

ESTUDIO DE LA ISOMERIZACION ENZIMATICA DE
SESQUITERPENOS EN FLAVEDO DE Citrus sinensis

TESIS

PRESENTADA A LA
UNIVERSIDAD DE CHILE

En cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS

por

LUZ MARIA PEREZ ROEPKE

Agosto, 1985

PROFESOR PATROCINANTE

DR. OSVALDO CORI

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

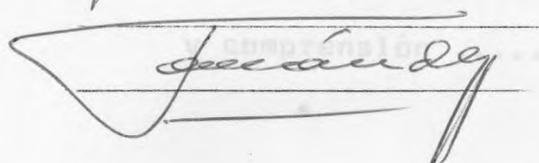
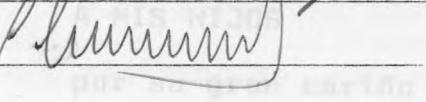
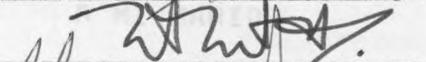
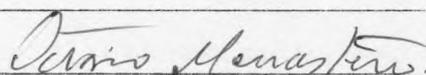
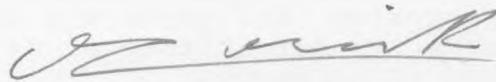
Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

Luz María Pérez Roepke

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 16 de Agosto de 1985.

Patrocinante de Tesis

Comisión Informante de Tesis



[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

A MI MARIDO
A MIS HIJOS
por su gran cariño
y comprensión

AGRADECIMIENTOS

A Olaya Bastías por su extraordinaria ayuda para la impresión de esta tesis, con el procesador de palabras.

A Osvaldo Cori, por su consejo oportuno, por su constante apoyo y estímulo, su crítica siempre constructiva, pero más que nada por todo lo que ha significado en mi formación como investigador.

A Cecilia Fernández por su gran colaboración en la confección de los dibujos.

A Jorge Garrido, por su gran ayuda y dedicación, y en especial por su enseñanza de diferentes aspectos sobre la ultraestructura de tejidos.

A Federico Leighton y Miguel Bronfmann, por la cálida acogida en el Laboratorio de Citología Bioquímica, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la P. Universidad Católica de Chile; y por todas las facilidades dadas para realizar los gradientes de sacarosa y para la discusión de los experimentos de fraccionamiento subcelular.

A Lucy Messen, por las preparaciones del material para microscopía electrónica; sin cuya ayuda no habría sido posible realizar parte de esta tesis.

A María Cecilia Necochea, por su amistad y constante apoyo en las largas jornadas de fraccionamiento subcelular.

A Gonzalo Pérez por su donación de naranjas de los Huertos de Betania, Mallarauco.

A mis compañeros de trabajo y a todas las personas, que en una u otra medida aportaron en la realización de esta tesis.

Esta Tesis fué realizada en el Laboratorio de Bioquímica General, Departamento de Bioquímica de la actual Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y fué financiada por el Programa CHI 81/001 del PNUD/UNESCO, y por los proyectos B-1127 del Departamento de Investigación y Bibliotecas de la Universidad de Chile y por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico.

INDICE DE MATERIAS

Indice de materias	iv
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	x
Lista de abreviaturas	xiii
Resumen	xv
Summary	xviii
1. INTRODUCCION	1
2. MATERIALES Y METODOS	25
2.1. Reactivos químicos, enzimas, coenzimas y proteínas.	26
2.1.1. Reactivos químicos.	26
2.1.2. Enzimas, coenzimas y proteínas.	27
2.2. Sustratos	27
2.2.1. Síntesis química.	27
2.2.2. Purificación.	29
2.2.3. Análisis de las fracciones de los sustratos.	31
2.3. Técnicas cromatográficas.	35
2.3.1. Cromatografía en capa fina (TLC).	35
2.3.1.1. Sílica gel H de 0,25 mm de espesor.	35
2.3.1.1.1. Solvente de desarrollo n-propanol : amoníaco : agua = 6 : 3 : 1.	35
2.3.1.1.2. Solvente de desarrollo Cloroformo puro.	37
2.3.1.1.3. Solvente de desarrollo Benceno : eter de petroleo (p.e. 40-60) = 7,5 : 2,5.	37
2.3.1.2. Placa reversa. Sílica gel G de 0,5 mm de espesor.	37
2.3.1.3. Sílica gel G de 0,25 mm de espesor.	38
2.3.2. Cromatografía en fase gaseosa (GLC).	38
2.3.3. Cromatografía en columna de las proteínas del flavedo de naranja.	39
2.3.3.1. Filtración disociativa.	39
2.3.3.2. Filtración en Sepharose 2-8.	40
2.4. Preparación del sistema enzimático.	41
2.4.1. Preparación de homogeneizados.	41
2.4.2. Fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial.	43

2.4.2.1.	Expresión de resultados del fraccionamiento subcelular.	43
2.4.3.	Fraccionamiento en gradientes de sacarosa.	45
2.4.3.1.	Gradiente discontinuo de sacarosa.	45
2.4.3.2.	Gradiente continuo de sacarosa.	45
2.5.	Determinación de proteínas.	46
2.5.1.	Método turbidimétrico.	46
2.5.2.	Azul de Coomassie.	47
2.6.	Determinación de almidón.	48
2.7.	Determinación de densidad de las fracciones obtenidas de gradientes de sacarosa.	48
2.8.	Ensayo de las diferentes actividades enzimáticas.	48
2.8.1.	Enzimas de la biosíntesis de isoprenoides.	48
2.8.1.1.	Incorporación de ^{14}C - MVA en trozos de flavedo de naranja.	48
2.8.1.2.	Determinación de la actividad de la IPP isomerasa.	50
2.8.1.3.	Determinación de la actividad de la preniltransferasa.	50
2.8.1.4.	Sistema de isomerización redox.	51
2.8.1.5.	Determinación de la actividad de la prenilfosfatasa.	51
2.8.1.6.	Actividad de la preoldeshidrogenasa.	52
2.8.1.6.1.	Determinación de la actividad de la preoldeshidrogenasa usando prenoles radiactivos como sustratos.	52
2.8.1.6.2.	Determinación de la actividad de la preoldeshidrogenasa por reducción de pNBT.	53
2.8.2.	Enzimas marcadoras de las fracciones subcelulares.	54
2.8.2.1.	Citocromo c oxidasa (Mitocondrias).	54
2.8.2.2.	Catalasa (Peroxisomas y glioxisomas).	54
2.8.2.3.	ATPasa dependiente de K^+ (Membrana plasmática).	55
2.8.2.4.	NADPH citocromo c reductasa (Retículo endoplásmico).	56

2.8.2.5.	NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A (Retículo endoplásmico).	56
2.8.3.	Controles no enzimáticos.	57
2.9.	Cuantificación de los productos radiactivos.	57
2.10.	Identificación de los productos de las reacciones catalizadas por las enzimas de la biosíntesis de isoprenoides.	58
2.10.1	Derivatización de aldehidos con 2,4-dinitrofenilhidrazina.	58
2.11.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.	59
2.12.	Electroenfoque en geles de poliacrilamida.	60
2.13.	Microscopía de luz.	61
2.14.	Microscopía electrónica de transmisión.	61
2.14.1.	Tinción de muestras con acetato de uranilo y citrato de plomo.	62
2.14.2.	Tinción de muestras con ácido fosfotúngstico y ácido crómico.	62
2.14.3.	Tinción negativa del S ₃₉₁₀₀ .	62
2.14.4.	Análisis de las fracciones de membranas.	63
2.15.	Microscopía electrónica de barrido.	63
3.	RESULTADOS Y DISCUSION.	64
3.1.	Ultraestructura de las células del flavedo de naranja.	65
3.1.1.	Microscopía de luz.	65
3.1.2.	Microscopía electrónica de barrido.	67
3.1.3.	Microscopía electrónica de transmisión.	69
3.2.	Fraccionamiento subcelular.	84
3.2.1.	Preparación del homogeneizado.	84
3.2.1.1.	Obtención del flavedo.	84
3.2.1.2.	Amortiguador usado para la homogeneización.	84
3.2.1.3.	Forma de homogeneizar el tejido.	84
3.2.2.	Centrifugación diferencial.	85
3.2.3.	Análisis de las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial.	86
3.2.3.1.	Enzimas marcadoras.	86

3.2.3.2.	Contenido de almidón.	93
3.2.3.3.	Ultraestructura de las fracciones.	95
3.2.3.4.	Membrana plasmática.	105
3.2.3.4.1.	Identificación de membrana plasmática.	105
3.2.3.4.2.	Separación de membrana plasmática en gradiente discontinua de sacarosa.	105
3.2.3.5.	Electroforesis en SDS.	111
3.2.3.6.	Electroenfoque.	113
3.2.3.7.	Incorporación de ¹⁴ C-MVA.	116
3.3.	Actividades enzimáticas relacionadas con la biosíntesis de compuestos de estructura isoprénica.	121
3.3.1.	Actividad de IPP isomerasa y de Preniltransferasa.	121
3.3.2.	Productos formados por el sistema enzimático a partir de diferentes sustratos.	126
3.3.3.	Actividad de prenilfosfatasa.	134
3.3.4.	Actividad de prenoaldeshidrogenasa.	137
3.3.5.	Filtración por Sepharose 2-B del S ₃₉₁₀₀ *	144
4.	CONCLUSIONES.	162
5.	BIBLIOGRAFIA.	168

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.3.I	Cuadro resumen de los diferentes compuestos separados e identificados por cromatografía en capa fina.	36
Tabla 3.2.I	Actividad de las enzimas marcadoras en el homogeneizado y recuperación después del fraccionamiento subcelular.	92
Tabla 3.2.II	Distribución de almidón en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial.	94
Tabla 3.2.III	Membranas presentes en el P ₃₉₁₀₀ .	99
Tabla 3.2.IV	Distribución de la radiactividad incorporada a partir de ¹⁴ C-MVA en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial.	117
Tabla 3.3.I	Distribución de las actividades de C ₁₅ preniltransferasa y de IPP isómerasa en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial.	122
Tabla 3.3.II	Actividad de la IPP isomerasa, C ₁₀ y C ₁₅ preniltransferasas en presencia y ausencia de NAD ⁺ agregado, en el S ₃₉₁₀₀ .	123
Tabla 3.3.III	Productos formados y cociente Z-farnesol/E-farnesol en las reacciones de IPP isomerasa, C ₁₀ y C ₁₅ preniltransferasas.	129
Tabla 3.3.IV	Actividad de prenilfosfatasa en presencia de diferentes sustratos.	135
Tabla 3.3.V	Actividad de prenildehidrogenasa en presencia de diferentes sustratos, medida por reducción de pNBT.	138
Tabla 3.3.VI	Actividad de IPP isomerasa, preniltransferasa y fosfatasa en S ₃₉₁₀₀ y fracciones eluidas de la columna de Sepharose 2-B.	149

Tabla 3.3.VII	Actividad de IPP isomerasa, preniltransferasa y fosfatasa en S_{39100}, S_{39100} precipitado con sulfato de amonio y fracciones eluidas de la columna de Sepharose 2-B.	153
Tabla 3.3.VIII	Porcentajes de unidades totales de preniltransferasa e IPP isomerasa en las proteínas eluidas de las columnas de Sepharose-2B.	154

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Estructura de diferentes isoprenoides.	4
Figura 1.2.	Reacción catalizada por la IPP isomerasa.	6
Figura 1.3.	Reacción catalizada por la preniltransferasa.	8
Figura 1.4.	Productos formados por la preniltransferasa de <u>Gossipum hirsutum</u> .	12
Figura 1.5.	Conformación del carbocatión intermediario en la reacción de la preniltransferasa.	14
Figura 1.6.	Isomerización redox de alcoholes.	17
Figura 1.7.	Mecanismo de isomerización redox en flavedo de naranja.	18
Figura 2.2.1.	Estructura de los sustratos fosforilados de enzimas de la vía isoprenica.	28
Figura 2.2.2.	Perfil de elución de los sustratos de una columna de DEAE-Sephadex A-25.	32
Figura 2.2.3.	Esquema de los métodos analíticos usados para identificar distintos ésteres fosfóricos de prenoles.	34
Figura 2.4.1.	Esquema del fraccionamiento subcelular de homogeneizados de flavedo de naranja.	44
Figura 3.1.1.	Microscopía de luz de cortes de flavedo de naranja provenientes de frutos verdes y maduros.	66
Figura 3.1.2.	Microscopía electrónica de barrido de cortes de flavedo de frutos verdes.	68
Figura 3.1.3.	Plasmodesmos.	70
Figura 3.1.4.	Nucleo.	73
Figura 3.1.5.	Cloroplastos.	74
Figura 3.1.6.	Cromoplastos.	76
Figura 3.1.7.	Mitocondrias.	78
Figura 3.1.8.	Retículo endoplásmico rugoso.	79
Figura 3.1.9.	Dictiosomas.	81

Figura 3.2.1.	Distribución de enzimas marcadoras en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial.	88
Figura 3.2.2.	Membranas tilacoides en P ₉₇₅₀ .	96
Figura 3.2.3.	Membranas presentes en P ₃₉₁₀₀ .	97
Figura 3.2.4.	Filtración disociativa en Sephadex G-25 de P ₃₉₁₀₀ .	101
Figura 3.2.5.	Membranas obtenidas a partir de P ₃₉₁₀₀ .	103
Figura 3.2.6.	S ₃₉₁₀₀ observado al M.E. con tinción negativa.	104
Figura 3.2.7.	Cortes de tejido teñidos con PTA/CrO ₃ .	106
Figura 3.2.8.	P ₃₉₁₀₀ teñido con PTA/CrO ₃ .	107
Figura 3.2.9.	Fracción de membranas obtenida de un gradiente discontinuo de sacarosa.	109
Figura 3.2.10.	Actividad de ATPasa-K ⁺ en gradiente discontinuo de sacarosa.	110
Figura 3.2.11.	Esquema de las proteínas separadas por electroforesis en SDS, a partir de las diferentes fracciones obtenidas por centrifugación diferencial.	112
Figura 3.2.12.	Electroenfoque de las proteínas obtenidas por centrifugación diferencial.	114
Figura 3.3.1.	Distribución subcelular del sistema enzimático que biosintetiza Z-farnesol, de C ₁₅ preniltransferasa e IPP isomerasa.	128
Figura 3.3.2.	Análisis por GLC de los productos formados por el sistema enzimático a partir de ¹⁴ C-IPP.	130
Figura 3.3.3.	Análisis por GLC de los productos formados por el sistema enzimático a partir de ³ H-GPP + IPP.	132
Figura 3.3.4.	Análisis por GLC de los productos formados por las fosfatasas.	136
Figura 3.3.5.	Análisis por TLC de los productos formados por la prenoldeshidrogenasa.	140

Figura 3.3.6.	Análisis por TLC de los productos formados por la preoldes-hidrogenasa a partir de sustratos radiactivos.	142
Figura 3.3.7.	Filtración en Sepharose-2B de S_{39100} .	145
Figura 3.3.8.	Filtración en Sepharose-2B de S_{39100} precipitados con $(NH_4)_2SO_4$ entre 0 y 70% de saturación.	151
Figura 3.3.9.	Esquema de las proteínas separadas por electroforesis en SDS, a partir de fracciones eluidas de Sepharose - 2B.	156
Figura 3.3.10.	Esquema de las posibles vías de utilización de ^{14}C -IPP.	161

ABREVIATURAS

AA	Fosfatos alílicos
AcUD	Acetato de Uranilo
DEAE	Dietyl, aminoetil
DMAPP	Dimetilalilpirofosfato
DMCS	Dimetilclorosilano
EDTA	Acido etiléndiamino tetracético
EGA	Etilénglicoladipato
FOH	Farnesol
FPP	Farnesil pirofosfato
g	Campo gravitacional
GGPP	Geranilgeranilpirofosfato
GLC	Cromatografía en fase gaseosa
GOH	Geraniol
GPP	Geranilpirofosfato
IPP	Isopentenilpirofosfato
K-Pi	Fosfato de potasio
LL	Lípidos libres
M.E.	Microscopio electrónico
MES	Acido 2(N-morfolino), etanosulfónico.
MVA	Acido mevalónico
pNBT	Azul de p-nitrotetrazolio.
NOH	Nerol
NPP	Nerilpirofosfato
P	pella
Pb	Citrato de Pb
POPOP	2,2 ,p-fenilén-bis-(feniloxasol)
PP	prenolfosfatos
PPD	2,5-difeniloxasol
PPi	Pirofosfato inorgánico
PTA	Acido fosfotúngstico
PVP	polivinilpirrolidona
S	sobrenadante
SDS	dodecilsulfato de sodio
TRIS	Tris-hidroxi-metil amino etano
TCA	Acido tricloroacético
TLC	Cromatografía en capa fina
Vc	Volumen de columna

MICROSCOPIA ELECTRONICA

a	almidón
CL	cloroplastos
CR	cromoplastos
dic	dictiosomas

M	mitocondrias
mp	membrana plasmática
N	nucleo
nu	nucleolo
pc	pared celular
Pd	plasmodesmos
rer	retículo endoplásmico rugoso
t	tonoplasto
til	tilacoides
V	vacuola

R E S U M E N

Las plantas superiores sintetizan una gran variedad de compuestos denominados "metabolitos secundarios", entre los cuales encontramos los isoprenoides. Estos últimos se forman a partir de ácido mevalónico (MVA) a través de una ruta biosintética en la que participan enzimas como la isopentenil pirofosfato (IPP) isomerasa, y las preniltransferasas.

Sistemas enzimáticos preparados de flavedo de Citrus sinensis catalizan la formación de sesquiterpenoides, tanto de conformación E como Z, en la que participan las enzimas mencionadas anteriormente. Sin embargo, no se ha podido establecer si existen preniltransferasas independientes responsables de la biosíntesis de ambos diastereoisómeros, o bien, si existe una vía de interconversión redox de estos compuestos.

Para establecer la vía de formación de sesquiterpenoides de conformación Z, y su distribución subcelular, se estudió inicialmente la ultraestructura de las células del flavedo de naranja. Este estudio permitió determinar las condiciones para la preparación de homogeneizados, en los que se mantuviera la integridad de los organelos presentes en este tipo de células. Los homogeneizados se prepararon en presencia de albúminas vegetales (leche de coco), y se fraccio-

narón mediante centrifugación diferencial. Dicho procedimiento permitió separar e identificar las fracciones mitocondrial y microsomal, y obtener una "fracción soluble" libre de lípidos y contaminantes de las fracciones que sedimentaron a g menores.

La "fracción soluble" (S_{39100}) contenía las actividades de IPP isomerasa, de preniltransferasa y los sistemas enzimáticos responsables de la transformación del MVA y de la formación de Z-farnesol. Este sesquiterpenoide de conformación Z se formaba más eficientemente a partir de ^{14}C -IPP, que cuando se ensayaba el sistema enzimático en presencia de ^{14}C -IPP más un sustrato alílico (DMAPP o GPP). En estas últimas condiciones, sin embargo, se estaba midiendo principalmente la actividad de la preniltransferasa. Al estudiar la misma reacción usando IPP más ^3H -GPP como sustratos, el producto resultó ser solamente el E-farnesilpirofosfato (E-FPP).

Al no existir una preniltransferasa que formara directamente Z-FPP, como precursor aislable del Z-farnesol, se intentó establecer si existía en la fracción soluble una vía de transformación de sesquiterpenoides de conformación E en compuestos de conformación Z. No se detectaron actividades aisladas de una fosfatasa que hidrolizara exclusivamente E-FPP, ni de preoldeshidrogenasa o reductasa, que pudieran catalizar una interconversión redox de sesquiterpenoides.

Estos resultados, sin embargo, no descartan la posible existencia de un complejo multienzimático que catalice la formación de Z-farnesol a través de un mecanismo redox de isomerización a partir de IPP más GPP, o bien, que exista una ruta alternativa que transforme directamente al IPP en Z-farnesol.

Se estudió entonces, la masa molecular del sistema enzimático responsable de la biosíntesis de Z-farnesol, filtrando la fracción soluble por Sepharose-2B. Se pudieron dissociar dos formas de IPP isomerasa (465 kDa y 123 kDa) y dos formas de preniltransferasa (465 kDa y 96 kDa). La proteína de masa molecular 465 kDa catalizaba, además, la formación de Z-farnesol.

Los resultados sugieren que esta proteína de 465 kDa podría corresponder a un complejo multienzimático responsable de la formación de Z-farnesol. Este podría contener a las enzimas que: a) Transformen directamente al IPP en Z-farnesol, o bien, b) Transformen a compuestos de conformación E en el Z-farnesol, a través de un mecanismo de isomerización redox.

S U M M A R Y

Isoprenoids belong to the so called "secondary metabolites", that are formed in higher plants. They are synthesized from mevalonic acid (MVA) through a pathway that involves enzyme activities as isopentenylpyrophosphate (IPP) isomerase and prenyltransferases.

Enzyme systems prepared from Citrus sinensis flavedo, catalyze the formation of E and Z sesquiterpenoids. It has not been demonstrated yet, if there are different prenyltransferases involved in the biosynthesis of each diastereomer, or Z products are formed through a redox isomerization pathway, from E compounds.

To establish the subcellular distribution and the pathway of Z sesquiterpenoids formation, it was initially studied the ultrastructure of cells from orange flavedo. These studies allowed us to prepare homogenates where practically no organelle destruction was produced, including plant albumins (coconut milk) in buffers used to obtain the homogenates. These were fractionated by differential centrifugation, obtaining clearly separated mitochondrial and microsomal fractions, as well as a "soluble fraction" free of lipids and contaminants from less g sedimenting fractions.

The "soluble fraction" (S₃₉₁₀₀) contained IPP isomerase and prenyltransferase activities and the enzyme systems responsible for the transformation of MVA and formation of Z-farnesol. This Z sesquiterpenoid was more efficiently formed from ¹⁴C-IPP than from ¹⁴C-IPP plus an allylic pyrophosphate (DMAPP or GPP). In the latter conditions, prenyltransferase activity was being measured. While studying this same activity, but with IPP plus ³H-GPP as substrates, only E-farnesylpyrophosphate (E-FPP) was found as product, showing that a Z prenyltransferase was absent from the enzyme preparation.

The formation of Z-farnesol could then have been performed from E compounds through an isomerization mechanism. No E-FPP specific phosphatase, nor prenaldehyde hydrogenase or reductase could be detected, to explain a redox isomerization of sesquiterpenoids. These results, whereas, cannot discard the existence of a multienzyme complex which could catalyze the direct formation of Z-farnesol from IPP, or transform E compounds into Z-farnesol through a redox isomerization mechanism.

The molecular mass of the enzyme system of the biosynthesis of Z-farnesol, was then studied. The soluble fraction was filtered through Sepharose-2B. Two different forms of IPP isomerase (465 kDa and 123 kDa) and prenyltransferase

(465 kDa and 96 kDa) could be dissociated. The 465 kDa protein, also catalyzed the formation of Z-farnesol.

The results suggest, that the 465 kDa protein, could correspond to a multienzyme complex that catalyze the formation of Z-farnesol and could include the enzymes that: a) transform IPP directly into Z-farnesol, or, b) transform E compounds to Z-farnesol through a redox isomerization mechanism.

1. INTRODUCCION

Los tejidos vegetales contienen una gran variedad de compuestos orgánicos, de estructura y tamaño muy diversos. El desconocimiento de su función y biosíntesis hizo que se les designara desde el siglo pasado con el nombre genérico de "metabolitos secundarios" (Goodwin, 1967; Richards & Hendrickson, 1964). Entre ellos podemos mencionar a los flavonoides, antocianinas, isoprenoides, taninos, polifenoles, ubiquinonas, alcaloides, etc. los cuáles no comparten un común denominador estructural. Actualmente se conoce un poco más sobre la biosíntesis de todos ellos, se ha establecido la función que desempeñan en la relación planta y medio ambiente (Seigler & Price, 1976; Mann, 1978) y se ha demostrado que muchos de ellos se renuevan activamente, con períodos de semidecaimiento de días ó aún de horas (Seigler & Price, 1976).

Algunos de estos "metabolitos secundarios" se encuentran en los "aceites esenciales" que forman las plantas superiores. Se denomina así a una mezcla de compuestos volátiles que pueden ser extraídos por destilación con arrastre de vapor, y cuyos componentes principales son hidrocarburos, aldehidos, cetonas y alcoholes mono- y sesquiterpénicos. Además de los aceites esenciales, existen en los tejidos vegetales otros terpenoides que se pueden extraer mediante técnicas diferentes, y que desempeñan importantes roles fisiológicos como fitohormonas, fitoalexinas, ubiquinonas,

carotenos, etc.

La estructura de todos estos compuestos deriva de una molécula simple, el isopreno (C_5H_8), y sus fórmulas corresponden a múltiplos de esta unidad: C_{10} , C_{15} , C_{20} , etc. (Fig. 1.-1). Es frecuente, sin embargo, que en el proceso de biosíntesis se pierdan uno ó más átomos de carbono, por oxidaciones sucesivas y descarboxilaciones.

Los isoprenoides son biosintetizados a partir de una unidad isoprénica, que fué llamada "isopreno activo" aún antes de conocer su estructura (Chaykin y col., 1958), determinándose luego que este isopreno activo era el isopentenil-pirofosfato (IPP)¹ (Lynen y col., 1958).

Se demostró su biosíntesis a partir de MVA en levadura (Rilling & Bloch, 1959), bacterias (Ohnoki y col., 1962), plantas superiores (Anderson y col., 1960; Beytía y col., 1969) y mamíferos (Witting & Porter, 1959). A partir de este metabolito de 6C se origina desde el isopreno (Rasmussen, 1978) y monoterpenos (C_{10}) hasta politerpenoides, como el caucho o la gutapercha.

La formación de precursores de los diferentes isoprenoides a partir de IPP, se realiza a través de reacciones

¹ Ver abreviaturas.

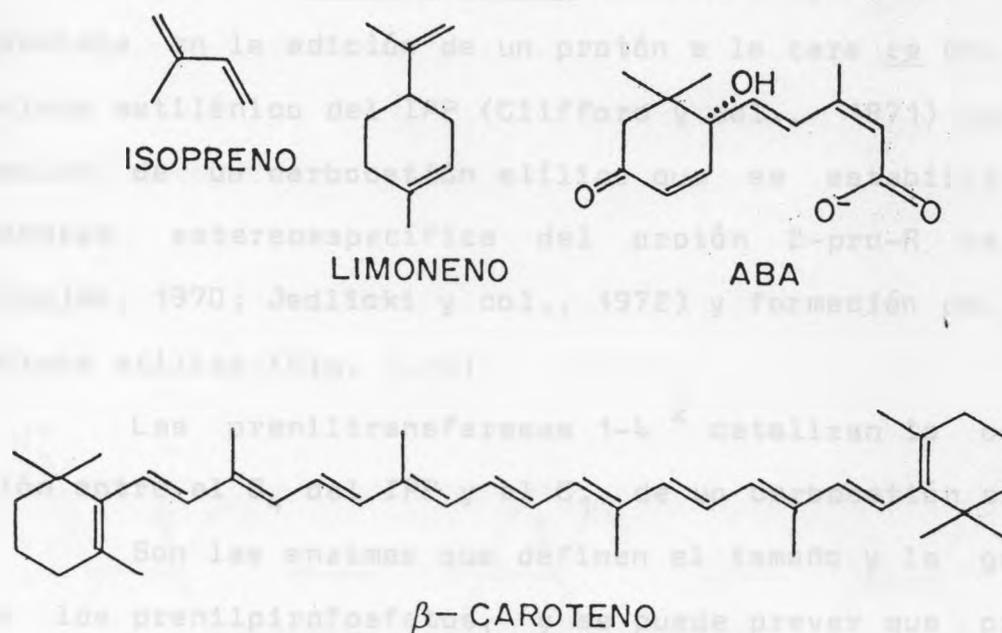


Figura 1.1. Estructura de diferentes isoprenoides.

catalizadas por dos grupos de enzimas: la IPP isomerasas y las preniltransferasas.

La IPP isomerasa cataliza la transformación del IPP en su isómero alílico, el DMAPP. El mecanismo de la reacción enzimática ha sido estudiado en hígado (Holloway & Popják, 1968; Shah y col., 1965), levadura (Agranoff y col., 1960) y Pinus y Citrus (Jedlicki y col., 1972). Consiste en la adición de un protón a la cara re del doble enlace metilénico del IPP (Clifford y col., 1971) con formación de un carbocatión alílico que se estabiliza por pérdida estereoespecífica del protón 2-pro-R del C₂ (Popják, 1970; Jedlicki y col., 1972) y formación del doble enlace alílico (Fig. 1.-2).

Las preniltransferasas 1-4² catalizan la condensación entre el C₄ del IPP y el C₁, de un carbocatión alílico.

Son las enzimas que definen el tamaño y la geometría de los prenilpirofosfatos, y se puede prever que presenten especificidad respecto a tres variables: largo de cadena del sustrato alílico, número de moléculas de IPP adicionadas y por ende largo de cadena del producto; y la conformación en torno a cada doble enlace generado. De este modo la distribución de isoprenoides característica de cada especie, de ca-

² No se hablará de las 1-1 preniltransferasas, ni de las que prenilan RNA, Triptofano, etc. (Poulter & Rilling, 1978).

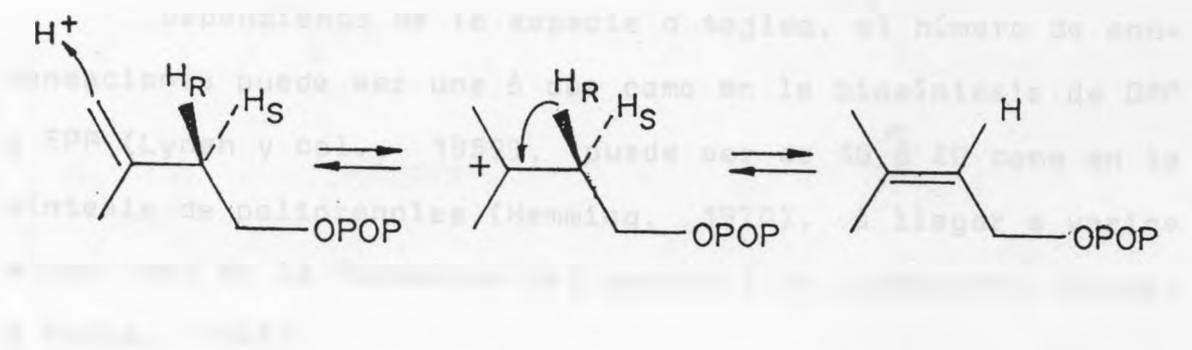


Figura 1.2. Reacción catalizada por la IPP isomerasa

da tejido ó cada órgano, dependerá de la especificidad de las preniltransferasas.

Estas enzimas alargan la cadena isoprénica usando como sustratos el IPP y un pirofosfato alílico de 5, 10, 15 ó más átomos de carbono. La reacción de condensación se inicia con el ataque nucleofílico del metileno del IPP sobre el C_1 , del carbocación alílico, generado por pérdida del grupo pirofosfato de un sustrato como el DMAPP, GPP u otro. (Fig. 1.-3). El producto de la reacción es un nuevo "prenólogo", es decir un pirofosfato alílico que contiene una unidad isoprénica más y un nuevo doble enlace. Hemming (1967) ha usado este término para designar compuestos isoprénicos que difieren sólo en el largo de la cadena.

Dependiendo de la especie o tejido, el número de condensaciones puede ser una ó dos como en la biosíntesis de GPP ó FPP (Lynen y col., 1959), puede ser de 10 ó 20 como en la síntesis de poliprenoles (Hemming, 1970), ó llegar a varios miles como en la formación del caucho ó la gutapercha (Archer & Audley, 1967).

En general las preniltransferasas de origen animal tienen una especificidad bastante restringida. Con excepción de los poliprenoles, moléculas que alcanzan largos de cadena de hasta C_{115} con dobles enlaces tanto de conformación E como

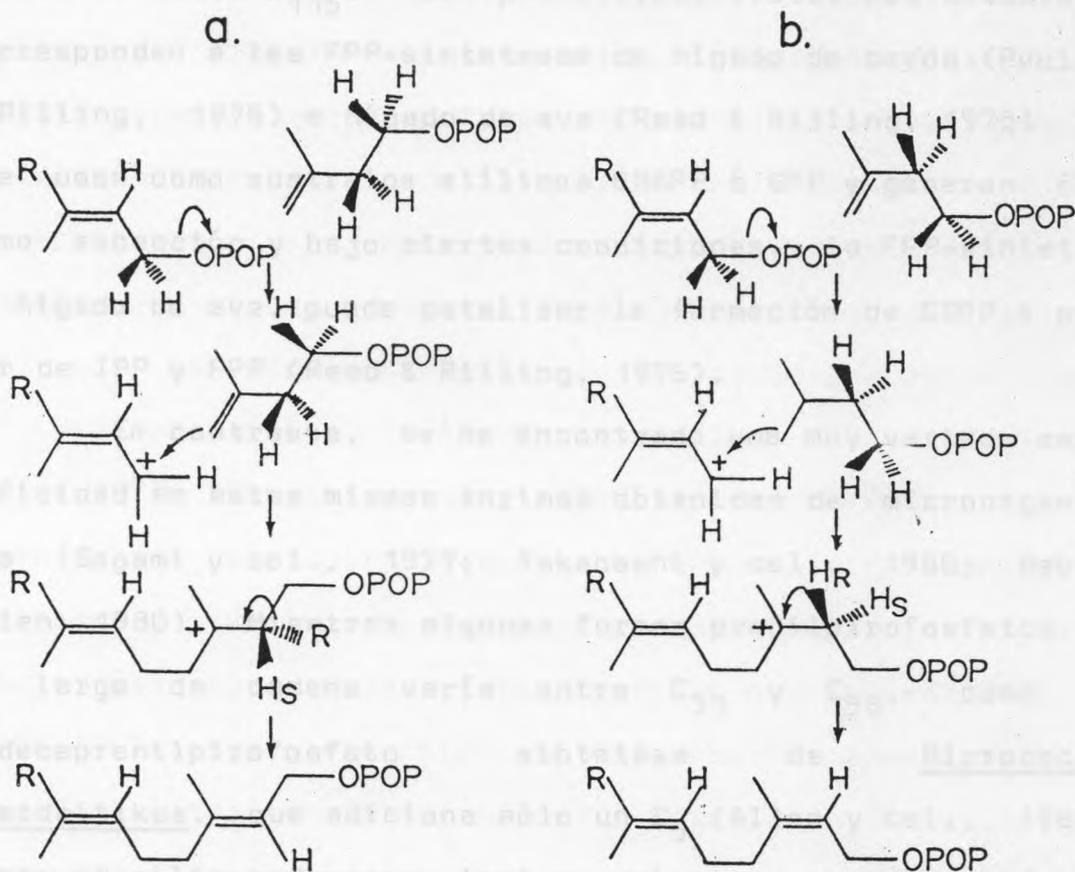


Figura 1.3. Reacción catalizada por la Preniltransferasa.
 a) Formación de compuestos **E**
 b) Formación de compuestos **Z**

Z,³ los prenólogos sintetizados en tejidos animales como intermediarios por condensación 1-4, tienen solamente la conformación E en torno a los dobles enlaces, y largos de cadena de hasta C₁₁₅. Las preniltransferasas más estudiadas corresponden a las FPP-sintetasas de hígado de cerdo (Poulter & Rilling, 1976) e hígado de ave (Reed & Rilling, 1975), las que usan como sustratos alílicos DMAPP ó GPP y generan FPP. Como excepción y bajo ciertas condiciones, la FPP-sintetasa de hígado de ave, puede catalizar la formación de GGPP a partir de IPP y FPP (Reed & Rilling, 1976).

En contraste, se ha encontrado una muy variada especificidad en estas mismas enzimas obtenidas de microorganismos (Sagami y col., 1977; Takahashi y col., 1980; Baba & Allen, 1980). Mientras algunas forman prenilpirofosfatos cuyo largo de cadena varía entre C₃₅ y C₅₅, como la undecaprenilpirofosfato sintetasa de Micrococcus lysodeitikus, que adiciona sólo un C₅ (Allen y col., 1967); otras preniltransferasas, incluso del mismo organismo, forman pirofosfatos alílicos de 10, 15 y 20 átomos de carbono

³ Conformación: Los isómeros Z (cis) y E (trans) se refieren a "diastereoisómeros" (a) que difieren en su "conformación", de acuerdo a las especificaciones de la IUPAC (b).
a) Mislow, K. (1966) "Introduction to Stereochemistry" p. 51, W.A. Benjamin, New York. b) IUPAC (1970) J. Org. Chem. 35, 2849

(Takahashi & Ogura, 1981; Sagami & Ogura, 1981; Sagami y Col., 1978; Kandutsch y col., 1970).

Esta diferencia de especificidad también se traduce en el largo de cadena del sustrato alílico a partir del cual se inicia el proceso de condensación. Esta relativa inespecificidad indica que la porción del sitio activo que acomoda al pirofosfato alílico no tiene requerimientos estructurales muy estrictos. Se ha demostrado experimentalmente que la FPP sintetasa de hígado de ave es capaz de condensar análogos de GPP, que han sido modificados en la región del doble enlace 6,7 (Nishino y col., 1972; Ogura y col., 1970; Nishino y col., 1973; Popják y col., 1969 a). Además la enzima es inhibida por octil-pirofosfato y por una serie de prenilpirofosfatos y prenilmonofosfatos de cadena larga. (Popják y col., 1969 b). Estos datos sugieren que la región de la unión de la cadena alquílica del GPP debería asemejarse a una hendidura lineal en la estructura terciaria de la enzima; por lo tanto, uno de los factores que determina la especificidad por el largo de cadena es la longitud de esta hendidura, respecto a la longitud del sustrato alílico. El hecho que el NPP no sea sustrato indica que en esta hendidura no puede acomodarse un sustrato más voluminoso.

