregó 4 μl de una solución de azul de Bromofenol conteniendo 40% de sacarosa. Estas muestras fueron sembradas en un gel de agarosa al 0.6% en buffer Tris acético 40 mM pH 8 conteniendo EDTA 1 mM.

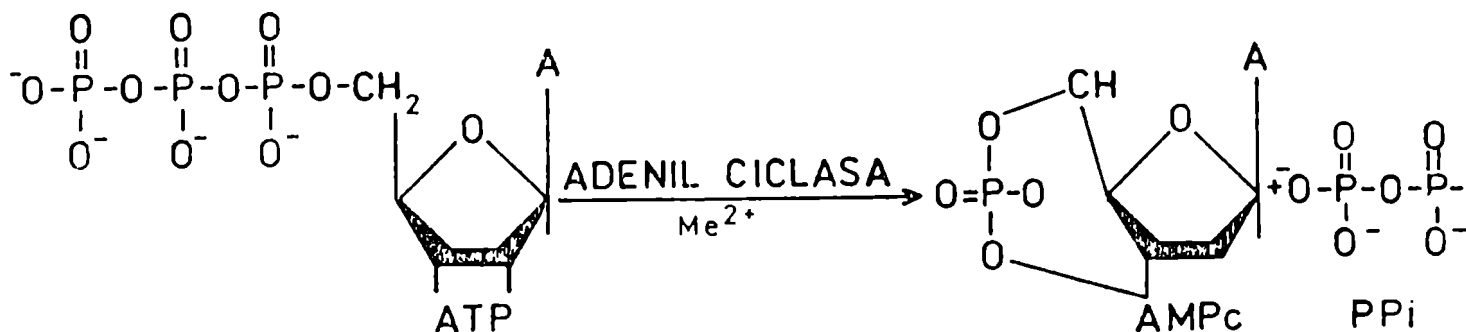
La electroforesis se llevó a cabo a 50 V. Cuando el frente de azul de Bromofenol alcanzó el extremo del gel, el mismo fue retirado y teñido en una solución de Bromuro de etidio 1 µg/ml. Las distintas bandas se observaron en un transiluminador marca Fotodyne Inc. y se fotografiaron.

Para la cepa Rm102F51 y las 6 mutantes, la obtención de plásmido se realizó de la misma manera que para *E. coli* 1830, salvo que antes de hacer el tratamiento alcalino se resuspendieron los pellets primero con TEG conteniendo EDTA 20 mM, luego con TEG conteniendo EDTA 20 mM y sarcosyl 0.1%, y finalmente fueron lavadas nuevamente con TEG que contenía 20 mM EDTA según el método de Rosenberg y col. (291).

VII. PREPARACION DEL SUSTRATO RADIOACTIVO DE LA ADENILATO CICLASA: [$\alpha^{32}\text{P}$] ATP

El método de ensayo de adenilil ciclasa usado en esta tesis se basa en la cuantificación del AMPc marcado radioactivamente con ^{32}P , para lo cual se utilizó como sustrato al ATP marcado con ^{32}P en la posición α , ya que éste es el único fosfato que se conservará en la molécula del producto, luego de la catálisis enzimática.

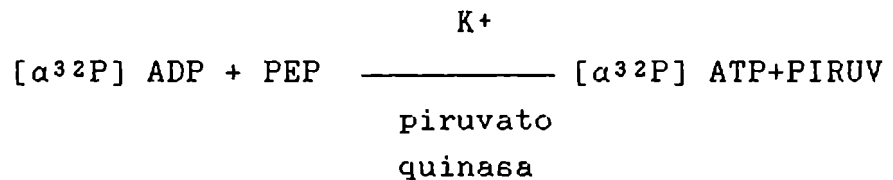
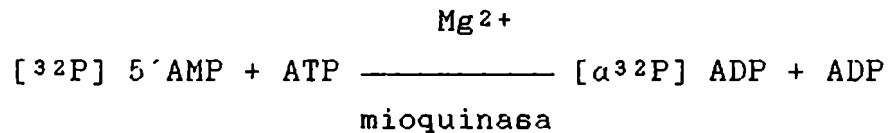
La síntesis del [$\alpha^{32}\text{P}$] ATP fue realizada por dos procedimientos diferentes que se detallan a continuación:



Procedimiento descrito por Flawiá y Torres (13):

Este método involucra dos pasos:

- 1°: Síntesis química que implica la esterificación del $^{32}\text{PO}_4\text{H}_3$ con el oxhidrilo de posición 5' de la isopropilidén-adenosina, seguida de una hidrólisis ácida del grupo isopropilideno para obtener 5' AMP marcado con ^{32}P .
- 2°: Síntesis enzimática del $[\alpha^{32}\text{P}]$ ATP usando como material de partida el producto de la reacción anterior:



Se procedió de la siguiente manera:

La solución clorhídrica de fosfato inorgánico radiactivo (50 mCi) se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio. El sedimento se retomó en aproximadamente 3 ml de agua, agregándose 5 μmoles de fosfato inorgánico "frío". Volvió a evaporarse a sequedad y a retomarse el sedimento en agua. Este procedimiento se

Materiales y Métodos

repitió tres veces con el objeto de eliminar por completo el ácido clorhídrico en que viene disuelto el ^{32}P i. Al sedimento de la última evaporación se le agregaron 60 mg (aprox. 200 μmoles) de isopropiliden-adenosina y se secó con acetonitrilo en línea de vacío según Greenless y Symons (292). Una vez que estuvo totalmente seca la preparación, se realizó la síntesis química:

Se preparó una mezcla de dimetilsulfóxido (solvente) 3,2 ml; tricloroacetoneitrilo (agente condensante) 20 μl y trietilamina (catalizador) 25 μl . Se agregó rápidamente la mezcla al balón de reacción donde estaban el ^{32}P i y la isopropilidénadenosina, se tapó herméticamente y se incubó a 37°C durante 15 minutos.

Luego se agregaron 6 ml de ácido acético 5 N y se calentó en baño de agua, con el balón destapado, a 100°C durante 1 hora (hidrólisis). Al cabo de ese tiempo, el contenido del balón se evaporó a sequedad, se resuspendió en 3 ml de agua y se evaporó nuevamente. Este procedimiento se repitió cuatro veces.

Síntesis enzimática:

El sedimento de la última evaporación (^{32}P 5'AMP) fue incubado durante 20 minutos, a 37°C en una mezcla de la siguiente composición:

| | | | |
|-------------------|------|------------------|--------|
| Buffer TRIS-HCl | 100 | mM | pH=7,4 |
| MgCl ₂ | 25 | mM | |
| K Cl | 100 | mM | |
| ATP | 0,16 | mM | |
| PEP | 7,5 | mM | |
| Piruvato quinasa | 20 | $\mu\text{g/ml}$ | |
| Mioquinasa | 200 | $\mu\text{g/ml}$ | |

El volumen total fue de 3,2 ml y la reacción se detuvo por el agregado de 3 ml de metanol, calentando luego en baño de agua a 100°C durante 3 minutos.

Purificación del [$\alpha^{32}\text{P}$] ATP:

Después de finalizada la síntesis enzimática, el contenido del balón fue sembrado en una columna de DEAE-Sephadex A 25 (1x9 cm) forma bicarbonato, previamente lavada y equilibrada con agua destilada. Una vez que la muestra penetró en la columna cromatográfica, se eluyó con un gradiente continuo de bicarbonato de trietilamina pH=7,5; de 0 a 1 M (volumen total 200 ml). Se recogieron fracciones de 7-8 ml, y la presencia de radioactividad en cada fracción fue estimada semicuantitativamente mediante el uso de un monitor marca Nuclear, modelo FM. Un perfil típico de la columna de DEAE-Sephadex puede verse en la figura 15.

Se juntaron las fracciones correspondientes al pico de ATP llevándoselas a sequedad en un evaporador rotatorio, o bien por congelamiento a -20°C y luego liofilización en un liofilizador marca F.T.S. El residuo se resuspendió en 5 ml de metanol, se evaporó nuevamente y por último se retomó en un volumen apropiado de agua destilada (usualmente de 1 a 4 ml).

La caracterización del ATP radioactivo se hizo por cromatografía ascendente en hojas de polietilén-imino-celulosa, conteniendo reactivo fluorescente, usando como solvente cloruro de litio 1,5 M. La posición de los nucleótidos utilizados como patrones (ATP, ADP y AMP) fue detectada bajo luz UV emitida por una fuente marca Mineralight.

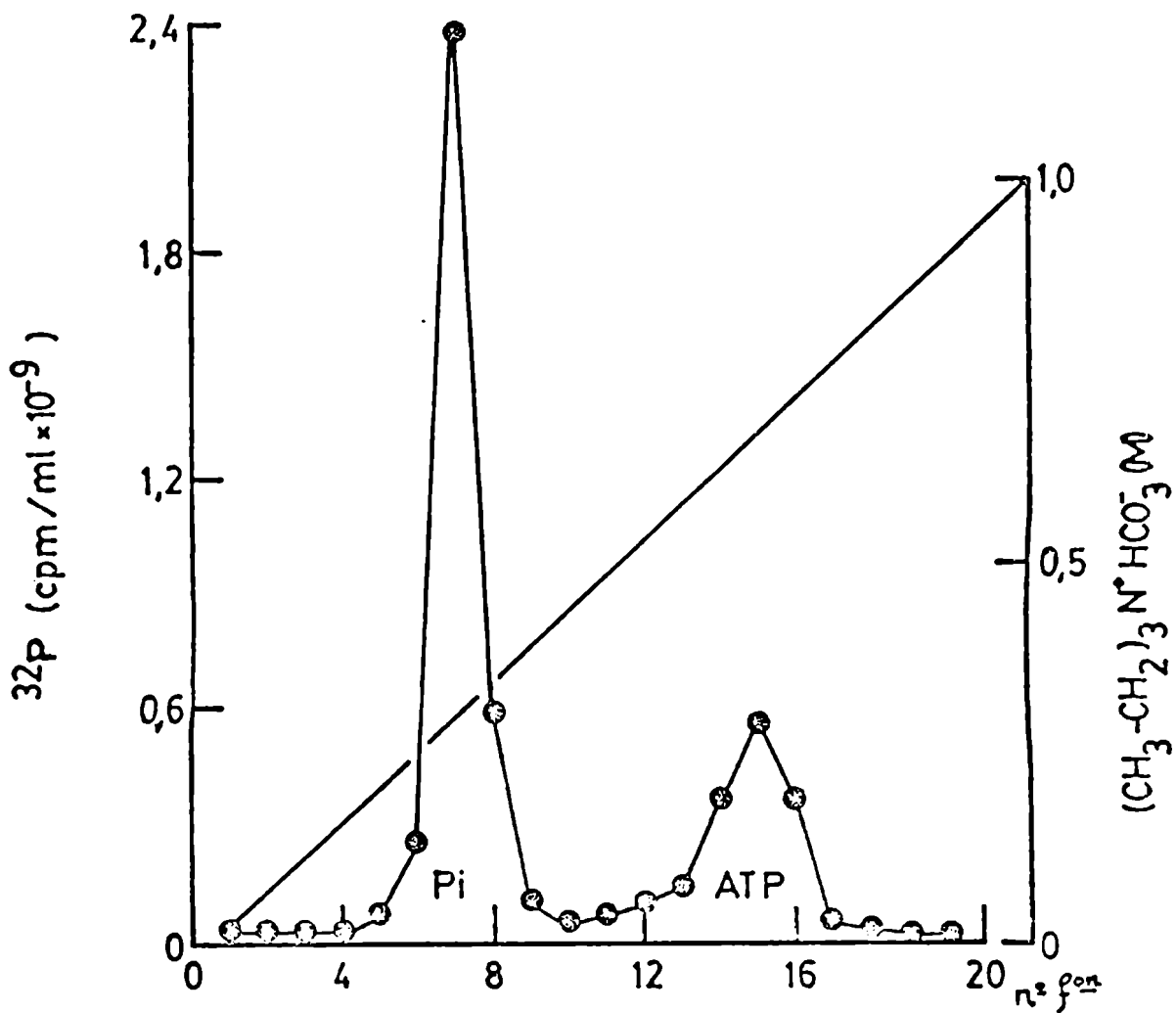


Figura 15: Perfil de elución de una cromatografía en DEAE-Sephadex A25, correspondiente a la mezcla de reacción después de la síntesis enzimática para la obtención de $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

VIII. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE ADENILIL CICLASA

Composición de la mezcla de incubación: solución buffer TRIS-HCl 50 mM, pH = 7,5; 3-isobutil-1 metil xantina 0,2 mM; AMPc 1 mM Mn Cl₂ 2,5 mM; [α^{32} P] ATP 0,5 mM (con una actividad específica que varía entre 50 y 200 cpm por pmol); fosfocreatina 2 mM, creatina quinasa 0,2 mg/ml y fracción enzimática (50 a 200 μ g de proteína). El volumen total fue de 0,1 ml y las incubaciones fueron realizadas a 37°C por 3 a 10 minutos. La reacción fue detenida por el agregado de 0,1 ml de una solución que contiene ATP 40 mM, [3 H] AMP cíclico 12,5 mM (actividad específica 3.800 cpm por μ mol) y por calentamiento de 3 minutos en un baño de agua hirviendo (293).

El AMP cíclico formado fue purificado siguiendo el procedimiento de cromatografía secuencial en columnas de Dowex 50 y alúmina descrito por Salomon *et al* (194). La base del método consiste en separar el AMP cíclico radioactivo de los otros fosfatos nucleotídicos radioactivos o no (ATP, ADP, AMP, P_{Pi}, P_i) a través de una resina intercambiadora de cationes (Dowex 50); los H⁺ de la resina se intercambian con los -NH₂⁺ de la adenina de los fosfatos. El AMP cíclico es el único compuesto de fosfato parcialmente retenido por la resina, pues su carga positiva (adenosina) no es totalmente contrarrestada por la única carga negativa del grupo fosfato. Luego del pasaje por la Dowex 50, el AMP cíclico fue adicionalmente purificado en una columna de alúmina, que retiene a todos los fosfatos aún contaminantes.

En esta columna, el AMP cíclico no se retiene a pH neutro.

Los pasos de la purificación del AMPc se detallan a continuación:

Una vez detenida la reacción, se agregó 1 ml de H₂O a la muestra y se sembró en una columna de resina Dowex AG 50 W-x 4 (200-400 mesh) forma H⁺ de 4 cm de largo por 0,5 cm de diámetro

interno. Después del pasaje de la muestra, se lavó con 5 ml de H₂O en dos etapas, una de 1 ml y otra de 4 ml, descartándose los eluidos.

Luego se pasaron 6 ml de H₂O, recogiendo el eluido directamente sobre una columna de alúmina neutra (3 cm x 0,5 cm) previamente equilibrada con buffer Imidazol-HCl 0,1 M, pH = 7,5. Una vez pasados los 6 ml por la columna de alúmina, y habiéndose desechado el eluido correspondiente, se lavó esta columna con 1 ml de buffer Imidazol-HCl y luego con 4 ml del mismo buffer, recogiendo el eluido en frascos de centelleo líquido. La radioactividad se midió según el método de Bray, añadiendo a los frascos 13,5 ml de la mezcla centelleadora (naftaleno-dioxano).

Las lecturas se hicieron en un contador de centelleo líquido marca Beckman con los siguientes parámetros: para ³H (el AMPc tritiado agregado al finalizar la incubación permite calcular el % de recuperación del AMPc después del pasaje por las columnas), 60% de ganancia con ventana entre 50 y 300; y para ³²P 5% de ganancia, con ventana entre 300 e infinito. Las recuperaciones usualmente oscilaron entre un 50 y un 80%.

IX. PURIFICACION PARCIAL DE LA ADENILATO CICLASA DE *RHIZOBIUM MELILOTI*

IX.1. Cromatografía en DEAE celulosa

La fracción S₁₀₀ (20 ml, 2,5 mg/ml) correspondiente a 600 ml de cultivo fue obtenida como se especifica en la sección I.2 de "Materiales y Métodos".

Dicha fracción se aplicó a una columna de DEAE celulosa (DE-52) con un lecho de resina de 1.4x6 cm y equilibrada con buffer A. Después de cargar la muestra en la columna, ésta se lavó

Materiales y Métodos

con 50 ml de buffer A de equilibrado y se aplicó un gradiente lineal formado por: buffer A, buffer A conteniendo NaCl 0.7M. El volumen total del gradiente fue de 70 ml, el flujo de elución de 1.5 ml/min y se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones con mayor actividad de adenilato ciclasa se combinaron, constituyendo lo que se llamó preparación DEAE (2 ml).

IX.2. Filtración por geles

La preparación DEAE (2 ml, 1 mg/ml) se aplicó a una columna de Ultragel AC-34 (60-140 μ m)(intervalo de fraccionamiento para proteínas globulares: 20.000-350.000) con un lecho de gel de 1.5x40 cm equilibrada con buffer A conteniendo NaCl 0.1M. La elución se realizó con el mismo tampón de equilibrio, con un flujo de 0.2 ml/min. Se recogieron fracciones de 1 ml.

X. PURIFICACION PARCIAL DE LA ADENILATO CICLASA DE *MEDICAGO SATIVA*

X.1. Cromatografía en DEAE celulosa

Se obtuvieron 105 ml de una fracción cruda a partir de 30 gr de raíces de *M. sativa* (3.16 mg proteína/ml) como se indica en la Sección II.2 de este capítulo. Esta fracción fue centrifugada a 100.000 x g durante 2 horas. Se obtuvieron 100 ml de sobrenadante o fracción S₁₀₀ (1.6 mg proteína/ml) los cuales se aplicaron a una columna de DEAE celulosa de lecho de resina 2.6 x 10 cm, previamente equilibrada con buffer A.

Luego de sembrar la muestra en la columna, se lavó con 200 ml de buffer A y la eluyó con un gradiente lineal formado por buffer A y buffer conteniendo NaCl 0.7 M. El volumen total

de gradiente fue de 300 ml, el flujo de elución de 1.0 ml/minuto y se recogieron fracciones de 6 ml. Las fracciones con mayor actividad de adenilato ciclasa se juntaron, constituyendo lo que se llamó preparación DEAE, la cual fue dializada durante 20 horas a 4°C frente a 100 volúmenes de buffer A.

X.2. Cromatografía en Hexilamino-sepharosa

La preparación DEAE fue dializada (20 ml, 0.7 mg proteína/ml), se aplicaron a una columna de hexilamino-sepharosa con un lecho de resina de 0.7 x 11 cm y equilibrada con buffer A. Después de sembrar la muestra en la columna, ésta se lavó con 20 ml de buffer A, y se aplicó un gradiente lineal formado por: buffer A y buffer A conteniendo NaCl 0.7 M. El volumen total del gradiente fue de 30 ml, el flujo de elución 1 ml/minuto y se recogieron fracciones de 1.1 ml. Las fracciones que presentaron actividad adenilato ciclasa fueron combinadas constituyendo lo que se llamó preparación hexilamino-sepharosa.

Esta preparación fue concentrada frente a una solución de sacarosa 70%.

X.3. Filtración por geles

La preparación hexilamino-sepharosa concentrada (1 ml, 0,4 µg proteína/ml) fue aplicada a una columna de Ultragel AC-34 (60-140 µm)(intervalo de fraccionamiento para proteínas globulares: 20.000 - 350.000) con un lecho de resina de 1.5 x 40 cm equilibrada con buffer A conteniendo NaCl 0.1 M. La elución se realizó con el mismo buffer con un flujo de 0.2 ml/min. Se recogieron fracciones de 1 ml.

XI. CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA ADENILATO CICLASA

XI.1. Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa

Se prepararon gradientes de 5 a 20% (P/V) de sacarosa, en agua destilada u óxido de deuterio (D₂O), conteniendo Tris-HCl-50 mM, pH 7.4; 2-mercaptoetanol 1 mM; EDTA 0,5 mM y NaCl 0.15 M.

Los gradientes se formaron en tubos de acetato de celulosa de 1.8x9.5 cm, correspondientes al rotor Beckman SW40. En el caso de *Rhizobium meliloti* se aplicaron 0.2 ml de una mezcla que contiene 0.06 mg de proteína correspondiente a la preparación Ultrogel y a las siguientes proteínas marcadoras: malato deshidrogenasa (corazón porcino) 0.06 mg/ml; lactato deshidrogenasa (músculo de conejo) 0.03 mg/ml y citocromo c (corazón de caballo) 2 mg/ml; catalasa (hígado de vaca) 0.1 mg/ml.

En el caso de *Medicago sativa* se aplicaron 0.2 ml de una mezcla que contenía 0.08 mg de proteínas correspondientes a la preparación DEAE-celulosa más las proteínas marcadoras.

Se centrifugó a 36.000 rpm durante 18 horas a 3°C. Finalizada la centrifugación, se fraccionó el gradiente con bomba peristáltica, comenzando por el fondo y evitando al máximo su distorsión.

Se recogieron fracciones de 0.2 ml con un flujo de 0.5 ml/min. Luego se procedió a la detección de la actividad adenilato ciclasa y de las proteínas utilizadas como marcadoras.

XI.2. Filtración en geles

La determinación del radio de Stokes (a) de ésta la adenilato ciclasa se llevó a cabo en un ultragel ACA34 (60-140 µm) con un lecho de gel de 1.5x57 cm equilibrada con buffer A conte-

Materiales y Métodos

niendo NaCl 0.1 M. A la columna se le aplicó 2 ml de una preparación DEAE celulosa (0.8 mg de proteína). En el caso de *R. meliloti* se procedió como en IX.2.

En todos los casos el volumen sembrado en el ultragel contenía: β galactosidasa (*E. coli*) 0.05 mg/ml; catalasa (hígado bovino) 0.1 mg/ml; malato deshidrogenasa (corazón porcino) 0.01 mg/ml; lactato deshidrogenasa (músculo de conejo) 0.03 mg/ml y citocromo c (corazón de caballo) 2 mg/ml. El volumen de exclusión se determina usando una solución de azul dextrano siguiendo la absorbancia a 690 nm. El volumen total de la columna se calculó midiendo el volumen de exclusión de una solución de CoCl_2 . El flujo de elución fue de 0.15 ml/min y se recogieron fracciones de 1 ml.

XI.3. Determinación de las proteínas marcadoras en los gradientes de sacarosa y en las columnas de Bio-Gel

Citocromo C: se midió su absorción en 410 nm (banda de Soret).

Malato deshidrogenasa: la activación se detectó por el consumo de NADH, en presencia de oxalacetato, siguiendo la disminución de su absorbancia a 340 nm (295).

Lactato deshidrogenasa: su actividad se determinó por el consumo de NADH, en presencia de piruvato, del mismo modo que para malato deshidrogenasa (295).

Catalasa: la disminución de la oxidación de yoduro a yodo, acoplada a la reducción del H_2O_2 por la enzima, permitió medir su actividad (296).

β -galactosidasa: se valoró utilizando o-nitrofenil-D-galactopiranosido como sustrato (295).

XII. CALCULO DE LOS PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS

XII.1. Volumen específico parcial

El método usado fue desarrollado por Clarke (297) y Meunier *et al.* (298) para determinar el volumen específico parcial de complejos de proteína-detergente, mediante el análisis de los coeficientes de sedimentación en gradientes de densidad hechos en H₂O y D₂O. La base del método fue descrito por Edelstein y Schachman (299) y consiste en el cambio en el coeficiente de sedimentación producido por el aumento de densidad de la solución por el uso de D₂O.

De acuerdo con el trabajo de Martin y Ames (300), la distancia r_i recorrida desde el origen por cualquier macromolécula sometida a ultracentrifugación en un medio i (i : H para H₂O e i : D para D₂O) es:

$$r_i = k_i S_{20,w} (1 - v \rho_i) \quad (1)$$

donde k_i es una constante en un medio, a una dada densidad para cualquier macromolécula con el mismo volumen específico parcial; $S_{20,w}$ es el coeficiente de sedimentación de la macromolécula determinado en agua a 20°C; v es el volumen específico parcial y ρ_i es la densidad del medio i . Dado que la densidad ρ_i aumenta linealmente a lo largo del gradiente de sacarosa, se hace una estimación promediada de ese parámetro tomando su valor a $r_i/2$. Bajo estas condiciones, el error en i es menor que el 0,5%. Entonces, dados dos gradientes de sacarosa realizados en H₂O y en D₂O, resulta:

$$\frac{r_H}{r_D} = \frac{k_H(1 - v \rho_H)}{k_D(1 - v \rho_D)} \quad (2)$$

Siendo entonces:

$$v = \frac{r_{HKD} - r_{DKH}}{r_{HKD} \rho_D - r_{DKH} \rho_H} \quad (3)$$

Dividiendo al numerador y al denominador del segundo término de la igualdad (3) por r_{DKD} , resulta:

$$v = \frac{\frac{r_{HKD}}{r_{DKH}} - 1}{\frac{r_{HKD} \rho_D}{r_{DKH}} - \rho_H} \quad (4)$$

Por otro lado, la ecuación (2) puede plantearse así:

$$\frac{r_{HKD}}{r_{DKH}} = \frac{(1 - v \rho_H)}{(1 - v \rho_D)} \quad (5)$$

y según la ecuación de Svedberg:

$$\frac{(1 - v \rho_H)}{(1 - v \rho_D)} = \frac{S_H \eta_H}{S_D \eta_D} \quad (6)$$

donde S_H y S_D son los coeficientes de sedimentación aparentes determinados experimentalmente en H_2O y D_2O , respectivamente, y η_H y η_D las viscosidades de las soluciones en H_2O y

D₂O, respectivamente, en la zona en que se ubica la macromolécula analizada.

De las ecuaciones (4), (5) y (6), es entonces:

$$v = \frac{\frac{S_H \eta_H}{S_D \eta_D} - 1}{\frac{S_H \eta_H}{S_D \eta_D} \cdot D - 1} \quad (7)$$

La ecuación (7) fue utilizada para calcular el v de la adenil ciclasa S_H , S_D , η_H y η_D fueron obtenidos a partir de la comparación de la movilidad de la adenilato ciclasa con respecto a la de las proteínas marcadoras utilizadas, en los gradientes de sacarosa en H₂O y D₂O, y cuyos valores numéricos serán presentados en el capítulo "Resultados y Discusión".

Las densidades ρ_D y ρ_H fueron determinadas por gravimetría, utilizando una micropipeta de 50 μ l.

XII.2. Radio de Stokes

El valor del radio de Stokes (a) fue obtenido a partir del perfil de las filtraciones en geles de agarosa (Bio-Gel). El valor fue estimado de un gráfico de a vs V_e/V_o (volumen de elución normalizado respecto del volumen de exclusión), obtenido con las proteínas marcadoras de parámetros moleculares conocidos.

XII.3. Peso molecular

El peso molecular de la adenilato ciclasa fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (301):

$$M = \frac{6 N \eta_{20,w}}{1-v} \cdot a \cdot S_{20,w}$$

siendo N el número de Avogadro; $\eta_{20,w}$, viscosidad del agua a 20°C (1,100.10⁻²g/cm seg); a, radio de Stokes; S_{20,w}, coeficiente de sedimentación a 20°C en agua; v, volumen específico parcial; $\rho_{20,w}$, densidad del agua a 20°C (0,9888 cm³/g).

XII.4. Coefficiente friccional

El coeficiente friccional fue calculado utilizando los parámetros moleculares previamente obtenidos (v, a, M) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$f/f_0 = a \frac{4 \pi N^{1/3}}{3Mv}$$

Siendo f el coeficiente de fricción de la proteína y f₀ el coeficiente de fricción de la proteína esférica y anhidra de igual masa.

XII.5. Parámetros de las proteínas marcadoras

En base a los datos recopilados por Haga *et al.* (302) fue confeccionada la tabla 4 con los parámetros moleculares de las proteínas marcadoras que se utilizaron para la calibración en gradientes y cromatografías en geles de agarosa.