El sitio de unión del IPP a la preniltransferasa tiene requerimientos estructurales mucho más estrictos (Ogura

y col., 1974), ya que la única modificación que se puede introducir es el reemplazo del metilo por un grupo etilo en el IPP (Ogura y col., 1972 a).

En tejidos vegetales existe una especificidad más restringida, en cuanto al largo de cadena de los productos formados por las preniltransferasas, ya que estos alcanzan a compuestos C_{20} . Por otra parte y a diferencia de los tejidos animales, se ha observado la formación de prenilpirofosfatos tanto de conformación E como Z, y se conocen productos con dobles enlaces de conformación Z como el ABA, γ bisaboleno, el NPP (Beytía y col., 1969) y el caucho (Archer & Audley, 1967).

Las preniltransferasas de origen vegetal, además de catalizar la formación tanto de compuestos E como Z, pueden usar como sustratos pirofosfatos alílicos con ambas conformaciones.

La preniltransferasa de Gossypun hirsutum forma los cuatro diastereoisómeros del FPP, y utiliza NPP y GPP como sustratos (Adams & Heinstejn, 1973) (Fig. 1.-4). Los sistemas enzimáticos de Citrus sinensis (de la Fuente y col., 1981) y Citrus paradisi (Pérez y col., 1983) utilizan solamente sustratos de conformación E y generan productos de conformación E y Z como GPP, NPP, Z-FPP y E-FPP. Un sistema enzimático de Pinus radiata genera 2-3 veces más nerol que ge-

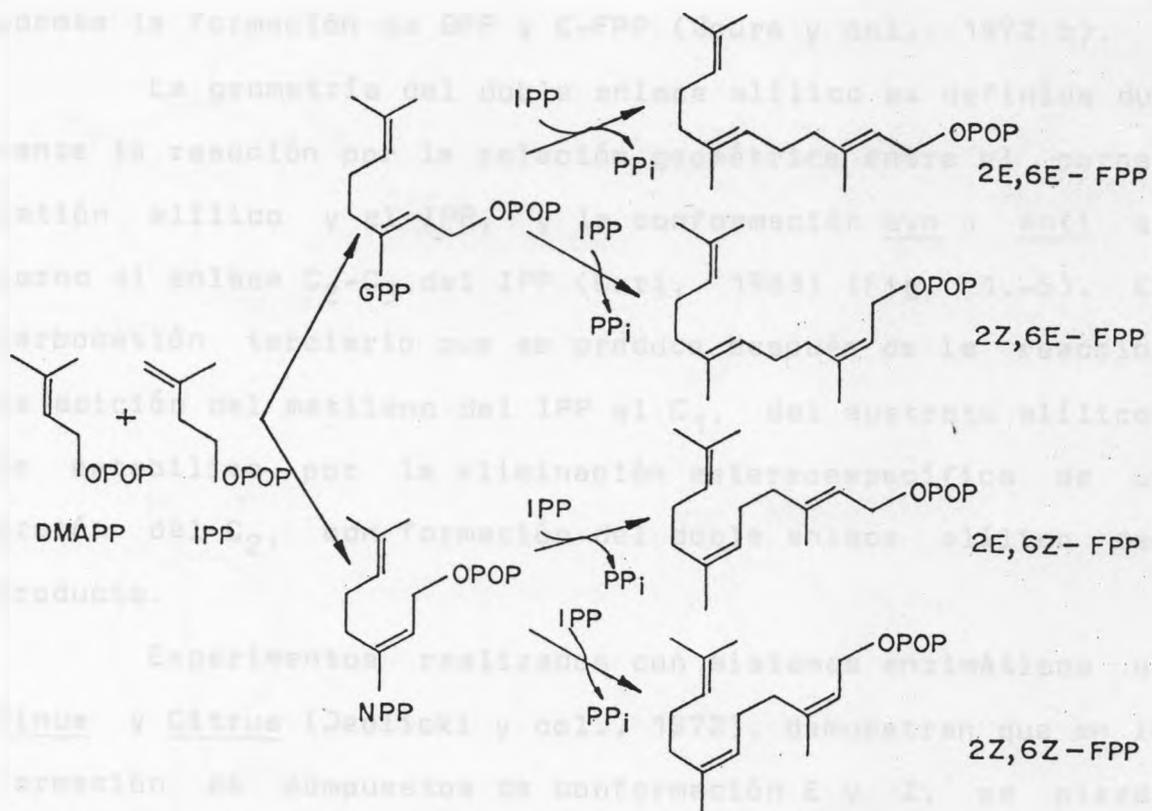


Figura 1.4. Productos formados por la preniltransferasa de Gossipium hirsutum

raniol (Beytía y col., 1969) pero la proporción de 2E-FDH es mayor que la del isómero 2Z (Jacob y col., 1972).

En Ricinus communis (Robinson & West, 1969; Green & West, 1974) y en Cucurbita pepo se han descrito E-FPP y GGPP sintetetasas. La GGPP sintetetasa de Cucurbita pepo cataliza además la formación de GPP y E-FPP (Ogura y col., 1972 b).

La geometría del doble enlace alílico es definida durante la reacción por la relación geométrica entre el carbocatión alílico y el IPP, y la conformación syn o anti en torno al enlace C₂-C₃ del IPP (Cori, 1983) (Fig. 1.-5). El carbocatión terciario que se produce después de la reacción de adición del metileno del IPP al C₁, del sustrato alílico, se estabiliza por la eliminación estereoespecífica de un protón del C₂, con formación del doble enlace alílico del producto.

Experimentos realizados con sistemas enzimáticos de Pinus y Citrus (Jedlicki y col., 1972), demuestran que en la formación de compuestos de conformación E y Z, se pierde siempre el protón 2-pro-R del IPP. Resultados similares han sido obtenidos por Banthorpe en otras especies (Banthorpe y col., 1972; Banthorpe y col., 1985); lo que sugiere que la especificidad por la conformación del producto formado no guarda una relación obligatoria con la estereoquímica del protón del IPP que es eliminado, sino que está determinada

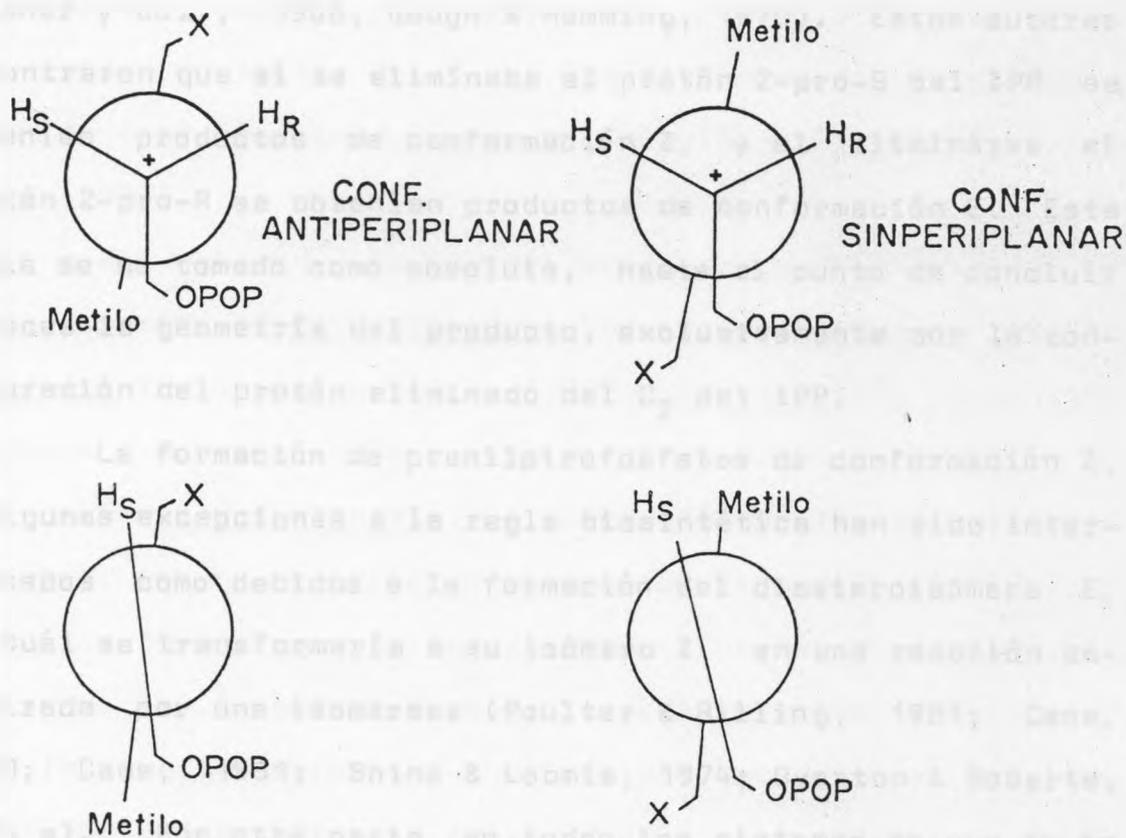


Figura 1.5. Conformación del carbocatión intermediario en la reacción de la Preniltransferasa

por la geometría del sitio activo de la preniltransferasa. Estos hechos han permitido demostrar que la denominada "regla biosintética", que se basó en experimentos sobre la estereoquímica de la biosíntesis del FPP, escualeno, caucho, betulaprenol y dolicol no era un principio de validez general (Archer y col., 1966; Gough & Hemming, 1970). Estos autores encontraron que si se eliminaba el protón 2-pro-S del IPP se obtenían productos de conformación Z, y al eliminarse el protón 2-pro-R se obtenían productos de conformación E. Esta regla se ha tomado como absoluta, hasta el punto de concluir a veces la geometría del producto, exclusivamente por la configuración del protón eliminado del C₂ del IPP.

La formación de prenilpirofosfatos de conformación Z, y algunas excepciones a la regla biosintética han sido interpretados como debidos a la formación del diastereoisómero E, el cuál se transformaría a su isómero Z, en una reacción catalizada por una isomerasa (Poulter & Rilling, 1981; Cane, 1980; Cane, 1981; Shine & Loomis, 1974; Overton & Roberts, 1974 a). Por otra parte, en todos los sistemas en que se ha buscado este tipo de isomerización de pirofosfatos, la evidencia ha sido negativa (Chayet y col., 1977; George-Nascimento & Cori, 1971; Banthorpe y col., 1976; Poulouse & Croteau, 1978; Croteau & Karp, 1979; Cori, 1969; Cori y col., 1980).

Por otra parte, la biosíntesis de alcoholes mono-y sesquiterpénicos de conformación Z, en ausencia de una preniltransferasa específica, podría realizarse a través de mecanismos de isomerización redox de los alcoholes, con participación de aldehídos como intermediarios (Fig. 1.-6). Esta isomerización ha sido descartada solamente en base a la no pérdida de tritio del C₁ de los alcoholes que participarían en este mecanismo, y no en relación a los pirofosfatos (Cane, 1980).

Sin embargo, la isomerización redox de alcoholes ha sido descrita en Rosa damascena (Banthorpe & Poots, 1979), Tanacetum (Banthorpe y col., 1978) y Andrographis paniculata (Overton & Roberts, 1974 a y b; Mackie & Overton, 1977).

En Citrus sinensis, a diferencia de las especies anteriores, se ha descrito un sistema de isomerización (Chayet y col., 1973), que no interconvierte prenoles sino que requiere de las reacciones previas de condensación (catalizadas por la preniltransferasa) e hidrólisis (catalizada por una prenilfosfatasa (Pérez y col., 1980)) para generar el E-FOH que participa en el mecanismo de isomerización (Fig. 1.7). Además de este alcohol, se han identificado ambos aldehídos (E y Z) y el Z-FOH. Un mecanismo semejante podría ocurrir en Pinus radiata donde se ha descrito la formación de Z-FOH, sin haber identificado aldehídos ni el correspondiente Z-FPP

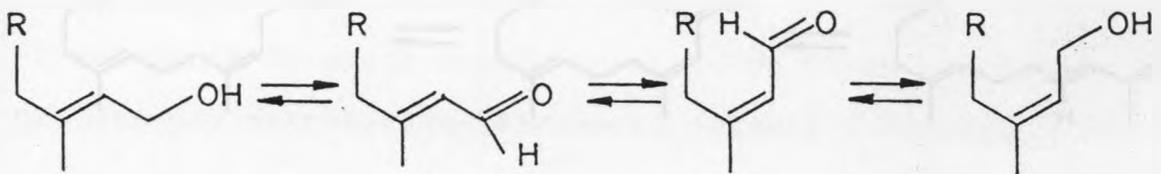


Figura 1.6. Isomerización redox de alcoholes.

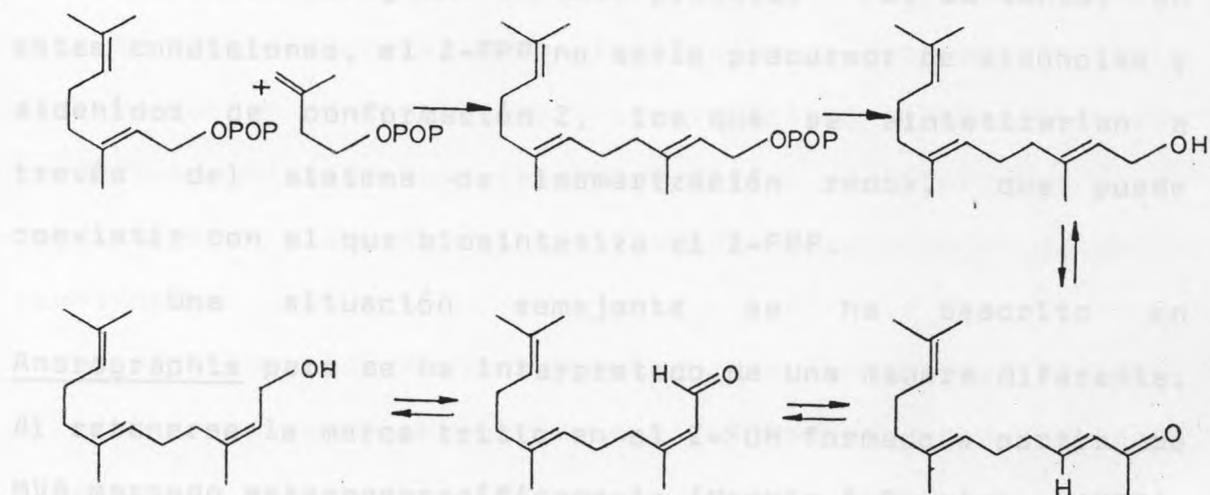


Figura 1.7 Mecanismo de isomerización redox en flavedo de naranja

(Jacob y col., 1972). Además tanto en Pinus como en Citrus no se ha observado isomerización directa de los alcoholes ni de sus correspondientes pirofosfatos. Estos resultados harían pensar que la biosíntesis de Z-FOH puede realizarse en un compartimento diferente del que forma Z-FPP. Este compuesto se forma aún cuando se incubaba el sistema enzimático de Citrus en presencia de anilina, que actúa como atrapador de los aldehídos (de la Fuente y col., 1981) que son intermediarios obligados en este proceso. Por lo tanto, en estas condiciones, el Z-FPP no sería precursor de alcoholes y aldehídos de conformación Z, los que se sintetizarían a través del sistema de isomerización redox, que puede coexistir con el que biosintetiza el Z-FPP.

Una situación semejante se ha descrito en Andrographis pero se ha interpretado de una manera diferente. Al retenerse la marca tritio en el Z-FOH formado a partir de MVA marcado estereoespecíficamente (Mackie & Overton, 1977), se ha descartado la isomerización redox, y se ha atribuido este hecho a una isomerización del E-FPP a su isómero Z y su posterior hidrólisis (Anastasis y col., 1982). Los datos de estos autores pueden, sin embargo, válidamente interpretarse como debidos a una síntesis estereoespecífica de Z-FPP, seguida de su hidrólisis.

La coexistencia de dos vías que formen productos de

conformación Z, a partir de los mismos precursores, puede proporcionar a la célula la alternativa para compartimentalizar intermediarios que van a formar productos finales muy diferentes, como podrían ser el ABA y lípidos presentes en diversas membranas de células vegetales. Se sabe que suspensiones de Cercospora rosicola (Bennett y col., 1984) pueden usar solamente E-FPP ó E-FP como precursores de ABA, cuya conformación en C_2 es Z, y no incorporan Z-FPP en este compuesto. Este hecho es un argumento más que apoya la existencia de vías alternativas de utilización de compuestos semejantes dentro de la célula. La compartimentalización puede producirse ubicando las vías alternativas en diferentes organelos, o bien a través de la existencia de complejos multienzimáticos.

La mayoría de los estudios relacionados con la biosíntesis de mono- y sesquiterpenos en plantas, han sido realizados en sistemas enzimáticos o enzimas obtenidas de extractos libres de células, sin considerar el tipo de tejido ni la forma de obtener homogenizados, ni tomar en cuenta que el proceso de obtención destruye totalmente la ultraestructura celular. Es así como no se ha podido correlacionar estructura de la célula, con distribución subcelular de enzimas y la función que desempeñan en el metabolismo celular. Una excepción la constituye el trabajo realizado en Pinus

pinaster (Gleizes, 1979; Gleizes y col., 1980) y en Citrofortunella mitis (Gleizes y col., 1983). Junto al estudio de ultraestructura de las células que forman las agujas de Pinus se obtuvieron fracciones por centrifugación diferencial, y se encontró que la biosíntesis de hidrocarburos sesquiterpénicos a partir de ^{14}C -MVA, estaba asociada a la fracción microsomal. En Citrofortunella mitis, por otra parte, la biosíntesis de hidrocarburos monoterpénicos se producía en los leucoplastos. Esto coincidía con la presencia de material osmiófilo en dichos organelos, observados por microscopía electrónica. Este material osmiófilo aparece en células que contienen aceites esenciales. Sin embargo, en estos trabajos sólo se ha estudiado la incorporación de un precursor a productos, sin establecer si las enzimas se encuentran asociadas a la misma fracción subcelular.

En otros tejidos, se han realizado exclusivamente estudios de ultraestructura (Amelunxen & Arbeiter, 1967; Bosabalidis & Tsekos, 1982 a y b; Heinrich, 1969; Heinrich, 1970; Heinrich y col., 1980) o bien se han aislado algunas enzimas estableciéndose su localización subcelular, pero sin un estudio de ultraestructura realizado en forma paralela. Es así como se ha encontrado que en plastidios de tomate existe un sistema enzimático que transforma el IPP a cis-fitoeno (Maudinas y col., 1975) y que se incorpora como un

complejo de masa molecular 200.000 Da, convirtiendo IPP, FPP más IPP y GGPP en fitoeno. También en plastidios de tomate se han descrito las actividades de IPP isomerasa y preniltransferasa (Spurgeon y col., 1984), mientras que en cromoplastos de Capsicum annus (Camara y col., 1982; Camara y col., 1983) y de Narcissus pseudonarcissus (Beyer y col., 1980) se ha descrito la biosíntesis de β -caroteno a partir de ^{14}C -IPP.

Por otra parte, en plantas superiores se han descrito dos isoenzimas de la quinasa mevalónica (una de las enzimas que participa en la transformación de MVA a IPP), una de las cuales se localiza en cloroplastos y la otra en una fracción soluble, después de fraccionamiento subcelular (Rogers y col., 1966 a y b).

Todos estos antecedentes sugieren que pueden coexistir vías alternativas de formación y utilización de isoprenoides. Aún cuando algunas de ellas se encuentran asociadas a un organelo específico, también se podría pensar en una asociación de enzimas dentro de un mismo compartimento subcelular, como una manera de aislar una secuencia de reacciones que utilice precursores comunes con otra secuencia de ellas.

Se ha descrito una asociación entre la IPP isomerasa y la preniltransferasa de Gossypium hirsutum (Widmaier y col., 1980), y se puede pensar que una asociación semejante pudiera

existir entre las enzimas que catalizan la formación de Z-FOH a partir de GPP más IPP en Citrus sinensis (Chayet y col., 1973). Dichas enzimas serían la preniltransferasa, una fosfatasa específica que hidrolizara sólo E-FPP, una deshidrogenasa y una reductasa (Fig. 1.7). La isomerización de E-Farnesal a Z-Farnesal puede corresponder a una reacción no enzimática, ya que la conjugación entre el doble enlace carbonílico y el doble enlace alílico favorecen esta isomerización y no se requeriría la presencia de una enzima en dicho proceso (Cori, 1983).

De las enzimas mencionadas, solamente la preniltransferasa (de la Fuente y col., 1981) y las fosfatasas (Pérez y col., 1980) de Citrus sinensis han sido caracterizadas. En vesículas de pulpa de naranja se ha descrito la oxidación de GOH (Potty & Bruemmer, 1970), en Foeniculum vulgare y Tanacetum vulgare se han descrito monoterpenol deshidrogenasas (Croteau & Felton, 1980); en Pelargonium graveolens una monoterpenol oxidasa, una monoterpenol deshidrogenasa y una monoterpenol reductasa (Banthorpe y col., 1983), y en Vitis vinifera se ha estudiado la interconversión de aldehidos y alcoholes monoterpénicos (Ambid y col., 1983). Hasta el momento no se han descrito deshidrogenasas ni reductasas específicas de sesquiterpenoides.

La presente tesis pretende complementar el estudio de

la ultraestructura de las células del flavedo de Citrus sinensis, con una metódica de fraccionamiento subcelular para este tipo de tejido y la distribución subcelular de diferentes enzimas de la biosíntesis de isoprenoides. El objetivo principal es el poder correlacionar los tres puntos mencionados anteriormente, y establecer además las evidencias que apoyen o descarten la existencia de vías independientes ó la participación de un complejo multienzimático, en la biosíntesis de sesquiterpenoles de conformación Z.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1.- Reactivos químicos, enzimas, coenzimas y proteínas.

2.1.1. Reactivos químicos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se obtuvieron de las firmas comerciales mencionadas en cada caso.

- Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wis., U.S.A. Ciclohexilamina, Isopentenol, E-Farnesol, Tricloroacetoni-
trilo, Trietilamina.
- Amersham/Searle Co., Illinois, U.S.A. $[1 - {}^{14}\text{C}]$ IPP de ra-
diactividad específica 57 Ci/mol.
- Dragoco, Holzminden: Nerol, geraniol, E-farnesol, Z-farne-
sol, linalol, terpineol, nerolidol.
- Merck A.G., Darmstadt, Alemania: Acetonitrilo, Acetona,
Amoníaco, Bicarbonato de amonio, Cloruro estanoso, Ca Cl_2 ,
Eter de Petróleo ($40^\circ - 60^\circ$), Eter etílico, Fe Cl_3 , Gluta-
raldehído, HCl , I_2 , KCl , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Li Cl , Mg Cl_2 , Mo-
libdato de amonio, n-Propanol, sacarosa, sílica gel G, sí-
lica gel H, sulfato de amonio, sulfato de tionilo, tritón
X-100, ácido sulfosalicílico.
- New England Nuclear, Boston, Mass., U.S.A. (RS) $[2 - {}^{14}\text{C}]$
MVA de radiactividad específica 27,3 Ci/mol.
- Poliscience Ins.: PTA, OsO_4 , Epon 812, Citrato de Plomo,
Acetato de uranilo.

- Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A. Acido succínico, ATP, antimicina A, DEAE-Sephadex A-25, EDTA, 2-mercaptoetanol, POPOP, PPO, Sephadex G-25, Sepharose-2B, TES, Tris, MES, Glicina, SDS, Anfolitos (Rango 3.5 - 10) PVP.
- Varian aerograph, Walnut Creek, California, U.S.A. Etilénglicol adipato. Chromosorb W.

2.1.2. Enzimas, coenzimas y proteínas.

- Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A. Apoferritina catalasa, Citocromo c, Fosfatasa alcalina E coli, Fosfatasa alcalina de intestino de ternera, Gliceraldehído-3-P Deshidrogenasa, Hexoquinasa, NAD^+ , $NADP^+$, NADH, NADPH.

2.2.- Sustratos

Los sustratos fosforilados IPP, DMAPP, GPP, fueron sintetizados en nuestro laboratorio. (Fig. 2.2.1.)

2.2.1.- Síntesis

Los sustratos se sintetizaron por pirofosforilación de los correspondientes alcoholes con fosfato de bis-trietilamonio en presencia de CCl_3CN , de acuerdo al método descrito por Cramer y Böhm modificado (Cramer & Böhm, 1959; Holloway & Popjak, 1967; Popjak y Col., 1962; Popjak y col., 1971). Todos los reactivos usados en la síntesis fueron previamente destilados a presión normal. Los reactivos oxigenados fueron además calentados a reflujo con $SnCl_2$ durante 1 h (Smith & Khorana, 1963).

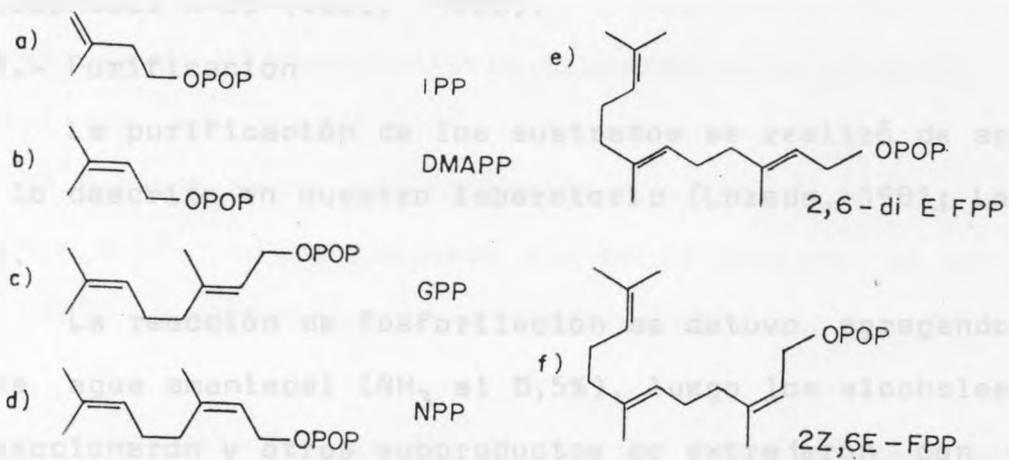


Figura 2.2.1. Estructura de los sustratos fosforilados de enzimas de la vía isoprenica

Los alcoholes utilizados fueron purificados por destilación fraccionada en una columna anular de banda rotatoria y posteriormente analizados por cromatografía gaseosa (Holuique, 1980) y por espectroscopía infrarroja y de resonancia magnética nuclear. Los productos de la reacción de fosforilación fueron separados por cristalización fraccionada (Fernández, 1978) y por cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sephadex A-25 (Vial, 1980).

2.2.2.- Purificación

La purificación de los sustratos se realizó de acuerdo a lo descrito en nuestro laboratorio (Lozada, 1981; Loyola 1980).

La reacción de fosforilación se detuvo agregando 50 ml de agua amoniacal (NH_3 al 0,5%), luego los alcoholes que no reaccionaron y otros subproductos se extrajeron con tres porciones de 80 ml c/u de éter etílico. La fase eterea se lavó con 20 ml de agua amoniacal. La fracción acuosa total (70 ml) se concentró en evaporador rotatorio a 40° hasta un volumen de 20 ml manteniendo el pH básico con NH_4QH . Se intentó una primera separación de los monofosfatos y pirofosfatos (XP y XPP) (Cramer & Böhm, 1953). Para ello se adicionaron 5 ml de LiCl 10 M y se dejó reposar durante 24 h a 4° . El precipitado obtenido se separó por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 10 min, luego se lavó con tres porciones de 8.

ml c/u de acetona a -20° centrifugando a -7° después de cada lavado. Finalmente se lavó de la misma manera con tres porciones de 8 ml c/u de éter etílico a -20° y se evaporó el éter a temperatura ambiente. El precipitado se redisolvió en NH_4HCO_3 50 mM pH 7,0 y se le adicionaron 2 ml de ciclohexilamina seguidos de 30 ml. de acetona y se dejó reposar 24 h a 4° . El precipitado que debía contener al monofosfato se separó por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 15 min, y se le lavó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Este precipitado se guardó a 4° . Al sobrenadante se le agregó LiCl 10 M hasta tener precipitación completa y se dejó reposar 24 h a 4° . El precipitado que debía contener el pirofosfato (XPP) se separó por el proceso ya descrito y se guardó a 4° .

Los análisis por TLC de los dos precipitados, mostraron que la separación del monofosfato (XP) del pirofosfato (XPP) no fué completa, pues ambos contenían compuestos mono y pirofosforilados.

Para lograr una mejor separación se disolvieron en agua amoniacal hasta obtener una conductividad de 1,2 mMHO. La muestra fué aplicada en una columna de vidrio de 2,2X67 cm rellena con DEAE-Sephadex A-25 previamente equilibrada con amortiguador de trietilamina-bicarbonato 50 mM pH 7,5 (Smith & Khorana, 1963; Vial, 1980). Una vez absorbida la muestra

se lavó la columna con 5 Vc del mismo amortiguador. Finalmente se eluyó con 5 Vc y con una gradiente lineal entre 50 mM y 610 mM de trietilamina bicarbonato pH 7,5.

2.2.3. Análisis de las fracciones de sustratos.

En la Fig. 2.2.-2 se presenta el perfil de elución de los sustratos, con trietilamina bicarbonato. El eluido de la columna se analizó midiendo la cantidad aparente de fósforo inorgánico ("P directo")¹ (Fiske & Subbarow, 1925) la cantidad de fósforo liberado por previa hidrólisis ácida en HCl 2N durante 7 min. a 100^o ("P de 7 min") (Umbreit y col., 1959).

Las fracciones que dieron reacción positiva para "P de 7 min." se analizaron además por TLC (Sección 2.3.1.1.1.) y se les determinó la cantidad de fósforo total ("P total") (Ames, 1966). La fracción obtenida entre 3,6 y 4,3 Vc reveló una sola mancha para materia orgánica y para fósforo.

VOLUMENES DE ELUCIÓN

¹ Los esteres fosfóricos de alcoholes alílicos o terciarios son bastante ácido-lábiles. En consecuencia, con el reactivo de Fiske y Subbarow (Fiske & Subbarow, 1925) que contiene H₂SO₄ 1N, se rompe el enlace C-O y se libera un alcohol terciario y orto o pirofosfato inorgánico. Por esto los fosfomonoesteres dan, como la N-fosforilcreatina (Cardemil y col., 1974) o el acetilfosfato una reacción positiva de ortofosfato inorgánico, que llamamos "Fósforo directo". No es posible diferenciar, con esta técnica, el ester fosfórico del ortofosfato.

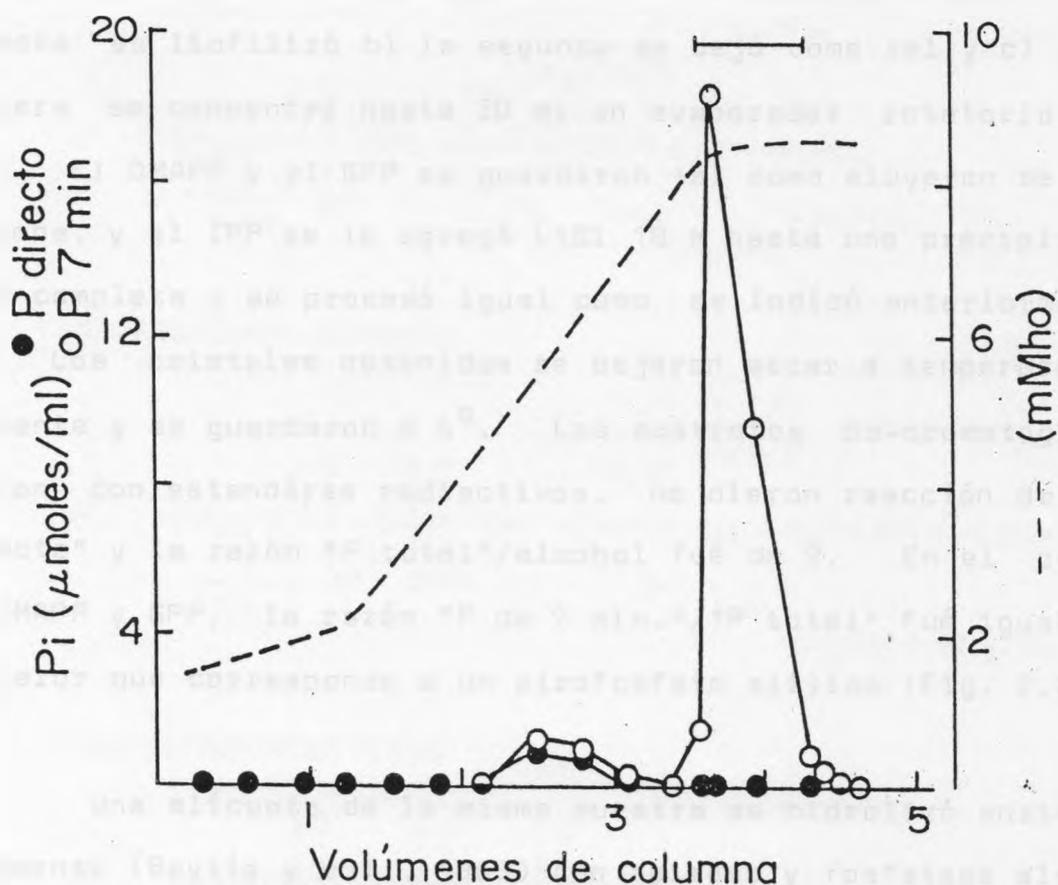
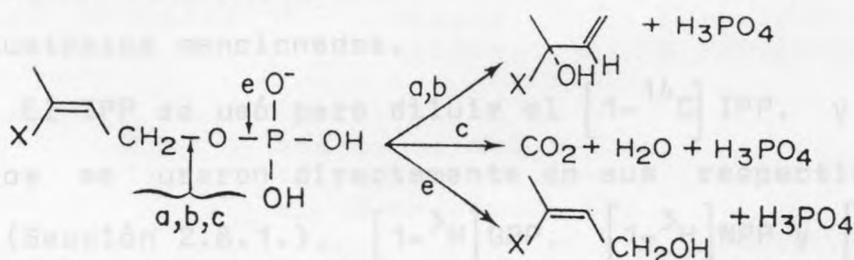


Figura 2.2.2. Perfil de elución de los sustratos de una columna de DEAE-Sephadex A-25. La columna se equilibró con amortiguador de trietilamina-bicarbonato 50 mM pH 7,5. La muestra se eluyó con un gradiente lineal del mismo amortiguador entre 50 mM y 610 mM. Volumen de la columna (V_c) = 200 ml. Las fracciones se analizaron para "P directo" (●—●) y "P de 7 minutos" (○—○). (— — —) representa la conductividad medida en mMho. Los sustratos fueron eluidos entre 3,6 y 4,3 V_c , indicado por la barra.

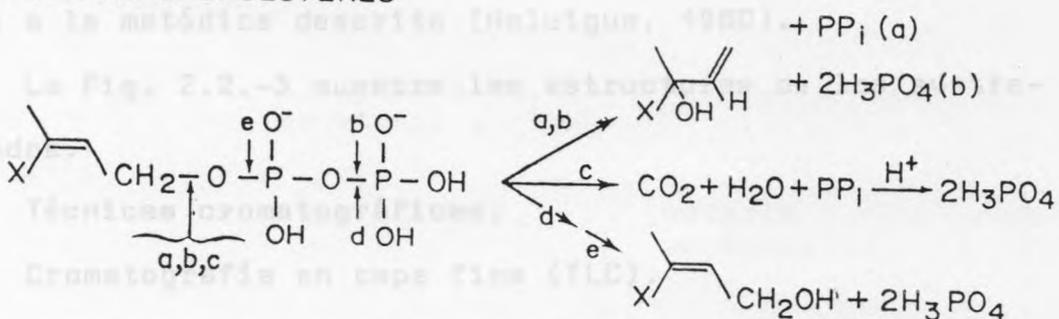
Estas se guardaron en diferentes condiciones, con la finalidad de estudiar la estabilidad del pirofosfato: a) la primera se liofilizó b) la segunda se dejó como tal y c) la tercera se concentró hasta 20 ml en evaporador rotatorio a 40^o. El DMAPP y el GPP se guardaron tal como eluyeron de la columna, y al IPP se le agregó LiCl 10 M hasta una precipitación completa y se procesó igual como se indicó anteriormente. Los cristales obtenidos se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron a 4^o. Los sustratos co-cromatografiaron con estándares radiactivos, no dieron reacción de "P directo" y la razón "P total"/alcohol fué de 2. En el caso de DMAPP y GPP, la razón "P de 7 min."/"P total" fué igual a 1, valor que corresponde a un pirofosfato alílico (Fig. 2.2.-3).

Una alícuota de la misma muestra se hidrolizó enzimáticamente (Beytía y col., 1969) con apirasa y fosfatasa alcalina de E coli. El alcohol producido se extrajo con hexano y se identificó por GLC (Sección 2.3.2.), este análisis reveló únicamente la presencia de los alcoholes primarios correspondientes a los sustratos, por lo tanto, la muestra analizada no contenía contaminación de otro alcohol fosforilado. Además el fósforo presente en la fase acuosa se cuantificó para determinar la razón "P directo"/ prenol dando un valor de 2, por lo cual se dedujo que por cada dos moles de fósforo se

FOSFOMONOESTERES



PIROFOSFOMONOESTERES



TRIFOSFOMONOESTERES

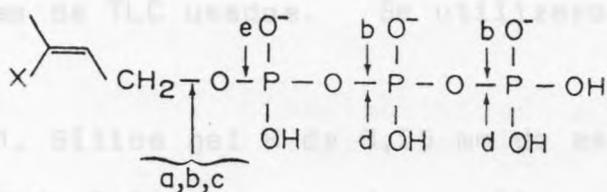


Figura 2.2.3. Esquema de los métodos analíticos usados para identificar distintos ésteres fosfóricos de prenoles.

- a) Reactivo de Fiske-Subbarow ("P directo").
- b) HCl 2N a 100 ° por 7 minutos ("P de 7 min").
- c) Combustión húmeda ("P total").
- d) Apirasa.
- e) Fosfatasa alcalina.

produjo un mol del alcohol correspondiente. Todos los resultados indicaron que los compuestos sintetizados correspondían a los sustratos mencionados.

El IPP se usó para diluir el $[1-^{14}\text{C}]$ IPP, y los otros sustratos se usaron directamente en sus respectivas reacciones (Sección 2.8.1.). $[1-^3\text{H}]$ GPP, $[1-^3\text{H}]$ NPP y $[1-^3\text{H}]$ FPP habían sido sintetizados anteriormente en el laboratorio de acuerdo a la metódica descrita (Holuigue, 1980).

La Fig. 2.2.-3 muestra las estructuras de los sustratos usados.

2.3. Técnicas cromatográficas.

2.3.1. Cromatografía en capa fina (TLC).

Como criterio analítico y de pureza se usó la cromatografía en capa fina. La Tabla 2.3.-I resume los diferentes sistemas de TLC usados. Se utilizaron los siguientes sistemas:

2.3.1.1. Sílica gel H de 0,25 mm de espesor.

2.3.1.1.1. Solvente de desarrollo n-propanol: amoníaco: agua=6:3:1.

Este sistema se usó para la identificación de compuestos fosforilados. Las placas se revelaron con vapores de yodo para visualizar materia orgánica y con pulverizado de FeCl_3 al 1% en etanol al 80% más ácido sulfosalicílico al 1% en etanol al 60% (Poulter & Satterwhite, 1977) para reconocer

Solventes	Proporc.	Método detecc.	Comp.identif. o separados	Otras Obs.
n-propanol	6	Fe Cl ₃ al 1% en etanol al 80% Ac. sulfosalicílico al 1% en etanol 60%	Pi	
NH ₃	3			
H ₂ O	1			
		Vapores I ₂	materia orgánica	
CHCl ₃	Puro	2,4-DNPH al 0.1% en etanol y 2NHCl	CO	
		Vapores de I ₂	materia orgánica	
Benceno	7.5			
Eter de petróleo (p.e.40-60)	2.5		hidrazonas	
Metanol	7	Radiactividad	Alcoholes de	Placa
H ₂ O	3	Vapores de I ₂	distinto lar- go de cadena	rev.
			materia orgánica	
Hexano	8	Radiactividad	Alcoholes E	Placa
Acetato de etilo	2	Vapores de I ₂	y Z materia org.	con EGAd. 2%

Tabla 2.3.-I Cuadro resumen de los diferentes compuestos separados e identificados por cromatografía en capa fina.

el fósforo. La radiactividad se localizó raspando la sílica cada 0,5 cm y recogiéndola en frascos que contenían 3 ml de una solución fluorescente y se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos (Sección 2.9).

2.3.1.1.2. Solvente de desarrollo Cloroformo.

Este sistema se usó para separar alcoholes de aldehidos. Las placas se revelaron primero con 2,4- dinitrofenilhidrazina al 0,1% en etanol y 2N HCl, para reconocer grupos carbonilos (Stahl & Jork, 1965), y luego con vapores de yodo para visualizar materia orgánica.

2.3.1.1.3. Solvente de desarrollo Benceno: Eter de petróleo (p.e. 40-60) = 7,5: 2,5 (Stahl & Jork, 1965).

Este sistema se usó para separar hidrazonas de distinto largo de cadena, formadas a partir de los correspondientes aldehidos alílicos (sección 2.10.1.).

2.3.1.2. Placa reversa : Sílica gel G de 0,5 mm de espesor.

El sistema se usó para separar e identificar prenoles de 5, 10 y 15 átomos de carbono, utilizando como solvente de desarrollo metanol : agua = 7 : 3 con dos gotas de vaselina (Stahl & Jork, 1965). La masa orgánica y la radiactividad se localizaron en forma semejante a la descrita en la sección

2.3.1.1.1.

2.3-1.3. Sílica gel G de 0,25 mm de espesor.

Este sistema se usó para separar e identificar prenil alcoholes de conformación E y Z de 10 y 15 átomos de carbono. El método sólo distingue conformación y no largo de cadena. Las placas se prepararon y se sumergieron durante 1 minuto en una solución de EGA al 2% en acetona. El solvente de desarrollo fué éter de petróleo (p.e. 40-60) : acetato de etilo = 8 : 2. La masa orgánica y la radiactividad se localizaron en la forma descrita en la sección 2.3.1.1.1.

2.3.2. Cromatografía en fase gaseosa (GLC).

Los análisis de cromatografía en fase gaseosa se llevaron a cabo en un cromatógrafo Varian 1800. con detector de conductividad térmica e inscriptor de doble registro Varian A-25. Para el análisis de muestras radiactivas el instrumento se acopló a un contador Geiger para fase gaseosa Nuclear Chicago 4998. Los productos analizados se identificaron por co-cromatografía con muestras estándares y en caso de muestras radiactivas por co-cromatografía de la radiactividad con la masa de los respectivos estándares.

Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Cromatógrafo de gases

Material de la columna	Acero inoxidable
Largo de la columna	3 m
Diámetro de la columna	6,25 mm

Soporte inerte	Chromosorb G-AW DMCS
Malla del soporte	60/70
Fase líquida	EGA 0,83% (p/p)
Flujo de helio	40 ml/min
Corriente del detector	150 mA
Temperatura del horno (variable)	100 - 170 grados
Temperatura del inyector	180 grados
Temperatura del detector	180 grados
<u>Contador Geiger</u>	
Flujo de butano	40 ml/min
Temperatura del detector de radiactividad	180 grados
Voltaje en el contador Geiger	2700 Volts

2.3.3. Cromatografía en columna de las proteínas del flavedo de naranja.

2.3.3.1. Filtración disociativa.

Una columna de vidrio (1,5 x 21 cm) se relleno con Sephadex G - 25 (malla 40/120). La matriz se preparó según las instrucciones del fabricante (Pharmacia, 1980) y se equilibró con 5 Vc de solución que contenía: amortiguador de K-Pi 100 mM pH 7,4 ; 2-mercaptoetanol 100 mM y EDTA 2 mM.

A la fracción de proteínas que se iba a filtrar se le agregó sulfato de amonio hasta 70% de saturación, agitando continua y homogeneamente en un baño a 0° durante 15 min

y controlando que el pH no bajara de 7, con NH_4OH . Una vez agregado todo el sulfato de amonio, el sistema se dejó estabilizar con agitación durante 30 min, y luego se centrifugó durante 20 min a $10.000 \times g$.

La pella que precipitó entre 0 y 70% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se disolvió en 5 ml de la solución de equilibrio y se aplicó a la columna en forma continua y homogénea. Cuando la muestra penetró totalmente en el gel, se agregaron 5 ml de la solución de equilibrio para asegurar su completa penetración. Las proteínas se eluyeron con una solución igual a la de equilibrio pero saturada al 70% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El eluido se analizó determinando las proteínas por su absorbilidad a 280 nm y los colorantes a 310 nm. En esta zona se obtiene la mayor diferencia de absorbancia entre proteínas y flavonoides.

Se ensayó la actividad enzimática de las diferentes fracciones. Se juntaron las fracciones que contenían la actividad, se guardaron a 4° y se usaron como fuente de enzima ó proteínas (membranas).

2.3.3.2. Filtración en Sepharose 2-B.

Una columna de vidrio (1,8 x 12 cm) se rellenoó con Sepharose 2-B, se lavó con 30 Vc del amortiguador de equilibrio para eliminar la azida de sodio usada como preservativo, y para equilibrarla en las condiciones de trabajo:

amortiguador K-Pi 100 mM pH 7,4 ; 2-mercaptoetanol 5 mM.

Se aplicó a la columna un volumen de muestra correspondiente a 0.1 Vc, y se eluyó con el amortiguador de equilibrio. El eluido se analizó determinando las proteínas por su absorbilidad a 280 nm y los colorantes a 310 nm. Se ensayó la actividad enzimática de las diferentes fracciones. Se juntaron las fracciones que contenían la actividad, se guardaron a 4^o y se usaron como fuente de enzima.

2.4.- Preparación del sistema enzimático.

2.4.1. Preparación de homogeneizados.

Los homogeneizados se prepararon utilizando el flavedo (exocarpio) de naranjas de variedad chilena (George-Nascimento & Cori, 1971), obtenido de las siguientes formas:

- a) Obtención de trozos de flavedo de 0,5 mm de espesor, y 0,5 x 0,5 cm., con hoja de afeitar.
- b) Obtención de flavedo por rallado superficial de la naranja.

En todos los casos, el flavedo se recibió sobre un amortiguador que tenía la siguiente composición:

- a' K-Pi 100 mM pH 7,4; sacarosa 0,3 M y PVP 5% (P/V)
- b' K-Pi 100 mM pH 7,4; sacarosa 0,3 M; MgCl₂ 5 mM y PVP 5% (P/V).
- c' K-Pi 100 mM pH 7,4; EDTA 20 mM (preparado en agua de coco)²

- d' TRIS-HCl 100 mM pH 7,4; sacarosa 0,3 M y PVP 5% (P/V)
- e' TRIS-HCl 100 mM pH 7,4; sacarosa 0,3 M, MgCl₂ 5 mM y PVP 5% (P/V)
- f' TRIS-HCl 100 mM pH 7,4; EDTA 20 mM (preparado en agua de coco)

Los homogeneizados se realizaron usando todas las combinaciones entre la obtención del flavedo y tipo de amortiguador usado, de las siguientes formas:

- a" Flavedo obtenido según el método a y homogeneizado por corte manual con hoja de afeitar.
- b" Flavedo obtenido según el método a y homogeneizado en una Waring Blendor a velocidad máxima durante 30 seg.
- c" Flavedo obtenido según el método a y homogeneizado en Politron a velocidad máxima durante 20 seg.
- d" Flavedo obtenido según el método b y homogeneizado con agitación manual durante 2 minutos.

Todos los homogeneizados se filtraron por 8 capas de gasa para eliminar restos de tejido y se fraccionaron tal como se indica en la sección 2.4.2.

2 El agua de coco usada corresponde a una fracción obtenida después de centrifugar a 100.000 x g durante 1 hora, el líquido contenido en un coco Palma nucifera. La concentración de proteínas es de 1 mg/ml, y su tonicidad es equivalente a 0,3 M sacarosa. El agua de coco se usa corrientemente en la preparación de homogeneizados de tejidos vegetales (Price, 1983).

2.4.2. Fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial.

Los homogeneizados obtenidos (Sección 2.4.1) se fraccionaron por centrifugación diferencial de acuerdo al esquema de la Fig. 2.4.-1.

Los lípidos sobrenadantes de cada centrifugación se eliminaron por filtración a través de tela de nylon. Las peyllas obtenidas de cada centrifugación se disolvieron en el mismo amortiguador usado para preparar el homogeneizado.

A cada fracción se le determinó concentración de proteínas (sección 2.5.), concentración de almidón (sección 2.6.), diferentes actividades enzimáticas (enzimas marcadoras : sección 2.8.2. y enzimas de la biosíntesis de isoprenoides : sección 2.8.1.). Además, cada fracción se analizó por microscopía electrónica (sección 2.14.) , por electroforesis en SDS (sección 2.11.) y por electroenfoque (sección 2.12.).

2.4.2.1. Expresión de resultados del fraccionamiento subcelular.

Los resultados del fraccionamiento subcelular se expresaron como actividad específica relativa en función del % de proteínas en las respectivas fracciones obtenidas por centrifugación diferencial (De Duve y col., 1955).

La actividad específica relativa de cada fracción se

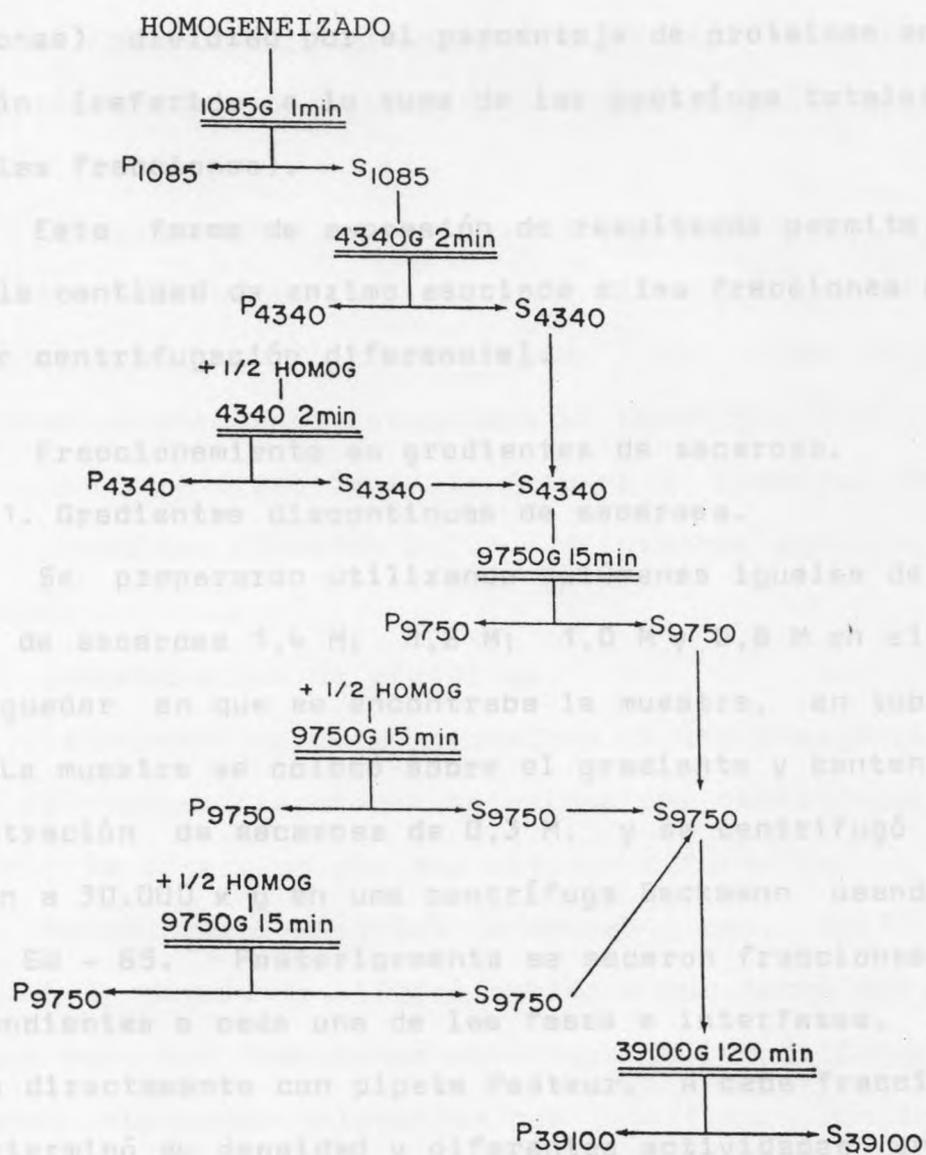


Figura 2.4.1. Esquema del fraccionamiento subcelular de homogeneizados de flavedo de naranja.

calculó como el % de las unidades totales de la enzima medida en la fracción (referida de las unidades totales en todas las fracciones) dividido por el porcentaje de proteínas en la fracción (referido a la suma de las proteínas totales de todas las fracciones).

Esta forma de expresión de resultados permite visualizar la cantidad de enzima asociada a las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial.

2.4.3. Fraccionamiento en gradientes de sacarosa.

2.4.3.1. Gradientes discontinuas de sacarosa.

Se prepararon utilizando volúmenes iguales de soluciones de sacarosa 1,4 M; 1,2 M; 1,0 M y 0,8 M en el mismo amortiguador en que se encontraba la muestra, en tubos de 5 ml. La muestra se colocó sobre el gradiente y contenía una concentración de sacarosa de 0,3 M, y se centrifugó durante 30 min a $30.000 \times g$ en una centrífuga Beckmann usando el rotor SW - 65. Posteriormente se sacaron fracciones correspondientes a cada una de las fases e interfases, pipeteando directamente con pipeta Pasteur. A cada fracción se le determinó su densidad y diferentes actividades enzimáticas (secciones 2.7. y 2.8.).

2.4.3.2. Gradientes continuas de sacarosa.

Se prepararon utilizando sacarosa 1,4 M como solución

pesada y sacarosa 0,3 M como solución liviana, preparadas en el mismo amortiguador en que estaba la muestra. Esta se incorporó al gradiente como solución liviana, o bien, en ambas soluciones de modo que se distribuyera a lo largo del tubo.

Los gradientes preparados en tubos de 5 ml, se centrifugaron durante 3 y 6 horas a 30.000 x g, en una centrifuga Beckmann usando el rotor SW - 65. Las diferentes fracciones se obtuvieron pinchando el fondo del tubo y colectando. A cada fracción se le determinó densidad (Sección 2.7.), proteínas (Sección 2.5.) y diferentes actividades enzimáticas.

2.5. Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas en los homogeneizados y en las diferentes fracciones obtenidas por centrifugación diferencial se determinó por dos métodos diferentes:

2.5.1. Método turbidimétrico (Stadtman y col., 1951)

Este método se utilizó debido a que tanto los homogeneizados como las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial contienen colorantes que interfieren con los métodos basados en la absorción de luz al UV, así como en la mayoría de las distintas reacciones de proteínas que se utilizan corrientemente para la determinación de su concentración.

En este método 2,5 ml de TCA al 6% (P/V) se agregaron

sobre 2,5 ml de una solución que contenía la muestra y la turbidez se comparó con un blanco de agua en un colorímetro Klett usando un filtro verde. El método es lineal hasta una cantidad de 3 mg finales de proteínas y detecta hasta 0,1 mg de proteína por muestra.

2.5.2. Azul de Coomassie (Bradford, 1976).

Este método se basa en la unión del colorante azul de Coomassie a las proteínas, y está especialmente diseñado para soluciones proteicas en las que existen contaminantes como flavonoides y colorantes en general. La cuantificación de proteínas por este método elimina, además, la mayoría de los problemas que presentan otros métodos para determinar concentración de proteínas. El método se basa en la diferencia de color (rojo y azul) del azul de Coomassie G-250. La forma roja del colorante se transforma en azul al unirse a la proteína; y el complejo colorante-proteína tiene un coeficiente de extinción muy alto, lo que proporciona una gran sensibilidad al método. La unión del colorante a la proteína es muy rápida (2 minutos), y el complejo colorante-proteína permanece disperso en solución por aproximadamente una hora.

En este método 100 μ l de una solución que contiene la muestra se agregan sobre 3 ml de reactivo (azul de Coomassie G-250 0,01% (P/V), etanol 4,7% (P/V) y ácido fosfórico 8,5% (P/V)), y se mide la absorbancia comparando con un blanco de

agua destilada en espectrofotómetro a 595 nm. El método es lineal hasta 125 μg de proteínas y detecta hasta 10 μg de proteínas por muestra.

2.6. Determinación de almidón.

Se determinó por el método del yodo-yoduro (Plummer y col., 1981) midiendo la absorbancia a 650 nm.

2.7. Determinación de densidad de las fracciones obtenidas de las gradientes de sacarosa.

Se obtuvieron comparando con una curva estándar que mide la posición de las gotas de KBr de diferente concentración (densidad) dentro de una gradiente orgánica (Leighton y col., 1977).

2.8. Ensayo de las diferentes actividades enzimáticas

2.8.1. Enzimas de la biosíntesis de isoprenoides

2.8.1.1. Incorporación de ^{14}C -MVA en trozos de flavedo de naranja.

50 g de trozos de flavedo obtenidos según la forma a) (Sección 2.4.1.) se suspendieron en 110 ml del amortiguador b' (sin PVP) que contenía ^{14}C -MVA 3,7 μM (rad. específica 6×10^7 dpm/ μmol), y se mantuvieron durante 48 horas a 25°. Posteriormente se procedió a filtrar el material y se lavó con 8 litros del amortiguador de incubación (sin el precursor radiactivo), con el fin de eliminar toda la radiactividad correspondiente a absorción inespecífica. Luego se obtuvo un

homogeneizado de acuerdo al método b' , el cuál se fraccionó mediante centrifugación diferencial (Sección 2.4.2.). Cada fracción se analizó de acuerdo a radiactividad presente en la fracción, en lípidos libres (LL), alílicos (AA) y prenol fosfatos (PP) como se explica más abajo.

La incorporación de ^{14}C -MVA se expresó como fracción incorporada de ^{14}C , referido siempre al isómero R en experimentos realizados en equilibrio. (El ^{14}C -MVA comercial es una mezcla racémica (RS), y las quinazas utilizan sólo el isómero R).

Los productos de la reacción se determinaron de acuerdo al siguiente procedimiento (George-Nascimento & Cori, 1971; Beytía y col., 1969):

- a) Extracción directa con 1,5 ml de hexano: la fracción extraída en la fase hexánica se denominó LL y contiene hidrocarburos y alcoholes.
- b) Hidrólisis ácida durante 7 minutos a 37° en HCl 2 N y sucesiva extracción con hexano como en a): la fracción extraída en la fase hexánica se denominó AA y contiene los alcoholes alílicos reordenados, producto de la hidrólisis ácida de los correspondientes compuestos fosforilados alílicos, y

c) Hidrólisis enzimática con fosfatasa alcalina de intestino de ternera, durante 2 horas a 37^o y posterior extracción con hexano igual que en a): la fracción hexánica se denominó PP y contiene a los alcoholes alílicos no reordenados más el isopentenol, producto de la hidrólisis enzimática de los correspondientes compuestos fosforilados alílicos.

2.8.1.2. Determinación de la actividad de la IPP isomerasa.

Se determinó cuantificando la transformación de [1-¹⁴C] IPP en fosfatos alílicos, midiendo la radiactividad en la fracción AA y se expresó como pmoles/min/mg de proteínas.

La incubación se realizó a 30^o durante 5 min en un medio que contenía amortiguador de succinato de sodio 150 mM pH 6,0; 2-mercaptoetanol 20 mM, [1-¹⁴C]-IPP 50 μM (rad. específica 4,25 x 10⁶ dpm/μmol) y 0,05 mg de proteínas en un volumen final de 0,5 ml. La reacción se detuvo enfriando los tubos en un baño de hielo y agregando HCl hasta una concentración final de 2N. Luego los tubos se incubaron durante 20 minutos a 30^o y los productos de la reacción se extrajeron con 1,5 ml de hexano.

2.8.1.3. Determinación de la actividad de la preniltransferasa.

Se determinó cuantificando la incorporación de ¹⁴C proveniente de la condensación de un sustrato alílico como el GPP ó el DMAPP con [1-¹⁴C]IPP en la fracción AA descontando la

respectiva actividad isomerásica del sistema. La actividad se expresó como pmoles/min/mg.

La incubación se realizó a 37^o durante 30 min en un medio que contenía: Amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 7,4, MgCl₂ 6 mM, 2-mercaptoetanol 20 mM, GPP o DMAPP 10 μ M, [1-¹⁴C] IPP 50 μ M (radiact. esp. 4,25 x 10⁶ dpm/ μ mol) y 0,03 mg de proteínas en un volumen final de 0,25 ml. La reacción se detuvo enfriando los tubos en un baño de hielo y los productos de la reacción se determinaron igual que en la sección 2.8.1.1.

2.8.1.4. Sistema de isomerización redox.

Se ensayo en condiciones semejantes a la de la preniltransferasa (sección 2.8.1.3.), utilizando GPP como sustrato; o bien cuantificando la incorporación de ³H proveniente de la condensación de [1-³H]-GPP con IPP en las fracciones de LL y AA.

La incubación se realizó durante 30, 60, 90 y 120 minutos tal como se indica en la sección 2.8.1.3. Los ensayos en que se utilizó [1-³H]-GPP se usó un sustrato de una radiactividad específica de 2,9 x 10⁷ dpm/ μ mol e IPP no marcado.

La reacción se detuvo enfriando los tubos en un baño de hielo y los productos de la reacción se determinaron igual que en la sección 2.8.1.1.

2.8.1.5. Determinación de la actividad de la prenilfosfatasa

Se determinó cuantificando la radiactividad presente en la fracción LL debida a la hidrólisis enzimática de $[1-^3\text{H}]$ GPP, $[1-^3\text{H}]$ NPP, $[1-^3\text{H}]$ FPP y $[1-^{14}\text{C}]$ IPP. La actividad se expresó como μ moles/min /mg.

La incubación se realizó a 37° durante 10 min en un medio que contenía: Amortiguador de succinato de sodio 100 mM pH 6,0; sustrato 3 0,2 mM y 0,03 mg de proteínas en un volumen final de 0,5 ml. La reacción se detuvo agregando 1,5 ml de hexano y enfriando los tubos a 0° , y se midieron los alcoholes radiactivos extraídos en la fase hexánica.

2.8.1.6. Actividad de la prenil deshidrogenasa

2.8.1.6.1. Determinación de la actividad de la prenil deshidrogenasa usando prenilos radiactivos como sustratos.

Se determinó cuantificando la radiactividad soluble en fase acuosa ($\text{NAD-}^3\text{H}$), luego de extraer el medio de incubación con hexano (Croteau & Felton, 1980).

La incubación se realizó a 37° en un medio que contenía: K-Pi 50 mM pH 7,85, MgCl_2 5 mM, Mercaptoetanol 2 mM, $^3\text{H-}$

³ Radiactividad específica de los sustratos.

^3H - GPP y ^3H -GOH: $2,9 \times 10^7$ dpm/u mol

^3H - NPP y ^3H -NOH: $2,9 \times 10^7$ dpm/u mol

^3H - FPP y ^3H -FOH: $1,6 \times 10^7$ dpm/u mol

^{14}C - IPP: $4,25 \times 10^6$ dpm/u mol

Alcohol (GOH, NOH, FOH)³ disuelto en Tween 20 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$) 0,1 mM; NAD^+ 1mM y 250 mg de proteínas en un volumen final de 0,5 ml. La reacción se detuvo enfriando en un baño de hielo y los tubos se extrajeron con 1.5 ml de éter de petróleo.

Se midió la radiactividad de la fase hexánica y de la fase acuosa remanente. La fase hexánica se analizó por GLC y TLC (secciones 2.3.2., 2.3.1.1.2.)

2.8.1.6.2. Determinación de la actividad de la prenol deshidrogenasa por reducción de pNBT.

Se determinó acoplando la reacción de oxidación de alcoholes a la reducción de pNBT.

La incubación se realizó a 30^o en un medio que contenía 0,5 ml de reactivo pNBT (Fottrell, 1966), 100 mM TRIS-HCl pH 7,4, 0,16 mM NAD^+ ó NADP^+ , 0,05% de ROH⁴ (preparado al 30% v/v en acetona) y 0,5 mg de proteínas, en un volumen final de 3 ml. El curso de la reacción se siguió espectrofotométricamente, midiendo la absorción del pNBT reducido a 600 nm. La actividad se expresó como μ moles de NADH o NADPH producidos por min y por mg de proteínas.

⁴ Sustratos usados: E-Farnesol, Z-Farnesol, Nerolidol, Geraniol, Nerol, Linalol, Terpeneol, Isopentanol, Etanol.

2.8.2. Enzimas marcadoras de fracciones subcelulares

2.8.2.1. Citocromo c oxidasa (Mitocondrias) (Leighton y col., 1968)

Se determinó cuantificando la oxidación de citocromo c a 550 nm, en velocidades iniciales.

Cada fracción obtenida por centrifugación diferencial y el homogeneizado se preincubaron a 0° durante 10 min con una solución que contenía NaHCO₃ 1 mM, Tritón X-100 0,01% y EDTA 1 mM en una relación de volúmenes 1:1.

La incubación se realizó a 25° en cubetas de vidrio de 3 ml. en un medio que contenía citocromo c 43.6 mM, K-Pi 30 mM pH 7,4 y EDTA 1 mM y 0,5 mg/ml de proteínas, y se registró la absorbancia a 550 nm.

La actividad enzimática se definió como el $\Delta \log DO_{410}/\text{min} / \text{mg}$.

2.8.2.2. Catalasa (Peroxisomas y glioxisomas) (Baudhuin y col., 1964)

Se determinó cuantificando el H₂O₂ remanente luego de la incubación con la enzima, usando el complejo coloreado que forma el H₂O₂ con el TiOSO₄ en medio ácido, que absorbe a 405 nm.

Cada fracción obtenida por centrifugación diferencial y el homogeneizado se preincubaron a 0° durante 10 min con una solución que contenía NaHCO₃ 1 mM, Tritón X-100 0,01% y

EDTA 1 Mm en una relación de volúmenes 1:1.

La incubación se realizó a 0° en un medio que contenía amortiguador imidazol 20 mM pH 7,0, H₂O₂ 0,006%, BSA 1 mg/ml y 0,5 mg/ml de proteínas en un volumen final de 5,2 ml ; durante 10 y 20 min. La reacción se detuvo agregando 3 ml. de TiOSO₄, y luego se colocaron los tubos en H₂O a temperatura ambiente. Se mide después de 3 min la absorbancia a 405 nm (Pabel & Mohan, 1960).

La actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que disminuye el log₁₀ de la concentración de H₂O₂ en una unidad por minuto y por mg de proteínas.

2.8.2.3. ATPasa dependiente de K⁺ (membrana plasmática) (Leonard & Van der Woude, 1976).

Se determinó midiendo el aumento de la hidrólisis de ATP en presencia de K⁺ y Mg²⁺, en relación a la hidrólisis de ATP en presencia de Mg²⁺, cuantificando el Pi liberado por el método de Fiske-Subbarow. (Fiske & Subbarow, 1925).

La incubación se realizó durante 30 min a 37° en un medio que contenía amortiguador MES-TRIS 100 mM pH 6,5, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, ATP 5 mM y 0,5 mg/ml de proteínas, en un volumen final de 0,5 ml. Para medir la actividad de la ATPasa dependiente de Mg²⁺, se omitió del medio de ensayo el KCl.

La actividad enzimática se definió como μ moles de Pi liberados por min y por mg de proteínas.

Para la medición de la ATPasa-K, las fracciones provenientes de los homogeneizados preparados en amortiguador K-Pi se dializaron en contra de 100 volúmenes de amortiguador MES-TRIS 0,1 M pH 6,5 durante 2 horas, con 4 cambios de líquido.

2.8.2.4. NADPH Citocromo c reductasa (Retículo endoplásmico) (Beaufay y col., 1974).

Se determinó cuantificando la reducción de citocromo c a 550 nm, en presencia de NADPH, en velocidades iniciales.

La incubación se realizó en cubetas de cuarzo de 1 ml a 25⁰ en un medio que contenía amortiguador K-Pi 36 mM pH 7,4, Nicotinamida 30 mM, Na CN 0,22 mM, citocromo c 42,6 μ M, NADPH 2 mM y 0,5 mg de proteínas, y se registró la absorbancia a 550 nm durante 15 minutos.

La actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que reduce 1 μ mol de citocromo c por minuto y por mg de proteínas.

2.8.2.5. NADH Citocromo c reductasa insensible a antimicina (Retículo endoplásmico) (Tolbert, 1974)

Se determinó cuantificando la reducción de citocromo c a 550 nm, en presencia de NADH y antimicina A, en velocidades iniciales.

La incubación se realizó en cubetas de cuarzo de 1 ml. a 25° en un medio que contenía amortiguador K-Pi 60 mM pH 7, citocromo c 60 μ M, KCN 0,15 mM, antimicina A 0,012 mg/ml, NADH 0,6 mM y 0,5 mg de proteínas, y se registró la absorbancia a 550 nm durante 15 min.

La actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que reduce 1 μ mol de citocromo c por min y por mg de proteínas.

2.8.3. Controles no enzimáticos.

Los controles no enzimáticos se realizaron usando enzima hervida, para todas las actividades mencionadas en la sección 2.8., descontandose de los respectivos valores de actividad medidos.

2.9. Cuantificación de los productos radiactivos.

Se midió la radiactividad en alícuotas de 1 ml de las respectivas fases hexánicas a la que se agregaron 3 ml de una solución centelleante. Esta solución contenía 0,05 g de POPOP y 4 g de PPO por litro de tolueno (Vial, 1980). Para muestras hidrosolubles se usó una alícuota de 1 ml de fase acuosa en 10 ml de la mezcla centelleante, preparada con 0,125 g de POPOP, 4 g de PPO, 500 ml de Tritón X-100 por litro de tolueno (Vial, 1980). La radiactividad se midió en un espectrómetro de centelleo para líquidos Delta 300 con 82% de eficiencia para ^{14}C y 63% de eficiencia para ^3H .

2.10. Identificación de los productos de las reacciones catalizadas por las enzimas de la biosíntesis de isoprenoides.

Los productos de la reacción de incorporación del MVA, extraídos en las fracciones LL, AA y PP se analizaron por TLC en los sistemas descritos en las secciones 2.3.1.2., 2.3.1.3. y 2.3.1.4. y por GLC (sección 2.3.3.).

Los productos de la reacción de la preniltransferasa y del sistema de isomerización redox extraídos en las fracciones LL y PP, se analizaron por TLC en los sistemas descritos en las secciones 2.3.1.2. y 2.3.1.3. y además por GLC (sección 2.3.3.)

Los productos de la reacción de la prenilfosfatasa, extraídos en la fracción de LL, se analizaron por TLC (sección 2.3.1.3.) y por GLC (sección 2.3.3.).

Los productos de la reacción de la preoldeshidrogenasa se analizaron por TLC (secciones 2.3.1.1.2. y 2.3.1.3.), y por GLC (sección 2.3.2.) y por TLC (sección 2.3.1.1.3.) previa derivatización.

2.10.1. Derivatización de aldehídos con 2,4-dinitrofenilhidrazina.

La derivatización se realizó mezclando volúmenes iguales de la fase hexánica de extracción de productos insolubles en H₂O o de una solución en hexano de citral (mezcla

de neral y geranial) de 22 mg/ml, con solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina al 0,1% en HCl 2N. Se agitó vigorosamente en un agitador Vortex durante 30 segundos y se analizó la fase hexánica por TLC (sección 2.3.1.1.3.).

2.11. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS, de acuerdo a lo descrito (Weber & Osborne, 1969), usando el sistema de amortiguadores de Laemmli (Laemmli, 1970).

Los geles se prepararon en placas y fueron de 1,5 mm de grosor y de 13 cm de altura. Se dejaron polimerizar durante la noche a temperatura ambiente, y luego se agregó solución de poliacrilamida al 4% como gel concentrador, cuya altura fué de 3,5 cm, dejando polimerizar durante 2 horas a temperatura ambiente.

Se aplicaron 10 muestras diferentes de 40 μ g de proteínas cada una al gel, previamente desnaturaladas.

Se aplicaron 20 mA por gel en un aparato para electroforesis modelo PROTEAN DUAL SLAB CELL de Bio-rad hasta que el colorante migró hasta el gel separador, y luego se incrementó la corriente a 30 mA. Se detuvo la electroforesis cuando el colorante había migrado entre 10 y 11 cm.

Los geles se fijaron durante 1 hora y luego se tñeron con azul de Coomassie, de acuerdo a lo descrito (Weber & Osborne, 1969).

La migración de las diferentes proteínas en el gel se midió solamente en el gel separador, considerando la migración del colorante como correspondiente a un $R_m=1$.

2.12. Electroenfoque en geles de poliacrilamida.

Se prepararon los geles para electroenfoque de acuerdo a lo descrito (Pearce y col., 1972). Se usaron anfolitos de rango de pH 3,5 a 10,0. El cátodo se sumergió en una solución de NaOH 20 mM y el ánodo en H_2SO_4 0,2%, se aplicó un voltaje de 300 volts durante 100 min tiempo que demoró en obtenerse una corriente constante (Mancilla, 1980).

Se aplicaron 100 ug de proteína por gel.

La medición de pH de los geles se hizo con un electrodo de superficie (Broadley James Corp., de 0,5 cm de base) a la misma temperatura a la cuál se realizó el electroenfoque. Para la localización de las bandas de proteínas en el gel se utilizaron las técnicas de tinción y destinción descritas (Mancilla, 1980). La cuantificación de las bandas de proteínas se efectuó por densitometría en un Quick-Seam, modelo R 4-077 (Helena Laboratories Corp., U.S.A.).

2.13. Microscopía de luz.

Se obtuvieron cortes de flavedo de naranja (exocarpio) de 0,1-0,2 mm de grosor, usando hojas de afeitar, y se cortaron en trocitos de 0.5 x 1 cm. El tejido se fijó durante 48 horas en paraformaldehído al 2% y luego se incluyó en parafina sólida. Se obtuvieron cortes de 4 μ m de espesor, las que se tiñeron con hematoxilina-eosina, para observación directa con un microscopio de luz con máquina fotográfica incorporada.

2.14. Microscopía electrónica de transmisión.

Se obtuvieron cortes de flavedo de naranja al igual que en la sección 2.13., las que se fijaron en glutaraldehído al 2% preparado en amortiguador K-Pi 0,1 M pH 7,4, durante 48 horas; y se post fijaron en OsO₄ al 1% durante 2 horas. Las muestras se incluyeron en Epon 812 después de deshidratar en series de acetona de concentración creciente.

Se siguió el mismo procedimiento de fijación para las diferentes fracciones obtenidas por centrifugación diferencial, con la excepción de la fijación en glutaraldehído que se realizó durante 3 horas.

De ambos tipos de muestras se obtuvieron cortes finos para observación al Microscopio Electrónico (Siemens, modelo 102).