XIII. ENSAYO DE CALMODULINA

El ensayo de calmodulina se realizó midiendo la activación producida sobre la fosfodiesterasa de cAMP de cerebro bovino. Esta última actividad se midió según el procedimiento descrito por Thompson y Appleman (303). La mezcla de incubación estaba compuesta por: Tris-HCl 40 mM pH 8, CaCl₂ 50 µM, albúmina 1 mg/ml, MgCl 5 mM, cAMP 200 µM, [³H]cAMP (50-70000 cpm) y una preparación de PDE de cerebro, gentilmente cedida por la Dra. María T. Téllez-Iñón. El volumen final fue de 100 µl.

La mezcla se incubó durante 5-10 minutos a 30°C y la reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 2 minutos. A continuación, la mezcla se incubó nuevamente con el agregado de 40 µl de 5' nucleotidasa de veneno de serpiente (King cobra, 2 mg/ml en Tris-HCl 10 mM pH 8). Esta segunda reacción se detuvo por el agregado de 20 µl de una solución conteniendo EDTA 50 mM y adenosina 5 mM.

A continuación se agregó 1 ml de una suspensión conteniendo un volumen de resina de intercambio iónico AG 1-X4 (200-400 mesh)(33% en etanol al 30%). Se dejó sedimentar la resina durante 15 minutos. Se tomaron alícuotas de 0.5 ml de los sobrenadantes, y se agregaron a tubos plásticos conteniendo la mezcla de centelleo, compuesta por Omnifluor 0.4% P/V y Tritón X100 30% (V/V) en tolueno.

| | Coefficiente de Sedimentación $S_{20,w}$ | Volumen Específico parcial v | Radio de Stokes a | Peso Molecular PM |
|------------------------|---|-----------------------------------|------------------------|----------------------|
| Proteína | (S) | (ml/g) | (nm) | |
| β -galactosidasa | 15.9 | 0.76 | 6.84 | 520000 |
| Catalasa | 11.3 | 0.73 | 5.21 | 247000 |
| Lactato deshidrogenasa | 7.3 | 0.74 | 4.75 | 142000 |
| Malato deshidrogenasa | 4.3 | 0.74 | 3.69 | 70000 |
| Citocromo C | 1.7 | 0.73 | 1.87 | 13300 |

TABLA 4: Parámetros hidrodinámicos y moleculares de las proteínas moleculares

La radioactividad se midió en un contador de centelleo Beckman, usando un programa con lectura para ^3H .

XIV. PURIFICACION DE CALMODULINA EN HOJAS DE ESPINACA

La calmodulina de hojas de espinaca se purificó a través de una modificación del método de Watterson y col. (304).

Las hojas de espinaca fueron lavadas y cortadas en pequeños trozos con tijera y luego homogeneizados con un desintegrador de tejidos tipo (Waring) en 100 ml de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 conteniendo EDTA 3 mM. El homogenato se filtró a través de una doble capa de gasa y el filtrado se centrifugó a 10000 x g durante 20 minutos. Se descartó el precipitado, y al sobrenadante (120 ml) se lo sometió a los siguientes pasos de purificación.

XIV.1. Cromatografía en DEAE-celulosa

El sobrenadante obtenido se aplicó a una columna de DEAE-celulosa (1.7 cm x 17 cm) previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4, y luego se la lavó con 100 ml del mismo buffer. La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de Tris-HCl 50 mM pH 7.4, y el mismo buffer conteniendo NaCl 0.7 M.

Se colectaron fracciones de 6 ml con un flujo de 1 ml/min.

El perfil de elución de la columna de DEAE-celulosa se muestra en la Figura 16. La calmodulina eluye en único pico a una concentración de NaCl de 0.45 con una actividad específica de 480 nmoles/min/mg de proteínas.

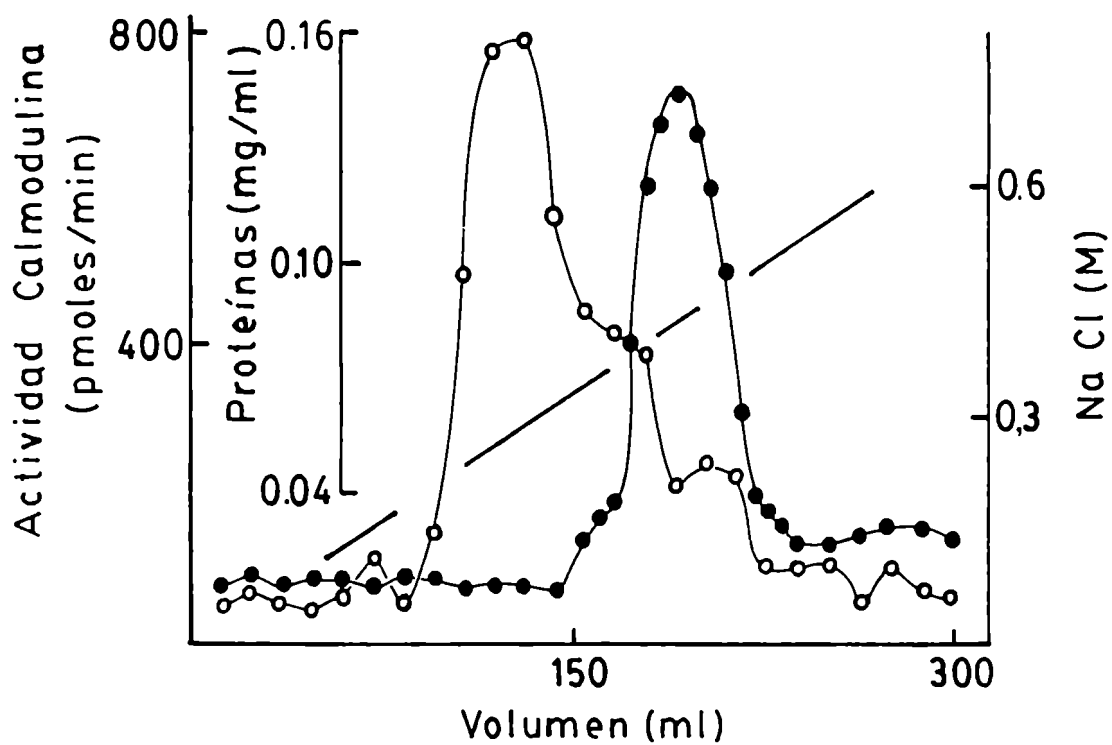


Figura 16: Cromatografía en DEAE-celulosa de un homogenato de hojas de espinaca.

- Proteínas (mg/ml)
- Actividad calmodulina (pmoles/min)

Materiales y Métodos

Las fracciones capaces de activar la fosfodiesterasa fueron combinadas y calentadas a 100 °C durante 10 minutos. Se eliminó el precipitado por centrifugación a 2000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante así obtenido fue denominado preparación DEAE.

XIV.2. Cromatografía de afinidad

A la preparación DEAE obtenida como se indica en la sección XIV.1, se le agregó CaCl₂ hasta llegar a una concentración de 5 mM. Esta preparación fue aplicada a una columna de fenilsefarosa previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 conteniendo CaCl₂ 5 mM.

El lecho de columna fue de 2.5 x 8 cm y se la lavó con 225 ml de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 conteniendo CaCl₂ 0.1 mM. Se eluyó la misma en tres etapas con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 conteniendo EGTA 1 mM a un flujo de 0.3 ml/minuto, obteniendo fracciones de 5 ml.

La primera etapa se realizó inmediatamente después del lavado recogiéndose 15 ml de eluido, y se dejó en contacto con el buffer de elución por 2 horas. En la segunda etapa se eluyó 30 ml de buffer. La tercera elución se realizó 48 horas después de la segunda, y se recogieron 70 ml de eluido.

La Figura 17 muestra el perfil de elución de la misma. a calmodulina eluye luego de dejar a la enzima unida a la resina en contacto con el buffer de elución durante 2 horas.

Las fracciones que contenían calmodulina se dializaron contra Tris-HCl 50 mM pH 7.4 durante la noche, se liofilizó y el material sólido obtenido fue conservado a -20°C.

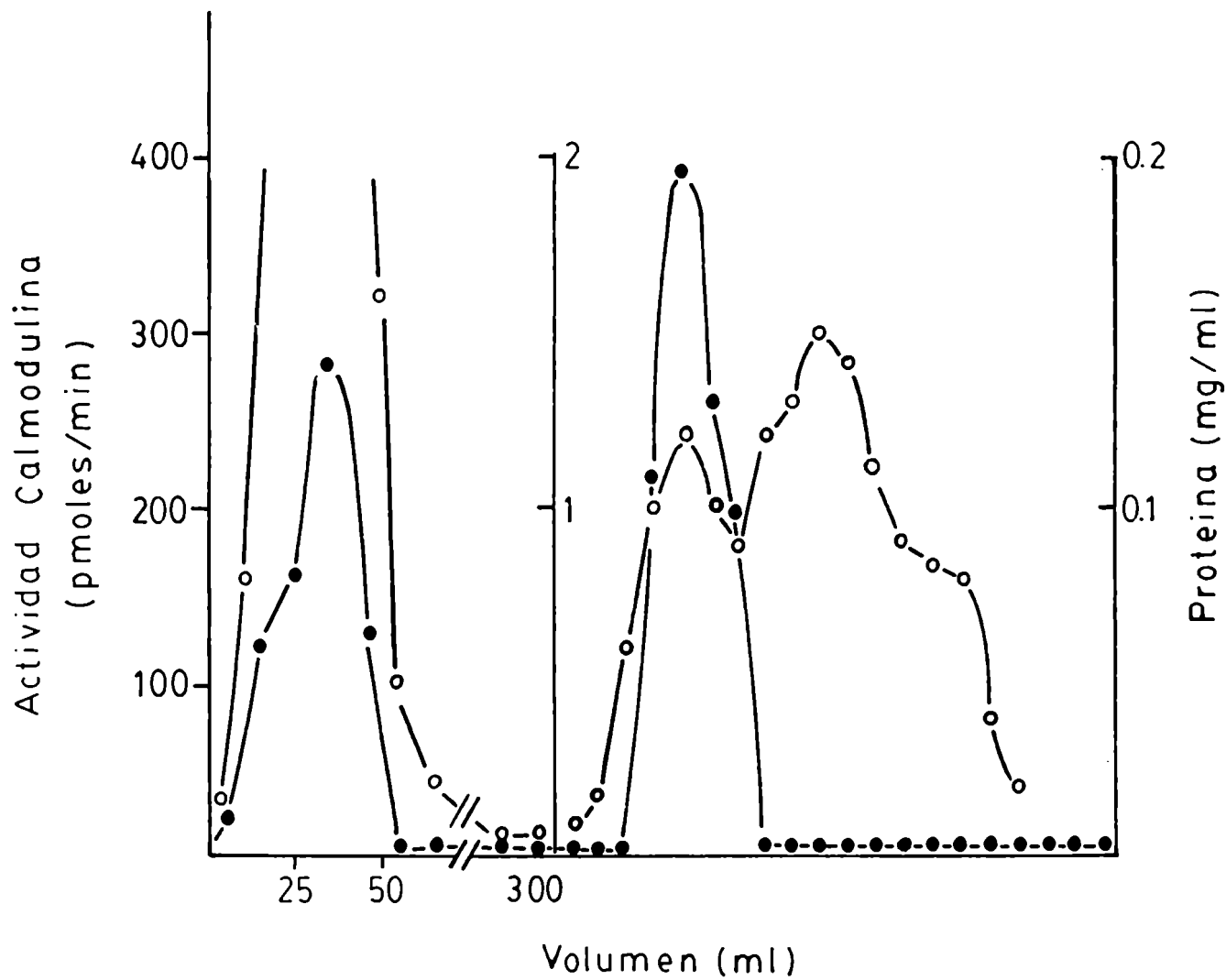


Figura 17: Cromatografía en fenil sepharosa de la fracción DEAE.

o Proteínas (mg/ml)
 o Actividad calmodulina (pmoles/min)

En la Figura 18 se observa un gel analítico en SDS-poliacrilamida de estas preparaciones. Se puede apreciar la presencia de 3 bandas, una de las cuales, que es mayoritaria, corresponde a un peso molecular de 16000, coincidente con el encontrado por Watterson (304) para la calmodulina de espinaca.

XV. ELECTROFORESIS ANALITICA EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA

Se realizaron geles planos polimerizados en una celda marca Bio-Rad, modelo C20 (305).

Dimensiones del gel separador: 8 cm de alto x 1.5 mm de espesor.

Composición del gel separador: acrilamida, 15% o 10% (P/V); bisacrilamida, 0.27% (P/V); SDS, 0.1% (P/V); Tris-ClH 0.375 mM pH 8.8; TEMED, 0.025% (V/V), y persulfato de amonio (PSA), 0.033% (P/V).

Dimensiones del gel concentrador: acrilamida, 5% (P/V); bisacrilamida, 0.13% (P/V); SDS, 0.1% (P/V); Tris-ClH 0.125 mM pH 6.8; TEMED, 0.05% (V/V), y PSA, 0.1% (P/V).

Preparación de la muestra y electroforesis: Las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en 80 μ l de una mezcla desnaturalizante de la siguiente composición:

SDS, 2% (P/V); 2-mercaptoetanol, 5% (V/V); glicerol, 20% (V/V); Tris-ClH, 0.06 M pH 6.8, y azul de bromofenol, 0.002% (P/V). Las muestras fueron calentadas durante 3 minutos en baño de agua a 100°C. El volumen de la muestra aplicada a cada canal fue de 50 μ l, conteniendo entre 10 y 100 μ g de proteína. El buffer de corrida fue Tris-Glicina 50 mM pH 8.0, conteniendo SDS 0.1% (P/V). La electroforesis fue realizada a una intensidad de corriente constante de 25 mD, durante 4-5 horas, manteniendo la temperatura a 15°C.

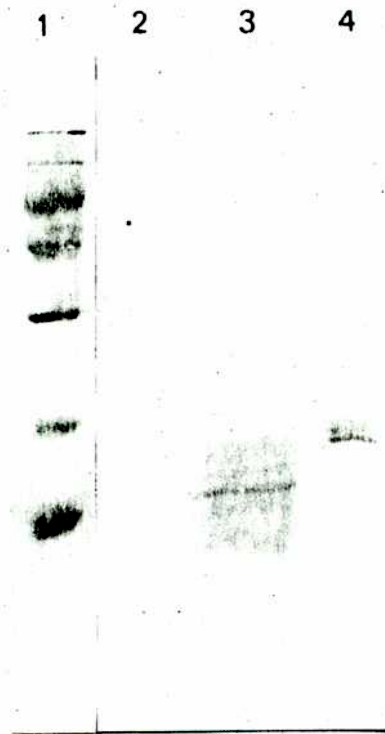


Figura 18: Gel analítico en SDS-poliacrilamida.

(Calle 3) Fracción DEAE; (Calle 2) Fracción fenil-sepharosa: (Calle 4) CaM de cerebro bovino; (Calle 1) Marcadores de peso molecular: Lactoalbúmina (14400), Inhibidor de tripsina (20000), Anhidrasa carbónica (30000), Ovoalbúmina (43000), Seroalbúmina bovina (67000), Fosforilasa b de músculo de conejo (94000).

Materiales y Métodos

Las proteínas para la calibración de los pesos moleculares fueron: fosforilasa b (músculo de conejo), albúmina (suero bovino), ovoalbúmina (clara de huevo), anhidrasa carbónica (eritrocito bovino) e inhibidor de tripsina (soja).

Los geles fueron fijados y teñidos al mismo tiempo, durante 2 horas a 37°C en una solución acuosa que contenía 25% (V/V), ácido acético 8% (V/V) y azul de Coomassie G o R250, 0.2% (P/V). El desteñido se hizo con la misma solución pero sin colorante.

XVI. PROCEDIMIENTOS ANALITICOS

XVI.1. Determinación de proteínas

Se utilizó el método de Lowry *et al.* (306): se tomó un volumen de muestra entre 5-200 μ l y se añadió 2 ml de una mezcla compuesta por: NaCo₃, 2% (P/V) y tartrato sódico potásico, 1% (P/V), CuSO₄ 5H₂O, 0.5% (P/V). En proporción 50:1 (V/V) se agitó y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 100 μ l de reactivo de Folin-Ciocaltean 1.47 N, y después de 15 minutos se midió la absorción de la mezcla de reacción a 700 nm. La recta patrón de concentraciones se calculó usando albúmina sérica bovina cristalina.

XVI.2. Radioinmuno análisis para la determinación de los niveles de cAMP

Las muestras a ser ensayadas fueron precipitadas con ácido tricloroacético 6% y conservadas a -70°C. Para la cuantificación de los niveles de cAMP se utilizó el *cyclic AMP*[¹²⁵I] *RIA*

Materiales y Métodos

Kit de New England Nuclear. Este se basa en una adaptación del método descrito por Steiner y col. (307). El antígeno marcado fue succinil tirosina-[¹²⁵I]-metil éster del cAMP.

Como primer anticuerpo se usó una globulina de conejo preparada contra el complejo succinil cAMP-albúmina, mientras que el segundo anticuerpo fue de oveja contra globulinas de conejo.

Las muestras fueron previamente acetiladas con anhídrido acético para aumentar la sensibilidad del ensayo y después de una incubación de toda la noche a 2-8°C con el complejo de anti-sueros, los tubos fueron centrifugados y los precipitados se contaron en un contador gamma marca Beckman.

En todos los casos se calculó el porcentaje de B/Bo según:

$$\% B/Bo = \frac{\text{cmp (muestra o standard)}}{\text{cmp ("0" standard)} \times 100}$$

Usando un papel semilogarítmico, se graficó el porcentaje B/Bo para cada standard en función de la concentración de cAMP correspondiente. Por interpolación en la curva standard así construida, se determinó la concentración de cAMP en cada muestra.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

I. ESTUDIO DE LA ADENILATO CICLASA DE *R. MELILOTI*

I.1. Localización subcelular

Se estudió la localización subcelular de la adenilato ciclasa de *R. meliloti* en las fracciones obtenidas a partir de un cultivo obtenido como se especificó en las secciones I.1 y I.2 de "Materiales y Métodos".

Los resultados de dichos experimentos se resumen en la Tabla 5. Como se observa, la actividad de adenilato ciclasa se encuentra localizada en un 60% en la fracción P₁₀₀ y un 40% en la fracción S₁₀₀. Este resultado sugirió que se trataba de una enzima débilmente asociada a membranas, sin embargo no podrían descartarse otras dos posibilidades:

- 1) Que la actividad encontrada fuese un producto de proteólisis parcial de una enzima asociada a membrana.
- 2) Que se tratase de dos genes distintos, uno cuya secuencia codificaría para la enzima soluble, y otro para la particulada.

Para descartar la primera posibilidad se realizó el tratamiento de ruptura y el ensayo enzimático en presencia de aprotinina (25 U/ml) o de fluoruro de sulfonil fenil metilo (PMSF) (0.5 mM), ambos inhibidores de proteasa.

El resultado de dicho experimento se muestra en la Tabla 6. El mismo indica que la distribución de las actividades de adenilato ciclasa en las fracciones P₁₀ y S₁₀ no se altera por la presencia o ausencia de inhibidores de proteasas. Esto indica que la actividad localizada en la fracción S₁₀₅ no es un producto de proteólisis.

| Fracción | Actividad Total (pmoles/min) | Actividad específica (pmoles/min/mg prot) |
|---|---------------------------------|--|
| Crudo | 120 | 30 |
| Sedimento de 3000xg.P ₃ | 80 | 23 |
| Sedimento de 10000xg.P ₁₀ | 360 | 24 |
| Sedimento de 100000xg.P ₁₀₀ | 672 | 62 |
| Sobrenadante de 100000xg.S ₁₀₀ | 390 | 37 |

TABLA 5: Distribución subcelular de la adenilato ciclasa de *R. melloti* (Mn²⁺-ATP como sustrato)

Resultados y Discusión

Para comprobar si se trata de una o dos enzimas, se obtuvieron en el laboratorio mutantes *cya*- por trasposición de un trasposón Tn5 como se indicó en "Materiales y Métodos". Las 6 mutantes obtenidas fueron ensayadas y no se detectó actividad de adenilato ciclasa en la fracción P₁₀₀ ni en la S₁₀₀, indicando que la enzima distribuida parcialmente entre la fracción particulada y la soluble es producto de un mismo gen.

Es de hacer notar en este caso, que la frecuencia de mutación obtenida es de 10^{-8} , valor que se corresponde a la frecuencia de trasposición. Si se tratara de dos genes (uno para la adenilato ciclasa de membrana y otro para la soluble), se esperaría un fenotipo *cya*- como producto de dos eventos de mutación y la frecuencia con que se obtendría dicho fenotipo sería el producto de la frecuencia de un evento por la frecuencia de un segundo evento mutacional.

Se ha demostrado que las enzimas débilmente asociadas a membrana pueden ser extraídas de la misma por un tratamiento en altas concentraciones salinas. Para ello, se realizó el fraccionamiento en presencia de NaCl 0.5 M.

Como se ve en la Tabla 6, el 70% de la actividad total se encuentra ahora localizada en la fracción S₁₀₀ luego del tratamiento salino.

En base a los datos obtenidos, puede concluirse que la adenilato ciclasa de *R. meliloti* es una enzima débilmente asociada a membranas.

Para investigar cuál es la variación de la actividad de adenilato ciclasa en los distintos estadios de cultivo, se cultivó *R. meliloti* en medio YM, y se tomaron alícuotas a distintos tiempos. La curva de crecimiento de *R. meliloti* que se muestra en la Figura 19.

Cada una de las alícuotas fue centrifugada a $10.000 \times g$ durante 10 minutos y los sedimentos fueron conservados a -70°C para medirles posteriormente la actividad adenilato ciclasa.

| Agregados al tampón de homogeneizador | Fracciones | Actividad de Adenilato ciclasa | |
|---|-----------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| | | Total (pmol/min) | Específica (pmol/min/mg prot) |
| Ninguno | Sedimento 100000xg | 684 | 165 |
| | Sobrenadante 100000xg | 508 | 52 |
| PMSF 0.5 mM | Sedimento 100000xg | 604 | 73 |
| | Sobrenadante 100000xg | 480 | 61 |
| Apotrimina 25 U/ml | Sedimento 100000xg | 608 | 78 |
| | Sobrenadante 100000xg | 490 | 63 |
| NaCl 0.5 M | Sedimento 100000xg | 350 | 75 |
| | Sobrenadante 100000xg | 860 | 48 |

TABLA 6: Actividad adenilato ciclasa en *R. melliloti* (Mn^{2+} -ATP como sustrato)

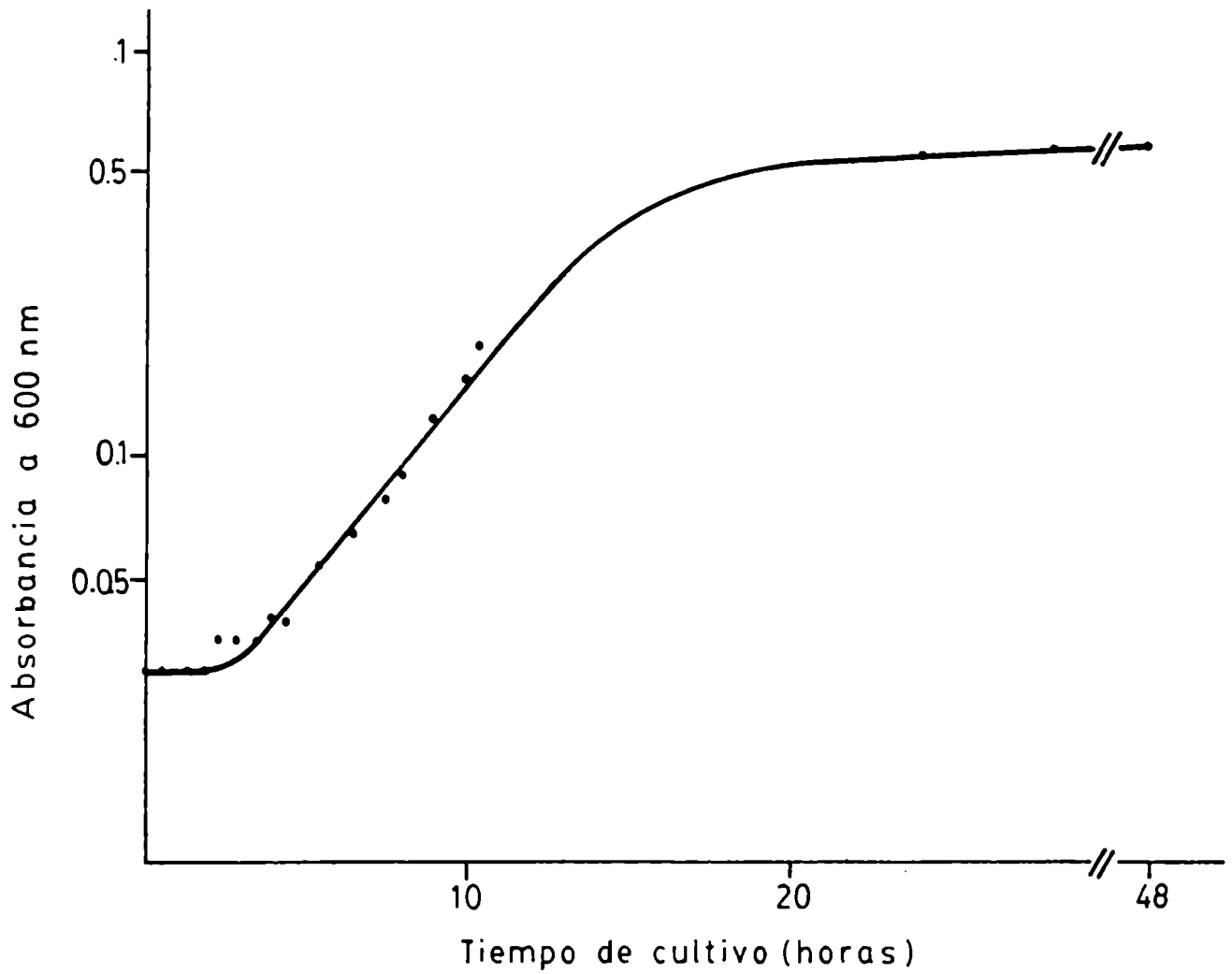


Figura 19: Curva de crecimiento de *Rhizobium meliloti* Rm102F51. El cultivo fue realizado en medio YM a 30°C con agitación rotatoria (200 rpm).

Resultados y Discusión

Como se ve en la Figura 20, la actividad específica de adenilato ciclasa disminuye a medida que el cultivo pasa de su fase de crecimiento exponencial a la fase estacionaria donde la actividad se mantiene relativamente constante.

I.2. Sustrato, cinética y efectores

Se estudiaron los requerimientos de catión de la adenilato ciclasa de *R. meliloti* para lo cual se midió la actividad enzimática en las distintas fracciones intracelulares como se indicó en la sección VIII de "Materiales y Métodos" usando como catión Mg^{2+} o Mn^{2+} .

Como se ve en la Figura 21, la actividad enzimática en presencia de Mg^{2+} es despreciable frente a la actividad encontrada con Mn^{2+} . El resultado obtenido en presencia de Mg^{2+} en todas las otras fracciones subcelulares fue similar al encontrado en la fracción P100.

A partir de los datos obtenidos se decidió usar como tiempo de reacción 10 minutos, ya que tanto en la fracción P100 como S100, la actividad enzimática es lineal en esta zona.