2.14.1. Tinción de muestras con AcUO y Pb .

Los cortes finos se recogieron sobre grillas de cobre de malla 200, y se tiñeron directamente con acetato de uranilo al 4% en metanol y después con citrato de plomo al 2%.

2.14.2. Tinción de muestras con PTA/CrO_3 . (Roland y col., 1972).

Los cortes finos se recogieron en anillos de plástico, los que se hicieron flotar en una solución de ácido peryódico al 1% durante 30 min. Se lavaron los cortes posteriormente en H_2O destilada (5 lavados de 5 min cada uno), y luego se tiñeron haciéndolos flotar durante 10 a 20 min a temperatura ambiente, sobre una solución de PTA al 1% en ácido crómico (CrO_3) al 10%. Después de teñir, se lavaron los cortes con agua destilada (2 veces durante 2 min cada una) y se recogieron sobre grillas de cobre de malla 200 para su observación al M.E.

2.14.3. Tinción negativa del S_{39100} .

Se colocó una gota del S_{39100} , tomada con pipeta Pasteur, sobre grilla de cobre de malla 200, y se retiró el exceso de líquido con papel filtro. Se colocó luego 1 gota de PTA al 2% sobre la misma grilla durante 2 min. Se retiró el exceso de PTA, se lavó con H_2O destilada y se observó directamente al M.E.

2.14.4. Análisis de las fracciones de membranas.

El grosor de las membranas se determinó midiendo con una lupa provista de una escala milimétrica (Leitz) perfiles de membrana presentes en ampliaciones fotográficas ($\times 67.500$) obtenidas de negativos cuyo aumento fué de 25.000. Se consideró el exterior de las dos líneas oscuras del sistema trilaminar de las membranas, para estimar su grosor.

El porcentaje de membranas de distinto grosor se determinó usando reticulados de 1×1 cm y de $0,5 \times 0,5$ cm, sobre un total de 20 fotografías diferentes tanto para preparaciones de frutos verdes como de frutos maduros.

2.15. Microscopía electrónica de barrido.

Cortes de flavedo de naranja preparados al igual que en la sección 2.14., se montaron usando grafito y luego se sombrearon con oro metálico hasta alcanzar un grosor de aproximadamente 300 \AA . La muestra así preparada se observó directamente en un microscopio electrónico de barrido Jeol, modelo 125.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.- Ultraestructura de las células del flavedo de naranja.

3.1.1. Microscopía de luz.

Las células del flavedo de naranja (exocarpio) corresponden a epidermis y parénquima subepidérmico, en el cuál se forman las cavidades lisígenas¹ que contienen a los aceites esenciales.

La Fig. 3.1.-1 muestra a células de flavedo de naranja. No existe gran diferencia en cuanto a tamaño y forma entre células de frutos verdes y maduros, lo que está de acuerdo con lo descrito por Heinrich en Citrus limon en el sentido de que las células del flavedo cambian muy poco durante el desarrollo del fruto (Heinrich y col., 1980). Dichos cambios se refieren fundamentalmente al hecho de que en frutos verdes

¹ Cavidades lisígenas de secreción: corresponden a espacios intercelulares que proceden de grupos de células cargadas de productos de secreción, cuyas membranas y protoplastos se han ido destruyendo poco a poco. Por esto se les asigna también con el nombre de espacios intercelulares lisígenos (del griego lisis, disolver). En las cavidades lisígenas de secreción, las células que se deshacen vierten el producto de secreción al espacio intercelular, quedando ellas parcialmente desintegradas alrededor de la periferia de la cavidad. (K.Esau. Anatomía Vegetal. Editorial Omega, Barcelona, 1959; E. Starsburger. Tratado de Botánica. M. Marín & Cía, editores, Barcelona, 1960)

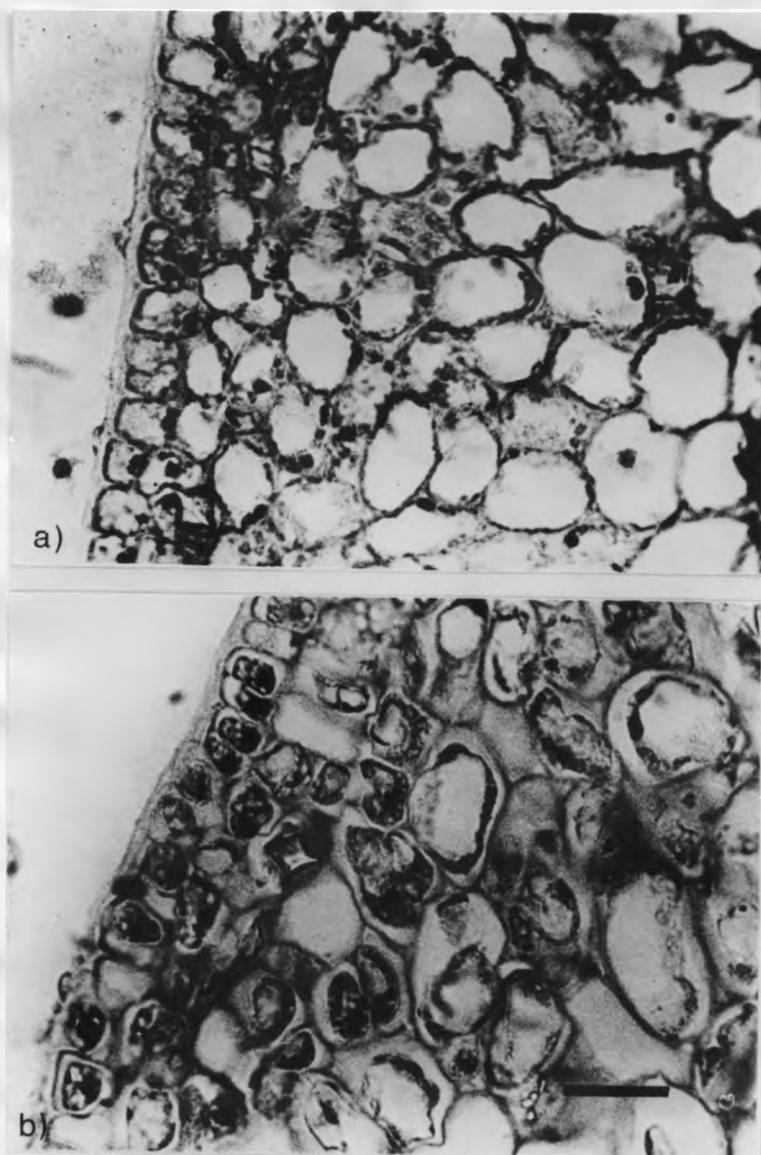


Figura 3.1.1. Microscopía de luz de cortes de flavedo de naranja provenientes de frutos verdes y maduros. a) Flavedo de fruto verde b) Flavedo de fruto maduro : se observa un alto grado de degeneración celular, correspondiente a tejido que está generando aceites esenciales. Escala: 10 μm .

y de tamaño pequeño (1-2 cm. de longitud), las células del flavedo ya poseen la gran vacuola central y el citoplasma se observa como una delgada franja entre la vacuola y la pared celular.

Existen sin embargo diferencias entre las células provenientes de frutos en distinto grado de maduración, ya que el ordenamiento interno y el contenido en organelos es diferente. En células de fruto maduro (Fig. 3.1.-1b) los organelos se encuentran en menor cantidad, el tamaño de la vacuola ha aumentado y en muchas células no es posible visualizar citoplasma. Se observa además un patrón de desorganización y degeneración celular, que concuerda con la formación de cavidades lisígenas en que existe autodigestión de las células conservando las paredes celulares.

3.1.2.- Microscopía electrónica de barrido.

Las células del flavedo de la naranja son ovaladas y contienen una gran vacuola central (Fig. 2.1.-2). Están rodeadas de una gruesa pared celular e interconectadas entre si mediante plasmodesmos. El citoplasma forma una capa muy angosta entre la membrana plasmática y el tonoplasto, y se ensancha para dar cabida a los organelos. Las células más cercanas a la superficie son más pequeñas y aplanadas, y el tamaño de la vacuola es menor que el de las células más

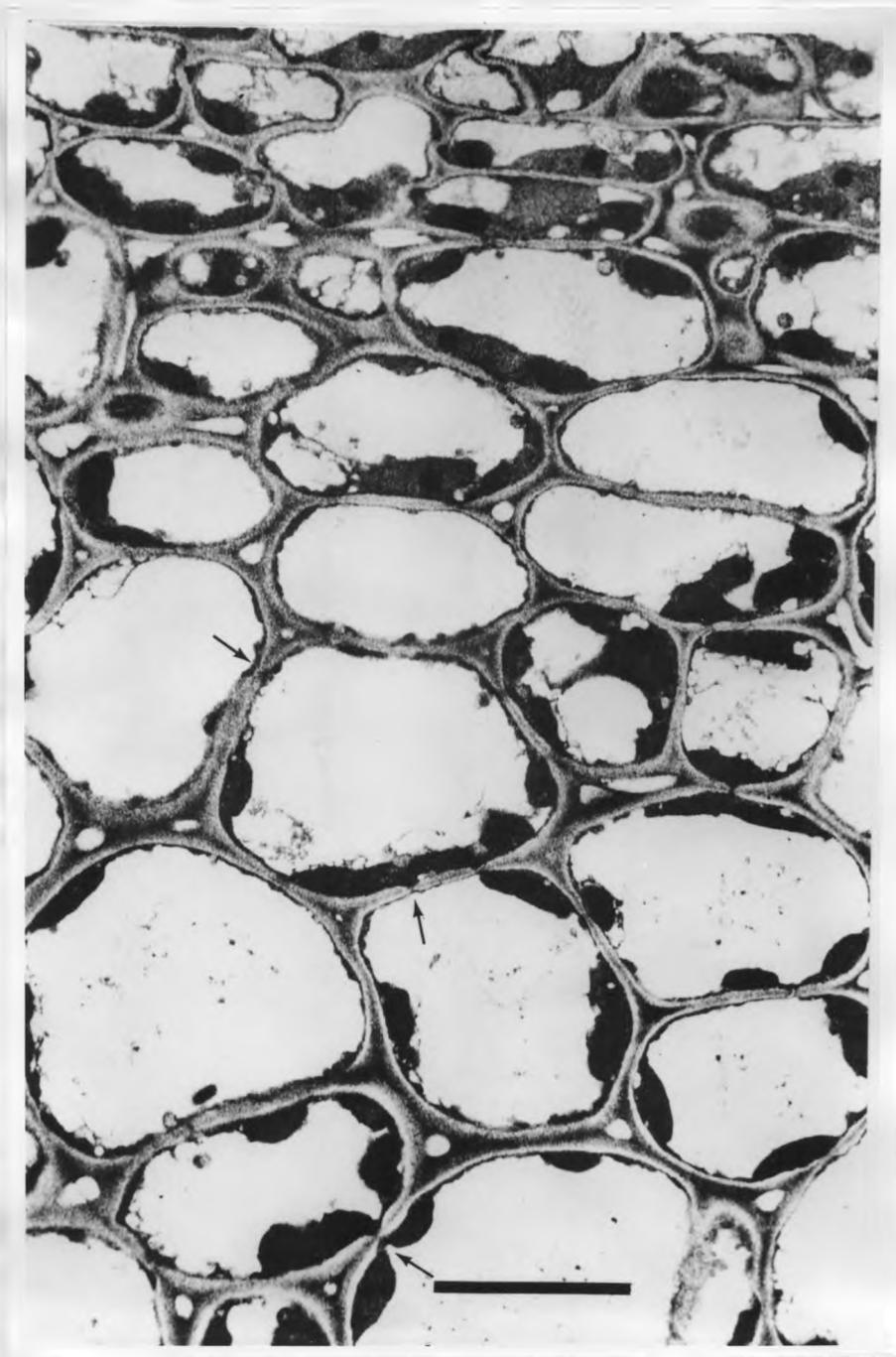


Figura 3.1.2. Microscopía electrónica de barrido de cortes de flavedo de fruto verde. Las flechas indican la localización de plasmodesmos. Escala : 10 μ m.

profundas. En algunas de ellas se observa más de una vacuola, y dentro de las vacuolas abundante material en proceso de degradación.

Los organelos de mayor tamaño corresponden a núcleos, con sus respectivos nucléolos, y plastidios. Nuevamente, el contenido en organelos es mayor en las células cercanas a la superficie.

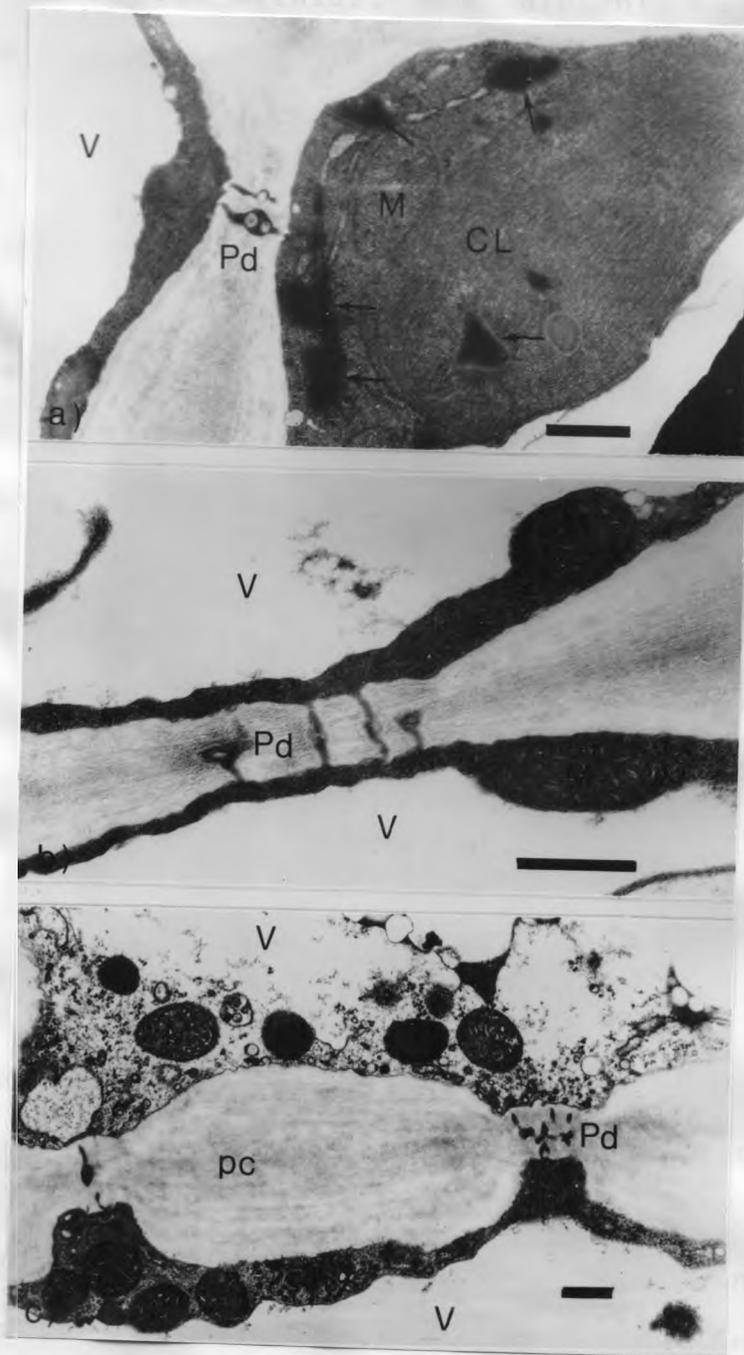
3.1.3.- Microscopía electrónica de transmisión.

La casi totalidad de los estudios de ultraestructura se hicieron mediante esta técnica, y se compararon preparaciones provenientes de frutos verdes y maduros.

En células provenientes de flavedo de naranjas verdes y maduras se observaron estrechamientos de la pared celular donde se localizan los plasmodesmos. Estos lugares de interconexión no tienen una distribución sistemática pero parecen ser más abundantes hacia los extremos de la célula (Fig. 3.1.-2), y en lugares donde existe un gran número de organelos como mitocondrias, plastidios, retículo endoplásmico, etc. (Fig. 3.1.-3).

Estos plasmodesmos pueden ser rectos o bien ramificados formando una cámara intermedia. Tienen membrana plasmática lo que permite que el protoplasma de una célula esté conectado directamente con el de otra vecina. Su diámetro

Figura 3.1.3. Plasmodesmos. a) Plasmodesmos conectando dos células de fruto verde. Se observan retículo endoplásmico rugoso, cloroplastos y mitocondrias. Los plasmodesmos presentan cámaras centrales. Las flechas indican material osmiófilo que puede contener aceites esenciales, localizado en el interior del cloroplasto y en la zona correspondiente al retículo endoplásmico rugoso. b) Plasmodesmos en células de frutos maduros. Se observan mitocondrias y trozos de membrana dentro de la vacuola, probablemente en proceso de degradación. c) Plasmodesmos en células de frutos maduros. Se observa gran número de mitocondrias y dictiosomas en la célula inferior. La célula superior carece de tonoplasto, probablemente debido al proceso de autodigestión de este tipo de células. Escala 0.5 μm .



fluctúa entre 40 y 140 nm.

La pared celular, que presenta su correspondiente laminilla media, permite mantener aisladas a las células vecinas que están sintetizando aceites esenciales y otros productos del metabolismo secundario. Su diámetro fluctúa entre 0,25 y 2,3 μm .

Las células provenientes de frutos verdes tienen un citoplasma muy osmiófilo, probablemente debido al mayor contenido proteico ó a mayor contenido en aceites esenciales en este estado de madurez. Tienen núcleo con su correspondiente nucléolo (fig. 3.1.-4) y los plastidios corresponden a cloroplastos (Fig. 3.1.-5), donde no es posible observar ribosomas.

Los cloroplastos identificados por el típico sistema de membranas tilacoides, contienen pequeñas cantidades de material osmiófilo (Fig. 3.1.-3) y algunos gránulos de almidón. No parecen transformarse en amiloplastos con el proceso de maduración del fruto, tal como se ha descrito en Citrus deliciosa (Bosabalidis & Tsekos, 1982 a y b).

En células de naranjas maduras no se observan núcleos y los plastidios corresponden a cromoplastos. En el proceso de maduración del fruto las células comienzan a autodigerir los componentes citoplasmáticos, aumentando el volumen

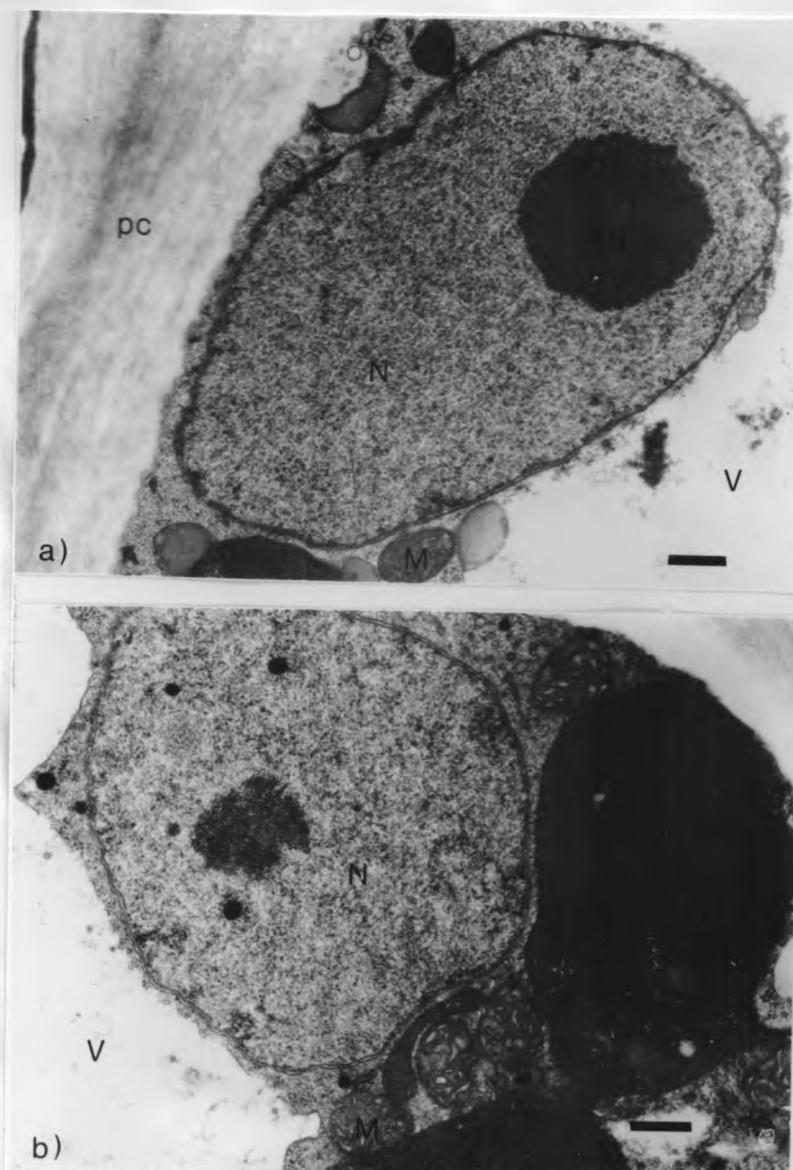


Figura 3.1.4. Núcleo. a) Fruto verde. Núcleo con su nucléolo. Se observan algunas discontinuidades de la membrana nuclear que podrían corresponder a los poros nucleares o a procesos de degradación de dicha membrana. No se observa tonoplasto en esa región de la célula. b) Núcleo vecino a un cloroplasto y a un gran número de mitocondrias. Se observan las mismas discontinuidades de la membrana nuclear. Fruto verde. Escala 0,5 μm .

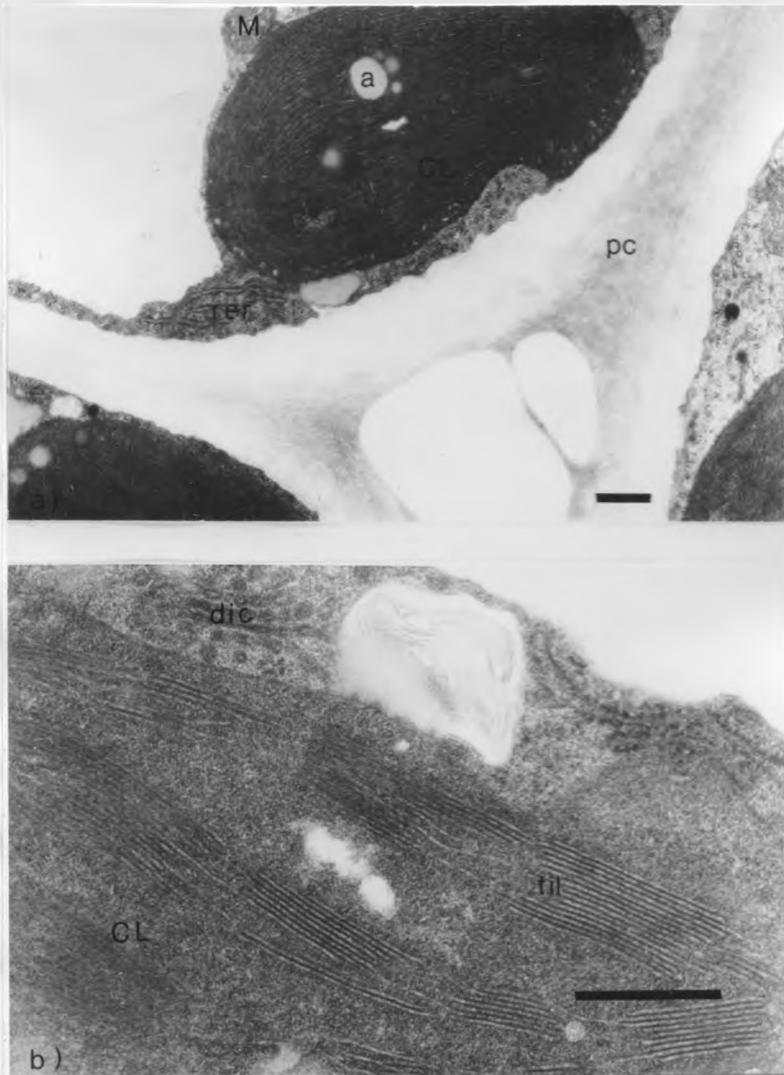


Figura 3.1.5. Cloroplastos de Fruto verde. a) Cloroplastos en tres células. Se observan elementos de retículo endoplásmico rugoso, y contenido de almidón dentro de los cloroplastos. b) Cloroplasto con sus membranas tilacoides; se encuentra vecino a dictiosomas y retículo endoplásmico rugoso. Se observa una inclusión con membranas. Escala 0,5 μm .

vacuolar y transformando los cloroplastos en cromoplastos (Fig. 3.1.-6).

Los cromoplastos contienen sistemas de membranas que se parecen a las de los cloroplastos, sin un patrón definido de organización. En algunos puntos presentan discontinuidades (Fig. 3.1.-6) que pueden deberse a procesos de autodigestión de la célula, ó en algún tipo de interconexión entre el plastidio y el citoplasma. Contienen además inclusiones de lípidos, gránulos de almidón y material osmiófilo. Se ha descrito que este material osmiófilo contiene aceites esenciales, y se ha observado dentro de plastidios de Poncirus trifoliata, Citrus limon (Heinrich, 1969; Heinrich, 1970) y Citrus deliciosa (Bosabalidis & Tsekos, 1982 a y b). La presencia de este material en plastidios de Citrus sinensis sugiere que éste puede ser uno de los lugares de biosíntesis de los aceites esenciales. Sin embargo, datos de formación de alcoholes e hidrocarburos monoterpénicos por sistemas enzimáticos de flavedo de naranjas (George Nascimento & Cori, 1971; Pérez y col., 1980), indican que estos terpenoides no serían sintetizados en los plastidios, sino por enzimas que se encuentran en sobrenadantes de 10.000 x g. Estos datos, sin embargo, podrían no ser concluyentes, ya que si las enzimas responsables de la biosíntesis de los diferentes aceites esenciales estuvieran débilmente unidas a estructuras ce-

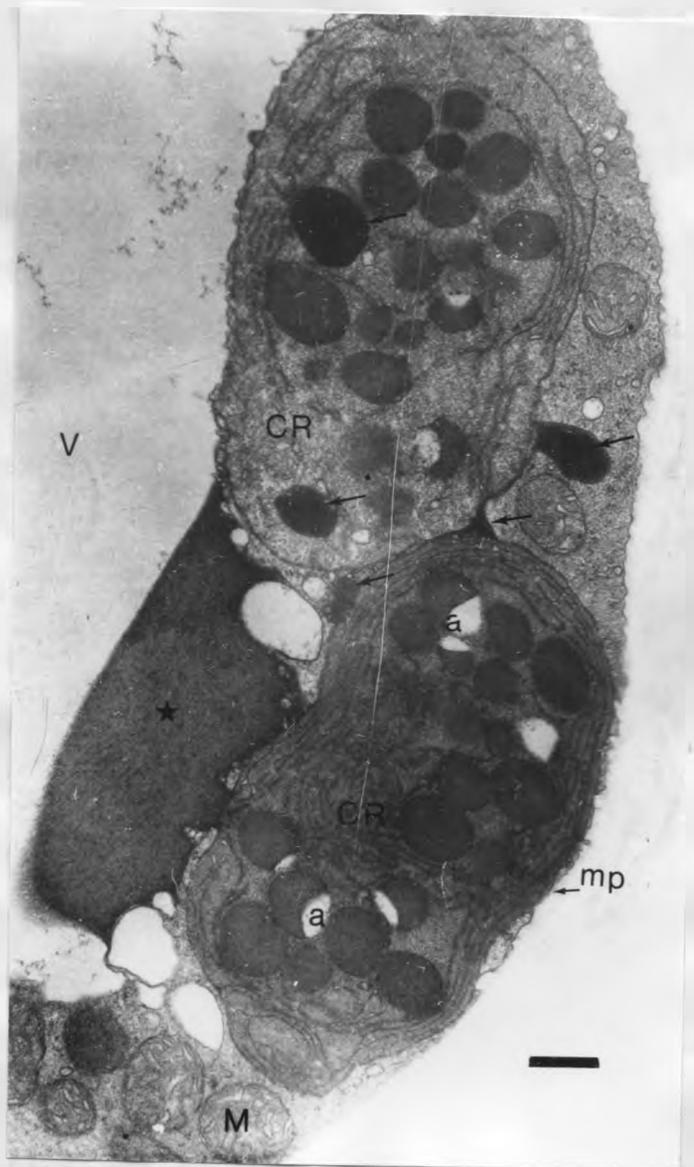


Figura 3.1.6. Cromoplastos. Cromoplastos de frutos maduros. Se encuentran vecinos a un gran número de mitocondrias. En su interior se encuentran gránulos de almidón, inclusiones lipídicas y material osmiófilo, además de un sistema de membranas que no poseen patrón de organización. Las flechas indican material osmiófilo que puede contener aceites esenciales, y los asteriscos indican material lipídico. Escala 0,5 μm .

lulares, podrían aparecer como enzimas solubles sin serlo realmente.

Por otra parte, se ha observado que cloroplastos aislados de espinaca absorben hidrocarburos monoterpénicos (Gleizes, 1979), agregados al medio de incubación que contiene plastidios. Por lo tanto, el hecho de encontrar material osmiófilo asociado a plastidios en flavedo de Citrus sinensis, no es prueba concluyente de que éstos sean un lugar de biosíntesis, tal como se ha descrito en Citrofortunella mitis (Gleizes y col., 1983).

Los organelos más abundantes, aunque de mucho menor tamaño, son las mitocondrias. Se distribuyen a través de todo el citoplasma, pero de preferencia en la cercanía de plastidios (Fig. 3.1.-7).

Cercanos a las mitocondrias se encuentran organelos que podrían corresponder a glioxisomas, sin estructuración interior y rodeados por una membrana simple. Estos organelos no se encuentran nunca aislados, lo que concuerda con el hecho de que siempre se les ha encontrado asociados con otros organelos dentro de la célula (Tolbert, 1971).

El retículo endoplásmico rugoso presenta una distribución similar a las mitocondrias (Fig. 3.1.-8), lo que concuerda con una interdependencia en los diferentes procesos metabólicos de la célula. La biosíntesis de hidrocarburos

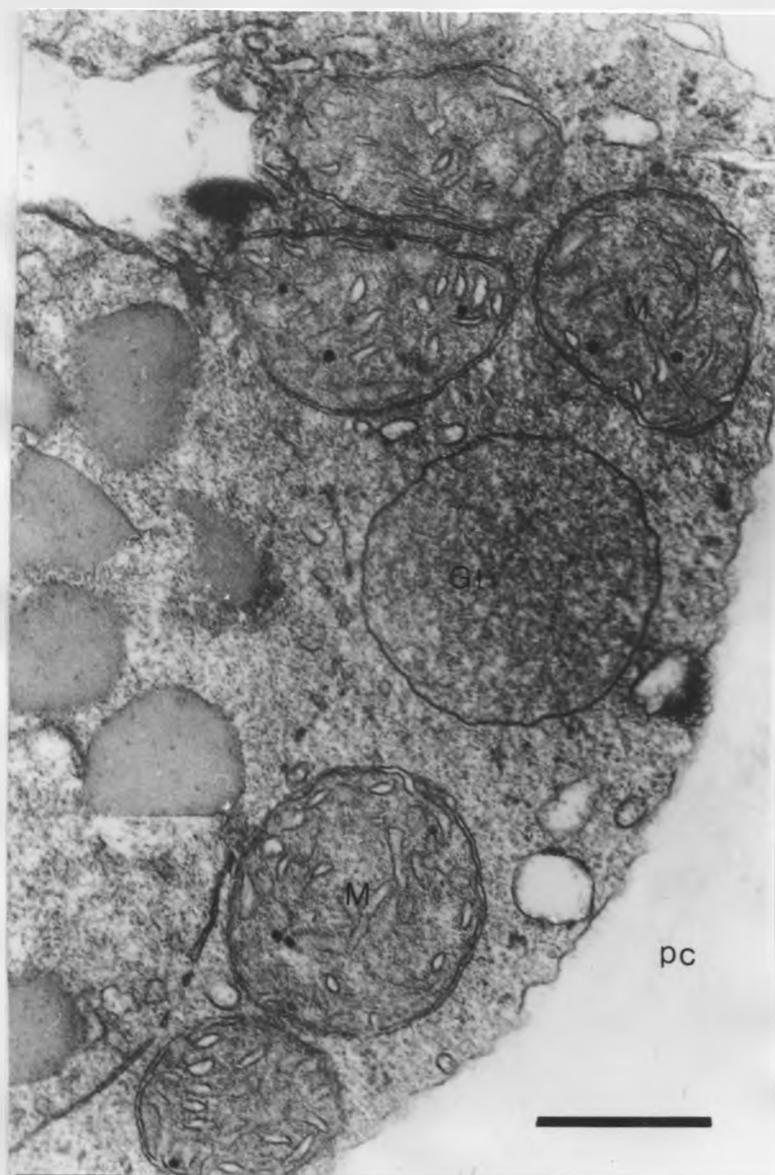


Figura 3.1.7. Mitochondrias. Agrupación de mitocondrias cercanas a un glioxisoma. Se observan además inclusiones lipídicas provenientes de un plastidio en proceso de degradación, debido a la discontinuidad de sus membrana. Fruto maduro. Escala 0,5 μm .

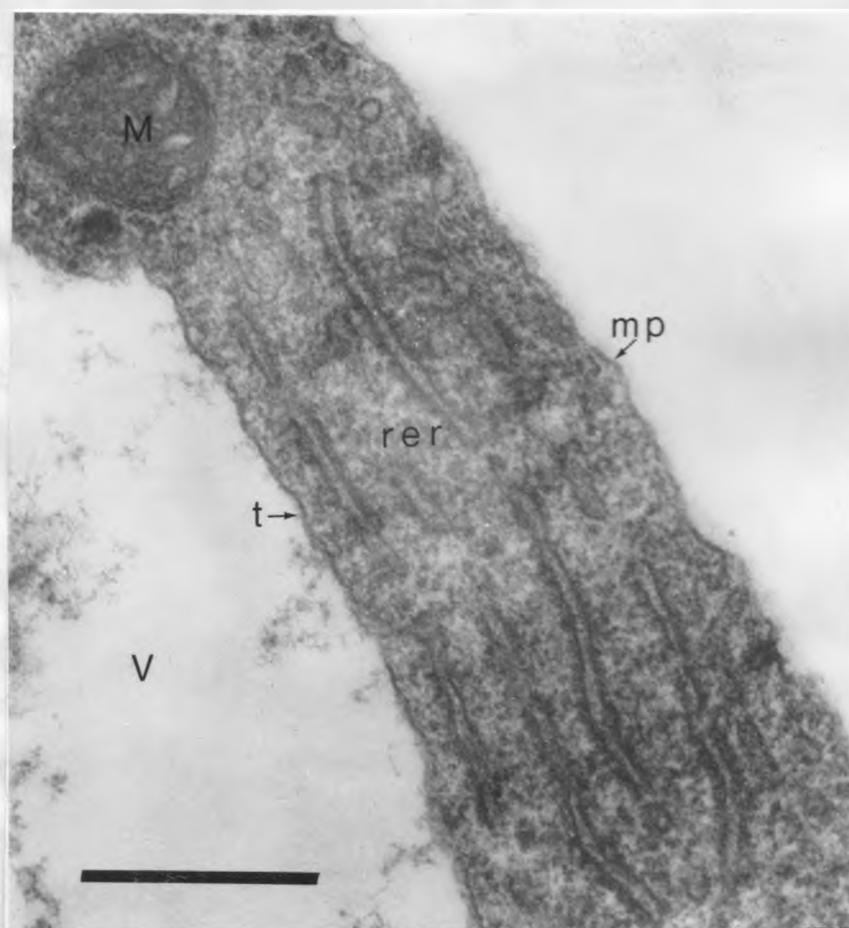


Figura 3.1.8. Retículo endoplásmico rugoso. Se encuentra a lo largo de todo el citoplasma, tanto de frutos verdes como maduros, y asociado a otro tipo de organelos como mitocondrias y plastidios; en las células del flavedo de naranja. Escala 0,5 μ m.

sesquiterpénicos parece estar ligada al retículo endoplásmico en Pinus pinaster (Gleizes y col., 1980), y por lo tanto, la presencia de material osmiófilo ligada a este organelo en frutos verdes de Citrus sinensis (Fig. 3.1.-3) podría corresponder a otro lugar de biosíntesis de aceites esenciales, o bien estar relacionado con un proceso de excreción de estos aceites hacia las cavidades lisígenas.

Debido al carácter hidrofóbico de los componentes de los aceites esenciales, es plausible pensar que su biosíntesis esté asociada a estructuras hidrofóbicas como son los distintos tipos de membranas.

De aquí que sea muy importante correlacionar los resultados de ultraestructura, con el de las diferentes enzimas relacionadas con la biosíntesis de isoprenoides, para no concluir sobre los sitios en que esto ocurre, basándose solamente en la presencia o ausencia de material osmiófilo, o en la radiactividad asociada a una determinada fracción subcelular, proveniente de un precursor marcado (Gleizes y col., 1980).