Se estudió luego la relación entre la actividad enzimática y la concentración de proteínas en el ensayo para las fracciones P100 y S100. Los resultados se muestran en las Figuras 22a y 22b. En el caso de la fracción P100, el sistema se satura cuando la cantidad de proteínas en el ensayo supera los 0.25 mg, mientras que el valor saturante es de 0.1 mg para la fracción S100; por lo tanto, los ensayos fueron realizados utilizando concentraciones de proteínas que no superasen los 0.25 mg y 0.1 mg para las fracciones P100 y S100, respectivamente.

Para determinar las concentraciones óptimas de Mn^{2+} y ATP en el ensayo de adenilato ciclasa de *R. meliloti*, se midió la actividad enzimática variando la concentración de catión a una

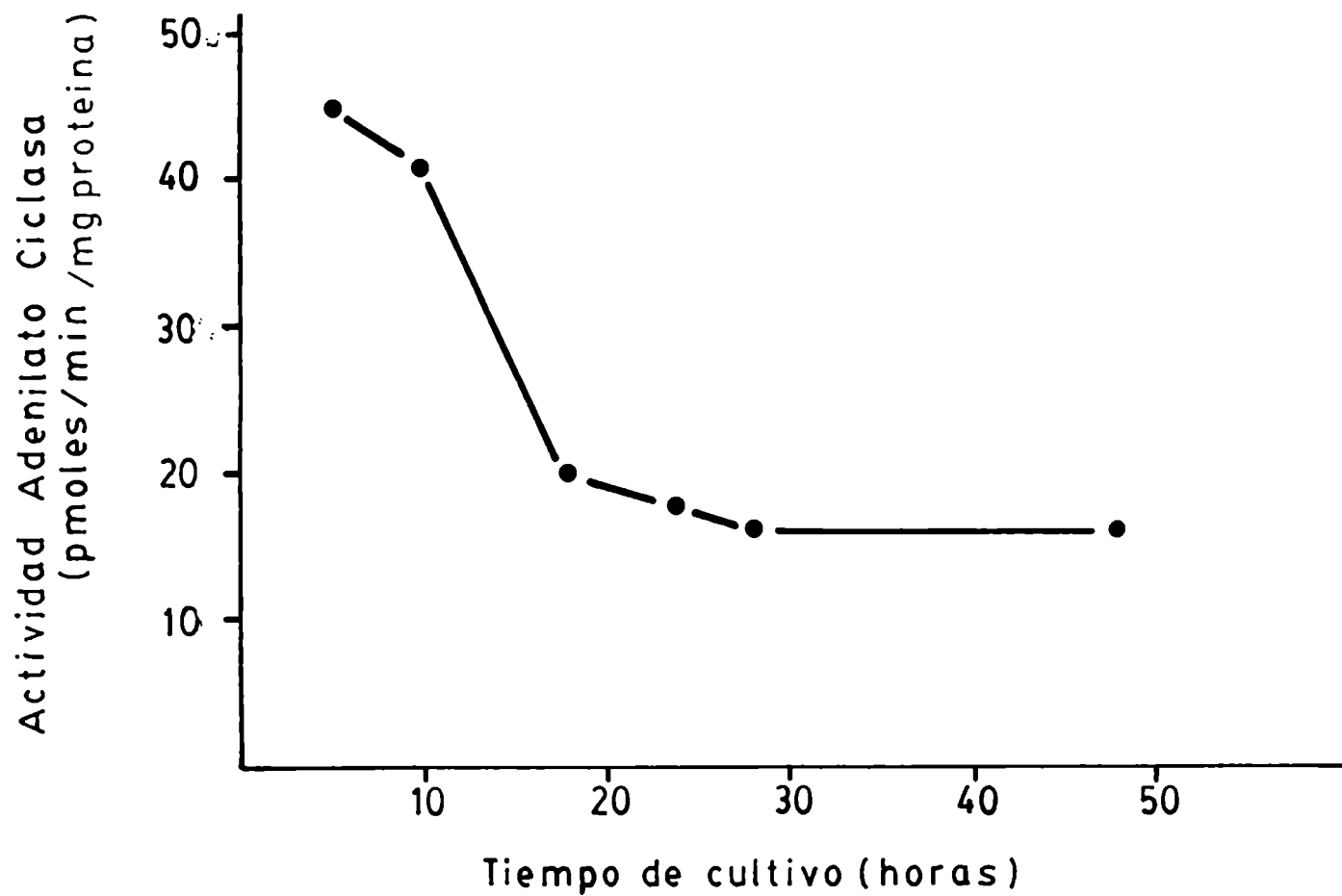


Figura 20: Actividad adenilato ciclasa de *Rhizobium meliloti* Rm102F51 en distintas etapas de cultivo.

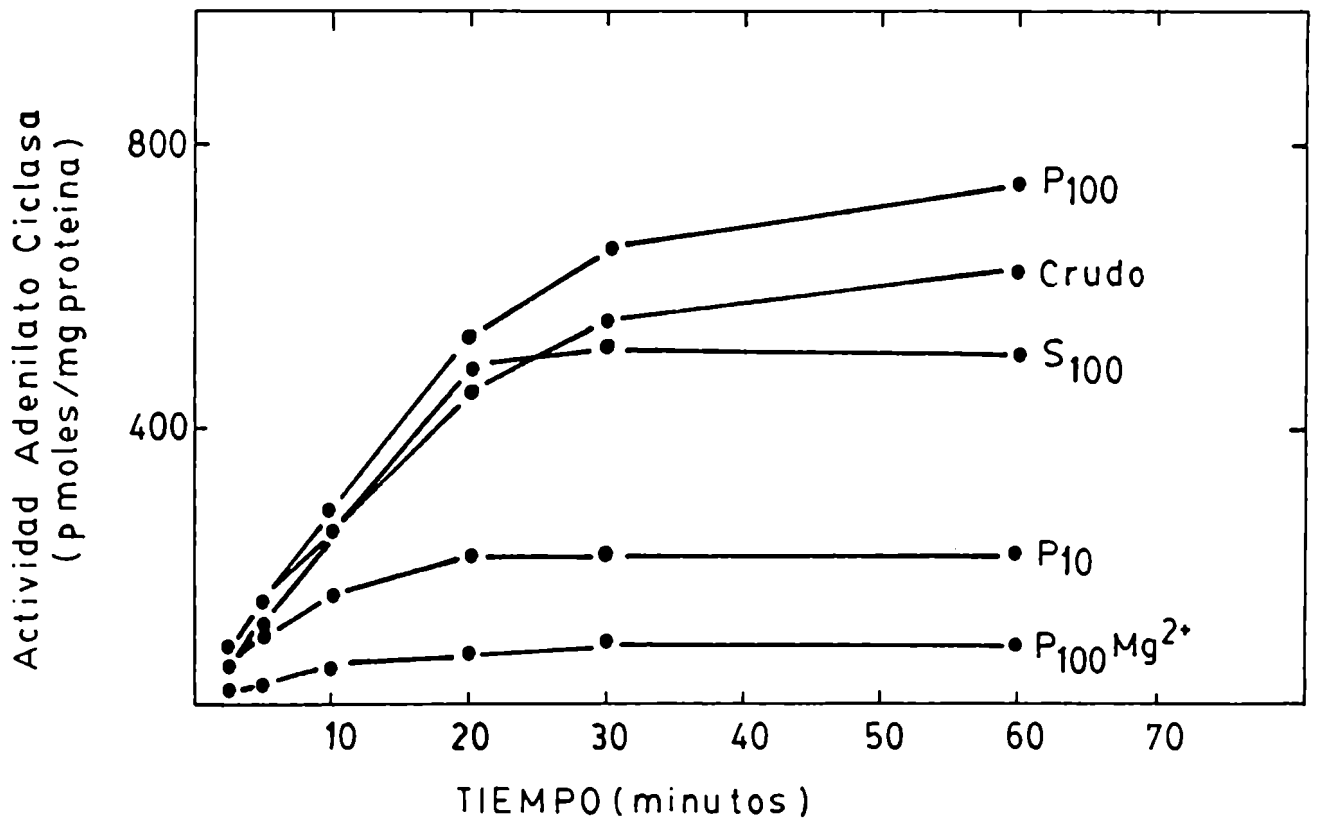


Figura 21: Actividad adenilato ciclasa en las distintas fracciones subcelulares de *Rhizobium meliloti* usando como sustrato ATP-Mg²⁺ o ATP-Mn²⁺.

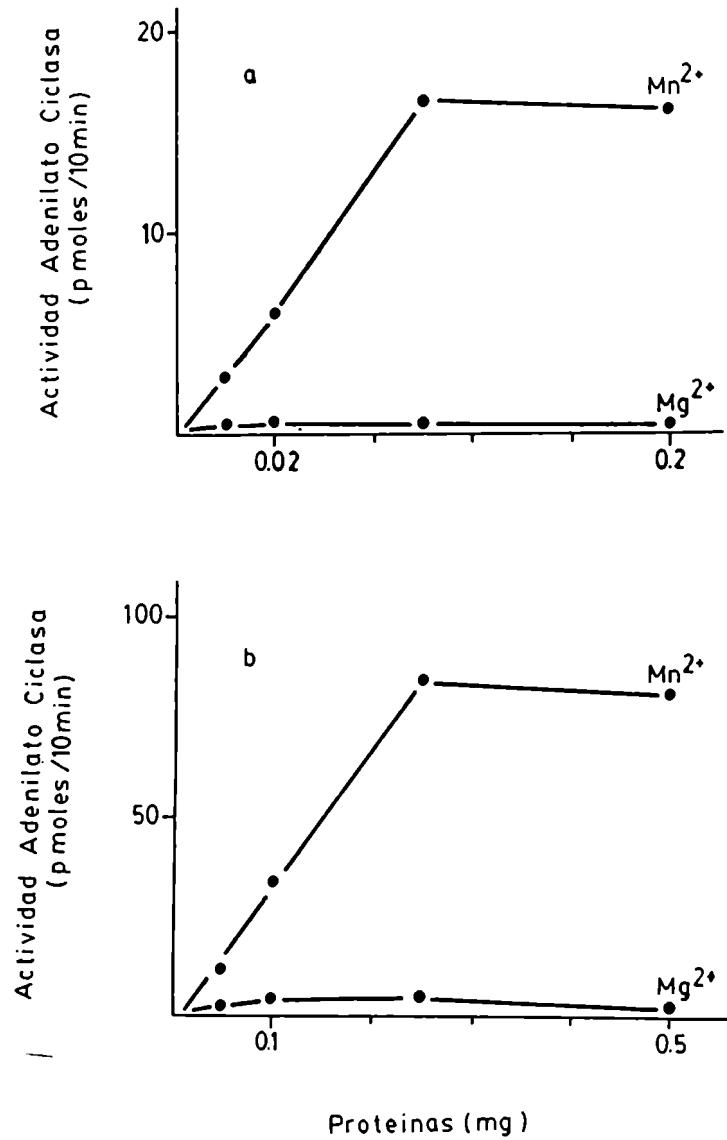


Figura 22: Actividad adenilato ciclasa en *Rhizobium meliloti* en función de la concentración de proteínas de las fracciones S100 (a) o P100 (b), utilizando ATP- Mg^{2+} o ATP- Mn^{2+} como sustrato.

Resultados y Discusión

concentración fija de nucleótido y, a su vez, modificando la concentración de nucleótido, manteniendo fija la de catión.

En las Figuras 23a y 23b vemos que la concentración óptima de Mn^{2+} fue 1 mM y la de ATP 0.5 mM. Estos valores fueron los mismos para las fracciones P100 y S100, indicando que los requerimientos de concentración del catión y de ATP son los mismos para ambas fracciones.

Además se estudió el efecto sobre esta adenilato ciclasa en las fracciones P100 y S100, de conocidos activadores de ciclasas eucarióticas tales como F-:GTP; Gppp(NH)p; Forskolina y GTP γ S.

Los efectores fueron ensayados en distintas concentraciones usando como catión Mg^{2+} o Mn^{2+} . Ninguno de ellos fue capaz de estimular la actividad enzimática por encima del nivel basal.

Los resultados hasta aquí expuestos demuestran que la adenilato ciclasa de *R. meliloti*:

- 1) Está localizada en un 40% en la fracción soluble, mientras que el otro 60% está asociado a membranas.
- 2) Es una proteína extrínseca de membrana, ya que puede ser extraída de la misma por un tratamiento con NaCl 0.5 M.
- 3) Requiere Mn^{2+} como catión, siendo despreciable la actividad en presencia de Mg^{2+} .
- 4) Su actividad enzimática decae a medida que el cultivo de *R. meliloti* alcanza su fase estacionaria, mientras que la distribución subcelular de la enzima permanece constante.
- 5) No puede ser estimulada por efectores como F, GTP o sus análogos no hidrolizables y Forskolina.

Todos estos datos indicaron que la adenilato ciclasa de *R. meliloti* se asemejaría a una típica protociclasa, como la que se encuentra en algunos eucariotes inferiores (21) y en bacterias como *E. coli* (152)(153).

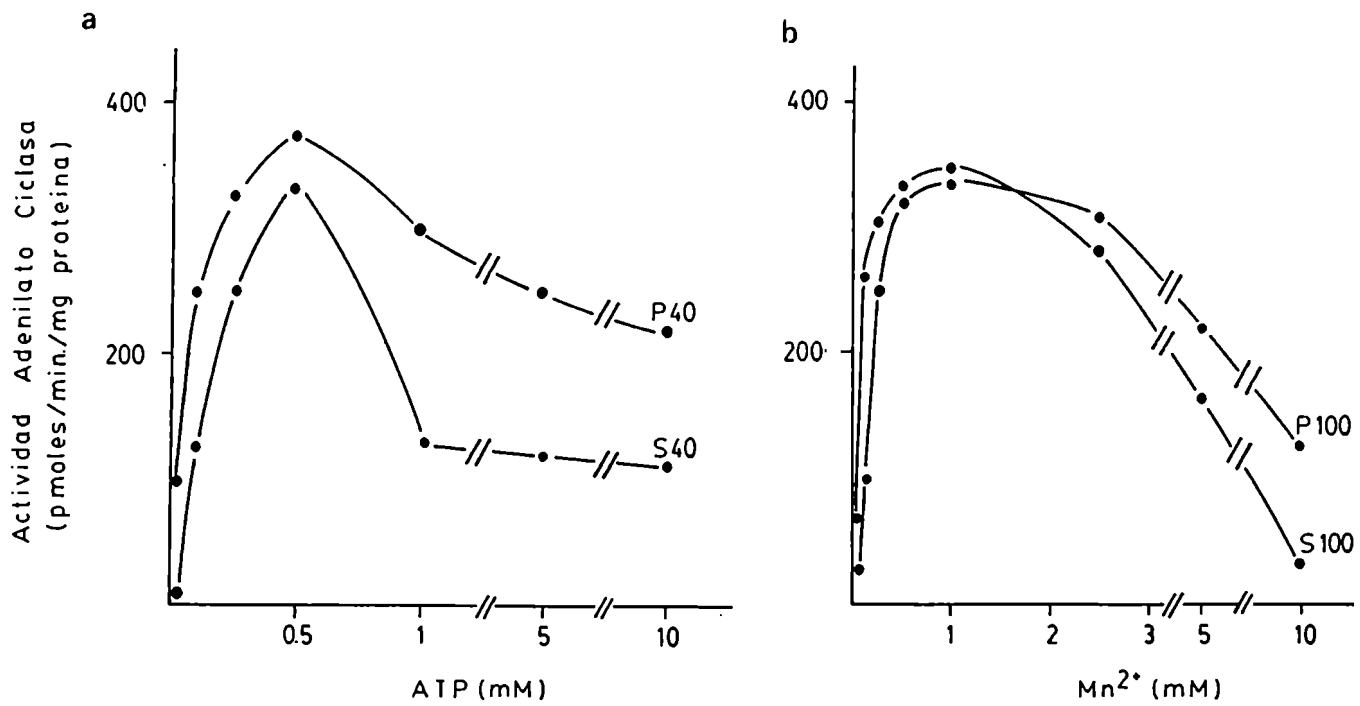


Figura 23: Actividad adenilato ciclasa en *Rhizobium meliloti* en función de la concentración de ATP a Mn^{2+} constante 1 mM (a) y de Mn^{2+} a ATP constante 0.5 mM (b) en las fracciones subcelulares P100 y S100.

II. PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA ADENILATO CICLASA DE *R. MELILOTI*

La fracción cruda de un cultivo de *R. meliloti* Rm102FS1 con una actividad específica de 60 pmoles/min/mg de proteína obtenida como se indicó en "Materiales y Métodos", fue centrifugada a 105.000 x g durante 2 horas obteniéndose así la fracción S100 con una actividad específica de 150 pmoles/min/mg proteína.

II.1. Cromatografía en DEAE-celulosa

La fracción S100 fue cromatografiada en una columna de DE-S2. El perfil de elución obtenido se muestra en la Figura 24.

La adenilato ciclasa se eluye a una concentración de NaCl de 0.28 M con una actividad específica de 2560 pmoles/min/mg de proteína. Este valor es aproximadamente 14 veces mayor al correspondiente a la fracción cruda.

II.2. Filtración por geles (Ultrogel Aca34)

Las fracciones obtenidas en la cromatografía en DEAE-celulosa que presentaron actividad de adenilato ciclasa fueron aplicadas a una columna de Ultrogel Aca34. El perfil de elución obtenido se muestra en la Figura 25.

uede apreciarse que la actividad de adenilato ciclasa eluye como un único pico con una actividad específica de 49 pmoles/min/mg de proteína. Este valor es aproximadamente 17 veces mayor al correspondiente a la fracción sembrada en la columna.

A través de los pasos descritos anteriormente se obtuvo una enzima purificada 325 veces como se observa en la Tabla 7. La mayor dificultad encontrada fue la rápida inactivación de la enzima. Manteniendo una preparación cruda o una fracción S100 a

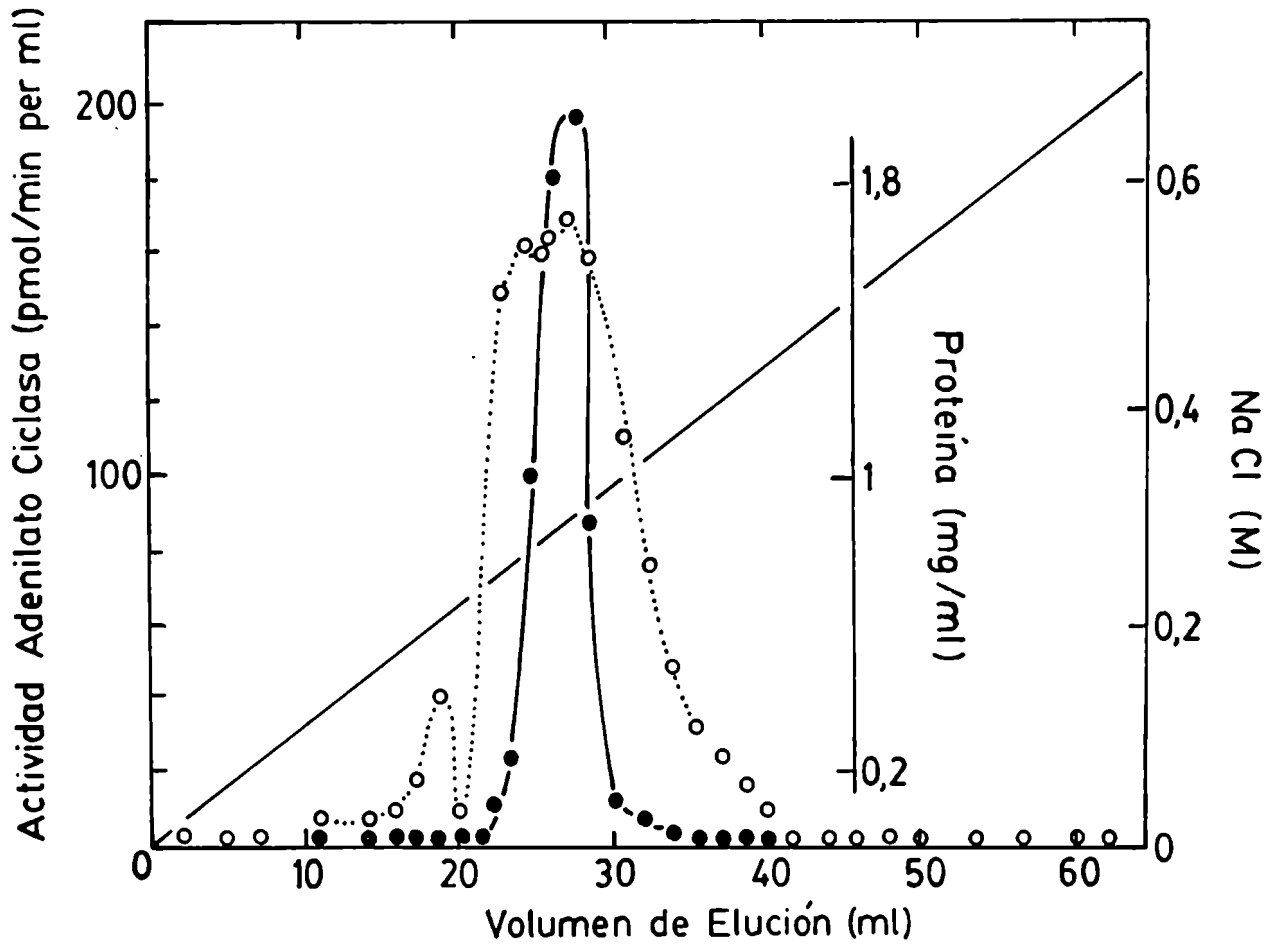


Figura 24: Cromatografía en DEAE-celulosa de una fracción S100 de *Rhizobium meliloti*.

- Proteínas (mg/ml)
- Actividad adenilato ciclasa (pmoles/min/ml)

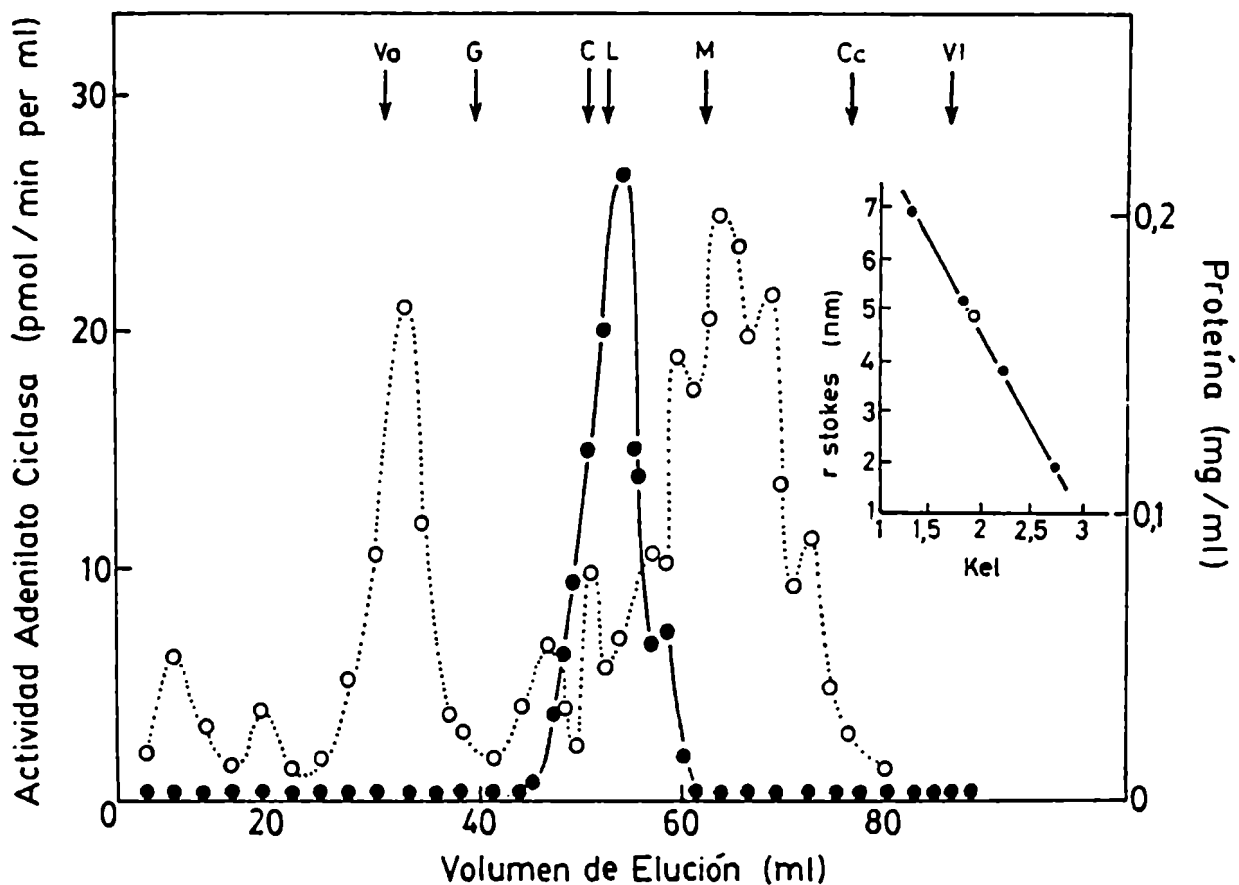


Figura 25: Filtración en geles (Aca34) de una fracción DEAE de *Rhizobium meliloti*.

○ Proteínas (mg/ml)

● Actividad adenilato ciclasa (pmoles/min/ml)

Marcadores de peso molecular: C_c=citocromo C; M=malato deshidrogenasa; L=lactato deshidrogenasa; C=catalasa; G=β-galactosidasa.

| Fracción | Proteína (mg) | Actividad Total (pmol/min) | Actividad Específica (pmol/min/mg prot) | Recuperación % | Factor de Purificación % |
|----------------|---------------|----------------------------|---|----------------|--------------------------|
| S100 | 53 | 8000 | 150 | 100 | |
| DEAE celulosa | 1.4 | 3700 | 2560 | 47 | 17 |
| Ultragel Aca34 | 0.06 | 2800 | 48800 | 35 | 325 |

TABLA 7: Purificación parcial de la Adenilato ciclasa de *Rhizobium meliloti*

Resultados y Discusión

4°C en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 toda la noche, la actividad cae prácticamente en un 100%. Esta situación pudo ser controlada parcialmente por el agregado de glicerol 5% y β mercaptoetanol 1 mM, con lo cual se preservaba la actividad en aproximadamente un 40%.

La actividad de las fracciones obtenidas en los siguientes pasos de purificación se mostró más estable si bien la enzima no pudo ser conservada en su forma activa por más de 72 horas.

Utilizando esta enzima parcialmente purificada, se determinaron los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la misma.

II.3. Gradientes de sacarosa

Con el objeto de conocer el coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) y el volumen específico parcial (v) de la enzima, se realizaron centrifugaciones en gradientes de sacarosa hechos en H_2O y D_2O . Los resultados se muestran en la Figura 26. En la curva de calibración inserta en dicha figura se graficó la distancia recorrida por cada proteína hasta la posición alcanzada al finalizar la centrifugación (r), en función del coeficiente de sedimentación (s).

Las constantes de sedimentación fueron las mismas para ambos gradientes, presentando un valor de 6.3 S. Este hecho indica que la adenilato ciclasa y las proteínas marcadoras tienen, esencialmente, el mismo volumen específico parcial, 0.74 ml/g, que es característico de las proteínas globulares solubles como la adenilato ciclasa soluble de testículo (Kornblihtt), la de *N. crassa* (J.A. Reig) descriptas en nuestro laboratorio y la de riñón descripta por Neer (1981).

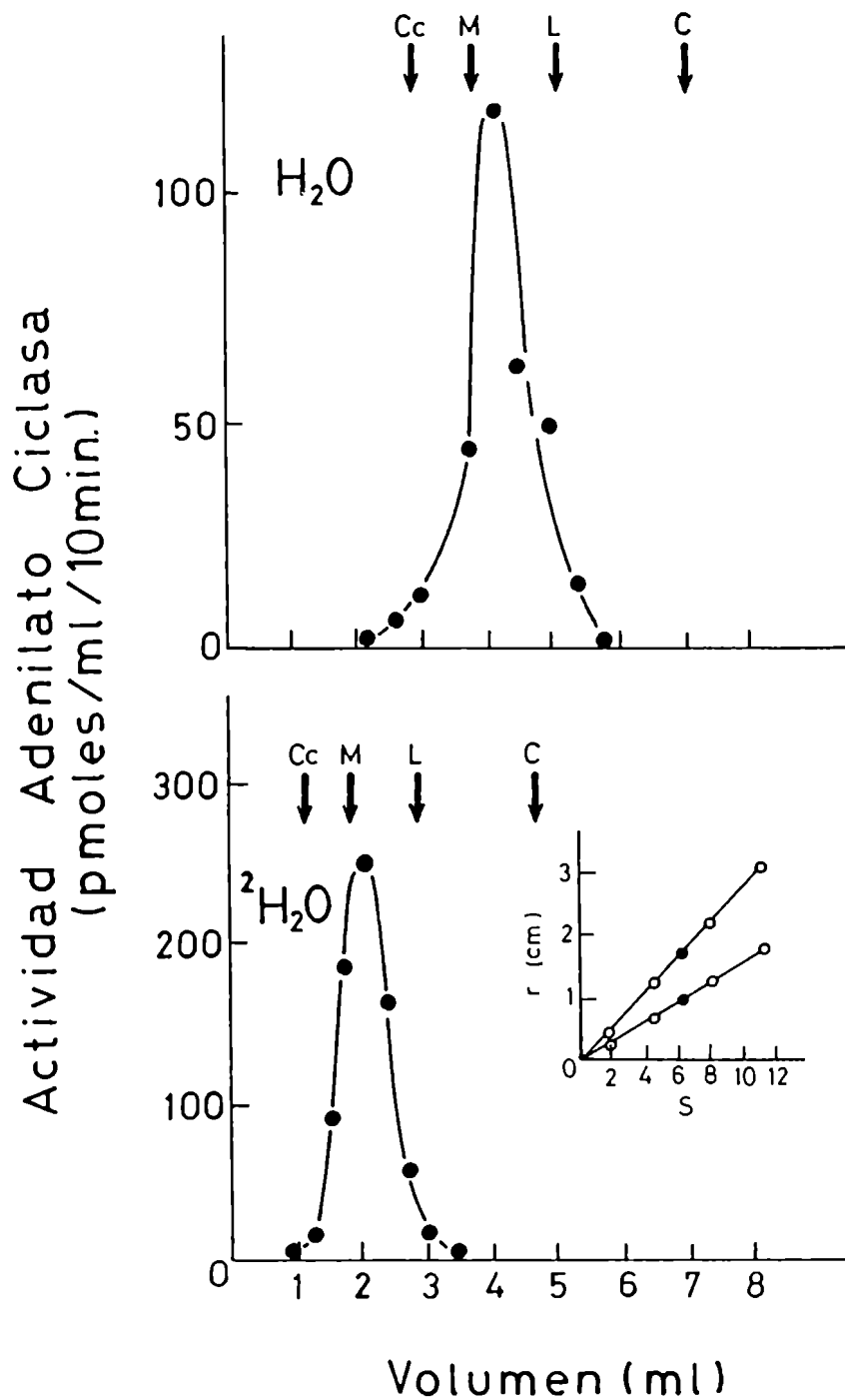


Figura 26: Gradientes de sacarosa en H₂O y ²H₂O de la adenilato ciclasa de *Rhizobium meliloti*.

Proteínas marcadoras: Cc (citocromo C); M (malato deshidrogenasa); L (lactato deshidrogenasa); C (catalasa)

Conociendo los valores del radio de Stokes (Figura 25), el coeficiente de sedimentación y el volumen específico parcial de la enzima, es factible estimar su peso molecular utilizando la fórmula planteada en la sección XII.3 de "Materiales y Métodos". El valor calculado es de 140.000 D. Además, se calculó el coeficiente friccional de 1.39 para la enzima, lo que indica que la misma se aleja de la esfericidad y/o presenta hidratación, ya que dicho valor se aleja de la unidad. Los parámetros hidrodinámicos y moleculares de esta enzima se resumen en la Tabla 8.

III. OBTENCION DE MUTANTES CYA- DE *R. MELILOTI*

III.1. Recuento y frecuencia de mutación

La mezcla de conjugación conteniendo las bacterias Rm102F51 mutagenizadas como se indicó en la sección VI.3 de "Materiales y Métodos" y la cepa dadora *E. coli* 1830, fue plaqueada en los distintos medios de cultivo obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 9.

En base a estos recuentos, pudimos calcular la frecuencia de conjugación, que fue de 3.10^{-2} .

Tomando en cuenta el número de bacterias capaces de crecer en el medio SMG-L con respecto al número de bacterias que habían recibido el plásmido pJB4J1, se calculó una frecuencia de mutación de 10^{-6} .

Las seis mutantes obtenidas presentaban resistencia a kanamicina y a gentamicina, lo cual nos permitió pensar que el plásmido pJB4J1 de 70 megadalton estaba aún presente. Para verificar esta hipótesis, se purificó el DNA plasmídico de *E. coli* 1830, de la cepa salvaje de *R. meliloti* Rm102F51, de las transconjugantes y de las 6 mutantes cya-.

PARAMETROS MOLECULARES DE LA ADENILATO
CICLASA DE R. MELILOTI

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Coeficiente de Sedimentación (S) | 63 |
| Radio de Stokes (nm) | 4.8 |
| Volumen Específico Parcial (ml/g) | 0.74 |
| Peso Molecular | 140.000 |
| Coeficiente Friccional | 1.39 |

TABLA 8

| Tipo de selección | Microorganismo seleccionado | CFU/ml | Frecuencia de |
|--|---|-------------------|--|
| LB + ácido nalidíxico | <i>E. coli</i> | 4.5×10^7 | |
| M9 + Biotina + Estreptomicina | <i>R. meliloti</i> | 2.5×10^8 | $\frac{8.6 \times 10^6}{2.5 \times 10^8} = 3 \times 10^{-2}$ |
| M9 + Biotina + Estreptomicina + Kanamicina | <i>R. meliloti</i> transconjugantes | 8.6×10^6 | $\frac{60}{8.6 \times 10^6} = 7 \times 10^{-8}$ |
| SMGL + Kanamicina | <i>R. meliloti</i> transconjugantes mutantes <i>cya</i> - | 60 | |

TABLA 9: Conjugación *E. coli* 9 $\text{Nal}^R/\text{Gen}^R\text{Kan}^R$ x *R. meliloti* Sm^R

Resultados y Discusión

En el gel de agarosa a 0.6% que se muestra en la Figura 27, se puede observar que todas las mutantes *cya*⁻ conservan el plásmido pJB4J1 de 70 m dalton presente en *E. coli* 1830. Como era de esperar, la cepa Rm102F51 no presenta dicho plásmido, pero sí los productos de conjugación.

La presencia del plásmido pJB4J1 en las mutantes *cya*⁻ indicaría que el mismo es capaz de replicarse en *R. meliloti*, y que es compatible con los otros plásmidos presentes en la bacteria, como, por ejemplo, el megaplásmido donde se encuentran localizados los genes responsables de la fijación de nitrógeno y la nodulación.

Podemos afirmar que todas las mutantes *cya*⁻ son mutantes de transposición, debido a que: 1) las seis mutantes aisladas en medio SMGL son Kanamicina resistentes, lo cual indica presencia del transposón utilizado; 2) cuando se sembró en SMGL la cepa salvaje Rm102F51, aún en un número de bacterias 10 veces superior al usado en la conjugación, no se observó crecimiento alguno descartando la posibilidad de que sean producto de mutaciones espontáneas; y 3) la frecuencia con que se obtuvieron las mutantes *cya*⁻ Km^R es del orden de 10⁻⁶, que coincide con la frecuencia de transposición.

III.2. Actividad adenilato ciclasa en las presuntas mutantes *cya*⁻

Para estudiar si la capacidad de crecer en medio SMG-L era revertida por la presencia de cAMP, las 6 mutantes putativas obtenidas fueron plaqueadas en medio SMG-L conteniendo cAMP 2 mM y 5 mM. Se observó que el crecimiento era normal en medio SMG-L, pero que el mismo era muy pobre en presencia de cAMP 2 mM; mientras que cuando el medio de cultivo contenía 5 mM de cAMP no se observó crecimiento alguno. La reversión del fenotipo por la presencia de cAMP indica que las mutantes serían *cya*⁻ y no *crp*⁻.

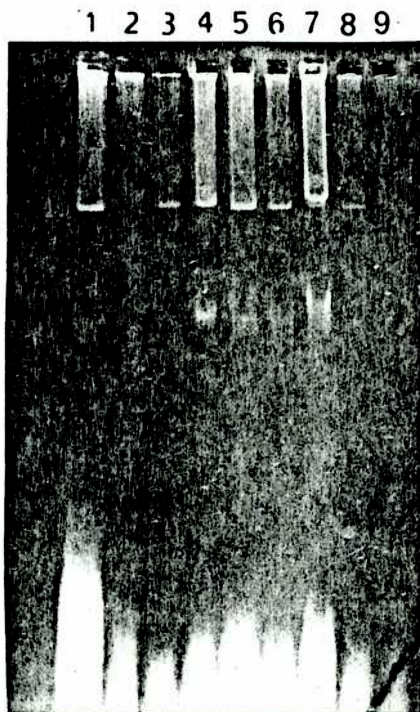


Figura 27: Electroforesis en geles de agarosa de las preparaciones de plásmidos obtenidas a partir de la cepa salvaje Rm102F51 (calle 2); *E. coli* 1830 (calle 1); transconjugantes (calle 3) y mutante 1 a 6 (calles 4 a 9).

Resultados y Discusión

Para confirmar el fenotipo *cya-*, 0.5 ml de inóculo congelado a -70°C de cada una de las 6 presuntas mutantes, fueron sembrados en 100 ml de medio YM, y cultivados a 30°C hasta alcanzar la fase logarítmica tardía de crecimiento. En ese momento, los cultivos fueron centrifugados, los pellets guardados a -70°C hasta el momento en que se procedió a su ruptura, y homogeneizados como se indicó en la sección I.2 del capítulo "Materiales y Métodos".

En la Tabla 10 se puede observar que ninguna de las 6 posibles mutantes presentó actividad adenilato ciclasa en presencia de ATP-Mn^{2+} . Resultados similares se obtuvieron cuando se usó ATP-Mg^{2+} como sustrato.

Los controles utilizados fueron la cepa salvaje Rm102F-51 y dos mutantes: WT131 (*fix-*) y WT149 (*nod-*), las cuales mostraron tener niveles de adenilato ciclasa equivalentes. También la distribución de la enzima entre la fracción de membranas (P_{100}) y la soluble (S_{100}) fue similar en las 3 cepas.

III.3. Prueba de infectividad de las mutantes *cya-* de *R. meliloti*

Con el objeto de estudiar la capacidad infectiva de las mutantes *cya-* en *M. sativa*, se inocularon semillas de *M. sativa* con cada una de las 6 mutantes obtenidas por trasposición, con la cepa salvaje Rm102F51, y con las mutantes WT131 y WT149, como se indicó en la sección III del capítulo "Materiales y Métodos".

La Figura 28, muestra los resultados después de 2 meses de crecimiento. Se observó que ninguna de las mutantes fue capaz de formar nódulos en *M. sativa*, observándose un crecimiento muy inferior al que mostraron las plantas inoculadas con la cepa Rm-102F51, que sí desarrollaron nódulos.

| | Fracción | Actividad total (pmoles/min) | Actividad Específica (pmoles/min/mg prot) |
|-----------|--------------------------------------|---------------------------------|--|
| Rm102 F51 | S ₁₀₀ P ₁₀₀ | 94 280 | 16 28 |
| WT 149 | S ₁₀₀ P ₁₀₀ | 95 240 | 16 25 |
| WT 131 | S ₁₀₀ P ₁₀₀ | 88 260 | 19 28 |
| Mutante 1 | S ₁₀₀ P ₁₀₀ | -- 0.48 | -- 0.10 |
| Mutante 2 | S ₁₀₀ P ₁₀₀ | -- 0.11 | -- 0.04 |
| Mutante 3 | S ₁₀₀ P ₁₀₀ | -- 0.83 | -- 0.27 |
| Mutante 4 | S ₁₀₀ P ₁₀₀ | 1.88 1.33 | 0.73 0.31 |
| Mutante 5 | S ₁₀₀ P ₁₀₀ | 0.07 0.86 | 0.03 0.27 |
| Mutante 6 | S ₁₀₀ P ₁₀₀ | 1.82 0.51 | 0.46 0.19 |

TABLA 10: Actividad adenilato ciclasa en presuntas mutantes de *Cya*-derivadas de *R. melloti* Rm102 F51

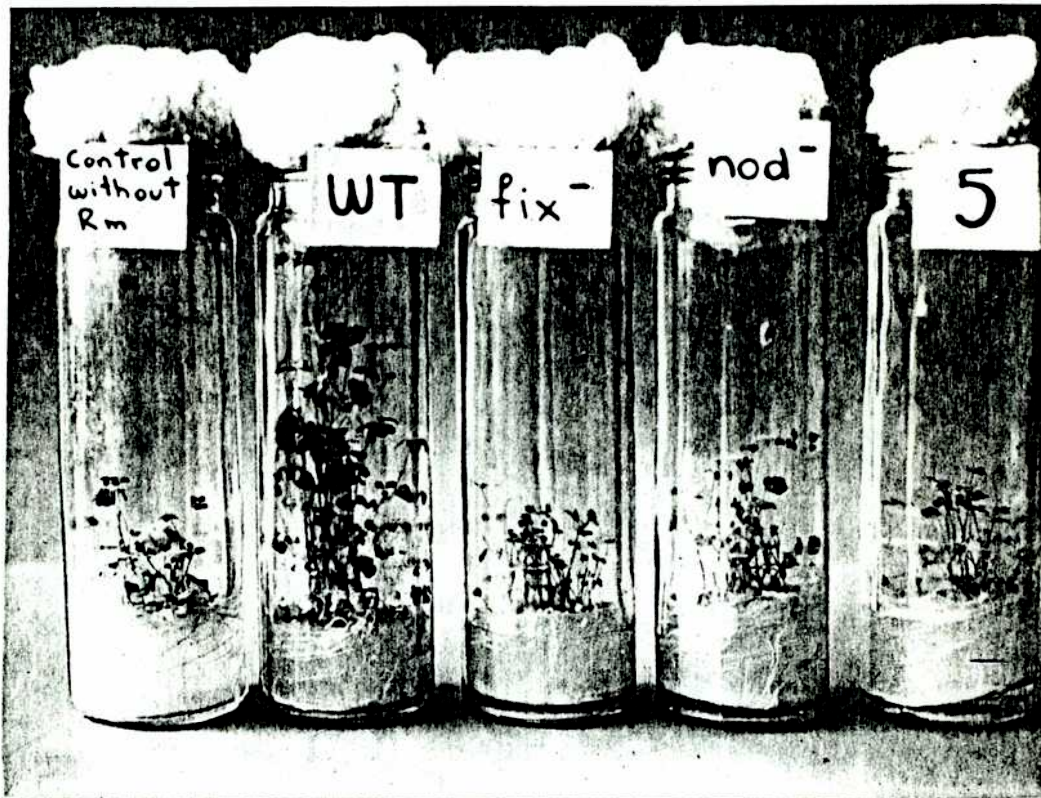


Figura 28: Las plantas fueron inoculadas con las cepas (de derecha a izquierda) mutante 5; WL131 (nod-); WL149 (fix-); Rm102F51 (WT); o no inoculadas.

Resultados y Discusión

El aspecto de las plantas infectadas con las mutantes *cya-* es similar al de las plantas control no inoculadas y al de aquéllas que fueron inoculadas con la mutante WT149 (*nod-*) que no noduló, y con la mutante WT131 (*fix-*) que si bien formó nódulos (Figura 29), estos son inactivos, es decir, carecen de la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Es de hacer notar que, si bien las Figuras 28 y 29 muestran el resultado obtenido con las mutantes 5 y 3 respectivamente, el aspecto de las plantas y sus raíces fue el mismo con cualquiera de las otras cuatro mutantes obtenidas.

Por otro lado, todas las colonias aisladas en SMGL son Km^R. Es importante también señalar que estas mutantes mantienen el fenotipo *cya-* aún después de más de 50 generaciones.

La incapacidad de formar nódulos de las 6 mutantes *cya-* mostrada en las pruebas de infectividad con *M. sativa*, sugiere que el cAMP podría ser necesario en algún paso del proceso de infección de las raíces por parte del *R. meliloti*.

Vimos que la adenilato ciclasa de *R. meliloti* no está presente cuando éste ya está en su forma de bacteroide, lo cual indicaría que el paso del proceso de nodulación en el que el cAMP estaría involucrado sería un paso temprano del proceso, tal vez actuando como receptor de señales emitidas por la planta.

IV. ADENILATO CICLASA EN NODULOS SIMBIOTICOS DE *M. SATIVA*

Los nódulos radiculares de *M. sativa* fueron extraídos de las plantas, desinfectados y homogeneizados, como se indicó en "Materiales y Métodos".

Se midió la actividad adenilato ciclasa en todas las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial a partir de un homogenato o fracción cruda de nódulos de *M. sativa*.

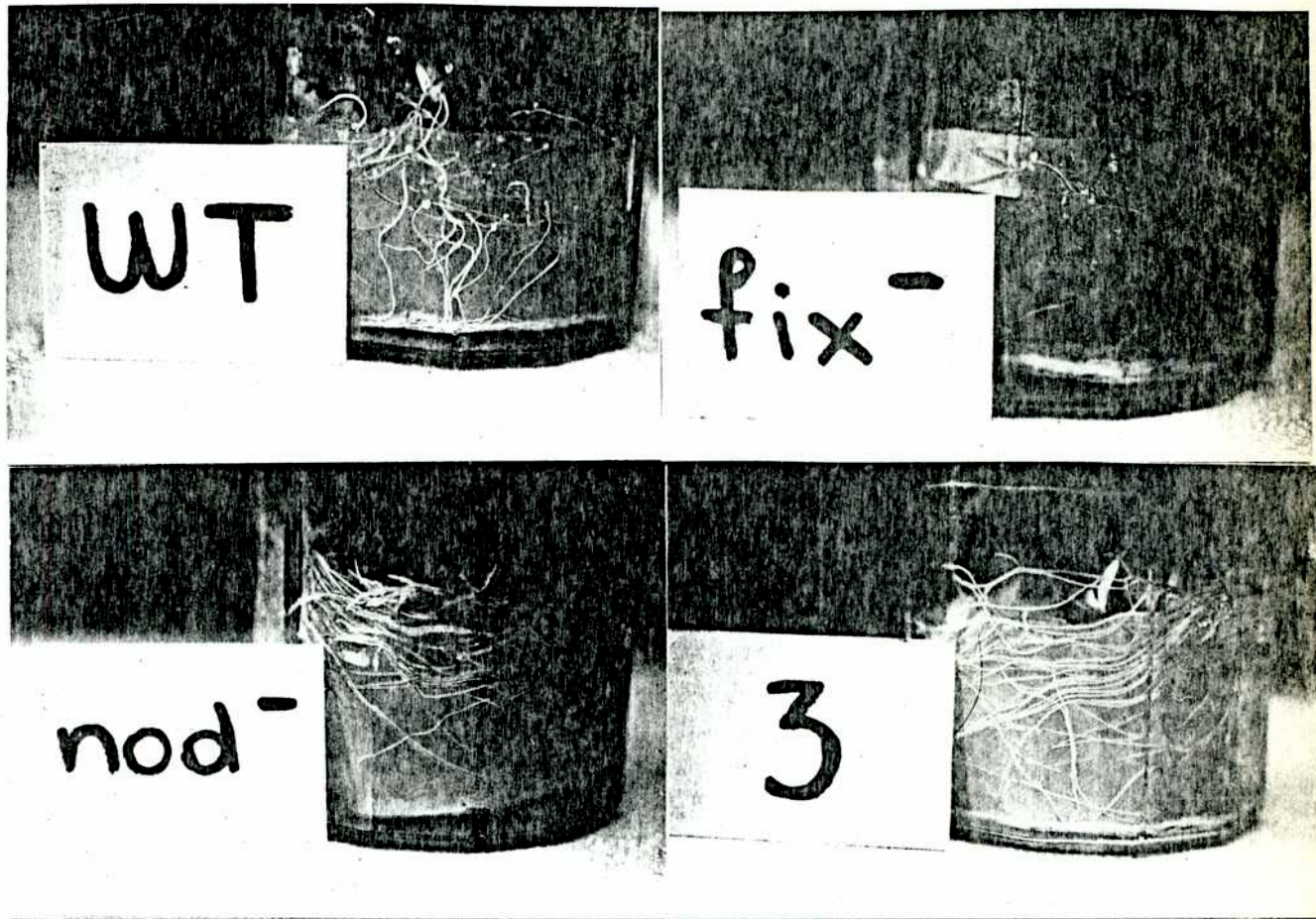


Figura 29: Detalle de las raíces de las plantas inoculadas con la cepa salvaje Rm102F51 (sup.izq.); WT149(fix-) (sup. der.); WT 131 (nod-)(inf.izq.) y mutante 3 (inf.der.).

Resultados y Discusión

La actividad enzimática está totalmente localizada en la fracción soluble obtenida luego de centrifugar a $100.000 \times g$ durante 2 horas, no pudiendo detectarse actividad asociada a la fracción de membranas (Tabla 11).

La actividad enzimática es dependiente del catión Mg^{2+} , mientras que en presencia de Mn^{2+} es despreciable con respecto a la encontrada con el mismo catión en *R. meliloti* en vida libre (Figura 30).

Para estudiar si la actividad adenilato ciclasa débilmente asociada a membrana y dependiente de Mn^{2+} , encontrada en *R. meliloti* es recuperada al volver el bacteroide a su forma de vida libre, se rescataron las bacterias a partir de nódulos de *M. sativa*, como se detalló en la sección IV de "Materiales y Métodos".

Se muestran los resultados en la Tabla 12. Vemos que al pasar el *R. meliloti* de su forma de bacteroide a vida libre, se recupera la actividad enzimática débilmente asociada a membrana y dependiente de Mn^{2+} como catión, mientras que la actividad dependiente de Mg^{2+} no se detectó en ninguna fracción.

Como conclusión podemos decir que el nódulo presenta una adenilato ciclasa soluble que usa como sustrato el $ATP-Mg^{2+}$, distinta a la encontrada en *R. meliloti* en vida libre, débilmente asociada a membrana, y cuyo sustrato es el $ATP-Mn^{2+}$.

Esta actividad se recupera cuando del nódulo se rescata el *R. meliloti* y se lo cultiva *in vitro*.

Como se vió en la sección XI-1 del capítulo Introducción, existen en *Rhizobium* una serie de mecanismos de transporte y caminos metabólicos que están presentes en el *Rhizobium* de vida libre pero que no lo están en el bacteroide. Por los resultados obtenidos éste sería también el caso de la adenilato ciclasa débilmente asociada a membrana y dependiente de Mn^{2+} de *R. meliloti*, la cual, por algún mecanismo no conocido aún, deja de estar presente cuando éste pasa a su forma de bacteroide.

| Fracción | Actividad total (pmol/min) | Actividad específica (pmol/min/mg prot) |
|-----------------------|-------------------------------|--|
| Extracto crudo | 37.5 | 27.7 |
| Sedimento 3000xg | 4.0 | 4.4 |
| Sedimento 10000xg | 0.3 | 2.1 |
| Sedimento 100000xg | No detectable | |
| Sobrenadante 100000xg | 35.1 | 52.0 |

TABLA 11 Distribución subcelular de la adenilato ciclasa en nódulos de *Medicago sativa* (Mg^{2+} -ATP como sustrato)

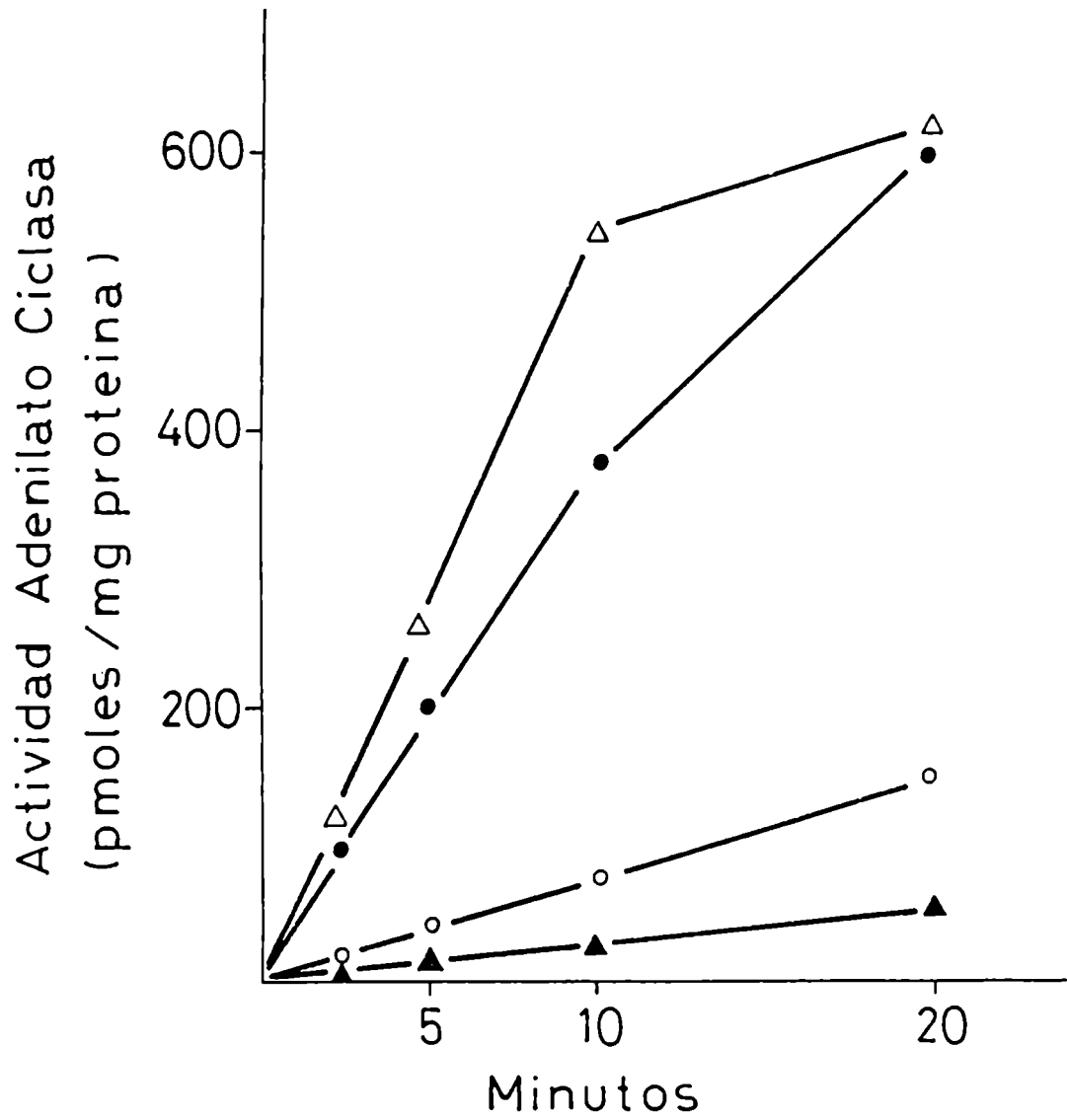


Figura 30: Actividad adenilato ciclase de *Rhizobium meliloti* y nódulos de *Medicago sativa* en presencia de Mn²⁺ o Mg²⁺.