A través del citoplasma se encuentran un gran número de cisternas y vesículas pequeñas que corresponden a dictiosomas (Fig. 3.1.-9), algunas de las cuáles presentan material osmiófilo en su interior. Su presencia en la célula está relacionada con su papel en la formación de pared celular y en diversos procesos metabólicos, y el transporte de distintos

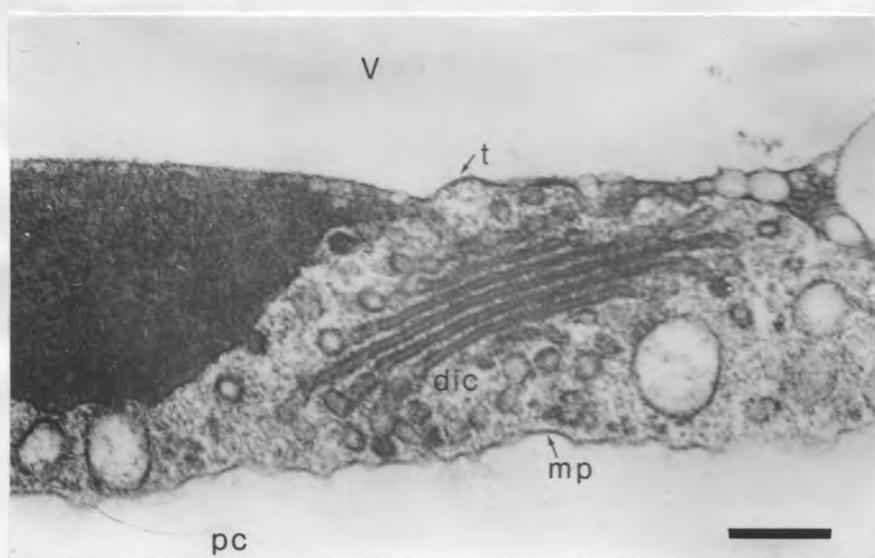


Figura 3.1.9. Dictiosomas. Dictiosomas presentes en las células del flavedo de naranja en una parte muy angosta de citoplasma. Su distribución es semejante a la del retículo endoplásmico. Se observa gran número de vesículas con diferente contenido, que aparecen solas, fusionándose con las cisternas o con otros tipos de membranas. Escala 0,2 μm .

componentes celulares. Entre estos componentes pueden encontrarse los aceites esenciales, y por lo tanto, la presencia de material osmiófilo dentro de este tipo de vesículas sugiere su participación en el proceso de transporte o excreción de estos compuestos hidrofóbicos.

Al madurar el fruto disminuye el número de organelos, lo que concuerda con un aumento en el tamaño de la vacuola. La vacuola se encuentra rodeada por el tonoplasto y no contiene ningún tipo de organización. Es común encontrar en su interior algunas inclusiones o trozos de membranas en proceso de degradación, de acuerdo con el hecho de que en tejidos vegetales es éste el organelo que desempeña la función de los lisosomas de la célula animal (Matile, 1982).

La ultraestructura de las células del flavedo de Citrus sinensis está relacionada con el tipo de función que desempeña, como es la biosíntesis de aceites esenciales y de otros metabolitos secundarios como flavonoides, carotenos, etc. Al igual que otras células secretoras, como la de los canales resiníferos en Pinus (Loomis & Croteau, 1973), presentan un patrón de degeneración progresiva del citoplasma en la medida que se acumula el producto, formando una gran vacuola central. Estos cambios en la estructura de la célula no parecen afectar las actividades de la IPP isomerasa y de la preniltransferasa (Pérez & Garrido, 1985), las que se man-

tienen constantes en frutos con distinto grado de maduración cuya ultraestructura indica un cambio significativo en el contenido en organelos y tamaño vacuolar.

Tanto en células provenientes de frutos verdes como maduros es posible encontrar material osmiófilo asociado a estructuras membranosas, como es el caso de plastidios y retículo endoplásmico, al igual que dentro de vesículas correspondientes a dictiosomas, cuya función sería probablemente la de transportar aceites esenciales hacia las cavidades lisígenas que se forman en este tipo de tejido.

La presencia de cromoplastos en las células de flavedo de Citrus sinensis coincide con el proceso de maduración del fruto. Es este el tipo de organelos donde se realiza la biosíntesis de carotenos, que reemplaza como pigmento a la clorofila que se encontraba en los cloroplastos de los frutos verdes.

3.2.- Fraccionamiento subcelular.

3.2.1.- Preparación del homogeneizado.

3.2.1.1.- Obtención del flavedo:

Los dos métodos usados para la obtención del flavedo resultaron satisfactorios; ya que tanto con el corte en trozos ó con el rallado se obtenían solamente células del flavedo con ocasional contaminación con células de albedo (mesocarpio).

3.2.1.2.- Amortiguador usado para la homogeneización:

Debido a la gran vacuola presente en las células del flavedo, y al escaso citoplasma y organelos, se decidió incorporar agua de coco a los amortiguadores y de este modo evitar una dilución en exceso del contenido celular, al aportar albúminas vegetales. El agua de coco aporta además una tonicidad equivalente a sacarosa 0,3 M con lo cuál se mantiene la integridad de los organelos. Los amortiguadores de K-Pi ó TRIS-HCl preparados en agua de coco y agregando EDTA fueron los que dieron resultados más satisfactorios para el posterior fraccionamiento subcelular.

3.2.1.3.- Forma de homogeneizar el tejido:

La homogeneización de cortes de flavedo en forma manual ó por medio de un politrón, ó la agitación manual del

rallado de flavedo sobre el amortiguador de homogeneización dieron resultados similares en el proceso de fraccionamiento.

La homogeneización en juguera a pesar de ser realizada durante tiempos cortos, dejaba a simple vista trozos muy grandes de tejido sin homogeneizar. Además los resultados del fraccionamiento indicaron que había ocurrido ruptura de organelos, pues se encontró una distribución de enzimas marcadoras en fracciones diferentes de las que correspondían. Es así como se encontraba la totalidad de la actividad de la catalasa en el S_{39100} y la totalidad de la actividad de la citocromo c oxidasa en el P_{39100} .

Se optó, finalmente, por utilizar el rallado del flavedo sobre el amortiguador de homogeneización, y posterior agitación manual con varilla de vidrio durante 2 minutos.

3.2.2. Centrifugación diferencial.

Una vez obtenido el homogeneizado, se filtró por gasa para eliminar restos celulares no homogeneizados, tal como se describió en la sección 2.4.1.; y se fraccionó por centrifugación diferencial de acuerdo al esquema de la Fig. 2.4.1.

Con el fin de acortar el proceso de fraccionamiento, y obtener las fracciones que presentaban las actividades enzimáticas señaladas en la sección 2.8., se intentó realizar una centrifugación a $4340 \times g$ durante 5 minutos, en vez de

las dos descritas en la sección 2.4.2. a 1085 x g y 4340 x g, respectivamente. Este procedimiento no permitió eliminar en las sucesivas centrifugaciones los lípidos que quedaban en los respectivos sobrenadantes, y se obtenía un S_{39100} con lípidos en suspensión. Lo mismo sucedía al tratar de obtener una fracción soluble si se reemplazaban las centrifugaciones a 1085, 4340 y 9750 x g por una sola centrifugación a 10000 x g durante 30 minutos.

Por este motivo aunque se necesitara ensayar solamente las actividades enzimáticas de la fracción soluble, era necesario realizar el procedimiento completo.

3.2.3.- Análisis de las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial.

3.2.3.1.- Enzimas marcadoras.

En el homogeneizado inicial y en las diferentes fracciones obtenidas por centrifugación diferencial se ensayaron las actividades de las siguientes enzimas marcadoras:

- a) Citocromo c oxidasa (mitocondrias).
- b) Catalasa (peroxisomas y glioxisomas).
- c) ATPasa- K^+ (membrana plasmática).
- d) NADPH citocromo c reductasa (retículo endoplásmico).
- e) NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A (retículo endoplásmico).

La distribución de las enzimas marcadoras se observa en la Fig. 3.2.-1 correspondiendo la Fig. 3.2.-1a a un homogeneizado realizado con un amortiguador que no contenía agua de coco, y la Fig. 3.2.-1b a un homogeneizado preparado con albúminas vegetales.

La distribución es la esperada para estas actividades enzimáticas, con la excepción de la NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A. Esta enzima se distribuye preferentemente en la fracción soluble, habiéndose esperado encontrarla en la fracción microsomal (Tolbert, 1974). La NADH citocromo c reductasa no se encuentra solamente asociada al retículo endoplásmico, pero su actividad medida en presencia de antimicina A permite diferenciarla de la enzima mitocondrial (Lord, 1983). Sin embargo, aún en presencia de este antibiótico, se observó una gran actividad en el S_{39100} . Esta puede deberse a la presencia de otras reductasas inespecíficas o bien, a una reducción no enzimática pues controles realizados con enzima hervida ó en ausencia de NADH agregado eran muy altos. Ambos efectos pueden ser aditivos y producir una "falsa" alta actividad enzimática que no refleje la real distribución de la enzima. Por otra parte, se ha encontrado NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A en preparaciones de vacuolas (Marty y col., 1980), y por lo tanto no podría descartarse que la actividad encontrada en la frac-

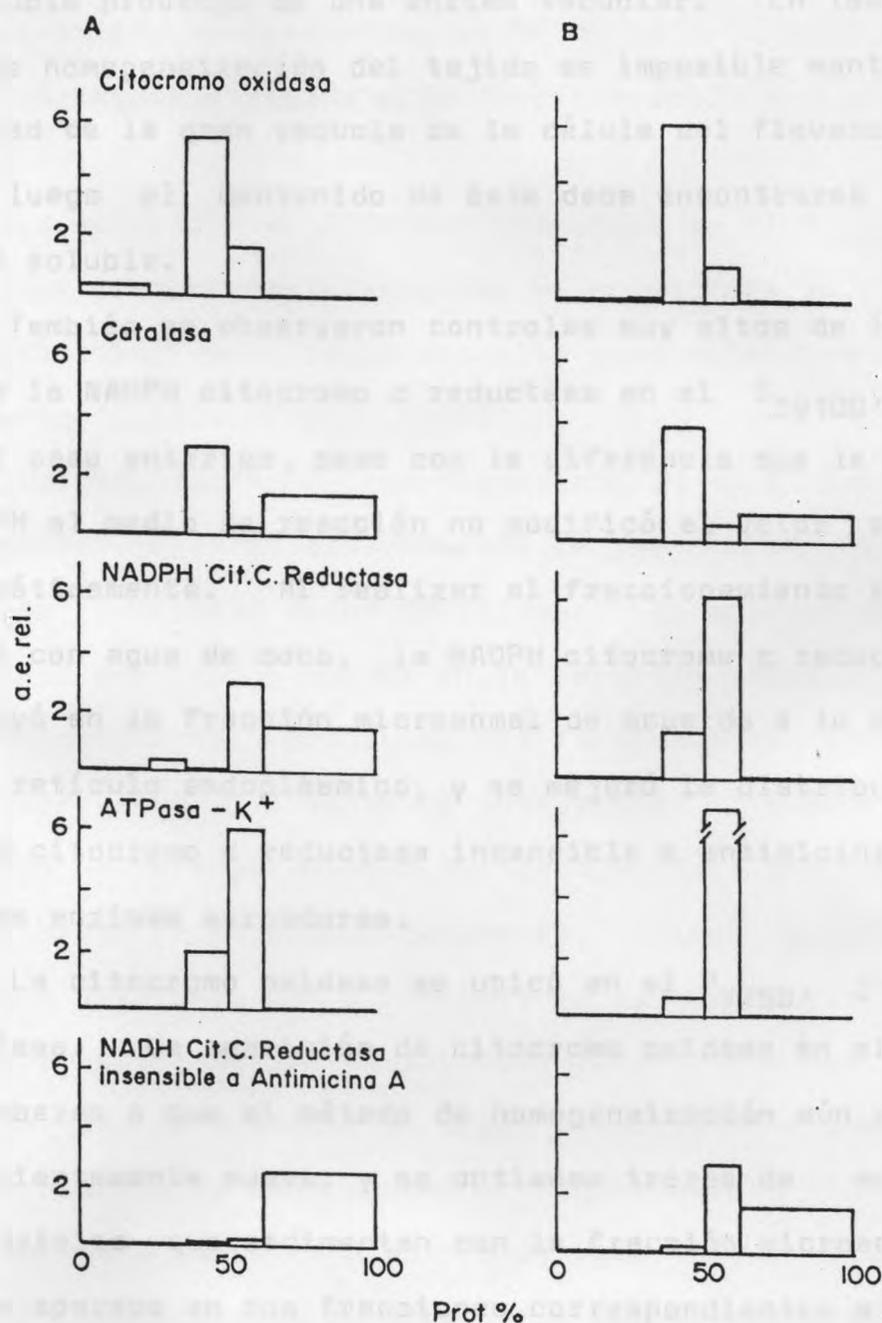


Figura 3.2.-1 Distribución de enzimas marcadoras en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. A) A partir de un homogeneizado preparado en amortiguador TRIS-HCl 0,1 M pH 7,4; sacarosa 0,3 M, MgCl₂ 10 mM, B) A partir de un homogeneizado preparado con albúminas vegetales, que contenía TRIS-HCl 0,1 M pH 7,4 y MgCl₂ 10 mM. La expresión de resultados se realizó de acuerdo a lo señalado en la sección 2.4.2.1.

ción soluble provenga de una enzima vacuolar. En las condiciones de homogeneización del tejido es imposible mantener la integridad de la gran vacuola de la célula del flavedo de naranja, luego el contenido de éste debe encontrarse en la fracción soluble.

También se observaron controles muy altos de la actividad de la NADPH citocromo c reductasa en el S_{39100} , semejante al caso anterior, pero con la diferencia que la adición de NADPH al medio de reacción no modificó el valor obtenido no enzimáticamente. Al realizar el fraccionamiento en amortiguador con agua de coco, la NADPH citocromo c reductasa se distribuyó en la fracción microsomal de acuerdo a lo esperado para el retículo endoplásmico, y se mejoró la distribución de la NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A y de las otras enzimas marcadoras.

La citocromo oxidasa se ubicó en el P_{9750} , junto con la catalasa. La aparición de citocromo oxidasa en el P_{39100} puede deberse a que el método de homogeneización aún no es lo suficientemente suave, y se obtienen trozos de membranas mitocondriales que sedimentan con la fracción microsomal. La catalasa aparece en dos fracciones correspondientes a P_{9750} y S_{39100} . Esta última no es de extrañar, ya que peroxisomas y glioxisomas son organelos muy frágiles, y por lo tanto muy susceptibles de romperse durante el proceso de

homogeneización, encontrándose parte de la actividad de catalasa normalmente asociada a la fracción soluble (Leighton y col., 1977).

La actividad de ATPasa-K⁺ se ubicó en el P₃₉₁₀₀, indicando que la membrana plasmática se encontraba en la fracción microsomal, como se ha descrito para este tipo de fraccionamiento (Gleizes y col., 1980).

La preparación de amortiguadores en agua de coco, indudablemente logró la distribución de las enzimas marcadoras medidas en fracciones mejor definidas. Al aportar albúminas vegetales, que van a quedar en la fracción soluble después del fraccionamiento, probablemente favoreció la interacción proteína-proteína por sobre la interacción proteína-lípido. El flavedo de naranja no solo contiene aceites esenciales sino que otros lípidos como carotenos, ácidos grasos, etc. (Kefford & Chandler, 1970). Durante la homogeneización del tejido, ambos tipos de compuestos hidrofóbicos que estaban hasta ese momento aislados en algún compartimento subcelular, se incorporan a la fase acuosa y probablemente interactúan con proteínas u otros componentes de membrana, intactos o no. Este fué probablemente el efecto que simuló una distribución anómala de la NADPH citocromo c reductasa, en los fraccionamientos realizados con amortiguador sin agua de coco. Si se piensa que el retículo endoplásmico puede ser uno de los

lugares de biosíntesis de aceites esenciales, es probable que éstos interactúen fácilmente con las membranas del retículo; interacción que sería más débil en presencia de otras proteínas, como las albúminas vegetales. Algo semejante puede atribuírsele a la NADH citocromo c reductasa insensible a antimicina A. Sin embargo, el hecho que parte de esta actividad haya permanecido en el S_{39100} probablemente no se deba a que membranas de retículo endoplásmico aún se encuentren en esa fracción sino a las razones expuestas anteriormente, puesto que la otra enzima marcadora de ese organelo se encuentra en el P_{39100} .

La recuperación de las enzimas marcadoras se encuentra en la tabla 3.2.-I. El porcentaje de recuperación indica que los resultados sobre la distribución subcelular son confiables. La recuperación total de cada enzima es superior al 80% del valor del homogeneizado, lo que excluye un artificio en el cálculo de la distribución.

La distribución de proteínas en cada fracción tuvo una variación de un 5%, considerando todos los fraccionamientos realizados.

El S_{39100} se centrifugó a $100.000 \times g$ durante una hora. En esas condiciones no hubo sedimentación de otra fracción; y el patrón de distribución de enzimas marcadoras fué idéntico al de la Fig. 3.2.-1b. Esto permite descartar del

ENZIMA MARCADORA	n	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg)	RECUPERACION (%)
Citocromo c oxidasa	20	$(16 \pm 2) \times 10^{-3}$	81,6 \pm 8
Catalasa	20	0,308 \pm 0,015	89,3 \pm 3
NADPH Citocromo c reductasa	30	$(6,4 \pm 0,7) \times 10^{-5}$	87,2 \pm 5
ATPasa-K ⁺	30	$(1,87 \pm 0,06) \times 10^{-3}$	90 \pm 5
NADH Citocromo c reductasa insensible a antimicina A	15	$(6,5 \pm 0,5) \times 10^{-5}$	91,3 \pm 4

Tabla 3.2.-I Actividad de las enzimas marcadoras en el homogeneizado y recuperación después del fraccionamiento subcelular. n corresponde al número de fraccionamientos realizados en los cuales se midieron las enzimas marcadoras. Las U/mg corresponden a lo definido en la sección 2.8.2.

S₃₉₁₀₀ la presencia de componentes de la fracción microsomal que no hubieran sedimentado en las condiciones de centrifugación.

El grado de madurez del fruto tampoco alteró la distribución subcelular de enzimas marcadoras, observándose solamente una diferencia en el color de las pellas obtenidas: las del fruto verde eran prácticamente incoloras el P₃₉₁₀₀ y verde la del P₉₇₅₀ (debido a la presencia de clorofila en los plastidios); mientras que ambas eran de color naranja en preparaciones con fruto maduro.

3.2.3.2.- Contenido de almidón:

La observación de gránulos de almidón en plastidios, tanto de frutos verdes como maduros, hizo necesario establecer su distribución después de fraccionar los homogeneizados. Se analizó, por lo tanto el contenido de almidón de cada una de las fracciones, y dicho contenido se expresó como concentración de almidón en la fracción (Tabla 3.2.-II). Se puede observar que el mayor porcentaje de almidón se encuentra en los P₁₀₈₅ y P₄₃₄₀; seguidos de P₉₇₅₀, P₃₉₁₀₀ y S₃₉₁₀₀. La gran cantidad de almidón que sedimenta en las dos primeras pellas, sugieren que éste puede provenir de los organelos que lo contienen y que se han deteriorado por el proceso de centrifugación, liberando su contenido. La mayor proporción de

FRACCION	% ALMIDON	ALMIDON (mg/ml)
Homogenizado	100	16,94
P ₁₀₈₅	25,55	19,77
P ₄₃₄₀	45,15	12,2
P ₉₇₅₀	15,59	1,27
P ₃₉₁₀₀	8,27	0,18
S ₃₉₁₀₀	5,44	0,44

Tabla 3.2.-II Distribución de almidón en las diferentes fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial.

almidón debiera encontrarse en el P₉₇₅₀, fracción en que debieran sedimentar los plastidios.

3.2.3.3.- Ultraestructura de las fracciones.

Cada fracción (pella) obtenida se fijó con glutaraldehído al 2% tal como se describió en la sección 2.14.; y el S₃₉₁₀₀ se observó al M.E. usando tinción negativa.

Las pellas correspondientes a P₁₀₈₅ y P₄₃₄₀ no pudieron ser observadas debido a que fué imposible realizar cortes ultrafinos. Esto se produjo probablemente debido al gran contenido en almidón que dañaba las cuchillas del ultramicrotomo obteniéndose cortes "rasguñados".

La fracción P₉₇₅₀, que contiene la actividad de citocromo oxidasa, contiene mitocondrias y contaminación con membranas. Cuando se han utilizado naranjas verdes, esta fracción aparece contaminada con membranas tilacoides de gran tamaño (Fig. 3.2.-2), lo cuál indica nuevamente que los plastidios se han deteriorado, probablemente en el proceso de centrifugación. La densidad de los gránulos de almidón es mucho mayor que la correspondiente a los plastidios, por lo tanto, aún cuando estos organelos no se hayan deteriorado durante la homogeneización del tejido, el almidón mismo al sedimentar a velocidades menores ha provocado la ruptura de la membrana de estos organelos, vaciando todo su contenido.

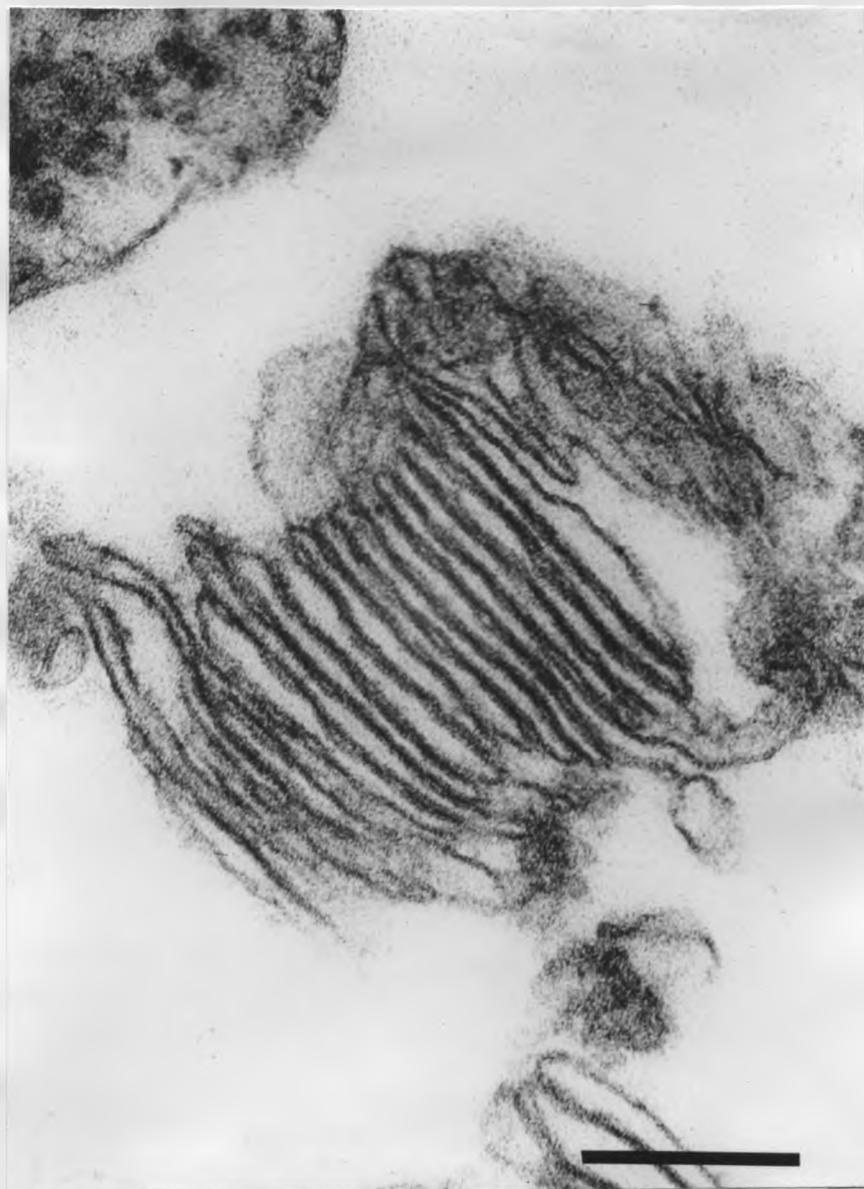


Figura 3.2.-2 Membranas tilacoides que sedimentan en el P₉₇₅₀ junto con la fracción mitocondrial. Escala 0.25 μ m.

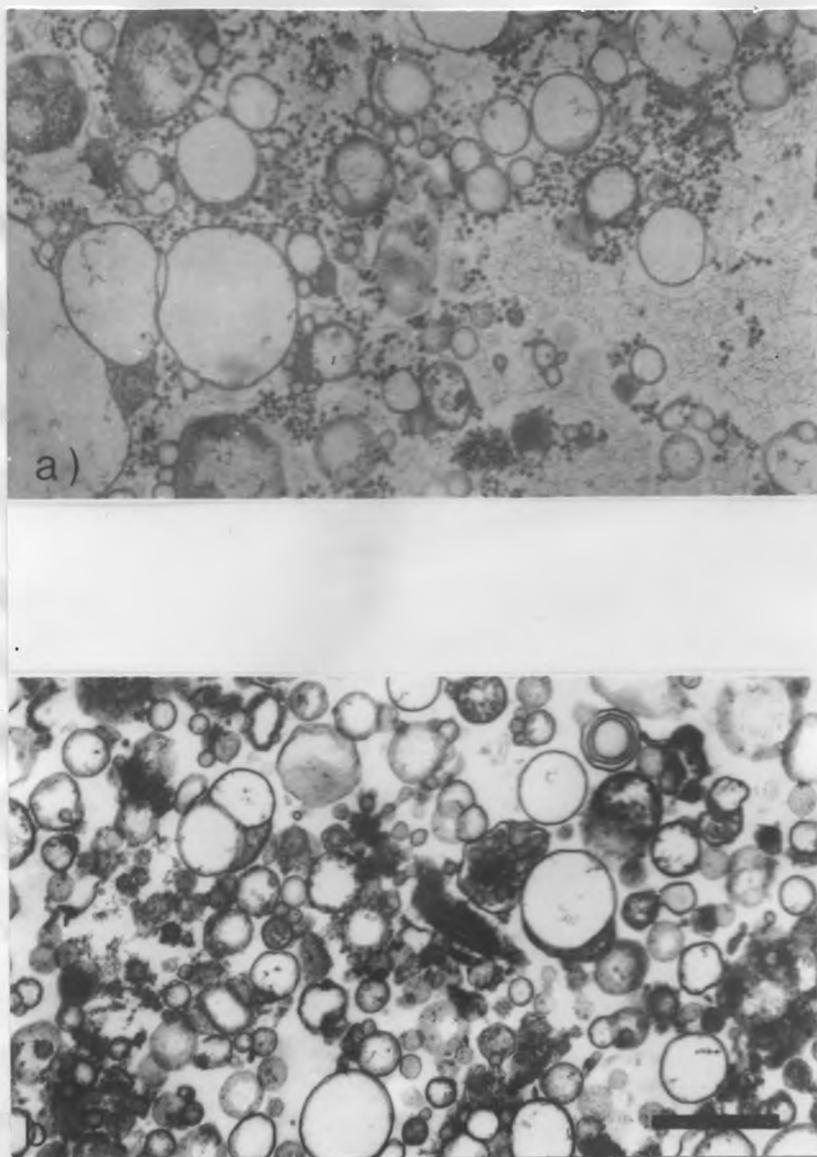


Figura 3.2.-3 Membranas presentes en el P₃₉₁₀₀ a) En preparaciones realizadas a partir de fruto maduro. b) En preparaciones realizadas a partir de fruto verde. Se observan pequeños trozos de membranas tilacoides. Escala 0,5 μ m.

La fracción P_{39100} contiene membranas de distinto grosor (Fig. 3.2.-3), cuyo % varía de acuerdo con el estado de madurez del fruto (Tabla 3.2.-III).

Se ha descrito que tanto la membrana plasmática como el tonoplasto tienen grosores de aproximadamente 10 nm, mientras que el retículo endoplásmico tiene membranas de aproximadamente 6 nm (Morré & Buckhout, 1979). Las membranas de 8 nm presentes en esta fracción pueden corresponder a membranas de los plastidios, que se dañaron en el proceso de fraccionamiento.

La disminución en el grosor de las membranas de 5,6 nm y el equivalente aumento de las 10,4 nm puede explicarse como el resultado del proceso de autodigestión de la célula del flavedo de naranja. Proporcionalmente, al aumentar el tamaño vacuolar, debe aumentar en longitud el tamaño del tonoplasto sin modificarse significativamente la membrana plasmática, y disminuir las membranas correspondientes a otros organelos como las del retículo endoplásmico. La mantención del porcentaje de membranas de 8 nm coincide con la transformación de cloroplastos en cromoplastos, en que no debiera existir una gran variación en este tipo de membranas, aún cuando la estructuración de estas dentro del organelo sea totalmente diferente.

GROSOR (nm)	% DE MEMBRANAS	
	NAR. VERDE	NAR. MADURA
5,6	34,4 \pm 0,5	23,9 \pm 0,5
8,0	38,9 \pm 1,24	39,8 \pm 1,4
10,4	26,7 \pm 0,36	36,3 \pm 0,4

Tabla 3.2.-III Membranas presentes en el P₃₉₁₀₀. El porcentaje de cada tipo de membrana se calculó de acuerdo a lo indicado en la sección 2.14.4.

La fracción P_{39100} contiene, además, una gran cantidad de pigmentos que aparecen como contaminantes en la preparación. Dichos pigmentos se pueden eliminar mediante una filtración disociativa en Sephadex G-25 (Sección 2.3.3.1.), previa solubilización del P_{39100} con el amortiguador en que se preparo el homogeneizado, precipitación entre 0 y 70% de saturación con sulfato de amonio y centrifugación a $10.000 \times g$ durante 10 minutos (Fig. 3.2.-4).

La fracción de membranas eluidas de la columna no presentaba contaminación con pigmentos, sin embargo, al ser observada al M.E. se encontro que algunas membranas adoptaban una forma de bastón. Este efecto era producido al precipitar con sulfato de amonio y no se revertía con la filtración (Fig. 3.2.-5).

Aún cuando este procedimiento eliminaba impurezas y colorantes, no resultó apropiado para purificar la fracción microsomal y obtener una posterior separación de los distintos tipos de membranas, debido a los cambios que se producian en éstas. El cambio de forma puede deberse a un proceso de exclusión de solvente del interior de las vesículas. Sin embargo, esto parece poco probable ya que las observaciones al M.E. muestran una membrana doble que no está formando vesículas. Otra posibilidad sería el que se hubiera producido una ruptura de la vesícula, quedando los extremos de la mem-

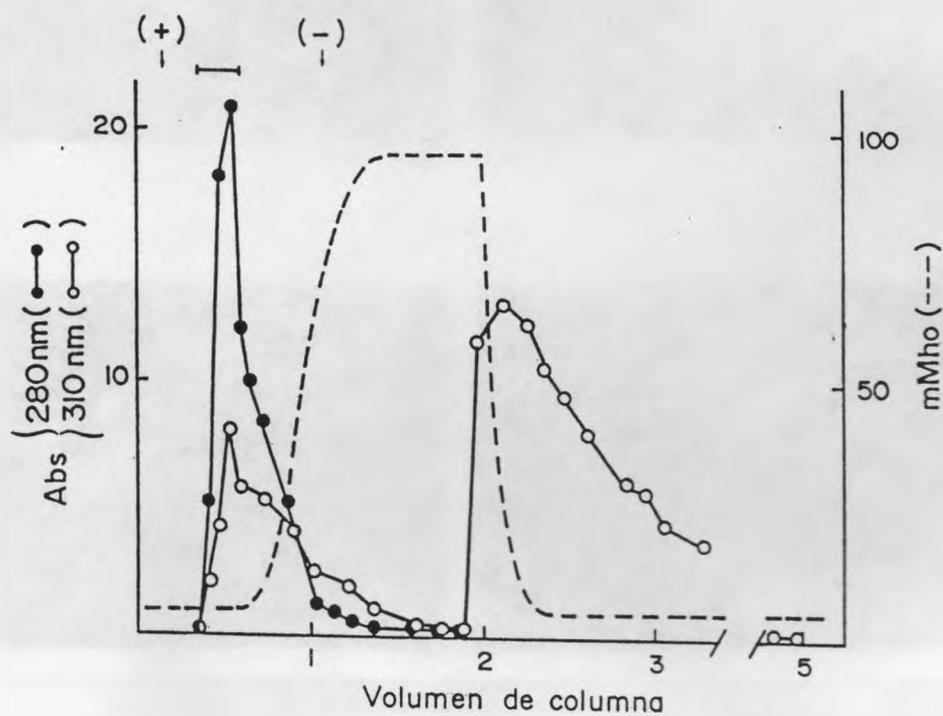


Figura 3.2.-4 Filtración disociativa en Sephadex G-25. La filtración se realizó de acuerdo a lo indicado en la sección 2.3.3.1. La fracción de proteínas usada como membranas está indicada por una barra horizontal sobre el perfil de elución de la columna.

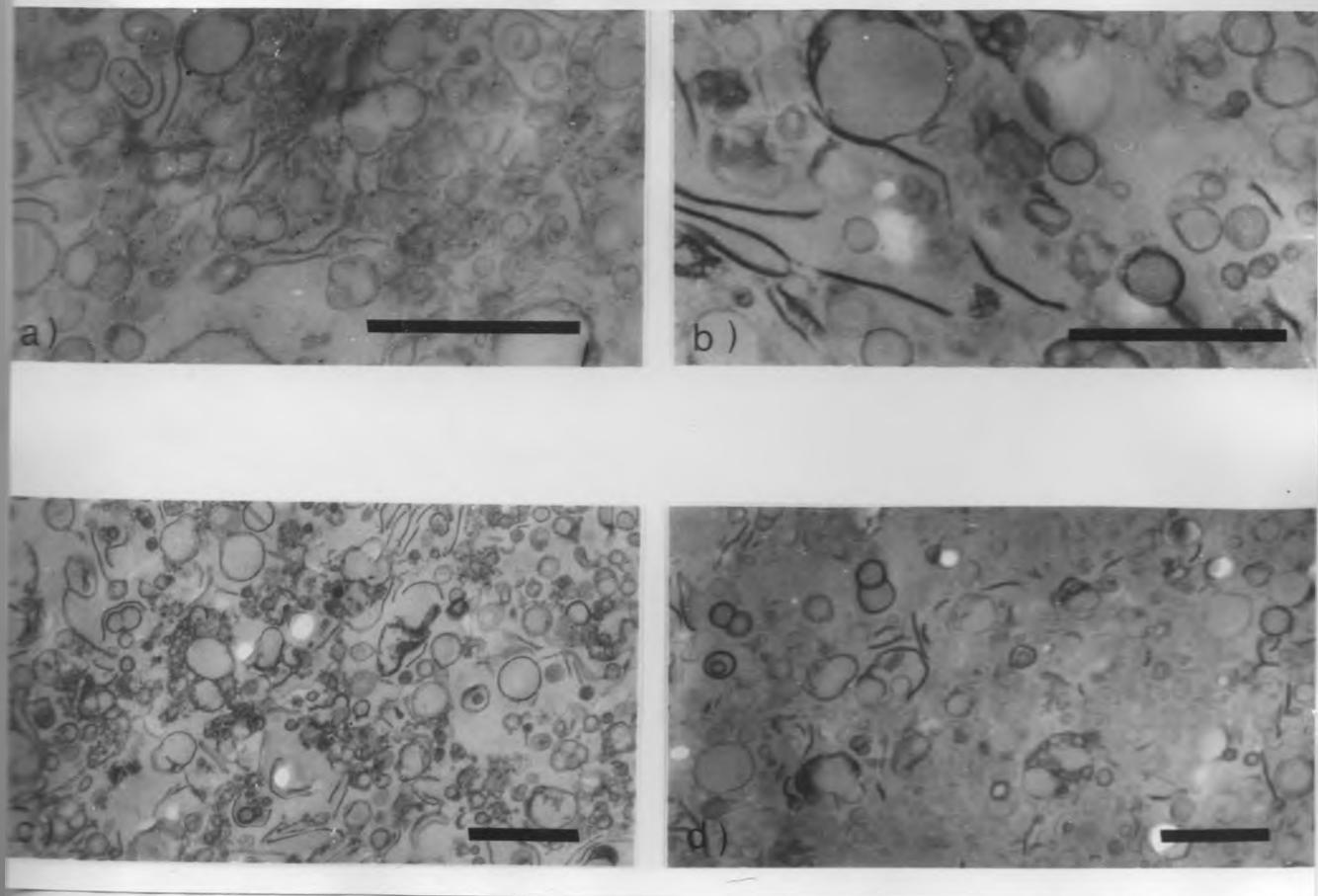


Figura 3.2.-5 Membranas obtenidas a partir de P_{39100} :
 a) Precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y teñidas con AcUO y Pb , b) Precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y teñidas con PTA/CrO_3 , c) Eluidas de Sephadex G-25 y teñidas con AcUO y Pb , d) Eluidas de Sephadex G-25 y teñidas con PTA/CrO_3 . Escala 0,5 μm .

brana en contacto con el solvente y que se hayan estabilizado en una forma semejante a una micela.

La observación al M.E. del S_{39100} mediante tinción negativa, mostró una estructuración de este sobrenadante (Fig. 3.2.-6a), la que se perdía al calentar a 100° por 10 minutos ó al tratar este S_{39100} con Tritón X-100 al 0,5% (Fig. 3.2.-6b). Estos hechos indican que las estructuras encontradas en el S_{39100} son agregados no covalentes. Su naturaleza proteica se confirmó al determinar la concentración de proteínas antes y después del tratamiento. El sobrenadante obtenido después de centrifugar el S_{39100} calentado o tratado con Tritón X-100, a $10.000 \times g$ durante 20 minutos, no contenía proteínas medibles por el método turbidimétrico ó con azul de Coomassie (sección 2.5.2.).