- R. meliloti Mn²⁺
- R. meliloti Mg²⁺
- ▲ Nódulos Mn²⁺
- △ Nódulos Mg²⁺

| CATION | Mg ²⁺ | | Mn ²⁺ | |
|---|---------------------|-----------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| | Actividad | | Actividad | |
| | Total (pmol/min) | Específica (pmol/ min/mg prot) | Total (pmol/min) | Específica (pmol/ min/mg prot) |
| <i>R. meliloti</i> | | | | |
| P40 | 70.2 | 8.3 | 602 | 65 |
| S40 | 40.1 | 4.6 | 350 | 40 |
| Nódulo | | | | |
| P40 | -- | -- | -- | -- |
| S40 | 8.4 | 53.8 | 0.5 | 3.2 |
| <i>R. meliloti</i> res- catado de nódulo | | | | |
| P40 | 50.7 | 6.4 | 650 | 82 |
| S40 | 24.6 | 3.9 | 410 | 65 |

TABLA 12: Actividad adenilato ciclasa en *R. meliloti*, nódulo y en *R. meliloti* rescatado de nódulo

V. ADENILATO CICLASA EN PLANTAS SUPERIORES. *M. SATIVA*

En la sección anterior de este capítulo, se describió que los nódulos de alfalfa presentan una adenilato ciclasa soluble dependiente de ATP-Mg²⁺. Considerando que el nódulo está formado por bacteroides embebidos en citoplasma vegetal, se pensó que probablemente la enzima que estábamos midiendo podría ser una adenilato ciclasa propia de la planta.

Esta hipótesis resultaba muy atractiva, ya que, como se señaló en la Introducción, hasta el momento no se había demostrado fehacientemente la existencia de esta enzima en plantas superiores.

En base a los resultados presentados hasta el momento en esta Tesis, se decidió trabajar con plantas de alfalfa no noduladas para tratar de corroborar la hipótesis aquí planteada.

V.1. Localización subcelular

Se tomaron plantas de alfalfa (*M. sativa*) no infectadas de un año de edad cultivadas en suelos ricos en nitrógeno. Se lavaron, homogeneizaron y sometieron a un fraccionamiento subcelular, como se indicó en la sección II.2 del capítulo "Materiales y Métodos". La actividad adenilato ciclasa fue medida en cada una de las fracciones usando sustrato ATP-Mg²⁺ o ATP-Mn²⁺.

En la Tabla 13 se observan los resultados. Toda la actividad adenilato ciclasa se encontró localizada en la fracción soluble (S100) de las raíces. Dicha activación resultó ser dependiente de ATP-Mg²⁺, siendo despreciable en presencia de Mn²⁺.

Cuando la homogeneización se realizó en presencia de inhibidores de proteasas como el fluoruro de sulfanil fenil metilo 0.5 mM y apotrinina (25 V/ml) los resultados fueron similares, indicando que la enzima soluble no es un producto de proteólisis.

| Adiciones al tampón A | Fracción | Actividad total (pmoles/min) | Actividad Específica (pmoles/min/mg prot) |
|-----------------------|---|------------------------------|---|
| Ninguna | crudo | 8.783 | 68.6 |
| | Sedimento de 3000xg.P ₃ | 30 | 18 |
| | Sedim. de 10000xg.P ₁₀₀ | 46 | 14.0 |
| | Sedim. de 100000xg.P ₁₀₀ | 52 | 7.7 |
| | Sobrenadante de 100000xg.S ₁₀₀ | 10.480 | 630.0 |
| PMSF 0.5 mM | crudo | 8.750 | 70 |
| | Sedimento de 3000xg.P ₃ | 40 | 10 |
| | Sedim. de 10000xg.P ₁₀₀ | 50 | 15 |
| | Sedim. de 100000xg.P ₁₀₀ | 58 | 8 |
| | Sobrenadante de 100000xg.S ₁₀₀ | 9.960 | 650 |
| Apotrinina 25 U/ml | crudo | 8.690 | 71 |
| | Sedimento de 3000xg.P ₃ | 40 | 13.6 |
| | Sedim. de 10000xg.P ₁₀₀ | 52 | 14.9 |
| | Sedim. de 100000xg.P ₁₀₀ | 59 | 8.3 |
| | Sobrenadante de 100000xg.S ₁₀₀ | 11.000 | 642 |

TABLA 13 Distribución subcelular de la adenilato ciclasa de *M. sativa*

Resultados y Discusión

No se pudo detectar actividad adenilato ciclasa en tallos u hojas con ninguno de los dos cationes.

Es importante hacer destacar que la actividad enzimática en *M. sativa* primero pudo ser medida solamente en época estival, mientras que en época invernal sólo se detectó actividad adenilato ciclasa si las plantas eran mantenidas entre 30 y 35°C con iluminación permanente.

V.2. Sustrato, cinética y efectores

Se determinaron las condiciones óptimas para medir esta actividad enzimática. Las Figuras 31a y 31b muestran las curvas de actividad de adenilato ciclasa en función del tiempo de reacción y de la cantidad de proteína presente en el ensayo, respectivamente. En ambos casos se trabajó con una fracción soluble (S₁₀₀). A partir de los resultados obtenidos, todos los experimentos realizados en esta Tesis con *M. sativa* se realizaron durante 10 minutos de incubación.

Cuando se trabajó con fracciones solubles, las concentraciones fueron ajustadas de tal manera de lograr que la cantidad de proteínas presente en el ensayo fuese aproximadamente 0.02 mg.

De esta manera, se trabajó en las zonas lineales de las curvas de actividad adenilato ciclasa en función del tiempo y de la concentración de enzima.

Para seleccionar la concentración de ATP y Mg²⁺ óptimas para el ensayo, se midió la actividad adenilato ciclasa variando las concentraciones de ATP y Mg²⁺. Los resultados se resumen en la Figura 32. A partir de estos datos, todas las mediciones enzimáticas de *M. sativa* se realizaron con Mg²⁺ en una concentración de 1 mM y ATP en un rango entre 0.5 y 1.0 mM.

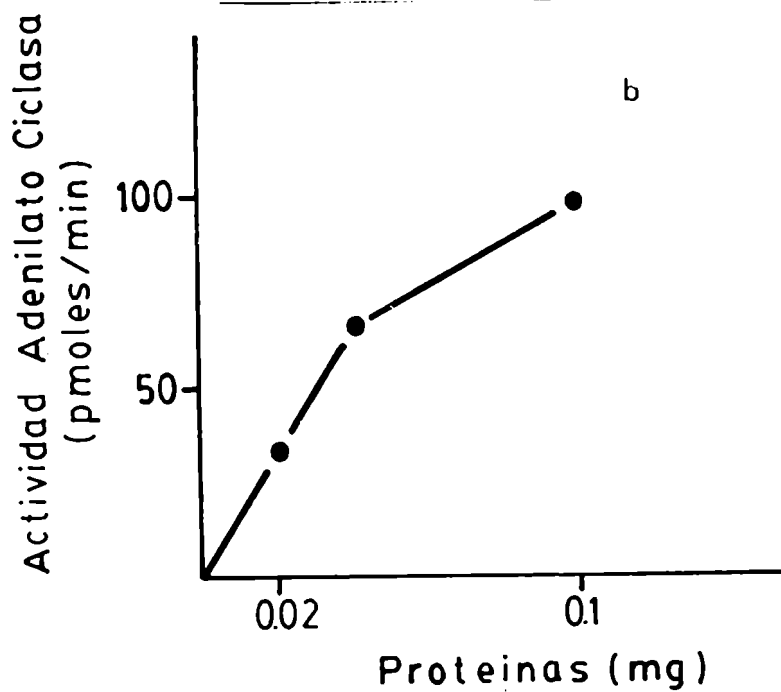
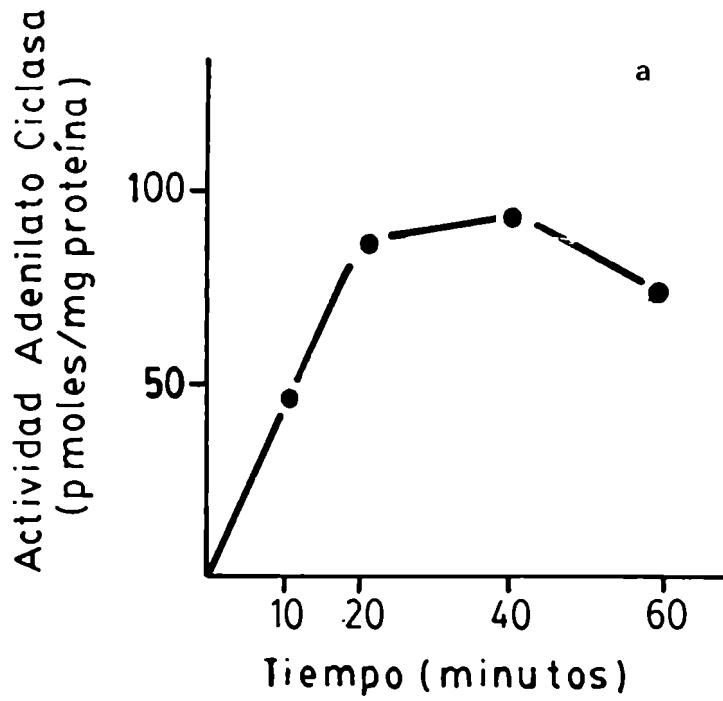


Figura 31: Actividad adenilato ciclasa de *Medicago sativa* en función del tiempo (a) y la concentración de proteínas en el ensayo (b).

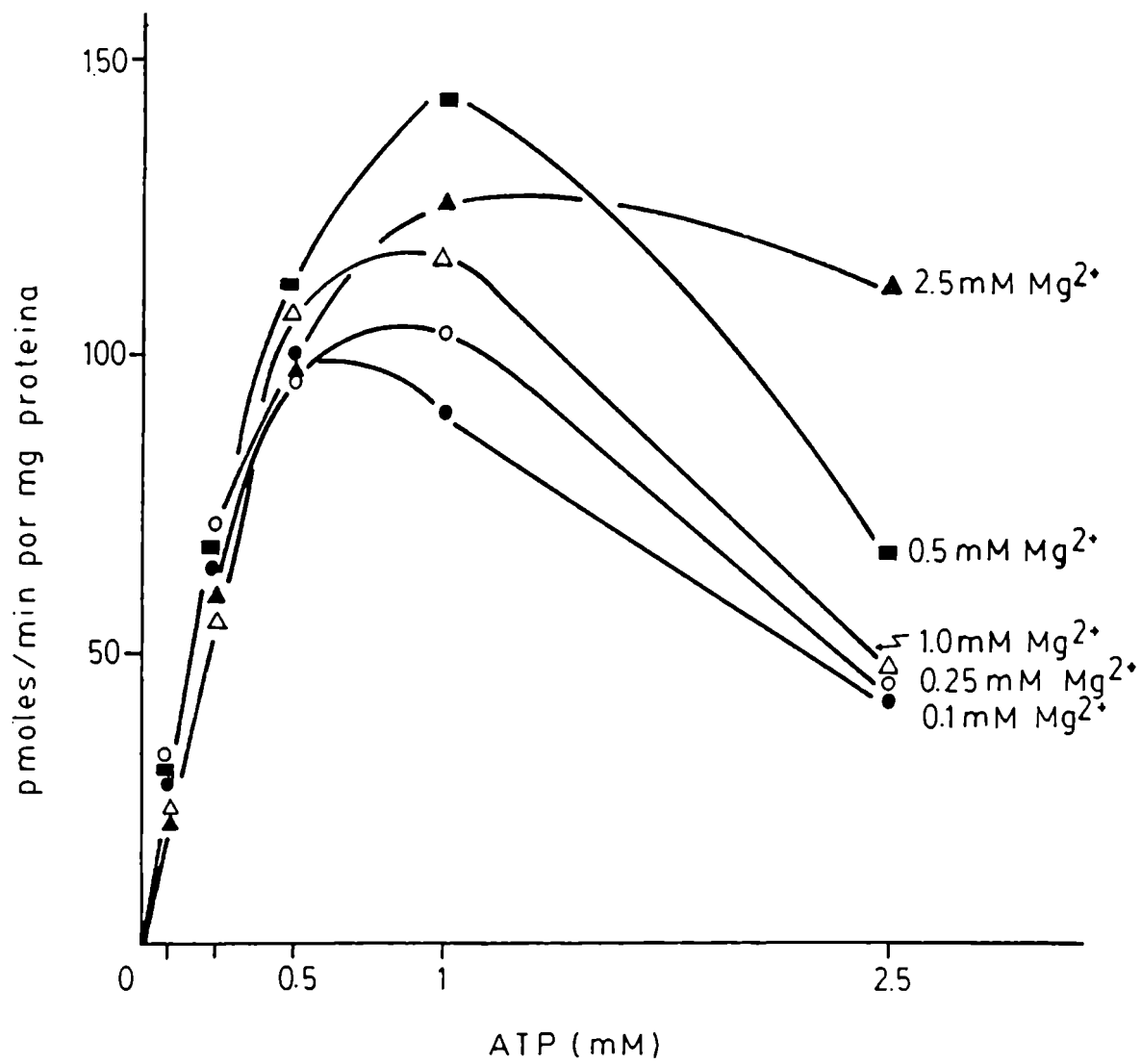


Figura 32: Actividad adenilato ciclasa en *Medicago sativa* en función de la concentración de ATP en el ensayo.

Se determinó la acción de efectores como GTP, sus análogos no hidrolizables (GTP- γ -S y GTP(NN)p), Forskolina y FNa, los cuales son capaces de estimular ciclasas eucarióticas. En la Tabla 14 se ve que ninguno de ellos fue capaz de estimular la actividad enzimática por encima del nivel basal, al igual que con otras adenilato ciclasa de procariotes.

La Tabla 14 también nos muestra el resultado obtenido luego de medir la adenilato ciclasa de *M. sativa* en presencia de una serie de seis hormonas vegetales. Dos de ellas, una citoquímica como la kinetina y una auxina como el ácido indolacético, parecerían ser capaces de estimular la actividad enzimática por encima del nivel basal. Estos resultados fueron confirmados por estudiando la variación de los niveles intracelulares de cAMP en plantas sometidas a la acción de hormonas.

V.3. Niveles de cAMP

Se midieron los niveles de cAMP en raíces, tallos, hojas y nódulos radiculares. En la Tabla 15 vemos que, nuevamente, dos hormonas vegetales, ácido indolacético y kinetina, estimularon los niveles de cAMP por encima del nivel basal, confirmando los resultados de estimulación de la adenilato ciclasa mostrados en la sección anterior. Asimismo, estos resultados apoyarían a aquéllos encontrados por Salomon (293) y Azhar (284) quienes observaron que el tratamiento con ácido indolacético de coleóptilos de avena y de *Cicer arietinum* aumenta los niveles de cAMP.

Una tercera hormona, el 2,4 diclorofenóxiacético (2,4D), que es una auxina sintética, incrementó también los niveles de cAMP, si bien no mostró tener efecto sobre la actividad adenilato ciclasa. Una explicación podría ser que la hormona 2,4D fuese un inhibidor de la fosfodiesterasa presente en *M. sativa*.

| Adiciones | mM | Actividad Adenilato ciclasa (pmoles/min/mg proteína) |
|-----------------------|------|---|
| Ninguna (Basal) | -- | 94.5 |
| GTP- γ -5 | 0.01 | 96.0 |
| GTP | 0.01 | 102.0 |
| Gpp(NN)P | 0.01 | 103.0 |
| Forskolina | 0.01 | 93.0 |
| NaF | 10 | 108.0 |
| Kinetina | 0.3 | 205.0 |
| Acido Indolacético | 0.3 | 329.0 |
| Benciladenina | 0.3 | 18.5 |
| 2.4D (Auxina) | 0.3 | 108.0 |
| Acido giberélico | 0.3 | 81.0 |
| Acido naftalenacético | 0.3 | 98.8 |

TABLA 14: Actividad adenilato ciclasa en *Medicago sativa* en presencia de hormonas vegetales y otros efectores

| Organo | Tratamiento | AMP cíclico (pmoles/mg prot.) |
|--------|------------------------------|----------------------------------|
| Raíces | | 15.0 |
| | Acido Giberélico 0.3 mM | 11.2 |
| | Acido Naftalenacético 0.3 mM | 35.8 |
| | Acido Indolacético 0.3 mM | 42.1 |
| | Kinetina 0.3 mM | 34.3 |
| | 2,4D (Auxina) 0.3 mM | 15.2 |
| | Benciladenosina 0.3 mM | 0.9 |
| Hojas | | 1.3 |
| Tallos | | 1.2 |
| Nódulo | | 20.5 |

TABLA 15: Niveles de cAMP en *M. sativa*

La ausencia de cAMP en hojas y tallos es coincidente con los resultados mostrados en la sección anterior, donde vimos que no se pudo detectar actividad adenilato ciclasa en tallos ni en hojas.

VI. ACTIVACION DE LA ADENILATO CICLASA DE *M. SATIVA* CON Ca^{2+}

Cuando se intentó purificar la adenilato ciclasa de *M. sativa*, se observó que no se podía medir actividad en ninguna de las fracciones obtenidas luego de realizar cromatografías en DEAE-celulosa o Ultrogel Aca34. Esto nos llevó a pensar que probablemente, en estos pasos de purificación estábamos eliminando algún co-factor indispensable para la actividad.

Ya fue señalado en el capítulo "Introducción" que existen adenilato ciclasas activables por Ca^{2+} -calmodulina, como, por ejemplo, las de testículo (308) y cerebro bovino (39), entre las holociclasas y la de *Bordetella pertussis* (104) y *Neurospora crassa* (102), como ejemplo de ciclasas de organismos procariotes. Se investigó entonces, si la adenilato ciclasa de *M. sativa* pertenecía a este grupo de enzimas activables por Ca^{2+} -calmodulina.

Las fracciones obtenidas por cromatografía de la fracción S₁₀₀ en DEAE-celulosa o filtración en Ultrogel Aca34 fueron ensayadas en presencia de ATP-Mg²⁺ y Ca^{2+} 2.5 mM. En la Figura 33 se observan los resultados. Vemos que las fracciones que tienen muy baja actividad en presencia de ATP-Mg²⁺ solamente, presentan una actividad superior a ésta cuando en el ensayo enzimático se agregó Ca^{2+} 2.5 mM.

Se estudió la activación por Ca^{2+} , usando como sustrato ATP-Mn²⁺ y no se pudo medir actividad adenilato ciclasa en ninguna fracción independientemente de la presencia de Ca^{2+} en el en-

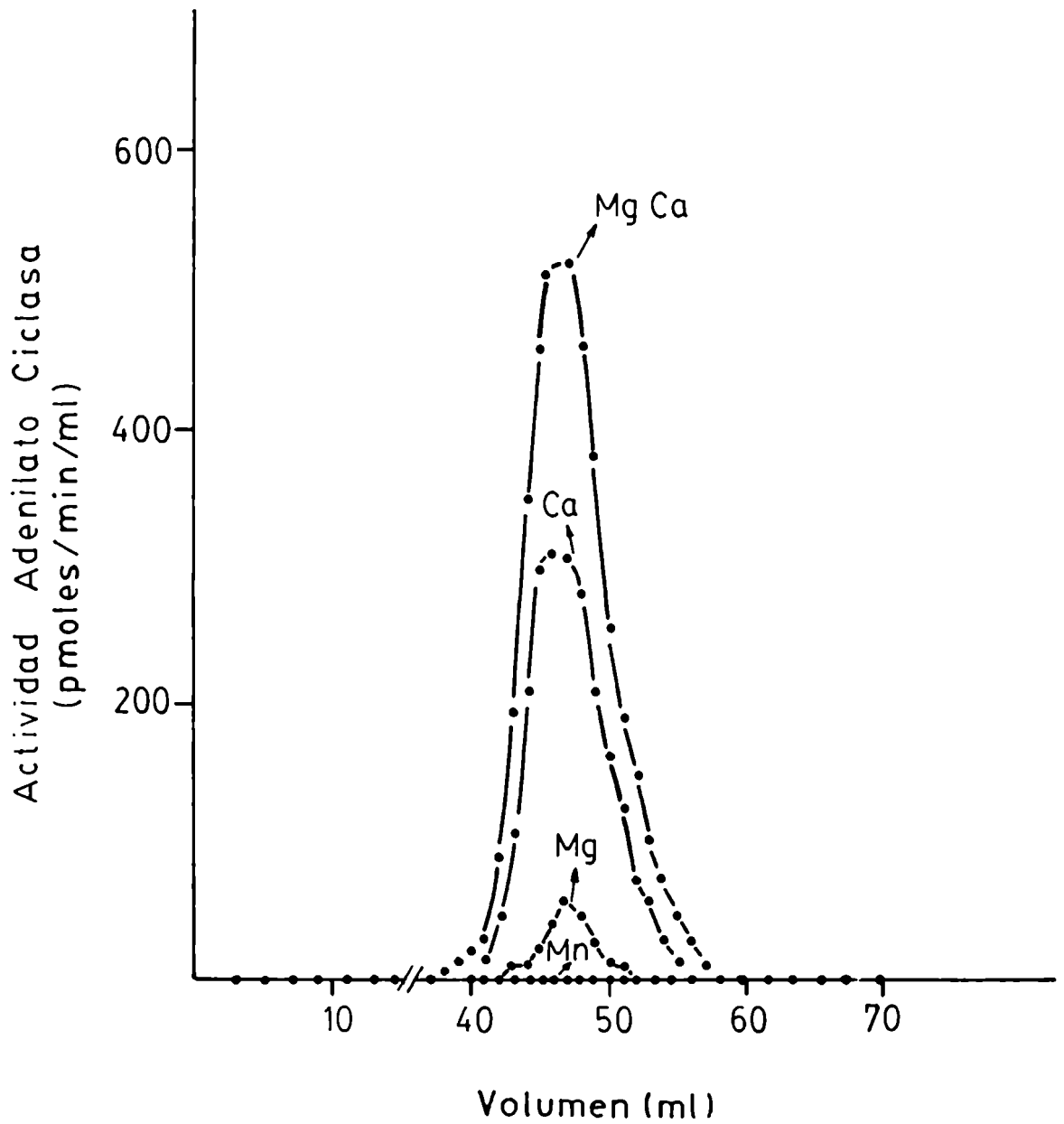


Figura 33: Actividad adenilato ciclasa en fracciones obtenidas en una columna de Ultrogel AcA34 medidas en presencia de Mn^{2+} 10 mM; Mg^{2+} 10 mM; 2.5 mM Ca^{2+} o Mg^{2+} y Ca^{2+} .

sayo, confirmando que la adenilato ciclasa en *M. sativa* utiliza como sustrato el ATP-Mg²⁺.

En base a la acción que el Ca²⁺ mostró tener sobre la actividad adenilato ciclasa de *M. sativa*, se investigó si la enzima era o no activable por calmodulina.

Para ello se usaron calmodulinas de dos orígenes diferentes. Las hojas de espinaca purificada como se indicó en "Materiales y Métodos", y otra cedida por la Dra. María T. Téllez-Iñón, la cual fue purificada de cerebro bovino según el método descrito (309), al igual que la fosfodiesterasa de cerebro bovino con la que se midió la presencia de calmodulina.

VII. ADENILATO CICLASA DE *M. SATIVA* Y CALMODULINA

En la sección V se mostró el efecto activador del Ca²⁺ sobre la adenilato ciclasa de *M. sativa*. Para estudiar el efecto de la calmodulina sobre esta enzima se midió la actividad enzimática en presencia de calmodulina de cerebro bovino y de hojas de espinaca.

La Tabla 16 resume los resultados obtenidos. Se puede observar que la activación obtenida por acción del Ca²⁺ 0.25 mM es bloqueada por EGTA 1 mM. Las actividades obtenidas en presencia de calmodulina de cerebro bovino y de hojas de espinaca son 14 y 8 veces superiores a la medida en presencia de Ca²⁺ 0.25 mM, respectivamente.

La activación obtenida por acción de la calmodulina fue totalmente bloqueada por la presencia de EGTA 1 mM y parcialmente bloqueada por 2 fenotiazinas: clorpromazina y flufenazina, que son inhibidores del complejo Ca-calmodulina.

La mayor activación encontrada con la calmodulina de cerebro bovino podría deberse a que ésta posee un mayor grado de pureza que la calmodulina de hojas de espinaca.

| Adiciones a la mezcla de reacción | Actividad específica (pmol/mg proteína) |
|---|--|
| Nada | 68 |
| 0,25 mM CaCl ₂ | 204 |
| 0,25 mM CaCl ₂ más 1 mM EGTA | 74 |
| 0,25 mM CaCl ₂ más 0,3 µg/ml cerebro calmodulina | 2856 |
| 0,25 mM CaCl ₂ más 0,3 µg/ml cerebro calmodulina más 1 mM EGTA | 74 |
| 0,25 mM CaCl ₂ más 0,3 µg/ml cerebro calmodulina más 100 µM clorpromazina | 1529 |
| 0,25 mM CaCl ₂ más 0,3 µg/ml cerebro calmodulina más 100 µM flufenazina | 1400 |
| 0,25 mM CaCl ₂ más 0,3 µg/ml espinaca calmodulina | 1680 |

TABLA 16: Adenilato ciclasa de *M. sativa*. Acción de calmodulina

Resultados y Discusión

Ninguna de las dos calmodulinas activó la adenilato ciclase de *M. sativa* en ausencia de Ca^{2+} .

Se estudió la relación entre la activación de la actividad enzimática y la concentración de Ca^{2+} presente en el ensayo. Vemos en la Figura 34, que la actividad específica aumenta con la concentración de Ca^{2+} hasta llegar a un punto en el que la actividad enzimática permanece constante aún aumentando la concentración de Ca^{2+} .

Resnik (100) y Lakey (101) observaron que las adenilato ciclasas de plaquetas y tiroides humanas presentan un comportamiento bifásico al Ca^{2+} ; esto es que el Ca^{2+} estimula la actividad enzimática a bajas concentraciones del catión, mientras que concentraciones más altas lo inhiben. Nosotros no observamos esta inhibición aún a concentraciones de Ca^{2+} del orden de 10^{-3} M en presencia o no de CaM.

Sin embargo, en la misma figura podemos ver que la relación entre la actividad adenilato ciclase en presencia o ausencia de CaM en el ensayo, se incrementa hasta alcanzar su máximo a una concentración de Ca^{2+} 0.25 mM para luego disminuir a concentraciones superiores del catión.

En base a estos resultados podemos interpretar que la CaM aumenta la síntesis de cAMP a concentraciones de Ca^{2+} a las cuales se detecta baja actividad adenilato ciclase. Por otro lado, a concentraciones superiores de Ca^{2+} la enzima parece independizarse de la presencia de CaM.

En ausencia de calmodulina, se obtiene una curva sigmoidea, mientras que en presencia de calmodulina de cerebro bovino, la curva es de tipo Michaeliana.

Para investigar la relación entre la activación por calmodulina y la concentración de la misma en el ensayo, se midieron los porcentajes de activación con respecto a un basal observado en presencia de Ca^{2+} , variando las concentraciones de calmodulina de cerebro bovino y de hojas de espinaca (Figura 35).

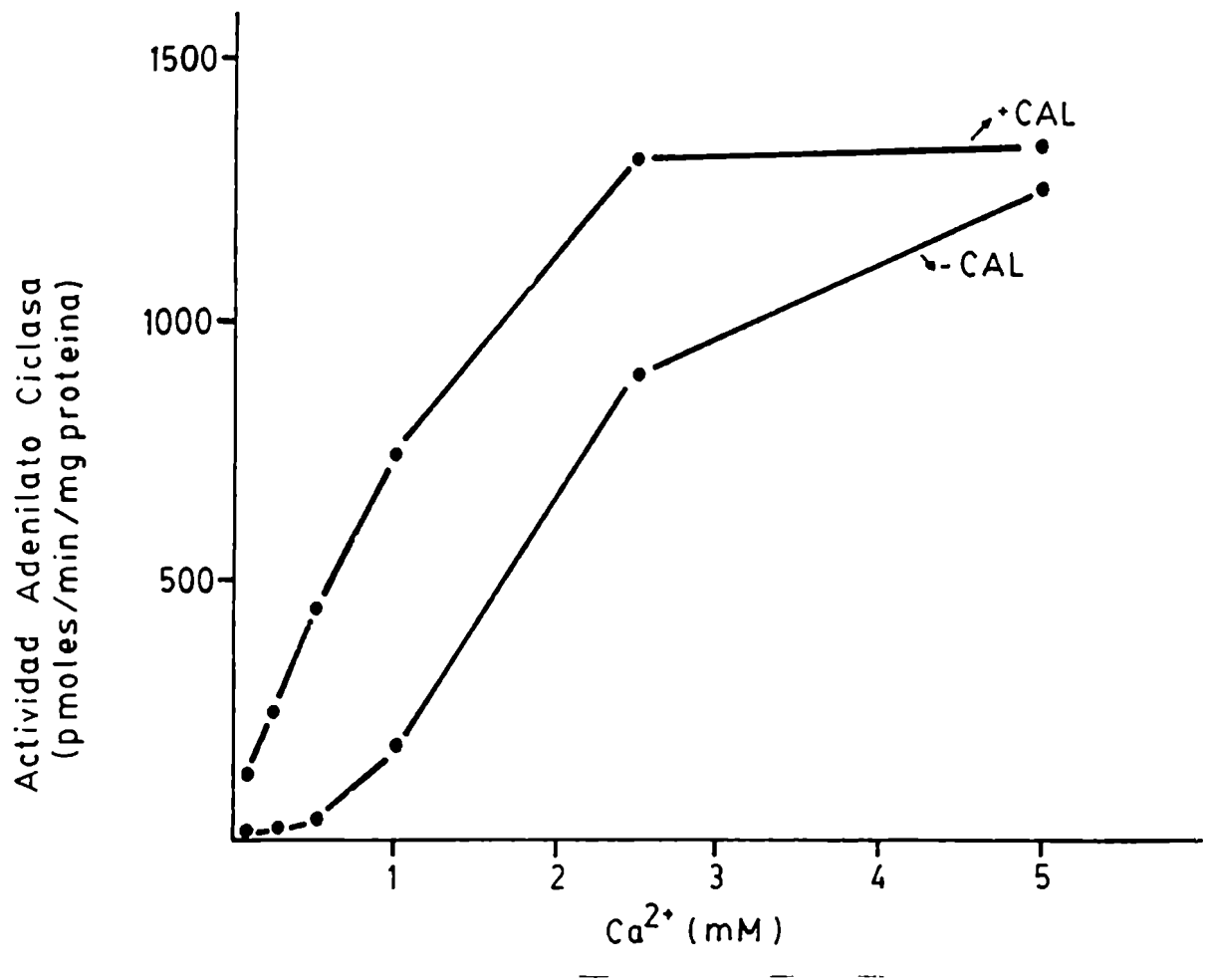


Figura 34: Actividad adenilato ciclasa de *Medicago sativa* en función de la concentración de Ca²⁺ en presencia o ausencia de calmodulina en el ensayo.

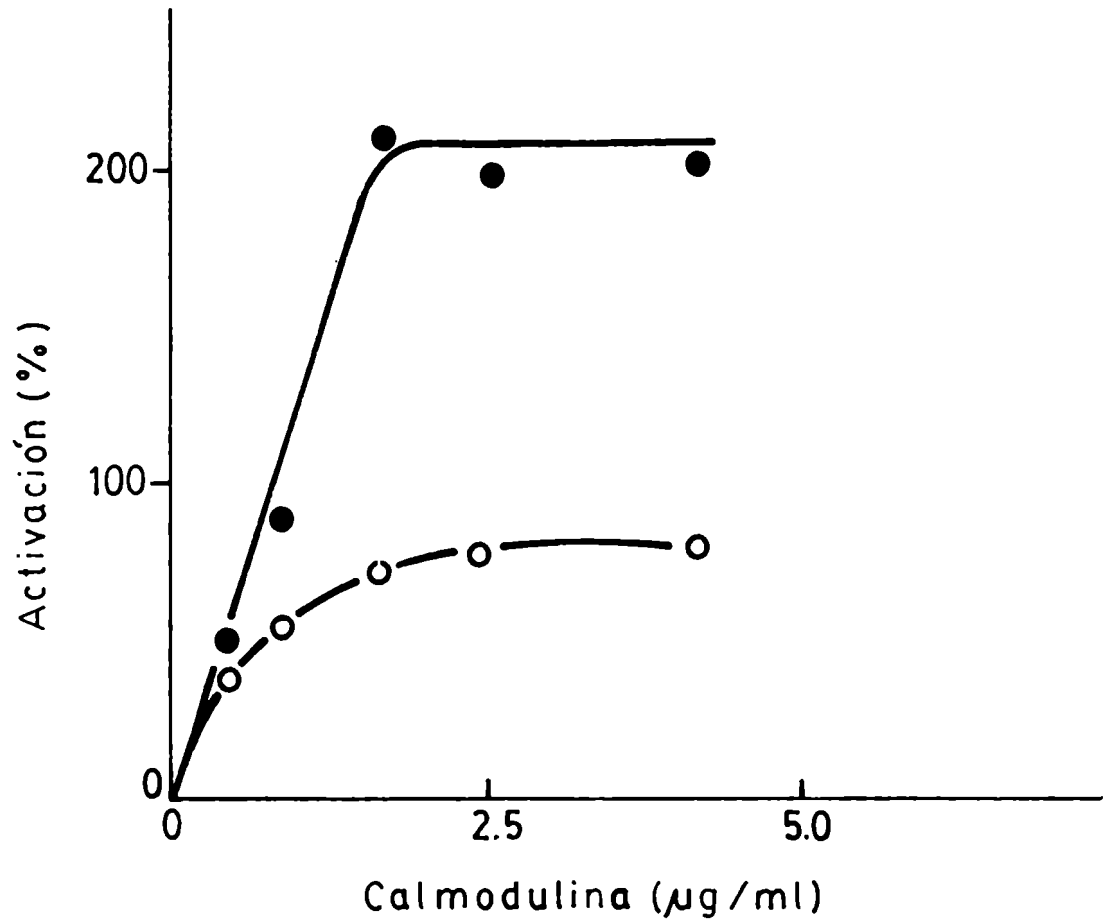


Figura 35: Porcentaje de activación de la adenilato ciclasa de *Medicago sativa* en presencia de 0.25 M de Ca^{2+} en función de concentraciones crecientes de calmodulina de cerebro (●) o espinaca (○) en el ensayo.

Resultados y Discusión

En ambos casos, se aprecia que hay un aumento en el porcentaje de activación a concentraciones crecientes de calmodulina, hasta alcanzar la saturación. La mitad de la estimulación máxima fue de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ para ambas calmodulinas.

La activación obtenida con el complejo Ca^{2+} -calmodulina es bloqueada por agentes como la flufenazina y la clorpromazina.

En la Figura 36 se observa que la mitad de la inhibición máxima se obtiene a una concentración de clorpromazina igual a 150 μm .

Cuando los distintos efectores de holociclasas como F-, forskolina, toxina de cólera (previamente activada con ditiotreitól); GTP y sus análogos no hidrolizables $\text{GTP}\gamma\text{S}$ y Gpp(NH)p fueron ensayados ahora en presencia de calmodulina y Ca^{2+} , no se observó estimulación alguna por encima de los niveles basales obtenidos con Ca^{2+} -calmodulina solos.

No se detectó actividad enzimática en tallos y hojas cuando ésta fue medida en presencia de Ca^{2+} -calmodulina independientemente del catión (Mg^{2+} o Mn^{2+}) utilizado.

Los resultados expuestos hasta el momento nos permiten concluir que la adenilato ciclasa de *M. sativa*:

- 1) Está localizada en la fracción soluble de las células radiculares.
- 2) Se la puede medir solamente en épocas estivales, desapareciendo su actividad en el período invernal.
- 3) Se detecta solamente en raíces, mientras que en tallos y hojas no se observa actividad en ningún momento del año.
- 4) No es estimulada por efectores típicos de holociclasas como FNa, GTP o Forskolina.
- 5) Parece ser activada por dos hormonas vegetales, una auxina (ácido indolacético) y una citoquina (kinetina).

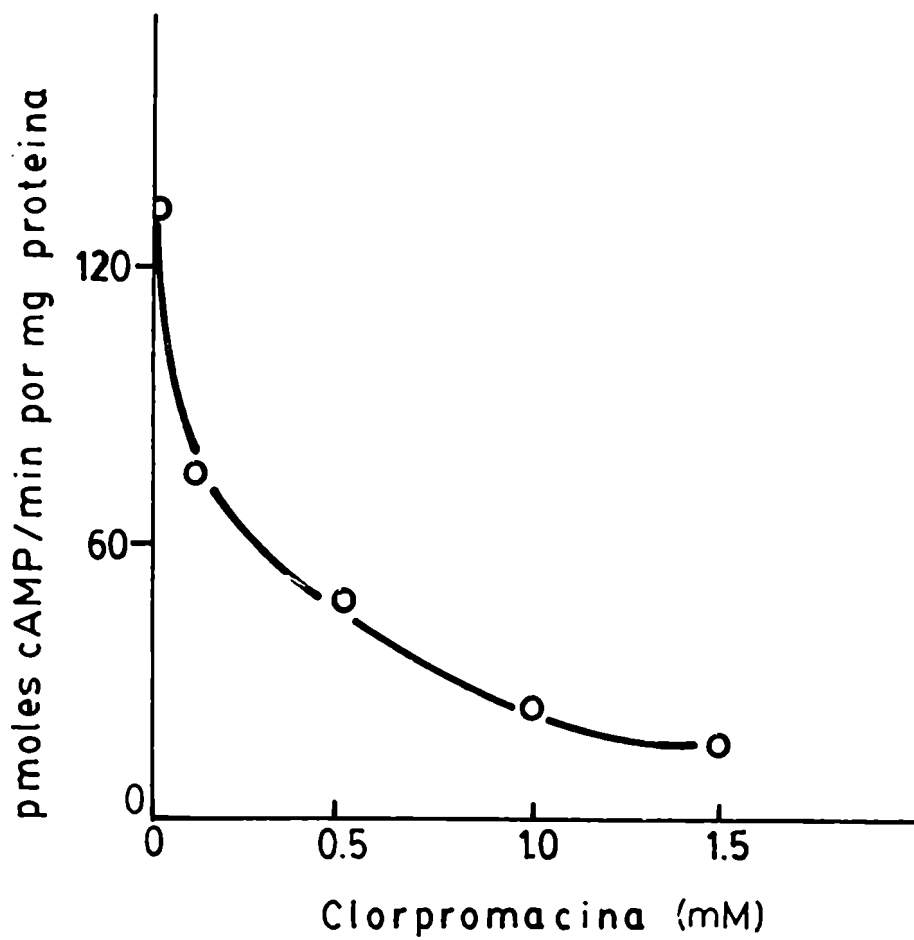


Figura 36: Actividad adenilato ciclasa de *Medicago sativa* en presencia de 0.25 mM Ca^{2+} ; 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de calmodulina de cerebro en función de concentraciones crecientes de clorpromacina.

- 6) Es activable por Ca^{2+} -calmodulina, siendo esta activación bloqueada por EGTA y por inhibidores de calmodulina como flufenazina y clorpromozina.
- 7) Es saturable a altas concentraciones de Ca^{2+} , presentando una curva sigmoidea en ausencia de calmodulina.
- 8) Presenta un máximo de activación por calmodulina a una concentración de Ca^{2+} de 1 mM. En concentraciones de Ca^{2+} superiores o inferiores a ésta, la activación es menor.

VIII. PURIFICACION DE LA ADENILATO CICLASA DE *M. SATIVA*

La fracción cruda de raíces de *M. sativa* con una actividad específica de 15.8 pmoles /min/mg de proteína fue centrifugada a 105.000xg durante 2 horas, obteniéndose así la fracción S100 con una actividad específica de 29.6 pmoles/min/mg proteína.

VIII.1. Cromatografía en DEAE celulosa

La fracción S100 fue cromatografiada en una columna de DE-52. En la Figura 37 se observa el perfil de elución obtenido.

La adenilato ciclasa eluye a una concentración de NaCl de 0.35 M con una actividad específica de 461 pmoles/min por mg proteína. Este valor es aproximadamente 16 veces mayor que el de la fracción S100 sembrada en la columna.

VIII.2. Cromatografía en Hexilamino-sepharosa

Las fracciones obtenidas por cromatografía en DEAE celulosa que presentaron actividad adenilato ciclasa, se juntaron y dializaron constituyendo la fracción DEAE. Esta fracción fue aplicada a la columna de hexilamino-sepharosa. En la Figura 38 se

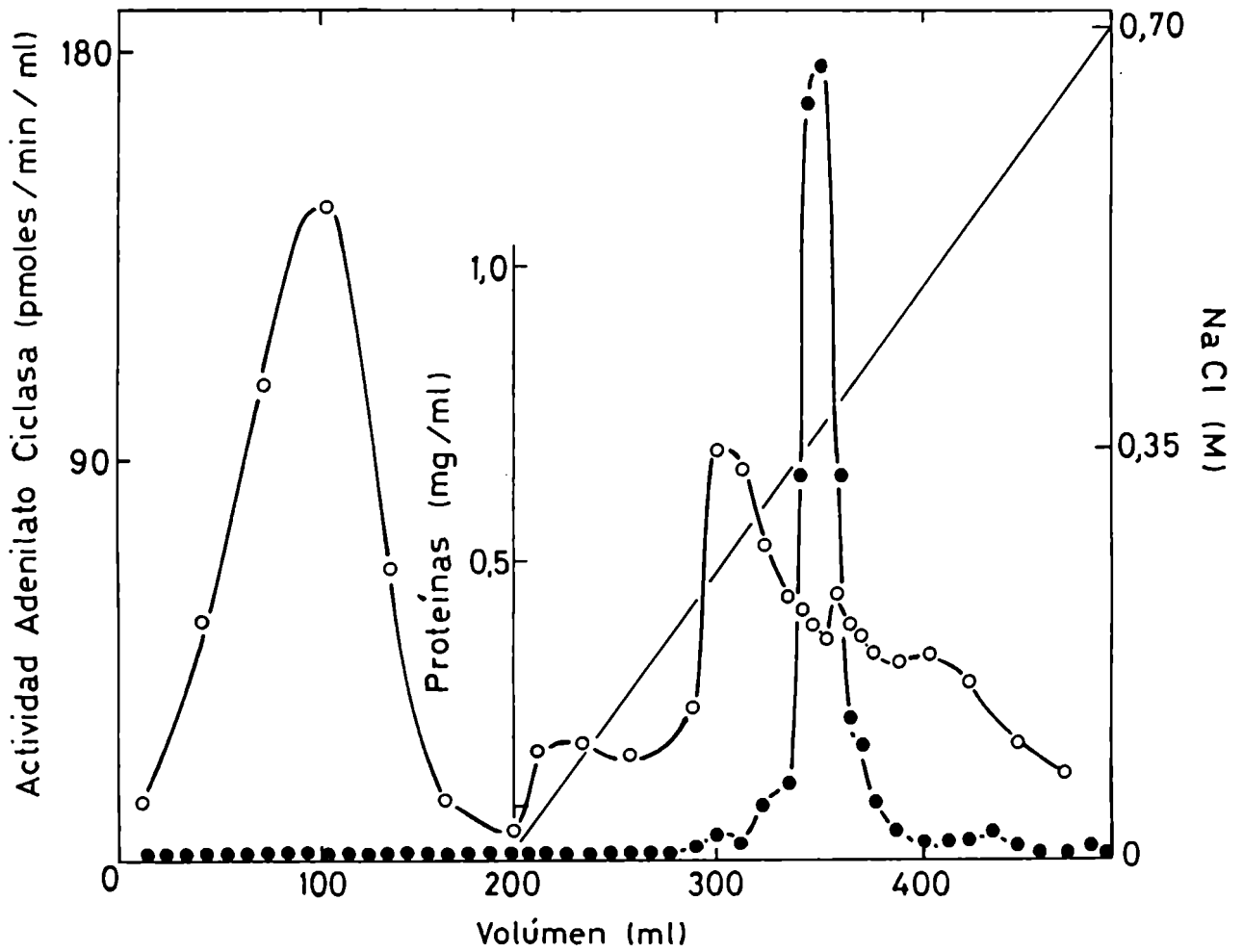


Figura 37: Cromatografía en DEAE-celulosa de una fracción S100 de raíces de *Medicago sativa*.

- Proteínas (mg/ml)
- Actividad adenilato ciclasa (pmoles/min/ml)

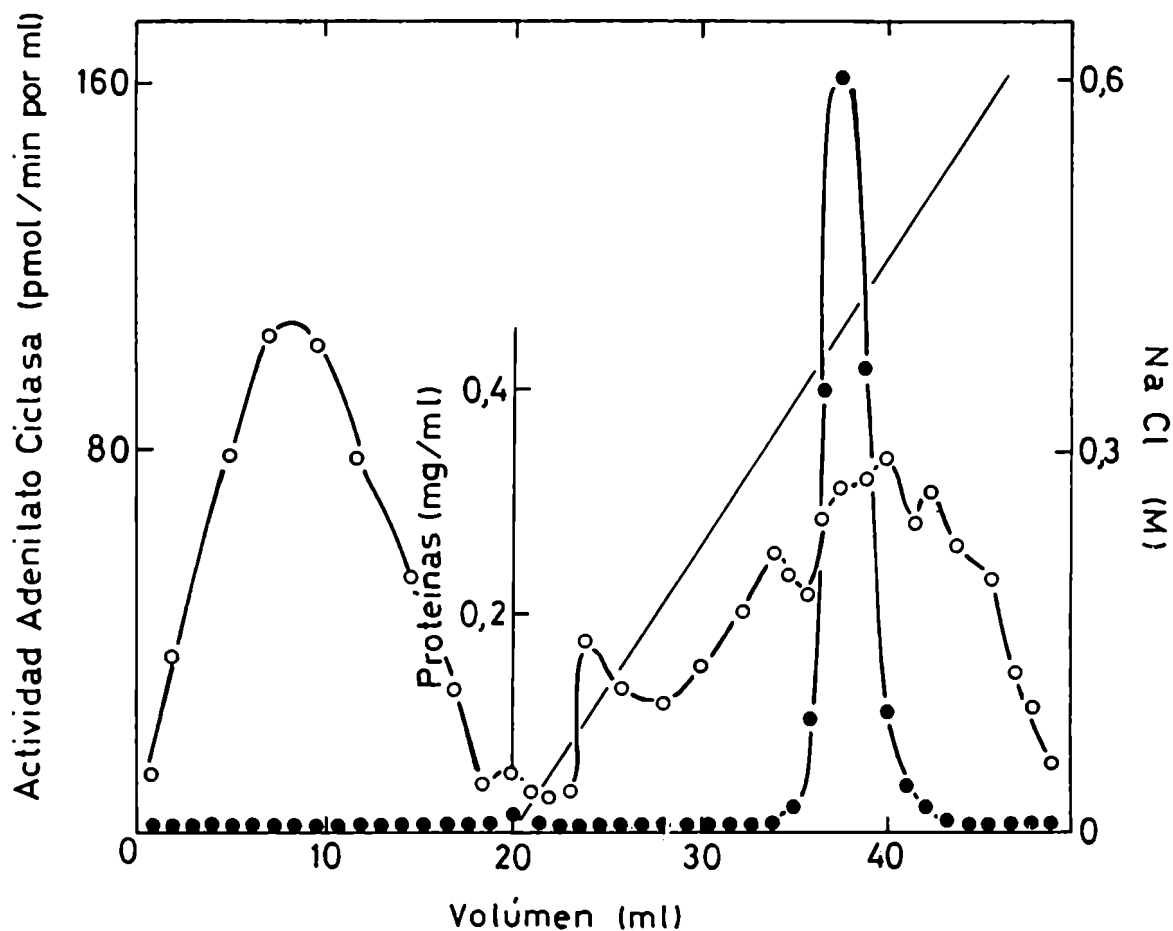


Figura 38: Cromatografía en hexilamino-sepharosa de la fracción DEAE dializada de *M. sativa*.

- Proteínas (mg/ml)
- Actividad adenilato ciclasa (pmoles/min/ml)

observa que la adenilato ciclasa eluye en un solo pico a una concentración de NaCl de aproximadamente 0.4 M con una actividad específica de 4140 pmoles/min por mg de proteína.

Las fracciones con actividad adenilato ciclasa fueron combinadas y concentradas en presencia de sacarosa 70%, constituyendo así la fracción HAS.

VIII.3. Filtración por geles (Ultrogel AcA34)

La fracción HAS fue sembrada en una columna de Ultrogel AcA34. En la Figura 39 se observa el perfil de elución obtenido. Podemos ver que la actividad adenilato ciclasa eluye como un único pico con una actividad específica de 17600 pmoles/min por mg proteína.

En la Tabla 17 podemos observar que hemos purificado la adenilato ciclasa de *M. sativa* 1131 veces con un rendimiento del 3.4%.

Esta enzima así purificada fue sometida a una electroforesis en geles de poliacrilamida SDS. Como vemos en la Figura 40, se observaron dos bandas correspondientes a pesos moleculares de 40.000-42.000 y 84.000.

IX. **CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA ADENILATO CICLASA DE *MEDICAGO SATIVA***

IX.1. Filtración por gel (Ultrogel AcA34)

En la Figura 41 se muestra el perfil de elución de una preparación de DEAE celulosa cromatografiada en una columna analítica de Ultrogel AcA34. Las flechas indican la posición en que filtran las proteínas marcadoras. La actividad adenilato ciclasa

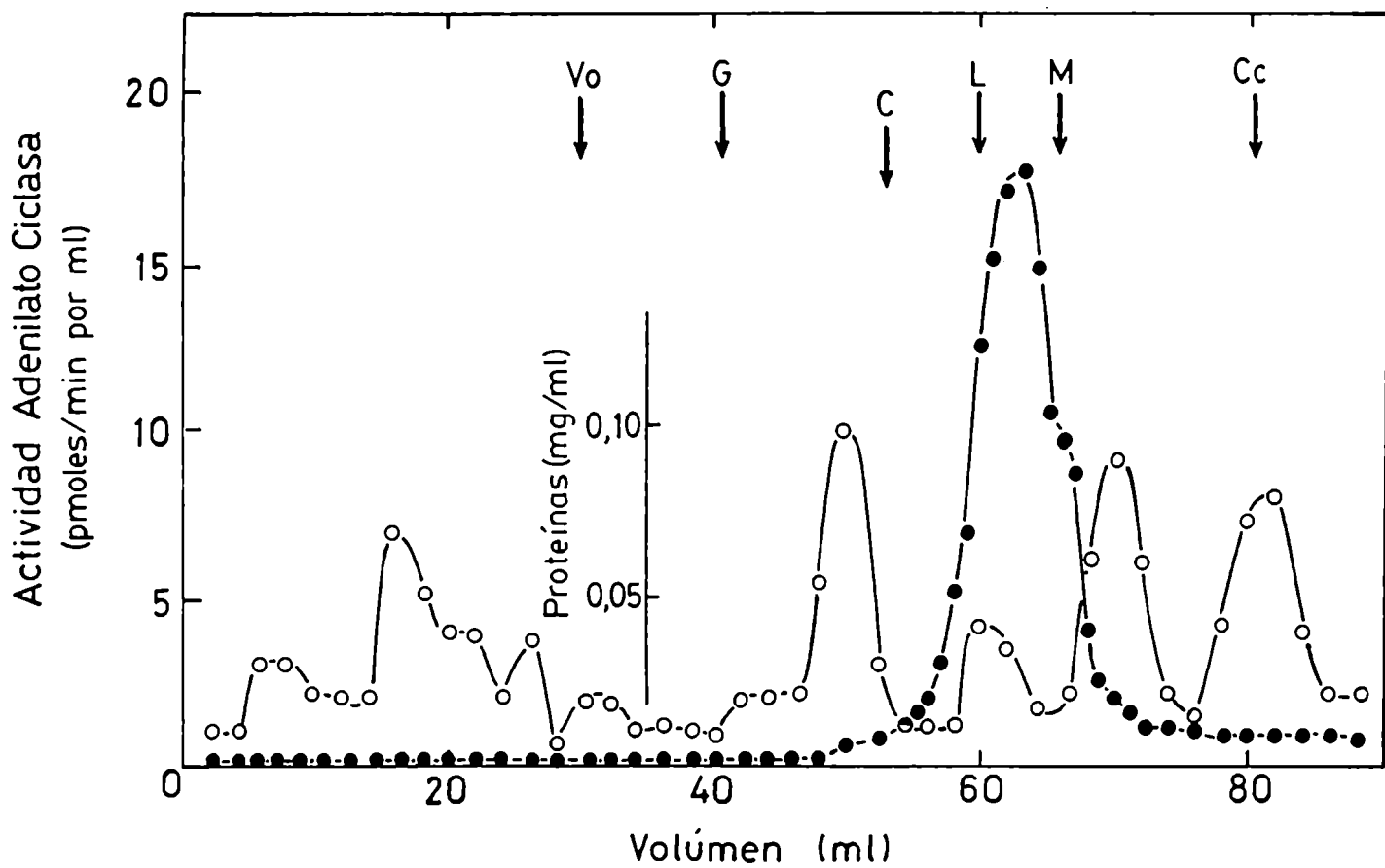


Figura 39: Filtración por Ultrogel AcA34 de la fracción HAS concentrada contra sacarosa 70%.

- Proteínas (mg/ml)
- Actividad adenilato ciclasa (pmoles/min/ml)

| Fracción | Actividad Total (pmol/min) | Actividad Específica (pmol/min/mg prot) | Recuperación % | Factor de Purificación |
|----------|-------------------------------|--|-------------------|------------------------|
| Crudo | 5250 | 15.8 | | |
| S100 | 4700 | 29.6 | 89.5 | 1.9 |
| DEAE | 3540 | 461 | 67 | 30 |
| HAS | 1474 | 4160 | 28 | 266 |
| Ultrogel | 174 | 17600 | 3.4 | 1131 |

TABLA 17: Purificación de la adenilato ciclasa de *Medicago sativa*

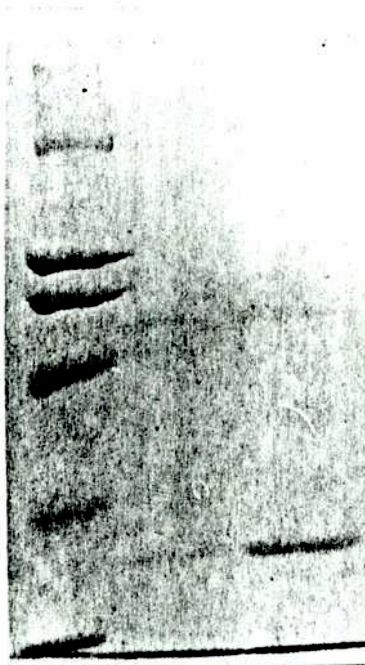


Figura 40: Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Marcadores de peso molecular: Anhidrasa carbónica (29000); ovoalbúmina (45000); seroalbúmina bovina (66000); fosforilasa B (97400); β -galactosidasa (116000) y miosina (205000).