La estructuración observada puede deberse a vesículas muy pequeñas producidas en el proceso de homogenización, que no corresponderían a membrana plasmática o retículo endoplásmico, de acuerdo a la distribución de las enzimas marcadoras de dichos organelos. Dicha estructuración, por otra parte, puede corresponder a proteínas del citoesqueleto de la célula vegetal que no sedimentan en las condiciones del fraccionamiento, debido a su interacción con lípidos del tejido mismo o a su densidad; o bien a complejos proteicos de gran tamaño que pueden existir originalmente en la célula o que

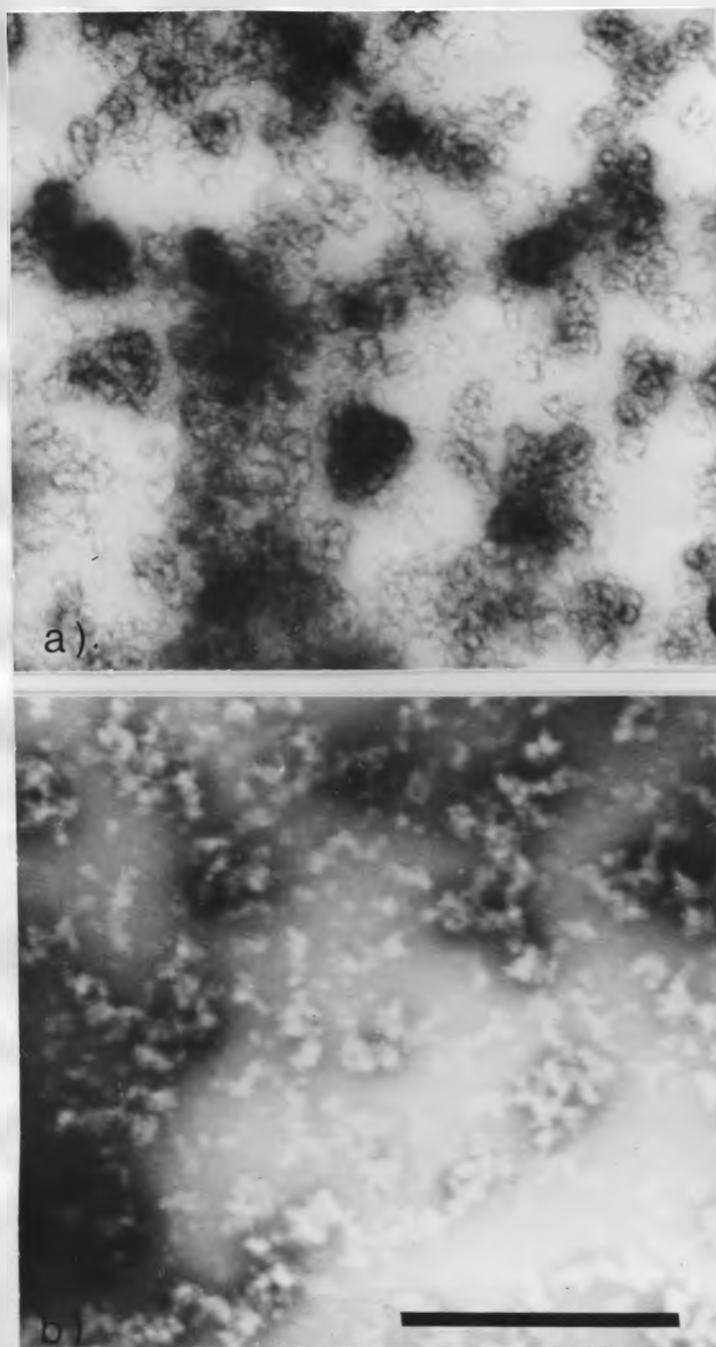


Figura 3.2.-6 S₃₉₁₀₀ observado al M.E. con tinción negativa.
a) S₃₉₁₀₀. b) S₃₉₁₀₀ desnaturado por calentamiento. Escala
0.5 μm

pueden formarse durante la homogenización del tejido.

3.2.3.4.- Membrana plasmática.

3.2.3.4.1.- Identificación de membrana plasmática.

Para determinar la presencia de membrana plasmática en las diferentes fracciones, (debido a que la actividad de la ATPasa-K⁺ es bastante baja) se decidió montar la tinción con PTA/CrO₃ descrita para otros sistemas como específica para membrana plasmática (Roland y col., 1972).

Cortes de tejido y la fracción P₃₉₁₀₀ previamente fijadas para M.E. (sección 2.14.) y que presentaban la actividad de ATPasa-K⁺ se trataron con HIO₄ y luego se tiñeron con PTA/CrO₃ (Sección 2.14.2.). Las Figs. 3.2.-7 y 3.2.-8 muestran la tinción de ciertas membranas en las preparaciones mencionadas permaneciendo el resto como "fantasmas". Las membranas que se teñían con PTA/CrO₃ eran solamente las de 10,4 nm de grosor.

3.2.3.4.2.- Separación de membrana plasmática en gradiente discontinuo de sacarosa

La fracción P₃₉₁₀₀ se disolvió en el amortiguador usado para el fraccionamiento subcelular, y se colocó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa preparado con el mismo amortiguador. Después de la centrifugación en las condiciones indicadas (Sección 2.4.3.1.), se tomaron cuidadosamente alícuotas desde la superficie del gradiente con pipeta

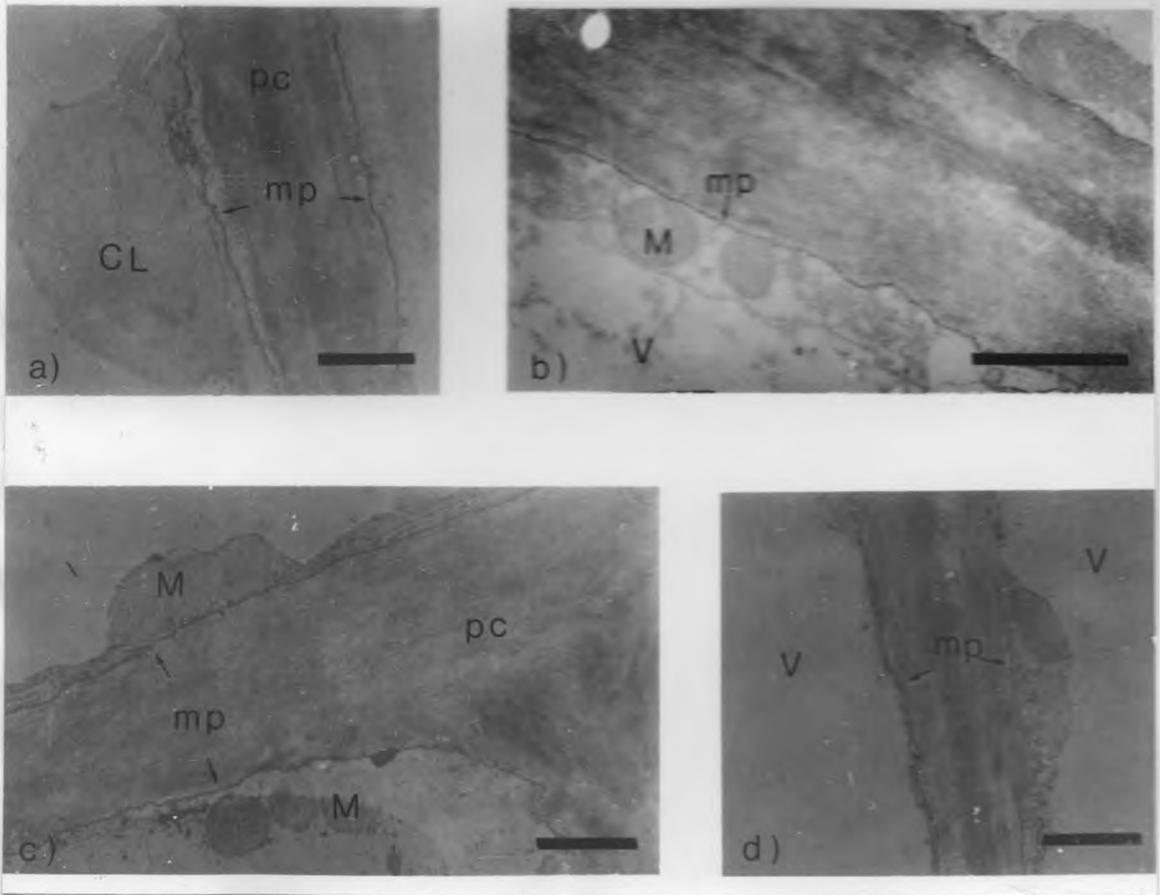


Figura 3.2.-7 Cortes de tejido teñidos con PTA/CrO₃. Solamente la membrana plasmática se encuentra teñida con este reactivo. Escala 1 μ m.

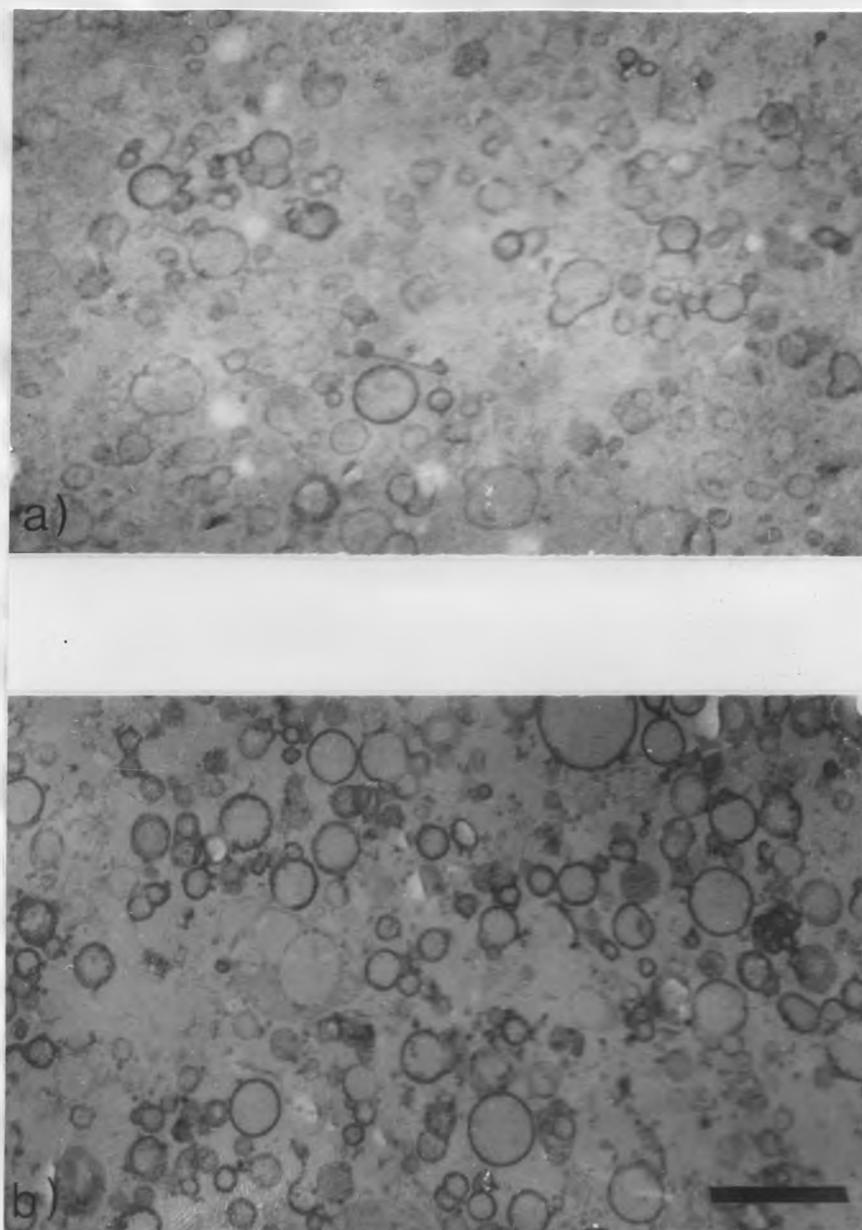


Figura 3.2.-8 Fracción P₃₉₁₀₀ teñida con PTA/CrO₃. Solamente se encuentran teñidas las membranas de 10 nm de grosor.
a) Teñidas durante 10 minutos. b) Teñidas durante 20 minutos.
Escala 0.5 μ m.

Pasteur. Se midió el volumen, la densidad (Sección 2.7.), la concentración de proteínas (sección 2.5.) y la actividad de ATPasa- K^+ y NADPH citocromo c reductasa (secciones 2.8.2.3. y 2.8.2.4.) en cada fracción. Los resultados se observan en las Fig. 3.2.-9 y 3.2.-10; donde la fracción que contenía toda la actividad de la ATPasa- K^+ , que se equilibró a una densidad de 1,08 g/ml, tienen membranas que se tiñen por igual con AcUO/Pb que con PTA/ CrO_3 . La actividad de NADPH citocromo c reductasa tiene una distribución diferente y se encuentra preferentemente en una fracción que se equilibró a una densidad de 1,12 g/ml. Estos resultados difieren de los publicados para este tipo de membranas de otros tejidos vegetales (Van der Woude y col., 1974; Helgersen y col., 1976; Williamson y col., 1975). Aún cuando se usó un procedimiento similar a los descritos, las membranas plasmática y del retículo endoplásmico se equilibraron en zonas de densidad más bajas, lo cuál sugiere que éstas también interactúan con los lípidos del flavedo de naranja. Centrifugaciones a tiempos más largos no modificaron la distribución de estas membranas en el gradiente.

La obtención de una fracción que contiene actividad de ATPasa- K^+ , que no contiene actividad de NADPH citocromo c reductasa, y cuya tinción con PTA/ CrO_3 es muy semejante a la obtenida con AcUO/Pb, sugiere que la membrana plasmática

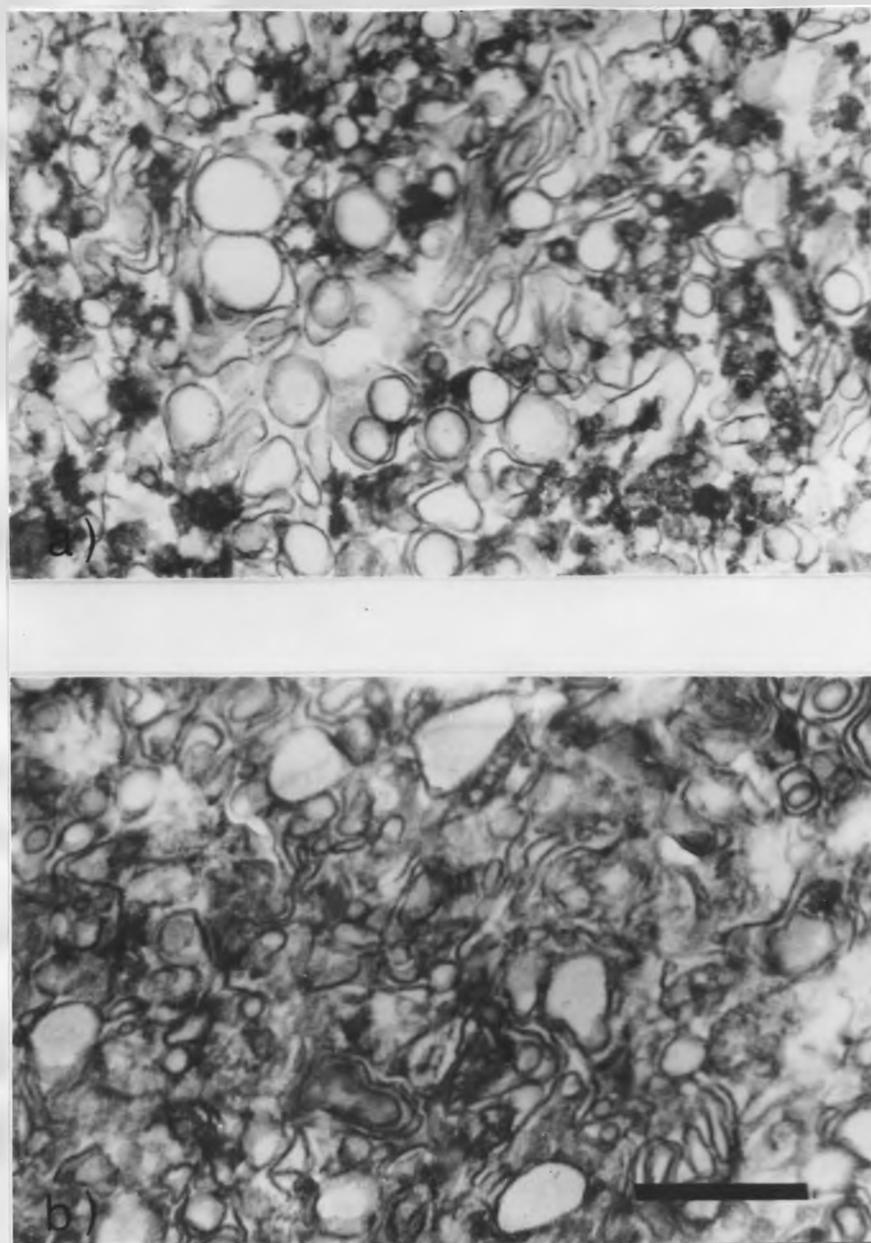


Figura 3.2.-9 Fracción obtenida de una gradiente discontinua de sacarosa a densidad 1.12 g/ml. a) Teñida con AcUO y Pb. b) Teñida con PTA/CrO₃. Escala 0,5 μ m.

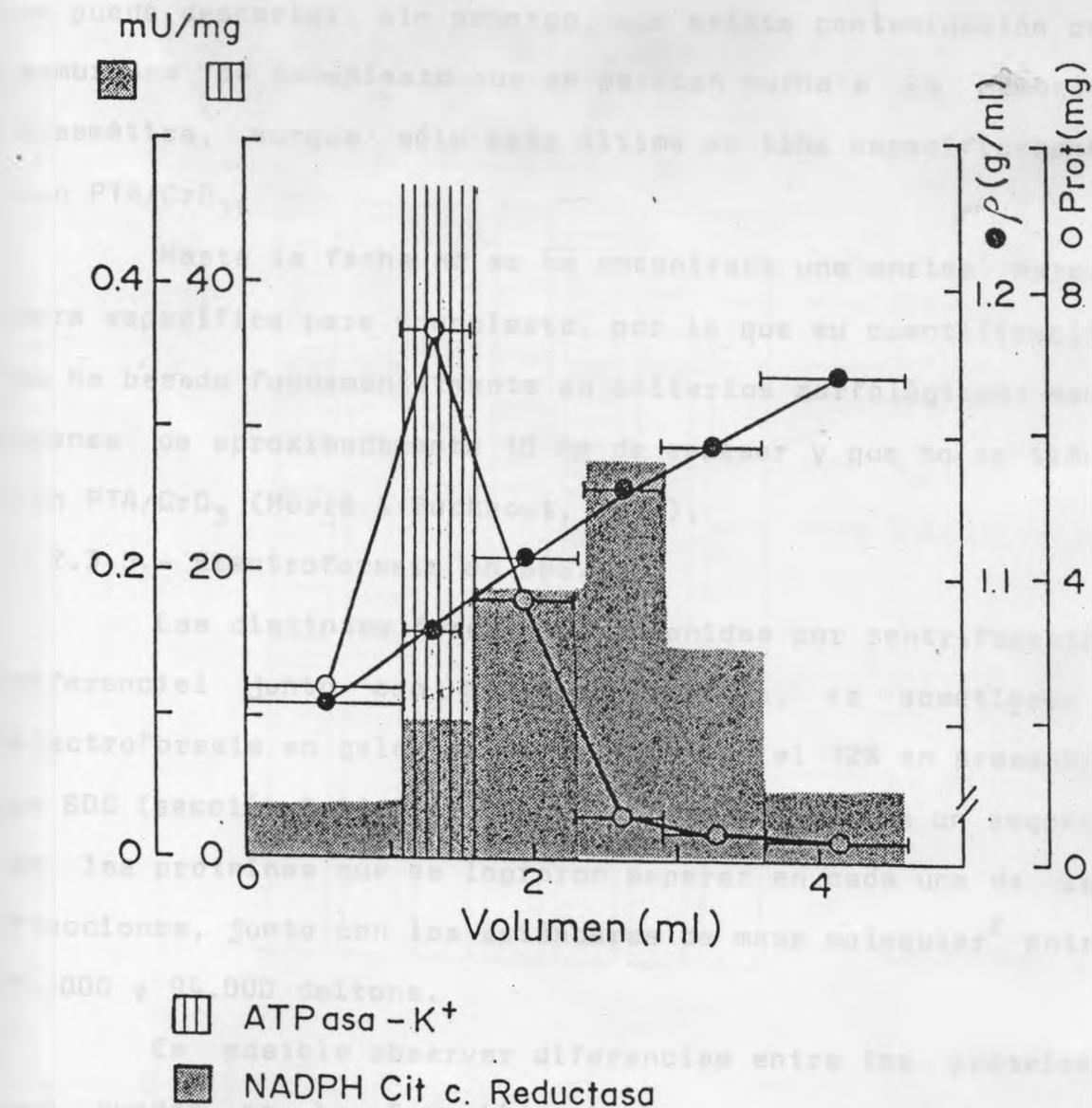


Figura 3.2.-10 Actividad de ATPasa-K⁺ en gradiente discontinuo de sacarosa. Recuperación de proteínas: 97,8%; recuperación de ATPasa: 87%; recuperación de NADPH citocromo c reductasa: 69%.

aislada en estas condiciones se encuentra bastante pura. No se puede descartar, sin embargo, que exista contaminación con membranas de tonoplasto que se parecen mucho a la membrana plasmática, aunque sólo esta última se tiñe específicamente con PTA/CrO₃.

Hasta la fecha no se ha encontrado una enzima marca-dora específica para tonoplasto, por lo que su cuantificación se ha basado fundamentalmente en criterios morfológicos: mem-branas de aproximadamente 10 nm de espesor y que no se tiñen con PTA/CrO₃ (Morré & Buckhout, 1979).

3.2.3.5.- Electroforesis en SDS.

Las distintas fracciones obtenidas por centrifugación diferencial junto con el homogeneizado, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS (sección 2.11.). La Fig. 3.2.-11 muestra un esquema de las proteínas que se lograron separar en cada una de las fracciones, junto con los estándares de masa molecular² entre 14.000 y 94.000 daltons.

Es posible observar diferencias entre las proteínas que quedan en la fracción soluble, con respecto a las

² Masa Molecular: 1 Dalton corresponde a 1/12 de la masa del átomo de ¹²C; de aquí que se use la nomenclatura kDa, etc. En forma alternativa se puede usar el término masa molar expresada como g/mol. (H.B.F. Dixon. 1983. TIBS 8, 49).

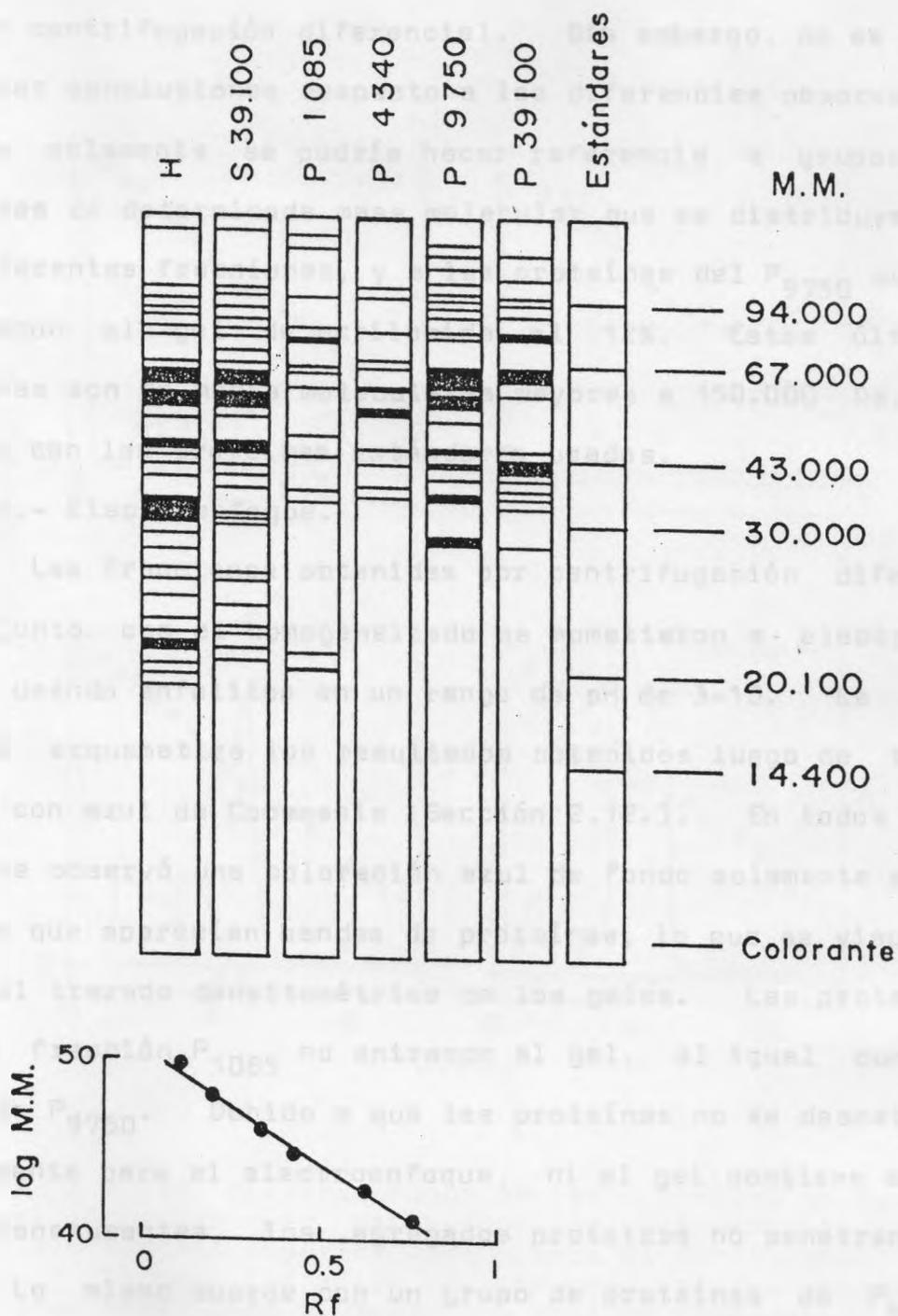


Figura 3.2.-11 Electroforesis en SDS de las proteínas de las diferentes fracciones obtenidas por centrifugación diferencial (Sección 2.4.2.), junto a estándares de masa molecular.

proteínas que sedimentan en las diferentes fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. Sin embargo, no se pueden sacar conclusiones respecto a las diferencias observadas, ya que solamente se podría hacer referencia a grupos de proteínas de determinada masa molecular que se distribuyen en las diferentes fracciones, y a las proteínas del P_{9750} que no penetraron al gel de acrilamida al 12%. Estas últimas proteínas son de masas moleculares mayores a 150.000 Da, de acuerdo con las proteínas estándares usadas.

3.2.3.6.- Electroenfoque.

Las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial junto con el homogeneizado se sometieron a electroenfoque usando anfólitos en un rango de pH de 3-10. La Fig. 3.2.-12 esquematiza los resultados obtenidos luego de teñir el gel con azul de Coomassie (Sección 2.12.). En todos los geles se observó una coloración azul de fondo solamente en la zona en que aparecían bandas de proteínas, lo que se visualiza en el trazado densitométrico de los geles. Las proteínas de la fracción P_{1085} no entraron al gel, al igual que la fracción P_{9750} . Debido a que las proteínas no se desnaturan previamente para el electroenfoque, ni el gel contiene agentes desnaturantes, los agregados proteicos no penetran al gel. Lo mismo sucede con un grupo de proteínas de P_{4340} , P_{39100} y S_{39100} .

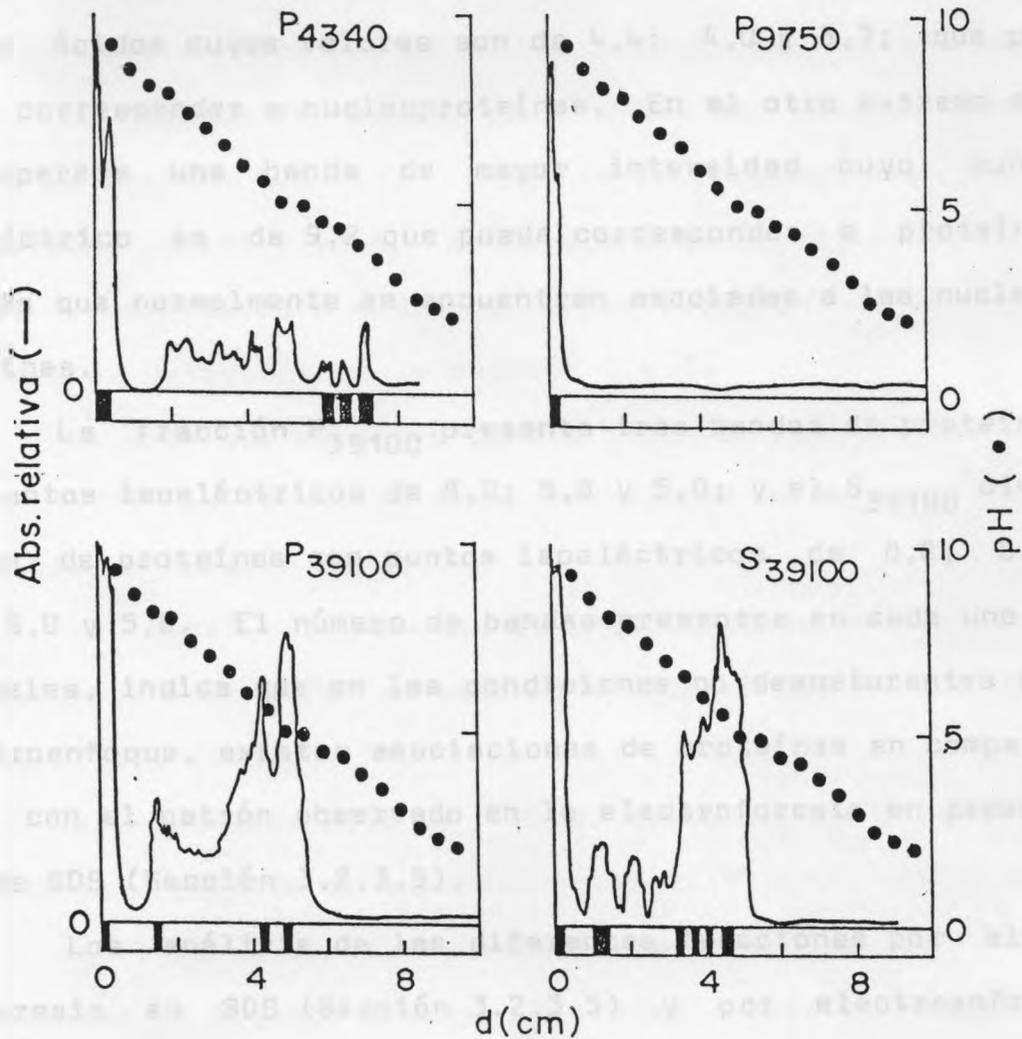


Figura 3.2.-12 Electroenfoque de las proteínas de las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial (Sección 2.4.2.). Trazado superior corresponde al densitograma de los geles. Esquema inferior corresponde a las bandas de proteínas observadas al teñir con azul de Coomassie.

El P_{4340} , que puede corresponder a una fracción nuclear por su sedimentación, presenta tres bandas de proteínas teñidas con azul de Coomassie, con puntos isoeléctricos ácidos cuyos valores son de 4,4; 4,0 y 3,7; que podrían corresponder a nucleoproteínas. En el otro extremo del gel aparece una banda de mayor intensidad cuyo punto isoeléctrico es de 9,2 que puede corresponder a proteínas básicas que normalmente se encuentran asociadas a las nucleoproteínas.

La fracción P_{39100} presenta tres bandas de proteínas con puntos isoeléctricos de 8,0; 5,8 y 5,0; y el S_{39100} cinco bandas de proteínas con puntos isoeléctricos de 8,2; 6,8; 6,4; 6,0 y 5,6. El número de bandas presentes en cada uno de los geles, indica que en las condiciones no desnaturantes del electroenfoque, existen asociaciones de proteínas en comparación con el patrón observado en la electroforesis en presencia de SDS (Sección 3.2.3.5).

Los análisis de las diferentes fracciones por electroforesis en SDS (Sección 3.2.3.5) y por electroenfoque (Sección 3.2.3.6) tuvieron como único objetivo establecer una comparación entre proteínas ó asociaciones de proteínas presentes en éstas; sin pretender sacar otras conclusiones de estos resultados.

3.2.3.7.- Incorporación de ^{14}C -MVA.

Para identificar la ó las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial, que podían transformar el ^{14}C -MVA a los distintos productos de la vía isoprénica, se incubaron cortes de flavedo de naranja con ^{14}C -MVA tal como se describió en la sección 2.8.1.1. Luego de la incubación y lavado exhaustivo de los cortes, se homogeneizó el tejido en forma manual y se fraccionó mediante centrifugación diferencial, tal como se describió en la sección 2.4.2.

Se sabe que en estas condiciones (George-Nascimento & Cori, 1971) la formación de hidrocarburos es escasa (menor que 0,05%) o nula.

Se midió directamente la radiactividad de cada fracción y luego se analizó de acuerdo a lo descrito en las secciones 2.9. y 2.10.

La incorporación de ^{14}C -MVA en el tejido entero fué de 0,4% con respecto al sustrato inicial (R-MVA), valor bastante superior al que se ha encontrado al incorporar ^{14}C -MVA en plantas u órganos enteros de otras especies vegetales (Banthorpe y col., 1972). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3.2.-IV. 0,78 del ^{14}C -MVA total incorporado se encuentra asociado a la fracción S_{39100} .

La aparición de un alto porcentaje de radiactividad en la fracción de lípidos libres concuerda con la alta acti-

	HOMOGEN.	P ₁₀₈₅	P ₄₃₄₀	P ₉₇₅₀	P ₃₉₁₀₀	S ₃₉₁₀₀	SUMA TODAS FRACC.
Lípidos libres	26,3	1,3	2,4	1,4	2,4	19,5	26,9
Alfílicos	4,9	0	0	0,2	0,02	3,7	3,9
Prenol fosfatos	8,7	0,2	0,3	0,2	0,4	8	9,1
Total	39,9	1,5	2,7	1,8	2,8	31,2	39,9
Fracción incorp.	1,00	0,038	0,068	0,045	0,07	0,782	1,00

Tabla 3.2.-IV Distribución de la radiactividad incorporada a partir de ^{14}C -MVA en las diferentes fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. La incorporación está expresada como fracción $\times 10^4$ a partir del 3R-MVA. (Ver Sección 2.8.1.1.)

vidad de fosfatasa que se ha encontrado en extractos de flavo de naranja (Pérez y col., 1980; sección 2.8.1.5.). Los lípidos libres contienen fundamentalmente prenoles solubles en hexano, productos de la hidrólisis de pirofosfatos alílicos ó IPP (Beytía y col., 1969), y no contienen derivados del MVA que son hidrosolubles. La fracción alílicos contiene prenoles reordenados, también solubles en hexano (Beytía y col., 1969), provenientes de hidrólisis ácida de los pirofosfatos alílicos productos de las reacciones enzimáticas. Una menor incorporación de ^{14}C -MVA en la fracción alílicos comparada con la de lípidos libres tanto en el S_{39100} como en otras fracciones, se debería principalmente a la alta actividad de las fosfatasa del medio, reflejadas en los lípidos libres. Por último, la fracción de prenoles fosforilados, que corresponde a todos los prenoles fosforilados o pirofosforilados, es decir, fosfatos alílicos más el IPP formado, presenta una mayor incorporación que la fracción de alílicos. Esto indica que la incorporación a IPP es mayor que la incorporación a pirofosfatos alílicos. El cociente alílicos/IPP es de 0,86, valor que se encuentra muy lejos del equilibrio para la reacción catalizada por la IPP isomerasa (Holloway, 1972); lo que indica que la actividad de esta enzima puede ser limitante, o bien que los alílicos se drenan más rápido y es por esto que se acumularía IPP. Si se consideran las di-

Los resultados de la Tabla 3.2.-IV indican que los productos formados, a partir de ^{14}C -MVA, interactúan poco ó no se forman en fracciones que contienen membranas. Experimentos similares realizados en Pinus pinaster (Gleizes y col., 1980), demostraron que toda la radiactividad incorporada a partir de ^{14}C -MVA, se encontraba asociada a la fracción microsomal.

Los resultados del fraccionamiento subcelular, indican que el método usado es el adecuado para obtener al menos tres fracciones claramente identificables: mitocondrial, microsomal y soluble. La distribución de enzimas marcadoras ha coincidido con las observaciones de ultraestructura, y se ha podido identificar a la membrana plasmática por medio de una tinción específica con PTA/CrO_3 . Los grupos de productos formados, a partir de ^{14}C -MVA, se encuentran casi exclusivamente en la fracción soluble, indicando que en estas preparaciones las enzimas encargadas de la transformación de este precursor, se encuentran también en esta misma fracción. No se puede descartar el metabolismo del ^{14}C -MVA en los plastidios, ya que no fué posible con la metódica usada, obtener estos organelos intactos.

3.3.- Actividades enzimáticas relacionadas con la biosíntesis de compuestos de estructura isoprénica.

3.3.1.- Actividad de IPP isomerasa y de Preniltransferasa.