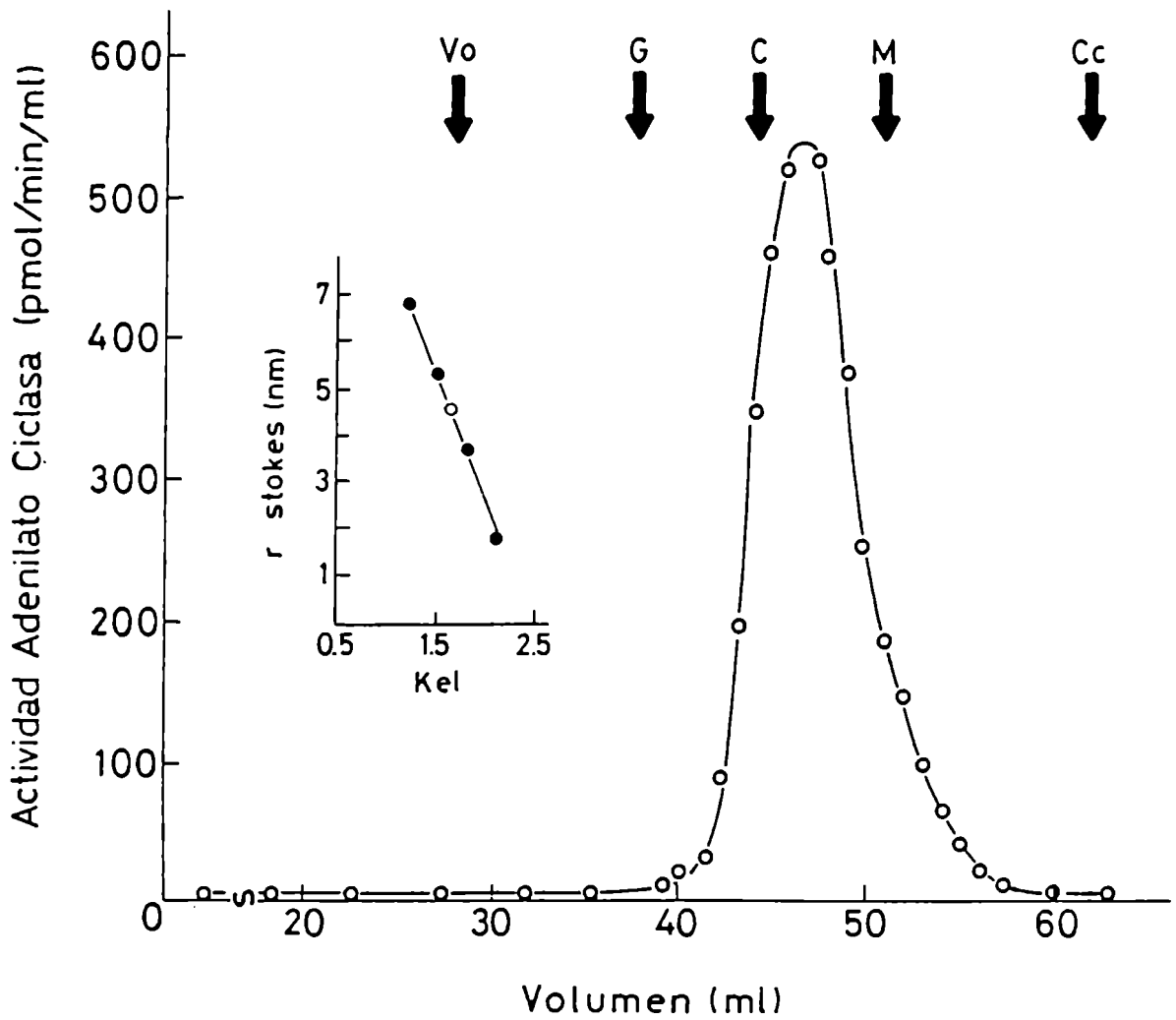


Figura 41: Filtración en geles (Ultrogel AcA34). Marcadores de peso molecular: Cc=citocromo C; M=malato deshidrogenasa; L=lactato deshidrogenasa; C=catalasa y G= β -galactosidasa.

filtra como un único pico que precede a la malico deshidrogenasa, con una K_{el} de 1.8, correspondiente a un radio de Stokes de 4.4 nm.

IX.2. Gradientes de sacarosa

Con el objeto de conocer el coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) y el volumen específico parcial (v) de la enzima, se realizaron centrifugaciones en gradientes de sacarosa hechos en H_2O y D_2O .

Los resultados se muestran en la Figura 42; en la curva de calibración inserta en dicha figura, se graficó la distancia recorrida por cada proteína marcadora desde el borde superior del gradiente hasta la posición alcanzada al finalizar la centrifugación (r), en función del coeficiente de sedimentación (S). Las constantes de sedimentación para la adenilato ciclasa fueron las mismas en ambos gradientes, presentando un valor de 4.1 S.

Este hecho indica que la adenilato ciclasa y las proteínas marcadoras tienen, esencialmente, el mismo volumen específico parcial: 0.74 ml/g, que es característico de las proteínas globulares solubles.

Conociendo los valores del radio de Stokes, el coeficiente de sedimentación y el volumen específico parcial de la enzima, es factible estimar su peso molecular, utilizando la fórmula planteada en la sección XII.3 de "Materiales y Métodos". El valor calculado es de 84.000 D. Además, se calculó una razón friccional de 1.54 para la enzima, indicando que la misma se aleja de la esfericidad y/o presenta hidratación, ya que dicho valor se aleja de la unidad. Los parámetros hidrodinámicos y moleculares así calculados se resumen en la Tabla 18.

Puede apreciarse que el peso molecular calculado para la adenilato ciclasa es similar al de la banda de mayor peso molecular encontrada en geles de poliacrilamida SDS (Figura 40).

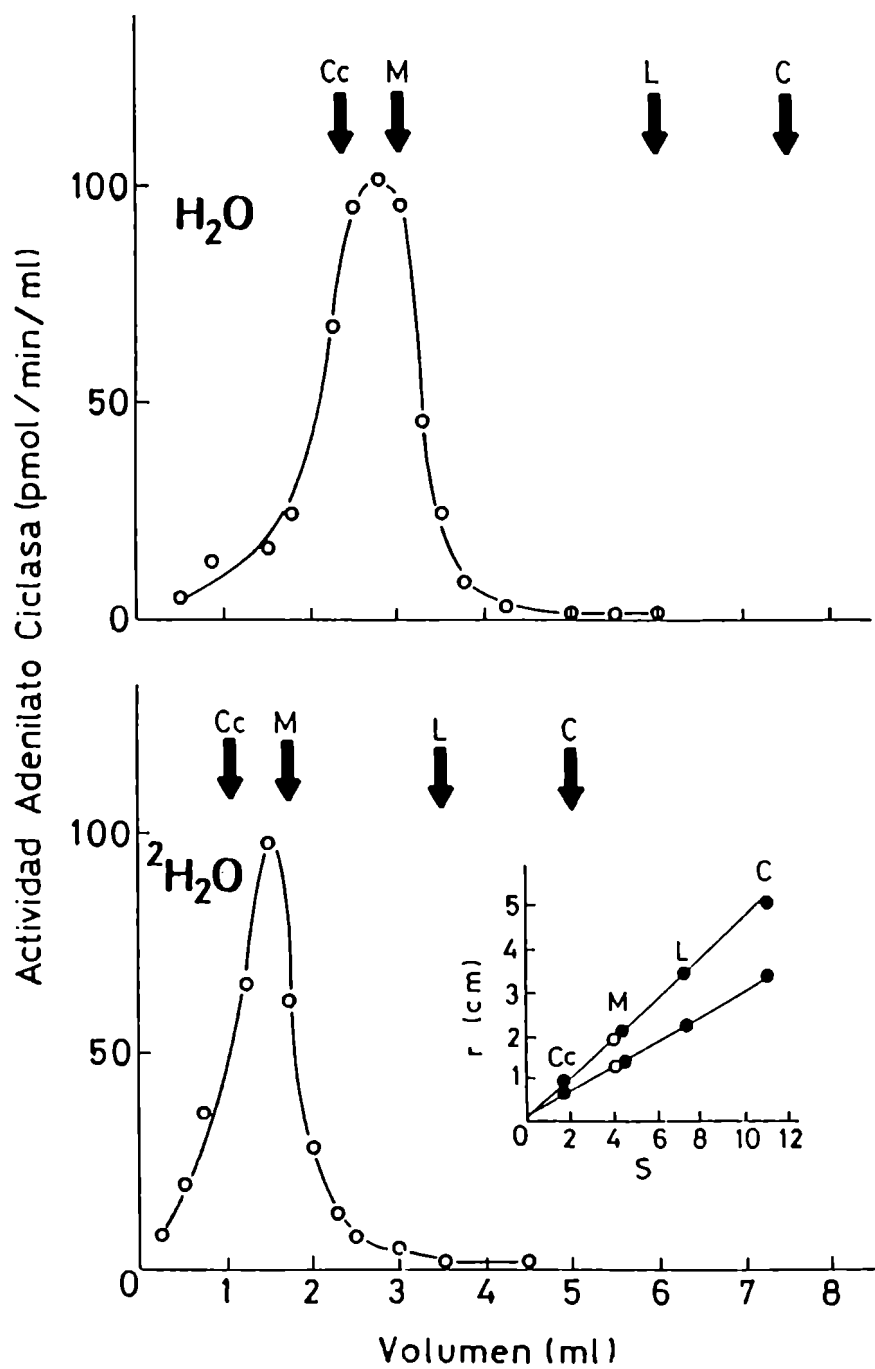


Figura 42: Gradientes de sacarosa en H₂O y ²H₂O de la adenilato ciclasa de *Medicago sativa*.

Proteínas marcadoras: Cc (citocromo C); M (malato deshidrogenasa); L (lactato deshidrogenasa); C (catalasa)

PARAMETROS MOLECULARES DE LA ADENILATO
CICLASA DE M. SATIVA

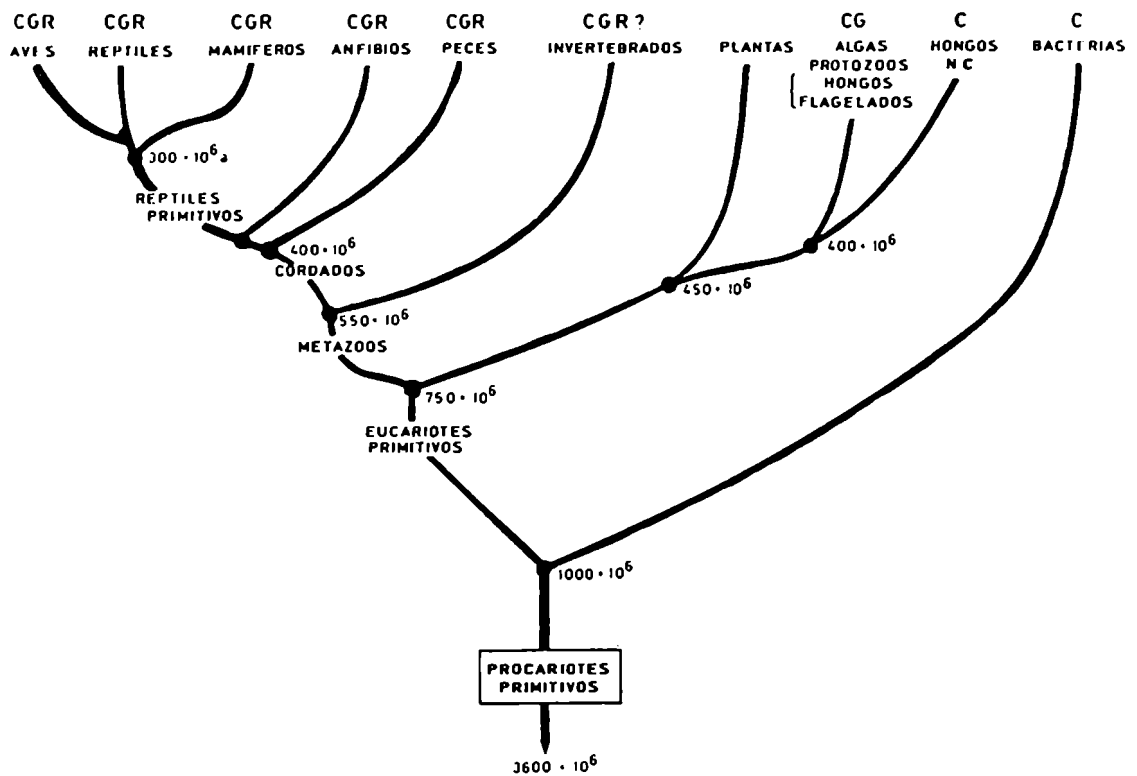
| | |
|-----------------------------------|--------|
| Coeficiente de Sedimentación(S) | 4.1 |
| Radio de Stokes (nm) | 44 |
| Volumen Específico Parcial (ml/g) | 0.74 |
| Peso Molecular | 84.000 |
| Coeficiente Friccional | 154 |

TABLA 18

CONCLUSIONES

Conclusiones

La adenilato ciclasa y sus componentes proteicos han sido ampliamente estudiados. Hasta la realización de esta Tesis nuestro conocimiento de esta enzima a lo largo de la evolución se resume en el siguiente esquema:



Conclusiones

Nuestro primer objetivo fue estudiar el papel del cAMP y la enzima que lo sintetiza en la relación simbiótica *Rhizobium meliloti*-*Medicago sativa*.

El estudio de la enzima en *R. meliloti* en vida libre nos permitió determinar que la misma se encuentra débilmente asociada a membranas, su sustrato es el ATP-Mn²⁺ y no responde a GTP, análogos no hidrolizables del mismo, forskolina o F-. Asimismo, se purificó dicha actividad enzimática y se determinaron sus parámetros moleculares: coeficiente de sedimentación 6.3S; radio de Stokes 4.8 nm; volumen específico parcial 0.74 ml/g; peso molecular 140.000 y coeficiente friccional 1.39.

Cuando se obtuvieron mutantes cya- de *R. meliloti* se pudo observar que ninguna de ellas era capaz de formar nódulos en *M. sativa*, lo cual involucraría al cAMP en algún paso del proceso de infección o nodulación.

Se estudió entonces la adenilato ciclasa en nódulos radiculares de *M. sativa* donde se encontró una actividad enzimática totalmente soluble y cuyo sustrato era el ATP-Mg²⁺. El hecho de que el nódulo esté formado esencialmente por bacteroides embebidos en citoplasma vegetal nos llevó a pensar que probablemente la actividad enzimática que se estaba midiendo en los nódulos correspondía a una adenilato ciclasa vegetal.

El estudio de la enzima en plantas de alfalfa no infectadas nos permitió medir la síntesis de cAMP sólo en raíces, no detectándose la misma en tallos ni hojas.

Conclusiones

Esta actividad se encontró en la fracción soluble siendo su sustrato el ATP-Mg²⁺. Esta actividad presentó variaciones estacionales.

Dos hormonas vegetales, la kinetina y el ácido indol acético, estimularon la síntesis de cAMP por encima del nivel basal.

Todos estos datos fueron confirmados midiendo los niveles de cAMP en las distintas partes de la planta.

Cuando el ensayo de adenilato ciclasa se realizó en presencia de Ca²⁺ y calmodulina de cerebro bovino o de hojas de espinaca se observó que la enzima era activada por el complejo Ca²⁺+CaM obteniéndose la mitad de la estimulación máxima con 1.0 µg de CaM/ml. Se observó un máximo de activación por CaM a una concentración de Ca²⁺ de 1.0 mM.

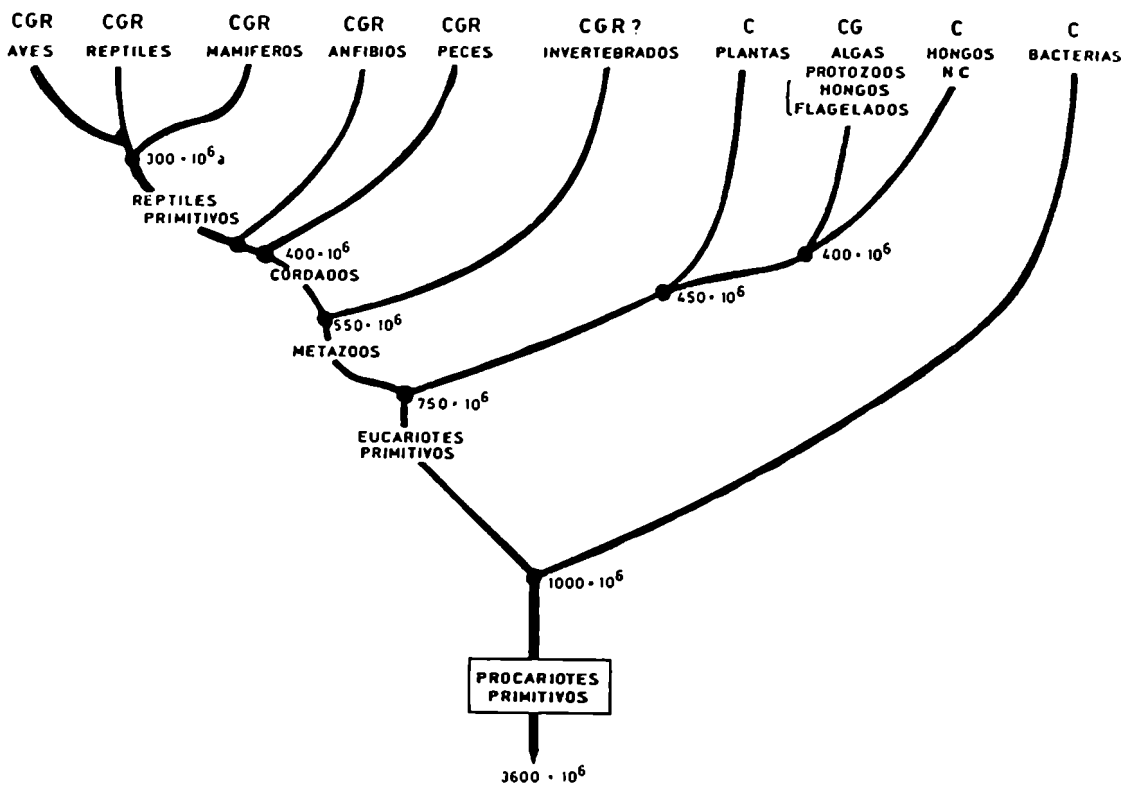
Esta activación a su vez fue bloqueada por EGTA y por derivados fenotiazínicos como la clorpromazina y la flufenazina, observándose la mitad de estimulación máxima con una concentración de 150 mM de clorpromazina.

La adenilato ciclasa de *M. sativa* fue purificada aproximadamente 1100 veces en tres etapas de purificación y finalmente se determinaron sus parámetros moleculares: coeficiente de sedimentación 4.1S; radio de Stokes 4.4 nm; volumen específico parcial 0.74 ml/g; peso molecular 84000; coeficiente friccional 1.54.

Esta es la primera vez que se mide, purifica y caracteriza una adenilato ciclasa en plantas superiores. Podemos decir, en base a los resultados aquí presentados, que las plantas superiores

Conclusiones

cuentan con una adenilato ciclasa que tiene como mínimo un componente catalítico (C). De esta manera, el esquema evolutivo presentado, ya puede ser modificado eliminándose el interrogante que ponía en duda la existencia de la adenilato ciclasa en vegetales (310).



BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

1. Sutherland, E.W. y T.W. Rall (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3608.
2. Sutherland, E.W. y T.W. Rall (1958) *J. Biol. Chem.* **232**, 1077.
3. Rall, T.W.; E.W. Sutherland y J. Berthet (1957) *J. Biol. Chem.* **224**, 463.
4. Hers, H.G. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* **167**.
5. Sutherland, E.W. y T.W. Rall (1960) *Pharmac. Rev.* **12**, 265.
6. Robinson, G.A.; R.W. Bütcher y E.W. Sutherland (1971) *Cyclic AMP Academic Press, New York*.
7. Sutherland, E.W.; T.W. Rall y T. Menon (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 1220.
8. Bütcher, R.W. y E.W. Sutherland (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 1244.
9. Gancedo, J.M.; M.J. Mazón y P. Eraso (1985) *TIBS*, 210.
10. Weber, I.T.; K. Takio; K. Titani y T.A. Steitz (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* **79**, 7679.
11. Boyton, A.L. y J.F. Whitfield (1983) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **15**, 193.
12. Pall, M.L. (1981) *Microbiol. Rev.* **45**, 462.
13. Flawiá, M.M. y H.N. Torres (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 6873.
14. Kornblihtt, A.R. (1980) *Tesis Doctoral U.B.A.*
15. Ross, E.M. y A.G. Gilman (1980) *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 533.
16. Torres, H.N. (1980) *Endocrinología Molecular*, Ed. El Ateneo, Cap. 7, pp. 75, Buenos Aires.
17. Ida, M. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **144**, 262.

Bibliografía

18. Varimo, K. y J. Londesborough (1976) *Biochem. J.* **159**, 363.
19. Chlapowski, F.J., R.W. Bütcher (1973) *Biochem. Biophys. Acta* **309**, 138.
20. Torruella, M. (1984) Tesis Doctoral U.B.A.
21. Flawiá, M.M. y H.N. Torres (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 6873.
22. Weiss, B. (1970) *Biogenic Amines as Physiological Regulators*, J.J. Blum Ed., Prentice Hall, New Jersey.
23. Braun, T. y R.F. Doas (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* **72**, 1097.
24. Kornblihtt, A.R.; M.M. Flawiá y H.N. Torres (1981) *Biochem.* **20**, 1262.
25. Robinson, G.A.; R.W. Bütcher y E.W. Sutherland (1971) *Cyclic AMP* Academic Press, New York.
26. Perkins, J., M. Moore (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 62.
27. Neer, E.J. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 3742.
28. Birnbaumer, L. y M. Rodbell (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 2477.
29. Birnbaumer, L. (1977) *Receptors and Hormone Action*, cap. 16, 485. Academic Press.
30. Flawiá, M.M. y H.N. Torres (1973) *FEBS Lett.* **30**, 74.
31. Shimmer, B.P.; K. Veda y G.H. Sato (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**, 806.
32. Rodbell, M.; L. Birnbaumer y S.L. Pohl (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 718.
33. Vauquelin, G.; P. Geinert; J. Hanoune y A.D. Strosberg (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* **74**, 3710.
34. Cuatrecasas, P. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* **63**, 450.

Bibliografía

35. Birnbaumer, L.; S.L. Pohl; M. Rodbell y F. Sundby (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 2038.
36. Kaumann, A.J. y L. Birnbaumer (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 7874.
37. Stengel, D.; L. Guenet y J. Hansume (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 10818.
38. Pfeuffer, E.; R.M. Dreher; H. Metzger y T. Pfeuffer (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* **82**, 3086.
39. Yeager, R.E.; W. Heiderman, G.B. Rosenberg y D.R. Storm (1985) *Biochem.* **24**, 3376.
40. Coussen, F.; J. Hiech; J. D'Alayer y A. Monneron (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* **82**, 6736.
41. Smigel, M.D. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 1976.
42. Stengel, D.; D. Henry, S. Tomova; A. Borsodi y J. Hanoune (1986) *Eur. J. Biochem.* **161**, 241.
43. Ross, E.M.; A.C. Howlett; K.M. Ferguson y A.G. Gilman (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 6401.
44. Ross, E.M. y A.G. Gilman (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 6966.
45. Rodbell, M.; L. Birnbaumer; S.L. Pohl y H.M. Krans (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 1877.
46. Rodbell, M.; H.M. Krans; S.L. Pohl y L. Birnbaumer (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 1982.
47. Gilman, A.G. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 615.
48. Bitonsky, M.W.; G.L. Wheeler; A. Yamasaki; M. Rasenick y P.J. Stein (1981) *Curr. Top. Membr. Transp.* **15**, 237.
49. Stryer, L. (1986) *Ann. Rev. Neurosci.* **9**, 87.
50. Cockcroft, S. (1987) *Trends Biochem. Sci.* **12**, 75.
51. Yatani, A.; J. Codina; A.M. Brown y L. Birnbaumer (1987) *Science* **235**, 207.

Bibliografía

52. Logothetis, D.E.; Y. Kurachi; J. Galper; E.J. Neer y D. E. Clophan (1987) *Nature* 325, 321.
53. Hescheler, J.; W. Rosenthal; W. Trautwein y G. Schultz (1987) *Nature* 325, 445.
54. Burgoyne, R.C. (1987) *Nature* 328, 112.
55. Lancet, D. y V. Pace (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 63.
56. Connolly, T. y R. Gilmore (1986) *J. Cell. Biol.* 103, 2253.
57. Jelsema, C.L. y J. Axelrod (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* 84, 3623.
58. Casey, P.J. y A.G. Gilman (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 2577.
59. Pfeuffer, J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6401.
60. Ross, E.M. y A.G. Gilman (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. N. Y.* 73, 4410.
61. Northup, J.K.; P.C. Sternweiss; M.D. Smigel; L. Schleifer; E.M. Ross y A.C. Gilman (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* 77, 6516.
62. Robishaw, J.D.; M.D. Smigel y A.G. Gilman (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9587.
63. Graziano, M.P.; P.J. Casey y A.G. Gilman (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 11375.
64. Bray, P.; A. Carter; C. Simons; V. Guo; C. Puckett; J. Komholtz; A. Spiegel y M. Nisemberg (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* 23, 8893.
65. Codina, J.; J.D. Hildebrandt; R.D. Sikura; M. Birnbaumer y J. Bryan (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 5871.
66. Codina, J.; J. Hildebrandt; R. Iyenzar; L. Birnbaumer; R. D. Sejura y C.R. Manclark (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. N. Y.* 80, 4276.
67. Bokoch, G.M.; T. Katada; J. Notrhup; E.L. Hewlett y A.G. Gilman (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2072.

Bibliografía

68. Bokoch, G.M.; T. Katada; J. Northup; M. Ui y A.G. Gilman (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 3560.
69. Nukada, T.; T. Tanaka; J. Takahashi; M. Noda; K. Haga (1986) *FEBS Lett.* **197**, 305.
70. Itoh, H.; T. Kozasa; S. Nagata; S. Nakamura; T. Katada (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* **83**, 3776.
71. Jones, D.T. y R.R. Reed (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 14241.
72. Lochrie, M.A.; J.B. Hurley y M.I. Simon (1985) *Science* **228**, 96.
73. Tanaka, T.; T. Nukada; Y. Nishibaura; K. Sugimoto y H. Suzuki (1985) *Nature* **315**, 242.
74. Yatsunamik, K. y H.G. Khorana (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* **82**, 4316.
75. Lerea, C.L.; D.E. Somers y J. Hurley (1986) *Science* **234**, 77.
76. Muschiatti, J.P.; G.M. Bianchini; V.C. Carricarte; N. Giusto; H.N. Torres; D. Farber y M.M. Flawiá. *Eur. J. Biochem.* Aceptado para su publicación.
77. Sternavere, P.C. y J.D. Robishaw (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 13806.
78. Evans, T.; M.L. Brown; E.D. Fraser y J.K. Northup (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 7052.
- 79a. Barbacid, M. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 779.
- 79b. Wakelam, M.J.; S.A. Davies; M.D. Bouslay; J. McKay; C. Marshall y A. Hall (1986) *Nature* **323**, 173.
80. M.A. Lochrie y M.I. Simon (1988) *Biochemistry* **27**, 49-57.
81. Katada, T.; G.M. Bokoch; J.K. Northup; M. Ui y A.G. Gilman (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 3568.
82. Northup, J.K.; P.C. Sternweiss y A.G. Gilman (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 11361.

Bibliografía

83. Kanaho, Y.; S.C. Tsei; R. Adanik; E.L. Hewlett; L. Moss y M. Vaughan (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 7378.
84. Fong, H.K.W.; T.T. Amatruda; B.W. Birren y M.J. Simon (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* **84**, 3792.
85. Gao, B.; A.G. Gilman y J.D. Robishaw (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* **84**, 6122.
86. Sugimoto, K.; T. Nukada; T. Tasake; H. Takahashi; M. Nada; N. Minamino; K. Kangawa; H. Matsuo; T. Hirose; S. Inayama y S. Numa (1985) *FEBS Lett.* **191**, 235.
87. Hildebrand, J.D.; J. Codina; W. Rosenthal; L. Birnbaumer; E.J. Noer; A. Yamazaki y M.W. Bitencky (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 14867.
88. Gierschik, P.; J. Codina; C. Simons; L. Birnbaumer y A. Spiegel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* **82**, 727.
89. Yatsunami, K.; B.V. Pandya; D.D. Oprian y H.G. Khorana (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* **82**, 1936.
90. Hurley, J.B.; H.K.W. Fong; D.B. Teplow; W.J. Dreyer y M.I. Simon (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. N.Y.* **81**, 6948.
91. Evans, T.; A. Fauzi; E.D. Frazer; M.L. Brown y J.K. Northup (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 176.
92. Lefkowitz, R.J.; J.M. Stadel y M.G. Caron (1983) *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 159.
93. Dickey, B.F.; J.B. Fishman; R.E. Fines y J. Navarro (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8738.
94. Katada, T.; J.K. Northup; G.M. Bokoch; M. Ui y A.G. Gilman (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 3578.
95. Katada, T.; G.M. Bokoch; M.D. Smigel; M. Ui y A.G. Gilman (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 3586.
96. Birnbaumer, L. (1987) *Trends Pharmacol. Sci.* **8**, 209.
97. Bostrom, C.O.; Y.C. Huang; B.M. Breckenridge y D.J. Wolff (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 64.

Bibliografía

98. Cheung, W.Y.; L.S. Brodham; T.J. Lynch; Y.M. Lin y E.A. Tallant (1975) *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **66**, 1055.
99. Keller, C.H.; D.C. La Porte; W.A. Toscano Jr.; D.R. Storm y K.R. Westcott (1980) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **356**, 205.
100. Resnik, T.J.; S. Stucki; G.Y. Gugorian; A. Zchauer; F.R. Bühler (1986) *Eur. J. Biochem.* **154**, 451.
101. Lakey, T.; S. Mac Neil; H. Humphries; S. Walker; D. Munro y S. Tomlinson (1985) *Biochem. J.* **225**, 581.
102. Reig, J.; M.T. Téllez-Iñón; M.M. Flawiá y H.N. Torres (1984) *Biochem. J.* **221**, 541.
103. Gustin, M. y D.L. Nelson (1987) *Biochem. J.* **246**, 337.
104. Ladant, D. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 2612.
105. Monneron, A.; D. Ladant; J. d'Alayer; J. Bellalon; O. Barzu y A. Ullman (1988) *Biochem. J.* **27**, 536.
106. Monod, J. (1947) *Growth* **11**, 223.
107. Makman, R.S. y E.A. Sutherland (1963) *J. Biol. Chem.* **240**, 1039.
108. Pastan, I. y R. Perlman (1970) *Science* **169**, 339.
109. Pastan, I. y S. Adhya (1976) *Bacteriol. Rev.* **40**, 527
110. Zubay, G.; D. Schwartz y J. Beckreith (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **66**, 104.
111. Emmer, M.; B. Grombrugghe; I. Pastan y R.L. Perlman (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **66**, 480.
112. Dickson, R.C.; J. Abelson; W.M. Barnes y W.S. Reznikoff (1975) *Science* **187**, 27.
113. Ullman, A. y A. Dauchin (1983) *Adv. in Cyclic Nucl. Res.* Vol 15, Raven Press, New York.
114. Reznikoff, W.S. y J.N. Abelson (1978) *The lactose operon*, pp. 221. Cold Spring Harbor, New York.
115. Schmitz, A. (1981) *Nuclear Acid Res.* **9**, 277.

Bibliografia

116. Simpson, R.B. (1980) *Nucleic Acid Res.* 8, 759.
117. Musso, R.E.; R. Di Lauro; S. Adhya y B. de Crombrughe (1979) *Cell* 12, 847.
118. Rothman-Denias, L.B.; J.E. Hesse y W. Epstein (1973) *J. Bacter.* 114, 1040.
119. Taylor, H.V. y M.D. Yudlin (1978) *Mol. Gen. Genet.* 165, 95.
120. Valentin-Hausen, P; B.A. Svenningesen; A. Munch Petersen y K. Hammer-Jaspersen (1978) *Mol. Gen. Genet.* 159, 191.
121. Casadaban, M.J. (1976) *J. Mol. Biol.* 104, 557.
122. Kosiba, B.E. y R. Schleif (1982) *J. Mol. Biol.* 156, 53.
123. Debarbouille, M. y M. Schwartz (1979) *J. Mol. Biol.* 132, 521.
124. Heinz, M.C. y E. McFall (1979) *J. Bacteriol.* 136, 104.
125. Franklin, N.C. y S.E. Luria (1961) *Virology* 15, 299.
126. Jacob, F. y J. Monod (1961) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26, 193.
127. Ullman, A.; E. Joseph y A. Danchin (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 3194.
128. Ullman, A. y A. Danchin (1980) *Trends in Biochem. Sci.* 5, 95.
129. Das, A.; D. Court y S. Adhya (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1959.
130. Queen, C. y M. Rosenberg (1981) *Cell* 25, 241.
131. Guidi-Rontani, Ch.; A. Danchin y A. Ullman (1984) *Mol. Gen. Genet.* 195, 96.
132. Pastan, I. y S. Adhya (1976) *Bact. Rev.* 40, 527.
133. Polgase, W.J.; D. Iwacha y M. Thomson (1978) *J. Bacter.* 133, 422.

Bibliografía

134. Chopra, I. y T.G. Billowe (1978) *Microbiol. Rev.* 42, 707.
135. Saier, M.H.; B.U. French y M.T. Carman (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7593.
136. Campos, J.m. y D.R. Zusman (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 518.
137. Orłowski, M. (1980) *Can. J. Microbiol.* 26, 906.
138. Gersh, D. y D. Strunk (1980) *Curr. Microbiol.* 4, 271.
139. Gersh, D.; W. Romer; H. Backer y H. Thrum (1978) *FEMS Microb. Lett.* 3, 39.
140. Lefebvre, G.; N. Martin; F. Schneider; G. Raval y R. Gay (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 540, 221.
141. Hood, E.E.; S. Armour; J.D. Ounky; A.K. Handis y R. Bresan (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 588, 193.
142. Kumar, H. y M. Gripta (1978) *Arch. Microb.* 119, 183.
143. Bianchini, G.M; A.C. Pastini; J.P. Muschietti; M.T. Téllez-Iñón; V.C. Carricarte; H.N. Torres y M.M. Flawiá. Enviado a publicación.
144. Tait, R.C.; K. Anderson; G. Cangelosi y K.T. Schanmugan (1981) *Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals*. Plenum Publishing Corp., New York, p. 279.
145. Hewlett, E. y J. Wolff (1976) *J. Bacter.* 127, 890.
146. Wolff, J. y G.H. Cook (1982) *Arch. Bioch. Biophys.* 215, 524.
147. Kessin, R.H. y J. Franke (1986) *J. of Bacter.* 166, 290.
148. William, S.; M. World y I. Suzuki (1974) *Can. J. Microbiol.* 20, 1567.
149. Ide, M. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 42.
150. Tao, M. y F. Lipman (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 63, 86.

Bibliografía

151. Walch, D.A. y C.D. Ashby (1973) Recent Prog. Horm. Res. 29, 329.
152. Yang, J.K. y W. Epstein (1980) Fed. Proceed 39, 2107.
153. Roy, A. y A. Danchin (1982) Mol. Gen. Genet. 188, 465.
154. Botaford, J.L. y M. Drexler (1978) Mol. Gen. Genet. 165, 47.
155. Majerfeld, F.H.; D. Miller; E. Spitz y H.V. Rickenberg (1981) Mol. Gen. Genet. 181, 470.
156. Joseph, E.; C. Bernaley; N. Guiso y A. Ullman (1982) Mol. Gen. Genet. 185, 262.
157. Peterkofsky, A. (1981) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 14, 215.
158. Dills, S.S.; A. Apperson; M.R. Schmidt y J.M. Sauer (1980) Microb. Rev. 44, 385.
159. Postma, P.W.; A. Schuitema y C. Kwa (1981) Mol. Gen. Genet. 184, 448.
160. Mitchell, W.J.; D.W. Saffen y S. Roseman (1987) J. Biol. Chem. 262, 16254.
161. Misko, T.P.; W.J. Mitchell; N.D. Meadow y S. Roseman (1987) J. Biol. Chem. 262, 16260.
162. Peterkofsky, A. y C. Gazdar (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 1099.
163. Ide, M.; A. Yoshimoto y T. Okakayachi (1967) J. Bacteriol. 99, 317.
164. Takai, K.; Y. Kuraehina; C. Suzuki-Hori; H. Okamoto y O. Hayaishi (1974) J. Biol. Chem. 248, 1965.
165. Upchurch, R.G. y G.H. Elkan (1978) Biochim. Biophys. Acta 538, 244.
166. Hanus, F.J.; R.J. Maier y H.J. Evans (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 1788.

Bibliografía

167. Lim, S.T. y K.T. Shanmugam (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **584**, 479.
168. Ditta, G.; S. Stanfield; D. Corbin y D.R. Helinski (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 7347.
169. Kiely, B. y F. O'Gara (1984) *Molec. Gen. Genet.* **408**, 230.
170. Stowers, M.D. (1985) *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 89.
171. Bhuvaneswari, T.V.; Turgeon, B.G. y Bauer, W.D. (1980) *Plant Physiol.* **66**, 1027.
172. Calvert, H.E.; M.K. Pence; M. Pierce; N.S.A. Malik y W.D. Bauer (1984) *Can. J. Bot.* **62**, 2375.
173. Halverson, L.J. y S. Stacey (1984) *Plant Physiol.* **74**, 84.
174. Bhuvaneswari, T.V.; A.A. Bhagwat y W.D. Bauer (1981) *Plant Physiol.* **68**, 1144.
175. Pierce, M. y W.D. Bauer (1983) *Plant Physiol.* **73**, 286.
176. Munns, D.H. (1968) *Plant Soil* **29**, 733.
177. Munns, D.H. (1968) *Plant Soil* **29**, 257.
178. Mc Neil, D.L. y T.A. La Rue (1984) *Plant Physiol.* **74**, 227.
179. Carroll, B.J.; D.L. Mc Neil y P.M. Gresshoff (1985) *PNAS* **82**, 4162.
180. Albersheim, P. y A.J. Anderson-Prouty (1975) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **26**, 31.
181. Kato, G.; Y. Maruyama y M. Nakamura (1980) *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2843.
182. Paau, S.A.; W.T. Leps y W.J. Brill (1981) *Science* **213**, 1513.
183. Dazzo, F.B. y D.H. Hubbell (1975) *Appl. Microbiol.* **30**, 1017.
184. Dazzo, F.B.; W.E. Yanke y W.J. Brill (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **539**, 276.

Bibliografía

185. Bhuvanewari, T.V.; K.K. Mills; D.K. Crist; W.R. Evans y W.D. Bauer (1983) *J. Bacteriol.* **153**, 443.
186. Smit, G.; J.W. Kijne y B.J.J. Lugtenberg (1986) *J. of Bacteriol.* **168**, 821.
187. Hrabak, E.M.; M.R. Urbano y F.B. Dazzo (1981) *J. of Bacteriol.* **148**, 697.
188. Dazzo, F.B. y G.L. Truchet (1983) *J. Membrane Biol.* **73**, 1.
189. Dazzo, F.B.; G.L. Truchet; J.E. Sherwood; E.M. Hrabak; M. Abe y S.H. Pankratz (1984) *Appl. Environm. Microbiol.* **48**, 1140.
190. Smit, G.; J.W. Kijne y B.J.J. Lugtenberg (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 4294.
191. Banfalvi, Z; G.S. Randhawa; C. Koncz; A. Kiss; J. Dusha y A. Kondorosi (1981) *Mol. Gen. Genet.* **184**, 318.
192. Rosenberg, C; P. Borstard; J. Denarie y F. Casse-Delbart (1981) *Mol. Gen. Genet.* **184**, 326.
193. Buikema, W.B.; S.R. Long; S.E. Brown, R. van den Bos; C.D. Earl y F.M. Ausubel (1983) *J. Mol. Appl. Genet.* **2**, 249.
194. Kondorosi, E.; Z. Banfalvi y A. Kondorosi (1984) *Mol. Gen. Genet.* **193**, 445.
195. Torok, I.; E. Kondorosi; T. Stepkowski; J. Posfai y A. Kondorosi (1984) *Nucl. Acid. Res.* **12**, 9509.
196. Jacobs, T.W.; T.T. Egelhoff y S.R. Long (1985) *J. Bact.* **162**, 4699.
197. Schmidt, J.; M. John; E. Kondorosi; A. Kondorosi; V. Wieneke; G. Schröder; J. Schröder y J. Schell (1984) *EMBO J.* **3**, 1705.
198. Egelhoff, T.T.; R.F. Fisher; T.W. Jacobs; J.T. Mulligan y R.S. Long (1985) *DNA* **4**, 241.
199. Mulligan, J.T. y S.R. Long (1985) *PNAS USA* **82**, 6609.
200. Horvath, B.; E. Kondorosi; M. John; J. Schmidt; I. Tosok; Z. Györgypal; I. Barobas; V. Wieneke; J. Schell y A. Kondorosi (1986) *Cell* **46**, 335.

201. Solheim, B. y J. Raa (1973) *J. Gen. Microbiol.* 77, 241.
202. Yao, P.Y. y J.M. Vincent (1969) *J. Biol. Sci.* 22, 413.
203. Yao, P.Y. y J.M. Vincent (1976) *Plant Soil* 45, 1.
204. Bhuvanewari, T.V. y B. Solheim (1988) *Physiol. Plant* 63, 25.
205. Sherwood, J.E.; J.M. Vass; F.B. Dazzo y G.L. Truchet (1984) *J. Bacteriol.* 159, 145.
206. Djordjevic, M.A.; P.R. Schofield; R.W. Ridge; N.A. Morrison; B.S. Bassam; J. Plazinski; J.M. Watson y G.B. Rolfe (1987) *Plant Mol. Biol.* 4, 147.
207. Innes, R.W.; P.L. Kuempel; J. Plazinski; H. Canter-Creners; G.B. Rolfe y M.A. Djordjevic (1985) *Mol. Gen. Genet.* 201, 426.
208. Zaat, S.A.; A.A.N. van Brussel; T. Tak; E. Pero y B.J.J. Lugtenberg (1987) *J. of Bact.* 169, 3388.
209. Firmin, J.L.; K.E. Wilson; L. Rossin y A.W.B. Johnston (1986) *Nature* 324, 90.
210. Peters, N.K.; J.W. Frost y S.R. Long (1986) *Science* 223, 977.
211. Redmond, J.W.; M. Batley; M.A. Djordjevic; R.W. Innes; P.L. Kuempel y B.G. Rolfe (1986) *Nature* 323, 623.
212. Rossen, I; C.A. Shearman, A.W.B. y J.A. Downie (1985) *EMBO J.* 4, 3367.
213. Zaat, S.A.J.; C.A. Wijffelman; H.P. Spaink; A.A.N. van Brussel; R.J.H. Okker y B.J.J. Lugtenberg (1987) *J. Bacteriol.* 169, 198.
214. Truchet, G.; M. Michel y J. Denarie (1980) *Differentiation* 16, 163.
215. Truchet, G; C. Rosenberg; J. Vaese; J.S. Julliot; S. Camut y J. Denarie (1984) *J. Bact.* 157, 134.
216. Vandenbosch, K.A.; K.D. Noel; R. Kanekis y E.H. Newcomb (1985) *J. Bact.* 162, 950.

Bibliografía

217. Finan, T.M.; A.M. Hirsch; J.A. Luigh; E. Johansen; G.A. Kuldán; S. Daegan; G.C. Walker y E.R. Signer (1985) *Cel* 40, 869.
218. Calaham, D.A. y J.G. Torrey (1981) *Can. J. Bot.* 59, 1647.
219. Turgeon, B.G. y W.D. Bauer (1985) *Planta* 163, 328.
220. Ljunggren, H. y G. Fahraens (1959) *Nature* 184, 1578.
221. Ljunggren, H. y G. Fahraens (1961) *J. Gen. Microbiol.* 26, 251.
222. Abe, M.; A.A. Amemura y S. Higachi (1982) *Plant Soil* 64, 315.
223. Abe, M.; J.E. Sherwood; R.I. Hollingsworth y F.B. Dazzo (1984) *J. Bact.* 160, 517.
224. Bhagwat, A.A. y J. Thomas (1984) *Arch. Microbiol.* 140, 260.
225. Higashi, S. y M. Abe (1980) *Appl. Environm. Microbiol.* 39, 297.
226. Noel, K.D.; G. Stacey; S.R. Tandon; L.E. Silver y W.S. Brill (1982) *J. Bact.* 152, 485.
227. Stacey, G.; A.S. Paan; K.D. Noel; R.J. Maier; L.E. Silver y W.J. Brill (1982) *Arch. Microbiol.* 132, 219.
228. Bisseling, T.; C. Been; J. Klugkiet; A. van Kamnsen y K. Nadler (1983) *EMBO J.* 2, 961.
229. Lang-Unnarsch, N. y F.M. Ausubel (1985) *Plant Physiol.* 77, 833.
230. Fuller, F. y D.P.S., Verma (1984) *Plant Mol. Biol.* 3, 21.
231. Verma, D.P.S. y K. Nadler (1984) *Genes involved in microba-plant interactions*. Springer-Verlag, New York, pp. 58.
232. Legacki, R.P. y D.P.S. Verma (1980) *Cell* 20, 153.
233. Hill, S.; C. Kennedy; E. Kavanagh; R.B. Goldberg y R. Hanau (1981) *Nature* 290, 424.

Bibliografía

234. Dilworth, M.J. y C.A. Appleby (1979) A treatise on Dinitrogen Fixation (Hardy, R.W.F.; F. BoHombey; R.C. Burns eds.), ppg. 691.
235. Appleby, C.A. (1984) Annu. Rev. Plant. Physiol. 35, 443.
236. Sans, S y Granick, S. (1961) JBC 236, 1172.
237. Moshiri, F.; L. Stults; P. Novak y R. Haier (1983) J. Bact. 155, 926.
238. Leong, S.A.; G.S. Ditta y D.R. Helinski (1982) JBC 257, 8724.
239. Guerinot, M.L. y Chelm, B.K. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1837.
240. Evans, H.J.; K. Purohit; M.A. Cantrell; G.Eisbrenner; S.A. Russell; F.J. Hanus y J.E. Lepo (1981) Current Perspectives in Nitrogen Fixation (Gibson, D; W. Newton eds.), pp. 84.
241. Dixon, R.O.D. (1972) Arch. Microbiol. 85, 193.
242. Dilworth, M.H. y A.R. Glenn (1982) J. Gen. Microbiol. 128, 29.
243. Boland, M.J.; K.J.F. Farnden y J.G. Robertson (1980) Nitrogen Fixation II (Newton, W.E.; W. Orme Johnson eds.), pp. 33.
244. Dilworth, M.; A. Glenn (1984) TIBS 108, 519.
245. Hooymans, J.J.; G.J.J. Logman (1984) Advances in Nitrogen Fixation Research, ed. W.E. Newton, C. Veeger, p. 261.
246. Reibach, P.H.; J.G. Streeter (1984) J. Bacteriol. 159, 47.
247. Dilworth, M.; A. Glenn (1984) Nitrogen Fixation and CO Metabolism (Ludden, P.W.; J.E. Burris eds.).
248. Peterson, J.B.; T.A. La Rue (1981) Plant Physiol. 68, 489.
249. Glenn, A.; Dilworth, M.J. (1981) J. Gen. Microbiol. 126, 243.

Bibliografía

250. Finan, T.M.; J.M. Wood; D.C. Jordan (1983) *J. Bact.* **148**, 193.
251. Glenn, A; P.S. Poole; J.F. Hudman (1980) *J. Can. Microbiol.* **119**, 267.
252. Ronson, C.W.; P. Lyttleton y J.G. Robertson (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4284.
253. Ronson, C.W.; S.B. Primrose (1979) *J. Gen. Microbiol.* **112**, 77.
254. Glenn, A; N.J. Brewin (1981) *J. Gen. Microbiol.* **126**, 237.
255. Glenn, A.R.; I.R. McKay; R. Arwas; M.J. Dilworth (1984) *J. Gen. Microbiol.* **130**, 239.
256. Tuzimuro, K.; H. Megura (1960) *J. Biochem.* **47**, 391.
257. Bergensen, F.J.; G.L. Turner (1975) *J. Gen. Microbiol.* **89**, 31.
258. Arias, A; C. Cervenansky, C.; A. Gardiol; G. Martínez-Dretz (1979) *J. Bacteriol.* **137**, 409.
259. Duncan, M.H.; Fraenkel, D.G. (1979) *J. Bact.* **137**, 415.
260. Gardiol, A; A. Arias; C. Cervenansky; G. Martínez-Dretz (1982) *J. Bacteriol.* **151**, 1621.
261. Johnson, G.V.; J.H. Evans; T. Ching (1966) *Plant Physiol.* **41**, 1330.
262. Lowe, R.H.; J.H. Evans (1962) *Soil Science* **94**, 351.
263. Wong, P.P.; H.J. Evans (1971) *Plant Physiol.* **47**, 750.
264. Karr, D.B.; J.K. Waters; F. Suzuki; D.W. Emerich (1984) *Plant Physiol.* **75**, 1158.
265. Kuclas, R.V.; J.H. Evans (1968) *Plant Physiol* **42**, 1458.
266. Stovall, J.; M. Cole (1978) *Plant Physiol.* **61**, 787.
267. Johnson, G.V.; H.J. Evans; T. Ching (1966) *Plant Physiol.* **41**, 1330.

Bibliografía

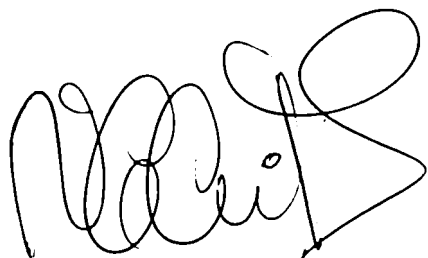
268. Pollard, C.J. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* **201**, 511.
269. Narayanan, A; J. Vermeersch y A. Pradet (1970) *C.R. Acad. Sci. Ser. D t* **271**, 2406.
270. Newton, R.P.; N. Gibbs; C.D. Moyse; J.J. Wiekers y E.G. Brown (1980) *Phytochemistry* **19**, 1909.
271. Brown, E.G. y R.P. Newton (1981) *Phytoch.* **20**, 2453.
272. Galsky, A.G. y J.A. Lippincott (1969) *Plant Cell Physiol.* **10**, 607.
273. Kessler, B. y B. Kaplan (1972) *Physiol. Plant.* **217**, 424.
274. Barton, K.A.; R. Verkeek; R. Ellis y A.A. Khan (1973) *Physiol. Plant* **29**, 186.
275. Tarantowicz-Marck, E. y K. Kleczkowski (1975) *Plant Sci. Letters* **5**, 417.
276. Polya, G.M. y A.R. Ashton (1974) *Plant Sci. Letters* **1**, 349.
277. Polya, G.M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **384**, 443.
278. Safran, E.M. y A.G. Galski (1974) *Planta Cell Physiol.* **15**, 527.
279. Hartung, W. (1973) *Z. Pflanzenphysiol.* **68**, 329.
280. Rao, V.S. y A. Khan (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **62**, 25.
281. Sela, I.; A. Hauschner y R. Mozes (1978) *Virology* **89**, 1.
282. Welburn, A.R.; J.P. Ashby y F.A.M. Welburn (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **320**, 363.
283. Salomon, D. y J.P. Mascarenhas (1972) *Plant Physiol.* **49**, 30.
284. Azhar, S. y C.R. Krishna Murti (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 58.
285. Weintraub, R.L. y J.R. Lawson (1972) *Plant Physiol.* **49**, 30.

Bibliografía

- 286 Kamusaka, S.; N. Saturai y Y. Masuda (1973) *Plant Cell Physiol.* **14**, 183.
- 287 Vincent, J.M. (1975) Blackwell Scientific Publications, Inglaterra.
- 288 Gibson, A.H. (1963) *Austral J. Biol. Sci.* **16**, 28.
- 289 Daniel, J. y A. Danchin (1979) *Molec. Gen. Genet.* **176**, 343.
- 290 Birnboim, A.C. y J. Doly (1979) *Nucl. Ac. Res.* **7**, 1513.
- 291 Rosenberg, N.; F. Casse-Delbart; I. Dusha; M. David y Ch. Boucher (1982) *J. of Bacter.* **150**, 402.
- 292 Greenless, A.W. y R.H. Symons (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 241.
- 293 Rodbell, M. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 5744.
- 294 Salomon, Y.; C. Londos y M. Rodbell (1974) *Annual Biochem.* **58**, 541.
- 295 Worthington Enzyme Manual (1972) Worthington Biochem. Corp. V Free-hold.
- 296 Terenzi, H.F.; E. Roschino y S. Passeron (1971) *Eur. J. Biochem.* **18**, 342.
- 297 Clarke, S. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 5459.
- 298 Meunier, J.C.; R.W. Olseng y J.P. Changeur (1972) *FEBS Lett.* **24**, 63.
- 299 Edelstein, S.J. y H.K. Schachman (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 306.
- 300 Martin, R.G. y B.M. Ames (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 1372.
- 301 Siegel, L.m. y K.J. Monty (1966) *Biochem. Biophys. Acta* **112**, 346.
- 302 Haga, T.; Haga, K. y Gilman, A.G. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 5776.
- 303 Thompson, W.J. y M.M. Appleman (1971) *Biochem.* **10**, 311.

Bibliografía

- 304 Watterson, D.M.; D.B. Iverson y L.J. Van Eldik (1980) Biochem. 19, 5762.
- 305 Laemmli, V.K. (1970) Nature 227 , 680.
- 306 Lowry, O.H.; N.J. Rosebrough; A.L. Farr y R.J. Randall (1951) J. Biol. Chem. 193, 285.
- 307 Stenier, A.L.; C.W. Parker y D.M. Kipnis (1972) J. Biol. Chem. 247, 1106.
- 308 Groso, M.K.; D.K. Toscano y W.A. Toscano Jr. (1987) J. Biol. Chem. 202, 8672.
- 309 Téllez-Iñón, M.T.; M.R. Ulloa; G.C. Glikin y H.N. Torres (1985) Biochem. J. 232, 425.
- 310 Carricarte, V.C.; G.M. Bianchini; J.P. Muschietti; M.T. Téllez-Iñón; A. Peticari y H.N. Torres (1988) Biochem. J. 249, 807-811.



DRA. MIRTHA MARIA FLAWIA
PROFESORA ASOCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INGEBI - CONICET