Ambas actividades se midieron en todas las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial, con el fin de determinar si las enzimas responsables de la incorporación de ^{14}C -MVA a productos alílicos, se encontraban en la misma fracción que los productos de dicha incorporación (sección 3.2.3.7.). La Tabla 3.3.-I muestra la distribución de las actividades de IPP isomerasa y de Preniltransferasa en las fracciones mencionadas, y su recuperación. Ambas actividades se encontraron asociadas al S_{39100} y por el proceso de fraccionamiento se obtuvo una purificación de 11 veces con un 86% de rendimiento para la C_{15} preniltransferasa; y una purificación de 13 veces con un 105% de rendimiento para la IPP isomerasa. Esta última actividad medida en iguales condiciones que la preniltransferasa³ excepto por la omisión del pirofos-

³ Este control es indispensable hacerlo, ya que la medición de la actividad de las preniltransferasas se basa en la radiactividad presente en la fracción alílica. El producto de la reacción catalizada por la IPP isomerasa también es un pirofosfato alílico, que se cuantifica igual que los productos formados en la reacción de las preniltransferasas. Cuando la radiactividad en la fracción de alílicos, proveniente de ambos tipos de reacciones es igual, significa que solamente hay actividad de IPP isomerasa. En ensayos de preniltransferasa, se descuenta el valor correspondiente a la IPP isomerasa.

FRACCION	C ₁₅ PRENILTRANSFERASA		IPP ISOMERASA	
	pmoles/min/mg	%	pmoles/min/mg	%
Homogeneizado	49	100	32	100
P ₁₀₈₅	20,6	1,84	6,9	0,94
P ₄₃₄₀	27,3	0,2	0	0
P ₉₇₅₀	9,2	0,33	0	0
P ₃₉₁₀₀	39,4	1,53	11,3	0,38
S ₃₉₁₀₀	534,4	86	430	105

Tabla 3.3.-I Distribución subcelular de las actividades de la C₁₅ preniltransferasa e IPP isomerasa.

SUSTRATO	ACTIVIDAD ESPECIFICA (pmoles/min/mg)			
	- NAD ⁺		+NAD ⁺	
	LL	AA	LL	AA
¹⁴ C-IPP	7	295	10	480
¹⁴ C-IPP+DMAPP	15	1.772	16	1.870
¹⁴ C-IPP+GPP	13	2.309	14	2.420

Tabla 3.3.-II Actividad del sistema enzimático en presencia de diferentes sustratos y en ausencia o presencia de NAD⁺ agregado. Los LL representan la actividad de la fosfatasa del sistema enzimático y los AA las actividades de IPP isomerasa, C₁₀ y C₁₅ preniltransferasas.

fato alílico, no alteró su distribución subcelular y resultó ser de un 16% y de un 13% de las actividades de C_{10} y C_{15} preniltransferasas medidas solamente en el S_{39100} (Tabla 3.3.-II).

Los resultados indican que la preniltransferasa utiliza más eficientemente al GPP(C_{10}) que al DMAPP(C_5), y que la actividad de la IPP isomerasa al ser menor, no influye en dichas actividades. La actividad fosfatásica, medida en las condiciones de ensayo de estas dos enzimas como los lípidos libres formados, no alcanzan a interferir con las concentraciones de sustrato requeridas para obtener velocidades iniciales en el tiempo que dura el ensayo de la IPP isomerasa o de la preniltransferasa.

Al incubar un sistema enzimático de Citrus sinensis con IPP más GPP, se había observado formación de alcoholes de conformaciones E y Z (Chayet y col., 1973), los que se producirían a través de un mecanismo de isomerización redox involucrando actividades de deshidrogenasas y reductasas. Una observación semejante se había realizado en Pinus radiata (Jacob y col., 1972), y por lo tanto se estudió el efecto de NAD^+ en las actividades de las preniltransferasas y de la IPP isomerasa. Al incubar el S_{39100} en presencia de NAD^+ 1 mM, se encontró una activación de un 60% de la formación de alílicos a partir de ^{14}C -IPP, en condiciones de ensayo de la prenil-

transferasa; mientras que las actividades de C_{10} y C_{15} preniltransferasas no se modificaron (Tabla 3.3.-II). Además se observó un aumento de un 43% de los lípidos libres, de la reacción en que se usó solamente ^{14}C -IPP como sustrato, mientras que los lípidos libres de las reacciones de C_{10} y C_{15} preniltransferasas casi no se modificaron.

Los aldehídos que se pueden producir a través del mecanismo de isomerización redox, se extraen en la fracción de lípidos libres; por lo tanto, un efecto de NAD^+ sobre deshidrogenasas del sistema debiera observarse como un aumento de radiactividad en la fracción de lípidos libres.

El efecto de NAD^+ , solamente sobre la reacción de la IPP isomerasa puede deberse a una activación de las fosfatasas del medio que hidrolicen el IPP, lo que resulta poco comprensible; o bien que exista formación de alcoholes y aldehídos como productos de las reacciones catalizadas por enzimas que participen en el mecanismo de isomerización redox.

3.3.2.- Productos formados por el sistema enzimático a partir de diferentes sustratos.

Con el fin de establecer si se producía un aumento de la actividad de la fosfatasa o se estaban sintetizando intermediarios del mecanismo redox, se analizaron los productos formados por el sistema enzimático a partir de ^{14}C -IPP, ^{14}C -IPP más DMAPP y ^{14}C -IPP más GPP, en las condiciones de ensayo de la preniltransferasa. En todos los casos los productos de la reacción medidos como lípidos libres y analizados por placa reversa (sección 2.3.1.2.), correspondieron a sesquiterpenos (Tabla 3.3.-III).

Los lípidos libres reflejan en forma indirecta la actividad de la preniltransferasa, y al encontrar en esta fracción de productos solamente C_{15} , indica que la o las preniltransferasas del flavedo de Citrus sinensis drenan los sustratos hasta sesquiterpenoles, sin formar intermediarios libres de 10 átomos de carbono. Si estos intermediarios se liberaran al medio deberían haberse observado en las reacciones en que la incubación se realizó con IPP y con IPP más DMAPP.

Al analizar los C_{15} presentes en los lípidos libres en relación a su conformación (sección 2.3.1.3.), se encontró que el cociente de productos Z/productos E dependía del sustrato usado, y que estos productos correspondían exclusi-

SUSTRATO	PRODUCTOS	Z-FOH/E-FOH	
		LL	PP
^{14}C -IPP	C_{15}	1,19	0,066
^{14}C -IPP+DMAPP	C_{15}	0,60	0,062
^{14}C -IPP+GPP	C_{15}	0,40	0,07

Tabla 3.3.-III Productos formados y cociente Z-farnesol/E-farnesol, en las reacciones de IPP isomerasa C_{10} , y C_{15} preniltransferasas. (Ver Secciones 2.8.1.2. y 2.8.1.3.)

vamente a farnesoles. Tampoco se observó formación de aldehidos (Tabla 3.3.-III). El sistema enzimático forma una mayor proporción de Z-farnesol, cuando el sustrato usado es solamente IPP, que cuando se usa IPP más GPP que es la reacción que forma directamente sesquiterpenos.

La formación de Z-farnesol se estudió en las diferentes fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. encontrándose que tanto la formación de Z-farnesol como las actividades de la IPP isomerasa y la preniltransferasa se encontraban exclusivamente en la fracción S_{39100} (Fig.3.3.-1).

La formación de ambos sesquiterpenoles (E y Z) puede producirse por hidrólisis de los correspondientes pirofosfatos, sintetizados estereoespecíficamente; o bien, el producto Z formarse a través del mecanismo de isomerización redox. Los pirofosfatos alílicos formados durante la reacción, medidos como prenol fosfatos y analizados de acuerdo a largo de cadena (sección 2.3.1.2.) y conformación (sección 2.3.1.3.), correspondieron solamente a E-FPP (Tabla 3.3.-III). Estos resultados fueron confirmados por GLC (Sección 2.3.2.), en que se analizaron los lípidos libres y prenolfosfatos de cada una de las reacciones (Fig.3.3.-2).

Los resultados sugieren que la formación de Z-farnesol en la fracción S_{39100} se realiza a través de un mecanismo de isomerización, aún cuando no se detectaron aldehidos como

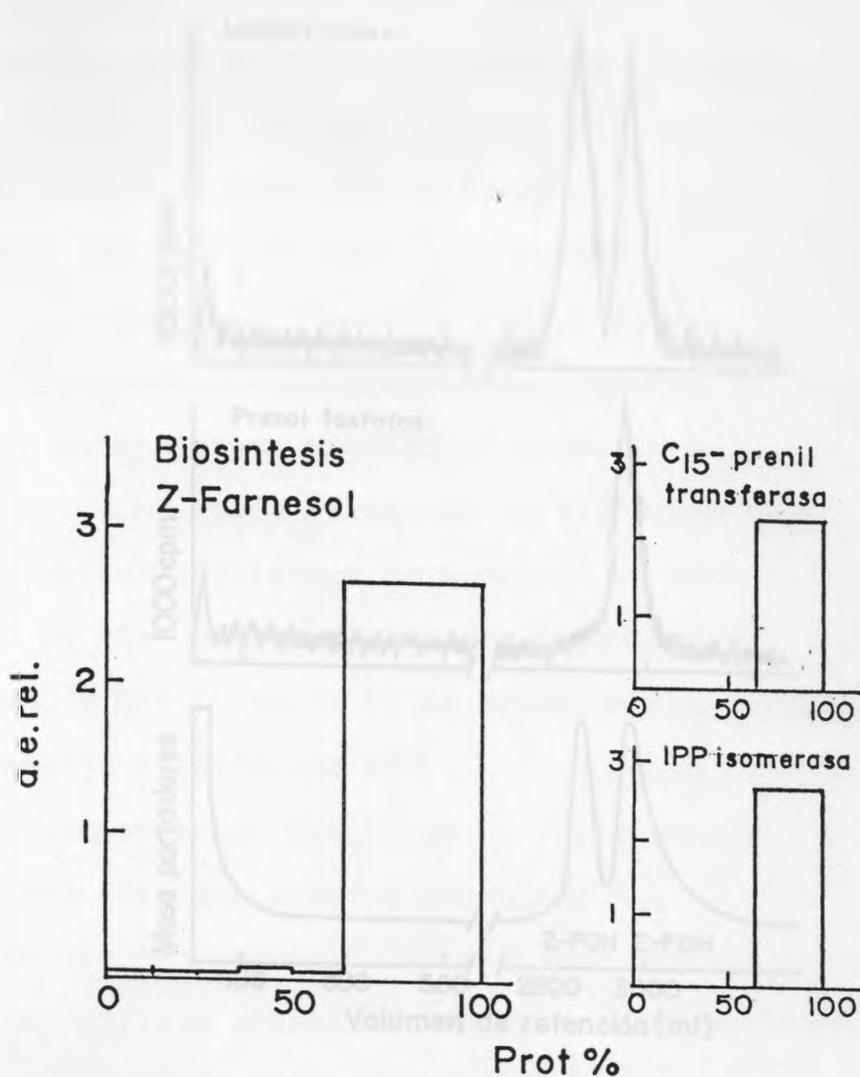


Figura 3.3.1. Distribución subcelular del sistema enzimático que biosintetiza Z-farnesol, de C¹⁵ Prenil-transferasa e IPP isomerasa. (Ver Secciones 2.8.1.2., 2.8.1.3. y 2.8.1.4.)

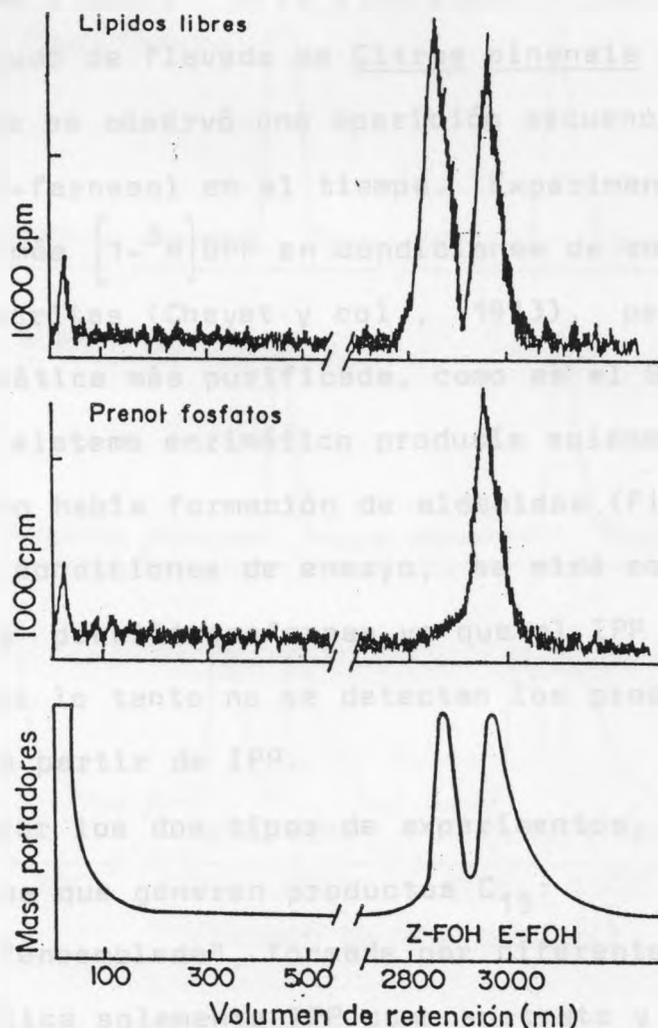


Figura 3.3.2. Análisis por GLC de los productos formados por el sistema enzimático a partir de ^{14}C -IPP. La reacción se realizó a 37° durante 3 horas en un medio que contenía amortiguador de K-Pi 100 mM pH 7.4; MgCl_2 6 mM, 2-mercaptoetanol 20 mM, $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -IPP 50 μM (Rad. espec. $4,25 \times 10^6$ dpm/ μmol) y 0,03 mg de proteínas (S_{39100}) en un volumen final de 0,25 ml. Los LL se extrajeron directamente en hexano (0,5 ml). La fase acuosa remanente se hidrolizó con fosfatasa alcalina de intestino de ternera a 37° durante 2 horas. Los PP se extrajeron directamente con 0,5 ml de hexano. Los LL y PP se analizaron por GLC de acuerdo a lo señalado en la sección 2.3.2.

intermediarios. Estos resultados son semejantes a los de Pinus radiata (Jacob y col., 1972) y difieren de los obtenidos en un extracto crudo de flavedo de Citrus sinensis (Chayet y col., 1973) en que se observó una aparición secuencial de los aldehidos y del Z-farnesol en el tiempo. Experimentos realizados usando IPP más $[1-^3\text{H}]$ GPP en condiciones de ensayo semejantes a las descritas (Chayet y col., 1973), pero con una preparación enzimática más purificada, como es el S₃₉₁₀₀, indicaron que este sistema enzimático producía solamente E-FPP y E-farnesol, y no había formación de aldehidos (Fig.3.3.-3).

En estas condiciones de ensayo, se mide solamente la actividad de la preniltransferasa ya que el IPP usado no tiene marca, y por lo tanto no se detectan los productos formados solamente a partir de IPP.

Al comparar los dos tipos de experimentos, se puede pensar en dos vías que generen productos C₁₅:

- a) Una vía "ensamblada", formada por diferentes enzimas, que utilice solamente IPP como sustrato y que forme como producto final Z-farnesol, y
- b) Una vía que isomericice IPP, pero que además acepte DMAPP o GPP libres para condensarlos con IPP, y que produzca solo FPP, el cuál puede ser hidrolizado por fosfatasas del medio.

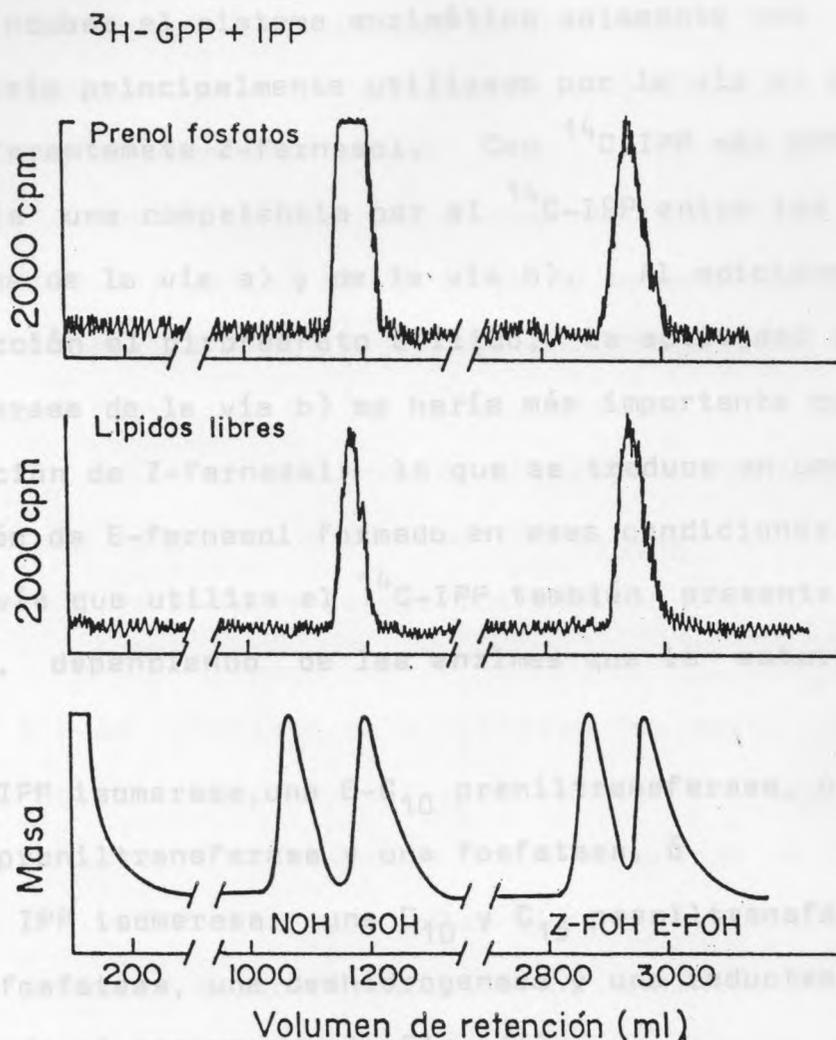


Figura 3.3.3. Análisis por GLC de los productos formados por el sistema enzimático a partir de ^3H -GPP + IPP. La reacción se realizó a 37° durante 3 horas en un medio semejante al de la Figura 3.3.2. usando $[1-^3\text{H}]\text{-GPP}$ $10\ \mu\text{M}$ (Rad. esp. $2,9 \times 10^7$ dpm/ μmol) e IPP $50\ \mu\text{M}$; y los LL y PP se obtuvieron y se analizaron de igual forma. La radiactividad asociada a GOH, tanto en LL como en PP, corresponde al sustrato hidrolizado por fosfatasas del medio (LL), o por la fosfatasa alcalina agregada al medio de reacción para analizar los PP formados.

Al incubar el sistema enzimático solamente con ^{14}C -IPP, este sería principalmente utilizado por la vía a) obteniéndose preferentemente Z-farnesol. Con ^{14}C -IPP más DMAPP o GPP existiría una competencia por el ^{14}C -IPP entre las dos IPP isomerasas de la vía a) y de la vía b). Al adicionar al medio de reacción el pirofosfato alílico, la actividad de la preniltransferasa de la vía b) se haría más importante que la vía de formación de Z-farnesol; lo que se traduce en una mayor proporción de E-farnesol formado en esas condiciones.

La vía que utiliza el ^{14}C -IPP también presenta dos alternativas, dependiendo de las enzimas que la estuvieran formando:

- a₁) Una IPP isomerasa, una E-C₁₀ preniltransferasa, una Z-C₁₅ preniltransferasa y una fosfatasa, ó
- b₁) Una IPP isomerasa, una C₁₀ y C₁₅ preniltransferasa, una fosfatasa, una deshidrogenasa y una reductasa, de acuerdo al esquema de la Fig. 1.7.

En ambos casos el producto final sería el Z-farnesol, y cada vía podría estar formada por enzimas independientes o por enzimas que interactuen entre si formando un complejo polienzimático.

Para establecer evidencias que apoyen o descarten las vías propuestas y la interacción entre diferentes proteínas,

se estudiaron además las actividades de fosfatasa y de deshidrogenasa, usando sustratos de estructura isoprénica.

3.3.3. Actividad de prenilfosfatasa.

La actividad de la prenilfosfatasa se midió a pH 6,0 (sección 2.8.1.5.) y en las condiciones de ensayo de la preniltransferasa (sección 2.8.1.3.). La actividad medida a pH 6,0 es siempre mayor que en las condiciones de la preniltransferasa. En ambas condiciones de ensayo, la fosfatasa se encontró asociada solamente a la fracción S_{39100} , para todos los sustratos de estructura isoprénica medidos (Tabla 3.3.-IV).

A pH 6,0 la velocidad de hidrólisis fue mayor para el E-FPP seguido por los monoterpenil pirofosfatos y finalmente el IPP. No se observó diferencias en la velocidad de hidrólisis entre NPP y GPP, lo que indica que la fosfatasa del sistema no presenta especificidad por la conformación del sustrato, sino por el largo de cadena, lo que coincide con lo descrito en preparaciones de polvo cetónico de Citrus sinensis (Pérez y col., 1980).

Los productos formados fueron solamente los alcoholes primarios de los respectivos sustratos usados, los que se analizaron por GLC (sección 2.3.1.2.) y por TLC (sección 2.3.1.3.).



SUSTRATO	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmoles/min/mg)	
	pH 7,4	pH 6,0
^{14}C -IPP	0,04	0,3
^3H -GPP	1,5	3,4
^3H -NPP	1,48	3,4
^3H -FPP	0,98	16,3

Tabla 3.3.-IV Actividad de la fosfatasa del S_{39100} en presencia de diferentes sustratos.



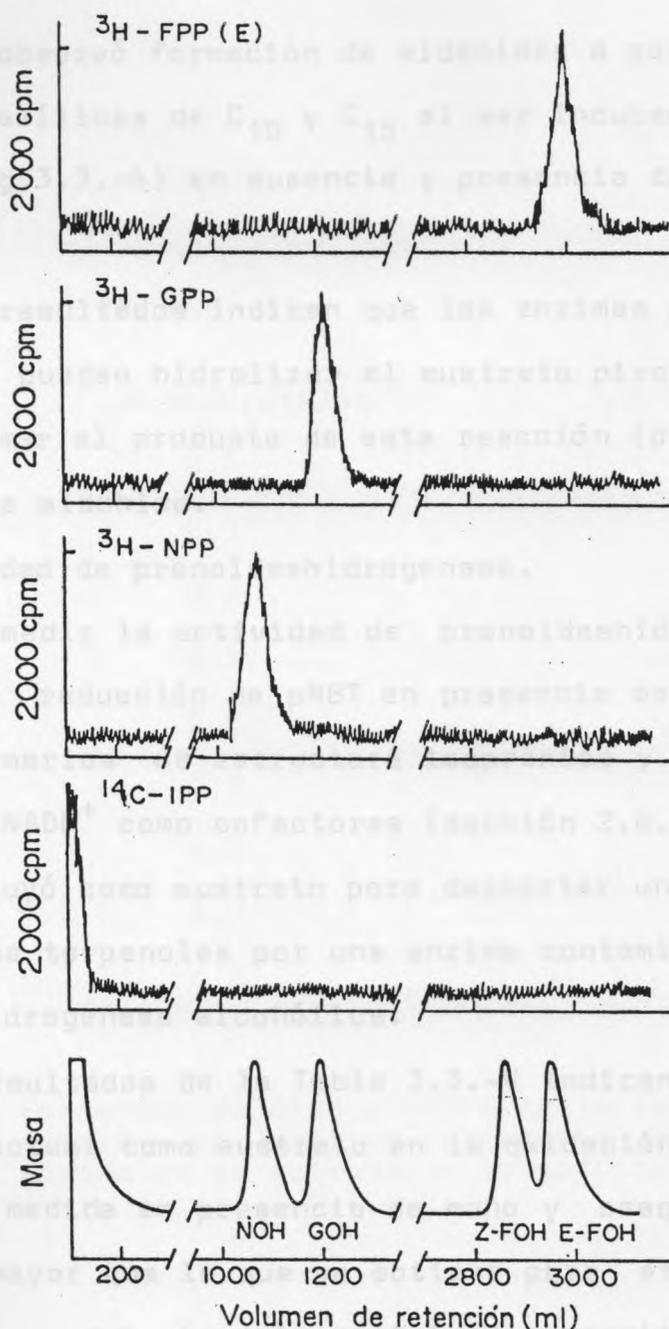


Figura 3.3.4. Análisis por GLC de los productos formados por las fosfatases.

La reacción se realizó a 37° durante 1 hora en un medio que contenía amortiguador de succinato de sodio 100 mM pH 6,0, sustrato 0,2 mM y 0,03 mg de proteínas (S_{39100}) en un volumen final de 0,5 ml. Los productos de la reacción se extrajeron directamente con 0,5 ml de hexano y se analizaron por GLC de acuerdo a lo indicado en la sección 2.4.2.

No se observó formación de aldehídos a partir de los pirofosfatos alílicos de C₁₀ y C₁₅ al ser incubados a pH 6,0 y a pH 7,4 (Fig.3.3.-4) en ausencia y presencia de NAD⁺ 1 mM agregado.

Estos resultados indican que las enzimas presentes en el S₃₉₁₀₀ sólo pueden hidrolizar al sustrato pirofosforilado, y no transformar al producto de esta reacción (prenol) en su correspondiente aldehído.

3.3.4.- Actividad de prenoldeshidrogenasa.

Para medir la actividad de prenoldeshidrogenasa se cuantificó la reducción de pNBT en presencia de diferentes alcoholes primarios de estructura isoprénica y de etanol, usando NAD⁺ ó NADP⁺ como cofactores (sección 2.8.1.6.2.). El etanol se incluyó como sustrato para descartar una deshidrogenación de los terpenoles por una enzima contaminante, como sería la deshidrogenasa alcohólica.

Los resultados de la Tabla 3.3.-V indican que sólo el NAD⁺ puede actuar como sustrato en la oxidación de etanol. La actividad medida en presencia de mono y sesquiterpenoles primarios es mayor que la que se obtiene para etanol. Esta actividad no se debería a la actividad concomitante de una deshidrogenasa alcohólica específica para NAD⁺ y no para el alcohol (Dickinson & Dalziel, 1967) ya que en presencia de NADP⁺ sólo se obtuvo actividad con alcoholes primarios alílicos, y no con etanol.

SUSTRATO	μM NADH/min/mg	μM NADPH/min/mg
2E-farnesol	8,4	8,4
2Z-farnesol	8,3	8,3
Nerolidol	0,0	0,0
Geraniol	5,3	2,3
Nerol	5,2	2,3
Linalol	0,0	0,0
Terpineol	0,0	0,0
Isopentenol	0,0	0,0
Etanol	4,2	0,0

Tabla 3.3.-V Formación de NADH y NADPH en la reacción de reducción de pNBT en presencia de diferentes alcoholes de estructura isoprénica y de etanol. (Ver Sección 2.8.1.6.2.)

La velocidad de reducción de pNBT fué mayor para los sesquiterpenoles, y no se observaron diferencias de velocidad en relación a la conformación de los sustratos.

Se probaron además como sustratos alcoholes terciarios de 10 y 15 átomos de carbono, los cuales fueron inefectivos y sirvieron para descartar un efecto de cambio de polaridad del medio que pudiera afectar la reducción del pNBT ó una interacción proteína-pNBT-grupo hidrofóbico hidroxilado. Se ha determinado que cambios en la polaridad del solvente, producen cambios en el coeficiente de extinción del pNBT (Ricardo Farías, comunicación personal), lo cuál se había descartado al usar los alcoholes terciarios.

Al medio de reacción que reducía pNBT en presencia de mono- o sesquiterpenoles primarios, se agregó hexano para extraer el sustrato remanente y los productos de la reacción solubles en este solvente.

La fase hexánica se analizó directamente por TLC (sección 2.3.1.1.2.), ó se derivatizó con 2,4-dinitrofenilhidrazina (sección 2.10.1.) para ser analizada posteriormente por TLC (sección 2.3.1.1.3.).

Los resultados de ambos análisis indicaron que no se habían formado aldehidos u otros compuestos carbonílicos, a pesar de haberse producido reducción de pNBT (Fig. 3.3.-5).

Para corroborar el resultado anterior, se usaron

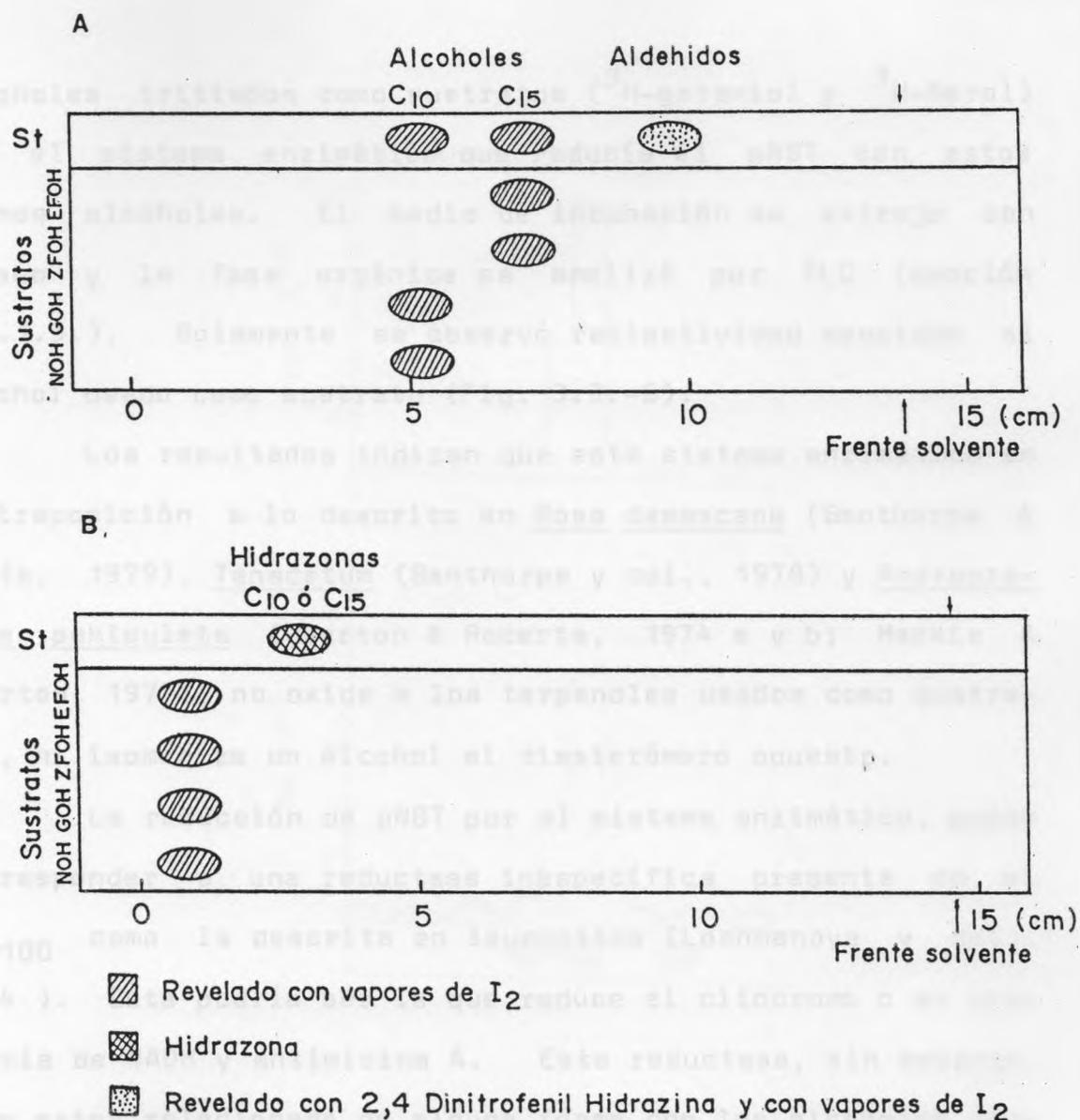


Figura 3.3.5. Análisis por TLC de los productos formados por la preoxidación.

a) Solvente de desarrollo: cloroformo puro

b) Solvente de desarrollo: benceno: éter de petróleo = 7,5:2,5.

La reacción se realizó a 30° durante 30 minutos en un medio que contenía amortiguador TRIS-HCl 100 mM pH 7,4 ; 0,5 ml de reactivo pNBT, NADP⁺ 0,16 mM, 0,05% de sustrato (ROH) y 0,5 mg de proteínas en un volumen de 3 ml. Los productos de la reacción se extrajeron directamente con 0,5 ml de hexano y se analizaron por TLC (Sección 2.3.1.1.2.) ó previa derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina (Sección 2.10.1. y sección 2.3.1.1.3.).

alcoholes tritiados como sustratos (^3H -geraniol y ^3H -Nerol) con el sistema enzimático que reducía el pNBT con estos mismos alcoholes. El medio de incubación se extrajo con hexano y la fase orgánica se analizó por TLC (sección 2.3.1.3.). Solamente se observó radiactividad asociada al alcohol usado como sustrato (Fig. 3.3.-6).

Los resultados indican que este sistema enzimático en contraposición a lo descrito en Rosa damascena (Banthorpe & Poots, 1979), Tanacetum (Banthorpe y col., 1978) y Andrographis paniculata (Overton & Roberts, 1974 a y b; Mackie & Overton, 1977), no oxida a los terpenoles usados como sustratos, ni isomeriza un alcohol al diasterómero opuesto.

La reducción de pNBT por el sistema enzimático, puede corresponder a una reductasa inespecífica presente en el S₃₉₁₀₀ como la descrita en leucocitos (Lochmanova y col., 1984). Esta podría ser la que reduce el citocromo c en presencia de NADH y antimicina A. Esta reductasa, sin embargo, debe estar relacionada de alguna forma con los alcoholes usados como sustratos (Tabla 3.3.-V), ya que descartado un efecto no enzimático relacionado con la polaridad del solvente en la reducción de pNBT, es clara la mayor velocidad de reacción con los alcoholes primarios C₁₅.

Otra posibilidad que no se puede descartar por ahora, es la transformación de los alcoholes a derivados hidrosolu-

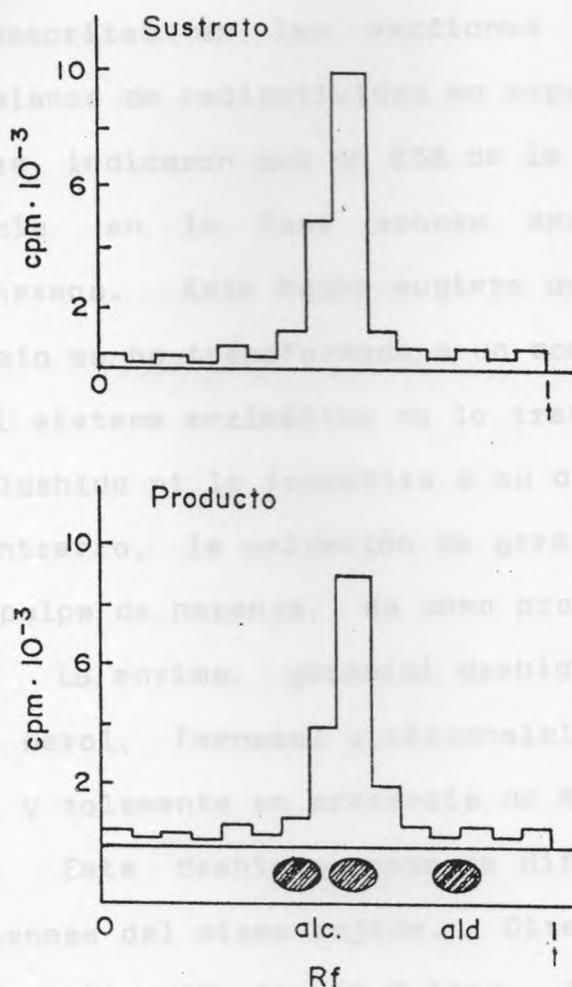


Figura 3.3.6. Análisis por TLC de los productos formados por la preoldeshidrogenasa a partir de sustratos radiactivos.

La reacción se realizó a 37° durante 30 minutos en un medio que contenía amortiguador K-Pi 50 mM pH 7,85; MgCl₂ 5 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM y ³H-Alcohol 0,1₂ mM y 0,25 mg de proteínas (S₃₉₁₀₀) en un volumen final de 0,5 ml. Los productos de la reacción se extrajeron directamente con 0,5 ml de hexano y se analizaron por TLC de acuerdo a lo indicado en la sección 2.3.1.3.

bles y que por este motivo no hayan sido identificados por las técnicas descritas en las secciones 2.3.1.1.2 y 2.3.1.1.3. El balance de radiactividad en experimentos con alcoholes tritiados, indicaron que un 25% de la radiactividad inicial permanecía en la fase acuosa después de 4 extracciones con hexano. Este hecho sugiere que el alcohol usado como sustrato se ha transformado a un compuesto hidrosoluble; y que el sistema enzimático no lo transforma en el correspondiente aldehído ni lo isomeriza a su diasterómero.

Por el contrario, la oxidación de geraniol por enzimas obtenidas de pulpa de naranja, da como producto exclusivamente geranial. La enzima, geraniol deshidrogenasa, también puede oxidar nerol, farnesol y citronelol, pero a velocidades menores y solamente en presencia de NADP^+ (Potty & Bruemmer, 1970). Esta deshidrogenasa es diferente de la alcohol deshidrogenasa del mismo tejido. Otras monoterpenol deshidrogenasas descritas (Croteau & Felton, 1980), también son diferentes de la deshidrogenasa alcohólica, y son específicas para determinados monoterpenoles como el fenchol y el tujanol.

Con el sistema enzimático de Citrus sinensis, no se pudo medir actividad en el sentido de la reducción de prenilaldehídos ya que no se obtuvo oxidación de NADH ni aparición de alcoholes.

3.3.5.- Filtración por Sepharose-2B del S₃₉₁₀₀

Los resultados obtenidos de la observación al M.E. del S₃₉₁₀₀ mediante tinción negativa (sección 2.14.3.); junto con los datos de biosíntesis de Z-farnesol (sección 3.3.2.), y antecedentes que existían sobre la masa molecular de la preniltransferasa, preparada a partir de polvo cetónico de flavedo de Citrus sinensis (de la Fuente, 1976); indicaron que el estudio del comportamiento del S₃₉₁₀₀ al ser filtrado por una columna de Sefarosa-2B, podría señalar algunas características de las proteínas que catalizan algunas etapas en la biosíntesis de isoprenoides.

El S₃₉₁₀₀ se filtró por una columna de Sefarosa-2B calibrada con proteínas estándares de masa molecular conocida, en las condiciones señaladas en la sección 2.3.3.2.

El perfil de elución de la columna indica que se produce una disociación entre dos formas de preniltransferasa, las que emergen de la columna en un volumen equivalente a masas moleculares de 462.000 y 95.500 Da (Fig. 3.3.-7).

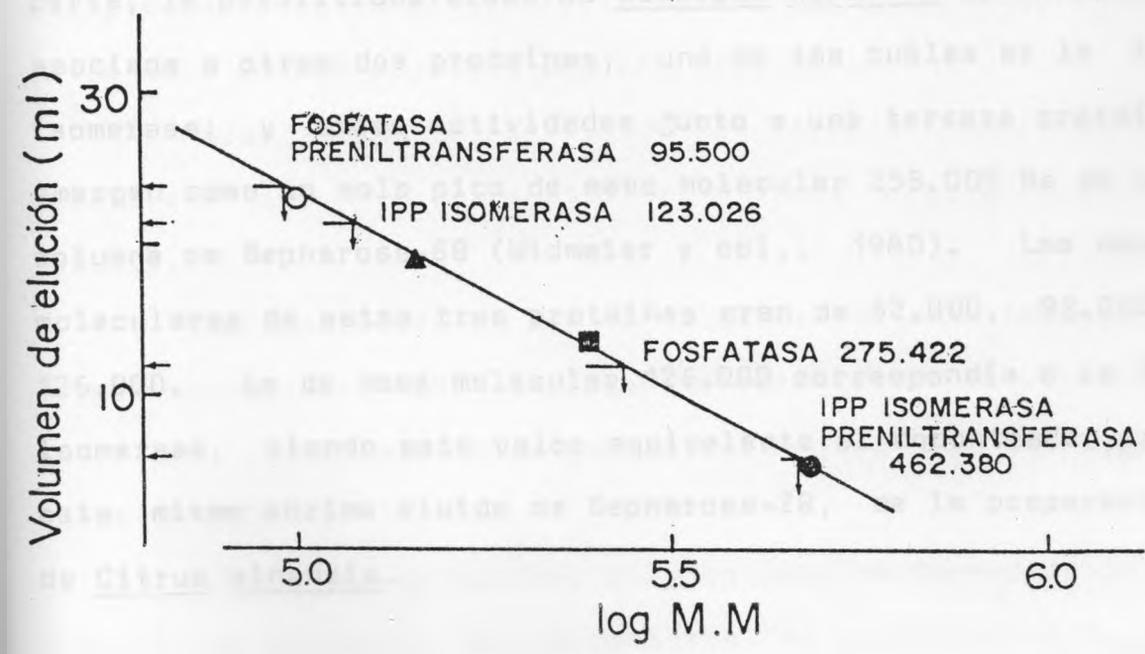
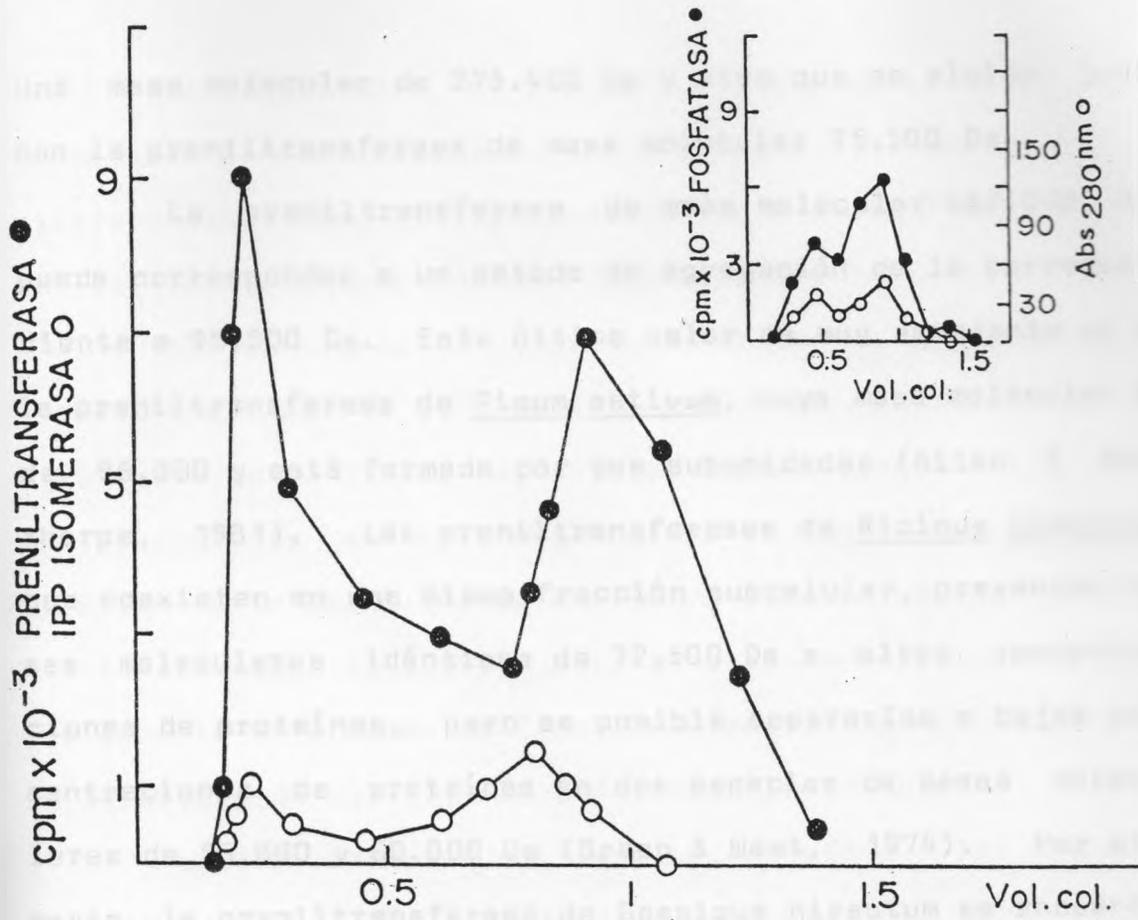
La actividad de IPP isomerasa también se encuentra disociada en dos formas: una que coeluye con la preniltransferasa de 462.000 Da y otra que eluye desfasada de la de 95.500 Da con un volumen equivalente a una masa molecular de 123.000 Da. Las fosfatasas del sistema se distribuyen en dos fracciones: una que eluye con un volumen es correspondiente a



Figura 3.3.7. Filtración en Sepharose 2B del S₃₉₁₀₀.

Se aplicaron 9 mg de proteínas del S₃₉₁₀₀ a una columna de Sefarosa 2B preparada según lo indicado en la sección 2.3.3.2., y se eluyeron con amortiguador K-Pi 100 mM pH 7,4 que contenía 2-mercaptoetanol 5 mM. En el eluido se determinó A₂₈₀, actividad de IPP isomerasa (sección 2.8.1.2.) y de preniltransferasa (Sección 2.8.1.3.). La actividad de fosfatasa corresponde a los LL del ensayo de la preniltransferasa. Se midieron proteínas por el método del azul de Coomassie (Sección 2.5.2.) a las fracciones que contenían las actividades enzimáticas mencionadas.

La columna se calibró usando ● apoferritina(480K), ■ catalasa(250K), ▲ gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa(144K) y ○ hexoquinasa(100K), (2 mg de cada una), las que se eluyeron en condiciones idénticas a las mencionadas anteriormente.



una masa molecular de 275.400 Da y otra que es eluída junto con la preniltransferasa de masa molecular 95.500 Da.

La preniltransferasa de masa molecular 462.000 Da, puede corresponder a un estado de agregación de la correspondiente a 95.500 Da. Este último valor es muy semejante al de la preniltransferasa de Pisum sativum, cuya masa molecular es de 96.000 y está formada por dos subunidades (Allen & Bantorpe, 1981). Las preniltransferasas de Ricinus communis, que coexisten en una misma fracción subcelular, presentan masas moleculares idénticas de 72.500 Da a altas concentraciones de proteínas, pero es posible separarlas a bajas concentraciones de proteínas en dos especies de masas moleculares de 56.000 y 60.000 Da (Green & West, 1974). Por otra parte, la preniltransferasa de Gossipum hirsutum se encuentra asociada a otras dos proteínas, una de las cuáles es la IPP isomerasa; y ambas actividades junto a una tercera proteína emergen como un solo pico de masa molecular 258.000 Da de una columna de Sepharose-6B (Widmaier y col., 1980). Las masas moleculares de estas tres proteínas eran de 52.000, 92.000 y 126.000. La de masa molecular 126.000 correspondía a la IPP isomerasa, siendo este valor equivalente al encontrado para esta misma enzima eluída de Sepharose-2B, de la preparación de Citrus sinensis.

La Tabla 3.3.-VI resume las actividades de la IPP isomerasa, prenilttransferasa y fosfatasas. Solamente la prenilttransferasa aumenta significativamente su actividad específica, recuperándose más del 100% de las unidades.

El cociente de actividades entre C_{10} y C_{15} prenilttransferasas es de 0,75 para la enzima de 465.000 Da y de 0,58 para la de 95.500 Da; siendo ambos valores diferentes del encontrado en el homogeneizado (1,125) y en el S_{39100} (0,69). Este hecho indica que puede existir más de una prenilttransferasa, específica para el sustrato alílico; o bien que durante el proceso de fraccionamiento, la enzima pierde su capacidad de utilizar al DMAPP como sustrato.

La IPP isomerasa mantiene su actividad y las fosfatasas pierden actividad durante la filtración y su recuperación es de sólo un 50% y un 38% respectivamente.

Ambos tipos de fosfatasas son inespecíficas, ya que hidrolizan los mismos sustratos que el S_{39100} (sección 3.3.3.).

Las fracciones en que son eluidas las actividades de prenilttransferasa, IPP isomerasa y fosfatasa, no presentan actividad de preoldeshidrogenasa, al igual que el S_{39100} (Sección 3.3.4.).

Con el fin de aplicar a la columna de Sepharose-2B una fracción de proteínas más concentrada, se precipitó el S_{39100}

FRACCION	PRENILTRANSFERASA		IPP ISOMER.		FOSFATASA	
	a.e.	U.tot	a.e.	U.tot	a.e.	U.tot
S ₃₉₁₀₀	640 442 ^a	19.200	107	3.210	94	2.820
Sepharose-2B						
MM						
465.000	1.950 1.462 ^a	6.340	140	460	-	-
275.000	-	-	-	-	15	66
123.000	-	-	83	1.055	-	-
95.500	1.134 658 ^a	14.800	-	-	77	1.013

Tabla 3.3.-VI Actividad de IPP isomerasa, C₁₅ preniltransferasa y fosfatasa en S₃₉₁₀₀ y proteínas de diferentes masas moleculares (MM) eluidas de una columna de sepharose-2B. La actividad específica (a.e.) está expresada en pmoles/min/mg.
^a actividad de C₁₀ preniltransferasa. La actividad específica se estimó para cada una de las proteínas en base al promedio de cpm en cada pico y la concentración de proteínas promedio (Fig. 3.3.7.)

entre 0 y 70% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sección 2.3.3.2.). La pella obtenida se disolvió en 1/6 del volumen original del S_{39100} (su concentración de proteínas fué de 18 mg/ml), y se aplicó a una columna de Sepharose-2B en las condiciones indicadas en la sección 2.3.3.2.

El perfil de elución de la columna se muestra en la Fig. 3.3.-8, y se puede observar que emergen tres formas de preniltransferasa, cuyas masas moleculares corresponden a 467.700 Da, 275.400 Da y 96.600 Da. Las actividades correspondientes a las masas moleculares de 467.700 y 96.600 Da son equivalentes a las eluidas de la columna de Sepharose-2B a partir del S_{39100} sin precipitar con sulfato de amonio. La de masa molecular 275.400 podría corresponder a un estado de agregación diferente.

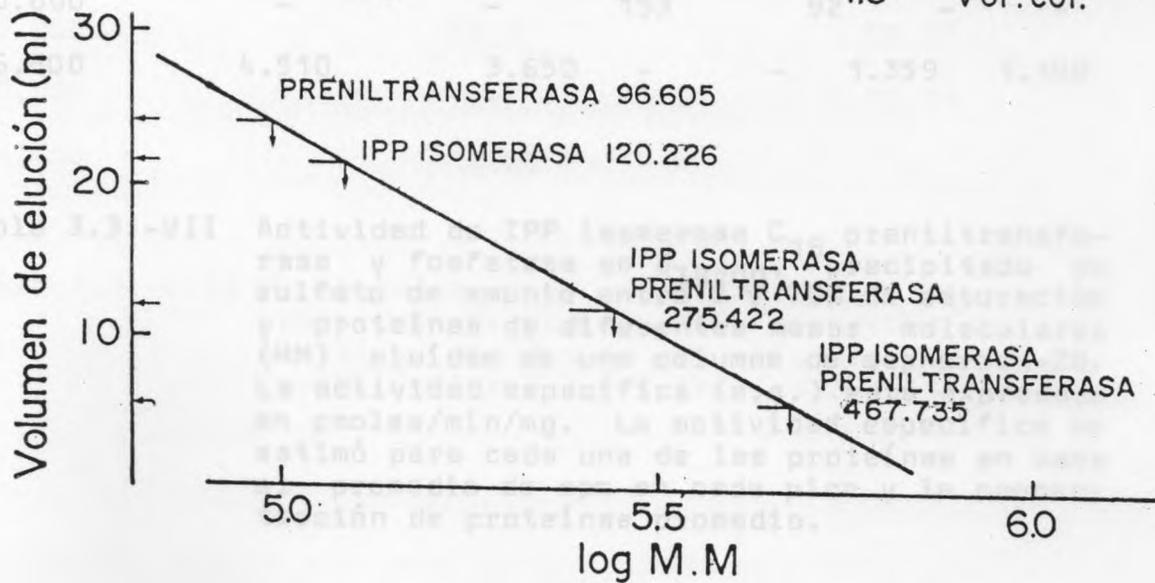
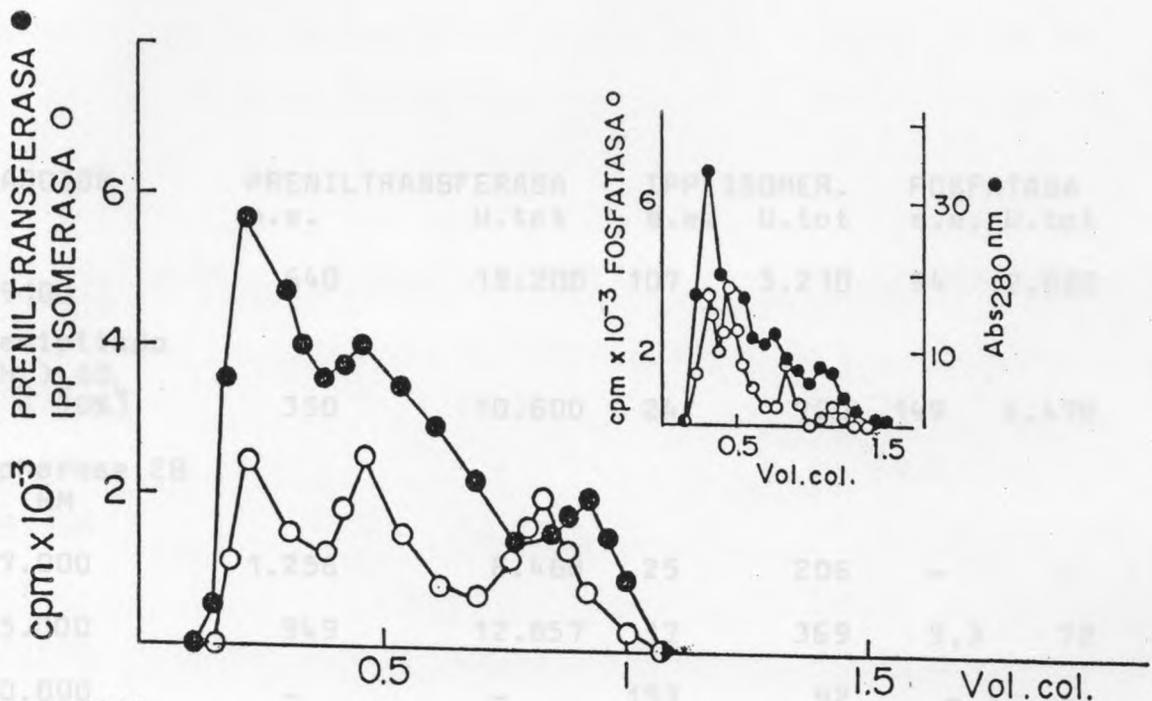
La Tabla 3.3.-VII resume las actividades de la IPP isomerasa, preniltransferasa y fosfatasas. El comportamiento de estas tres actividades es semejante al observado en la columna anterior en cuanto a actividad específica y recuperación de unidades totales.

El porcentaje de cada actividad eluida de las columnas de Sepharose-2B, que se encuentran en las diferentes fracciones de masas moleculares distintas, se encuentran resumidas en la Tabla 3.3.-VIII. Los resultados sugieren que la preniltransferasa de masa molecular 465.000 se comporta



Figura 3.3.8. Filtración en Sepharose 2B del S_{39100} precipitado con $(NH_4)_2SO_4$ entre 0 y 70 % de saturación.

Se aplicaron 12,6 mg de proteínas del S_{39100} precipitado con sulfato de amonio entre 0 y 70 % de saturación a una columna de Sepharose 2B en condiciones semejantes a las señaladas en la Figura 3.3.7.



FRACCION	PRENILTRANSFERASA		IPP ISOMER.		FOSFATASA	
	a.e.	U.tot	a.e.	U.tot	a.e.	U.tot
S ₃₉₁₀₀	640	19.200	107	3.210	94	2.820
Precipitado (NH ₄) ₂ SO ₄ (0 - 70%)	350	10.600	24	720	149	4.470
Sepharose 2B MM						
467.000	1.256	6.480	25	206	-	-
275.000	949	12.857	17	369	5,3	72
120.000	-	-	153	92	-	-
96.600	4.510	3.650	-	-	1.359	1.100

Tabla 3.3.-VII Actividad de IPP isomerasa C₁₅ preniltransferasa y fosfatasa en S₃₉₁₀₀, precipitado de sulfato de amonio entre 0 y 70% de saturación y proteínas de diferentes masas moleculares (MM) eluidas de una columna de sepharose-2B. La actividad específica (a.e.) está expresada en pmoles/min/mg. La actividad específica se estimó para cada una de las proteínas en base al promedio de cpm en cada pico y la concentración de proteínas promedio.

MASA MOLECULAR (Da)	% PRENILTRANSFERASA	% IPP ISOMERASA
a		
465.000	29,99	30,4
123.000	-	69,6
95.500	70,01	-
b		
467.700	28,18	30,8
275.000	55,9	55,32
120.000	-	13,88
96.600	15,89	-

Tabla 3.3.-VIII Porcentajes de unidades totales de preniltransferasa e IPP isomerasa en las proteínas eluidas de las columnas de sepharose-2B (Tablas 3.3.-VI (a) y 3.3.-VII (b))

siempre como una sola entidad pese a las diferentes concentraciones de proteínas mientras que la de 275.000 y 96.000 podrían corresponder a diferentes estados de agregación de la misma enzima.

La proteína de masa molecular 275.400 podría ser semejante a la que se obtiene de Gossipum hirsutum (Widmaier y col., 1980), formada por la IPP isomerasa de masa molecular 123.000 Da, la preniltransferasa de masa molecular 96.000 Da y otra proteína de masa molecular 56.000 Da.

El perfil de elución de ambas columnas de Sepharose-28 muestra un pico de elución de proteínas en el rango de 69.000 y 48.000 Da, que no presenta actividad enzimática.

La Fig. 3.3.-9 muestra un esquema de las bandas de proteínas separadas en geles de acrilamida al 12,5% y en presencia de SDS (sección 2.11.) de las distintas fracciones eluidas de ambas columnas de Sepharose-28. Es posible observar diferencias entre las bandas de proteínas provenientes de los picos de preniltransferasa de masa molecular 465.000 Da y 275.000 y 96.000 Da. En los dos últimos casos se observan bandas de proteínas de masa moleculares 72.500, 59.000 y 35.000 Da que no aparecen junto a la preniltransferasas de masa molecular 465.000 Da. Este resultado es un argumento más para suponer que la forma de 465.000 Da, es diferente de las de 275.000 y 96.000; siendo probablemente estas últimas

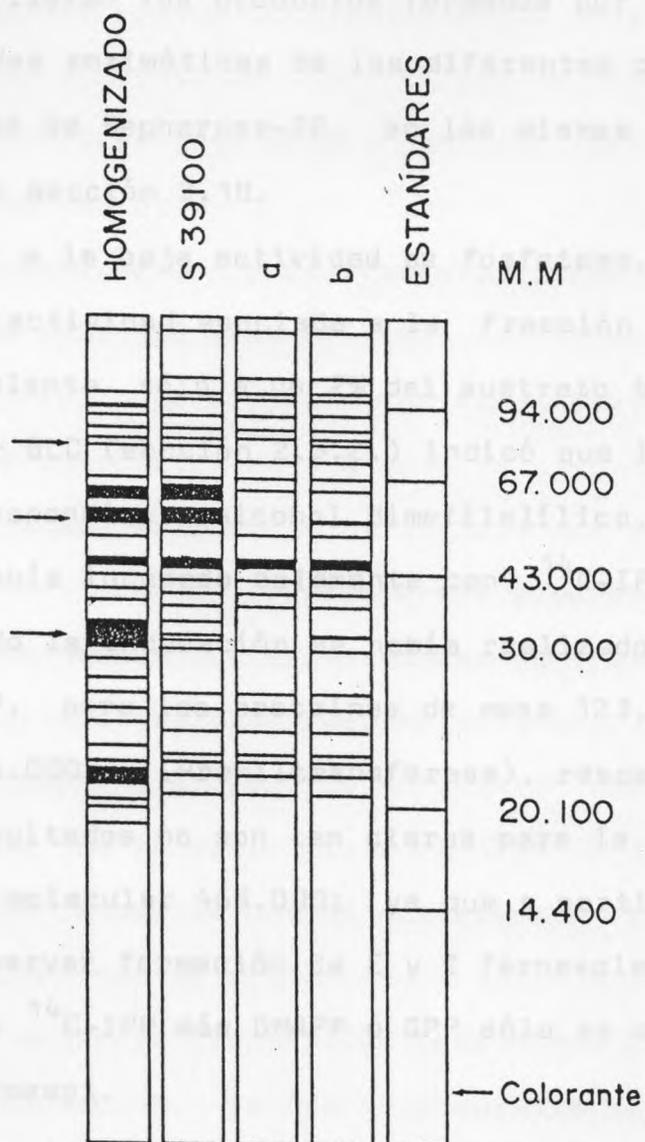


Figura 3.3.9. Esquema de las proteínas separadas por electroforesis en SDS, a partir de fracciones eluidas de Sepharose 2B.
 a) Proteína de M.M. 465.000 Da.
 b) Proteína de M.M. 275.000 Da ó 96.000 Da.

preniltransferasas con diferente grado de asociación.

Se analizaron los productos formados por cada una de estas actividades enzimáticas de los diferentes picos eluidos de las columnas de Sepharose-2B, en las mismas condiciones indicadas en la sección 2.10.

Debido a la baja actividad de fosfatasa, se obtuvo muy poca radiactividad asociada a la fracción de lípidos libres, equivalente sólo a un 2% del sustrato transformado. El análisis por GLC (sección 2.3.2.) indicó que los alcoholes formados correspondían a alcohol dimetilalílico, cuando el sistema se había incubado solamente con ^{14}C -IPP; y a E-farnesol cuando la incubación se había realizado con ^{14}C -IPP más DMAPP ó GPP, para las proteínas de masa 123.000 Da (IPP isomerasa) y 96.000 Da (Preniltransferasa), respectivamente.

Los resultados no son tan claros para la preniltransferasa de masa molecular 465.000; ya que a partir de ^{14}C -IPP es posible observar formación de E y Z farnesoles, mientras que a partir de ^{14}C -IPP más DMAPP ó GPP sólo se observa formación de E-farnesol.

El bajo nivel de radiactividad encontrada en la fracción de lípidos libres, no permite establecer con seguridad la verdadera composición de productos de los lípidos libres a partir de los diferentes sustratos, aún cuando parecieran existir diferencias en cuanto al tipo de productos formados

por las especies de 465.000 Da y 96.000 Da.

Mientras la enzima de 465.000 Da es capaz de formar ambos farnesoles a partir de ^{14}C -IPP, la de 96.000 no tiene actividad de IPP isomerasa y sólo estaría catalizando la reacción de condensación.

El análisis de los prenolfosfatos formados por ambos tipos de enzimas (465.000 y 96.000 Da), indicaron que sólo se había formado E-FPP. La fracción correspondiente a 123.000 Da sólo contenía compuestos de 5 átomos de carbono.

El conjunto de resultados sugiere que en el S_{39100} existen más de una forma de IPP isomerasa y de preniltransferasa, los que coinciden con experimentos de fraccionamiento del S_{39100} en gradientes continuas de sacarosa. En dichos gradientes (sección 2.4.3.2.) se observaron dos formas de preniltransferasa que se equilibraron a 1,095 y 1,135 g/ml y dos formas de IPP isomerasa que se equilibraron a 1,1 y 1,135 g/ml. La proteína que es eluida de la columna de Sepharose-2B con una masa molecular de 465.000 podría ser la que forma los E y Z farnesoles, ya que se encuentra asociada a una actividad de IPP isomerasa. Este complejo proteico también presenta actividad de C_{10} y C_{15} preniltransferasas, y puede corresponder a una forma de preniltransferasa diferente de la que eluye con una masa molecular de 96.000, o bien tener una

especificidad de productos diferente debido a un distinto tipo de asociación con otras proteínas del medio.

A pesar de encontrar ambas formas de enzima asociadas al S₃₉₁₀₀, no puede descartarse que una provenga de los plastidios y otra se encuentre realmente en el citoplasma. Los resultados de ultraestructura indicaron que no se observaban plastidios intactos, y por lo tanto, es posible que alguna de las formas de enzima (tanto preniltransferasa como IPP isomerasa) pueda encontrarse en estos organelos, tal como se ha descrito en plastidios de tomate (Spurgeon y col., 1984).

La preniltransferasa de masa molecular 96.000 Da podría corresponder a la forma soluble de enzima, semejante a la descrita en Pisum sativum (Allen & Banthorpe, 1981).

La coexistencia de más de una forma tanto de preniltransferasa como de IPP isomerasa, de masas moleculares muy diferentes, permiten suponer que la formación de Z-farnesol pueda ser realizada por un complejo proteico, aún cuando no se hayan podido aislar o medir enzimas individuales. La ausencia de una fosfatasa específica y de una actividad de preoldeshidrogenasa, no permiten descartar la existencia de un complejo enzimático que forme Z-farnesol a partir de IPP y a través de un mecanismo redox de isomerización (Fig. 1.7.), ni permiten afirmar que este alcohol se forme por hidrólisis directa del Z-FPP sintetizado estereoespecíficamente a partir

de IPP, dentro de un complejo diferente. La proteína de 465.000 Da que tiene tanto la actividad de IPP isomerasa como de C₁₀ y C₁₅ preniltransferasa podría corresponder a este complejo.

La formación de E-FPP y E-farnesol puede realizarse por las reacciones catalizadas por la preniltransferasa de 96.000 Da más una fosfatasa inespecífica del medio, que hidrolice al pirofosfato formado.

Los productos formados a partir de diferentes sustratos por el S₃₉₁₀₀, pueden explicarse por la existencia de dos formas de preniltransferasa y de IPP isomerasa, de acuerdo a lo señalado en la Fig. 3.3.-10, en la que la formación de Z-farnesol podría realizarse a través de los dos mecanismos allí señalados.

Los resultados de las observaciones de ultraestructura de las células del flavedo de naranja, de fraccionamiento subcelular y de las diferentes actividades de enzimas de la biosíntesis de sesquiterpenos, sugieren que esta biosíntesis podría realizarse en más de un compartimento celular. En forma paralela existiría una preniltransferasa y una IPP isomerasa que fueran solubles, aún cuando dentro de la célula estuvieran ligadas a estructuras membranosas, de las cuáles puedan haber sido disociadas en el proceso de homogenización.

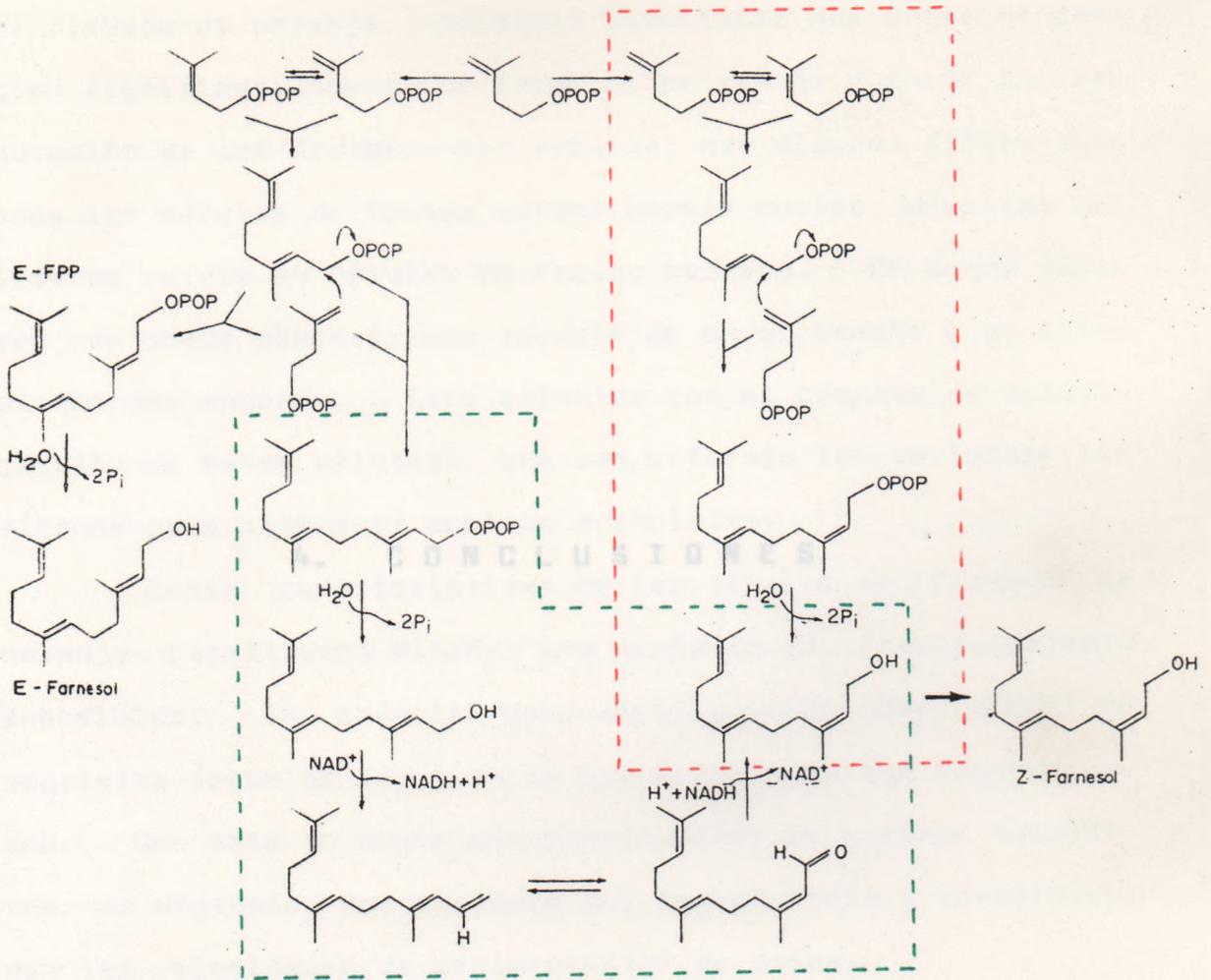


Figura 3.3.10. Esquema de las posibles vías de utilización del ¹⁴C-IPP.

CONCLUSIONES

El estudio de la ultraestructura de las células que forman el flavedo de naranja, permitió establecer que éstas no cambian significativamente de forma ni de tamaño durante la maduración de los frutos. Sin embargo, hay algunas diferencias pues las células de frutos verdes poseen núcleo, mientras que éste no existe en células de frutos maduros. En estos últimos se puede observar una vacuola de mayor tamaño y un citoplasma más angosto. Esto coincide con el proceso de autodigestión de estas células, que van a formar las cavidades lisígenas para almacenar aceites esenciales.

Estas características de las células de flavedo de naranja permitieron diseñar una metodología de fraccionamiento subcelular. Es esencial usar amortiguadores con albúminas vegetales (agua de coco) en la preparación de los homogenizados. Con esto se logra una distribución de enzimas marcadoras de organelos subcelulares muy reproducible y concordante con las velocidades de sedimentación de estos.

Mediante el proceso de fraccionamiento se logran también eliminar los lípidos de la preparación enzimática y purificar con muy buen rendimiento las actividades de la IPP isomerasa y de la Preniltransferasa. La eliminación de un componente no proteico del homogeneizado (lípidos,

flavonoides, taninos, polisacáridos). es de por si un importante proceso de purificación. Este criterio no es destacado lo suficiente, pero en trabajos de enzimología vegetal debe ser tomado en cuenta como una etapa indispensable (Pérez y col., 1980; Chayet y col., 1977) que permite obtener preparaciones más reproducibles.

Esta separación ha permitido también descartar la participación del retículo endoplásmico en la biosíntesis de isoprenoides en flavedo de naranja. La fracción S_{39100} (que contiene las actividades de IPP isomerasa y de preniltransferasa) aún cuando posee un cierto grado de estructuración, no contiene membranas correspondientes a retículo endoplásmico, lo que se traduce en una ausencia de la actividad de NADPH citocromo c reductasa en esta fracción. Este hecho, y la ausencia de actividad de preniltransferasa e IPP isomerasa en el P_{39100} que contiene al retículo endoplásmico, descartan su participación en la formación de sesquiterpenoides, a diferencia de lo descrito en Pinus pinaster (Gleizes y col., 1980).

No puede descartarse que la existencia de IPP isomerasa y Preniltransferasa en la fracción soluble (S_{39100}) puede deberse a la rotura de plastidios debido a la presencia de gránulos de almidón en el interior de cloroplastos y cromoplastos. Estos gránulos probablemente favorecieron la

ruptura de estos plastidios en el proceso de centrifugación. Con ello se vacía el contenido de estos organelos y la IPP isomerasa y la preniltransferasa aparecen en la fracción soluble. La ruptura de plastidios es un hecho corriente en los procesos de fraccionamiento subcelular, sin embargo, depende mucho del tipo de plastidios que se encuentren en las células el tipo de resultados obtenidos. Es así como en el caso de los leucoplastos, cuya forma es alargada, se encuentran muchas veces a lo largo de toda la célula y no contienen almidón en su interior, su ruptura sólo produce formación de vesículas con igual contenido que el leucoplasto intacto (Gleizes y col., 1983)

La fracción S₃₉₁₀₀ forma Z-farnesol, E-farnesol y E-FPP. La formación de Z-farnesol no ocurre en estas preparaciones enzimáticas a través de reacciones catalizadas por una Z-preniltransferasa específica, ya que no se observó formación de Z-FPP. El mecanismo de isomerización redox, iniciado con la reacción de condensación entre G-PP más IPP para dar E-FPP, es una probable vía que no puede descartarse pues las enzimas participantes podrían estar formando un complejo multienzimático. El hecho de no haber podido detectar actividades aisladas de fosfatasa, prenildehidrogenasas ni prenilreductasa, pero que si se observa la formación de Z-farnesol, apoyan la hipótesis de un complejo multienzimático.

Nos parece interesante discutir esta posible duplicidad de rutas biosintéticas a la luz de los conceptos propuestos por Tito Ureta, para el metabolismo de hidratos de carbono (Ureta, 1978; Ureta, 1985), en que se postula la existencia de más de una vía de utilización de un mismo sustrato.

Cada vía correspondería a un compartimento celular, y estaría formada por isoenzimas que podrían estar débilmente unidas entre sí ó a alguna proteína de citoesqueleto.

Dentro de las enzimas de la biosíntesis de isoprenoides, sólo se han descrito isoenzimas de la quinasa mevalónica que se encuentran en compartimentos diferentes (Rogers y col., 1966 a y b), y de la preniltransferasa de Ricinus communis que se encuentran en la misma fracción subcelular (Green & West, 1974). La mayoría de los estudios realizados en plantas sobre biosíntesis de isoprenoides, no se ha establecido si existen otras isoenzimas, que participen en el metabolismo de terpenos.

La presencia de más de una forma de enzima, tanto para preniltransferasa como para la IPP isomerasa sugiere que en el flavedo de naranja podrían existir vías paralelas de utilización de IPP y de formación de sesquiterpenos; aún cuando los resultados no permiten afirmar que ambas formas de enzimas provengan de diferentes ó de un mismo compartimento subcelular.

Sería esta una modalidad diferente de la señalada (Ureta, 1978), pues se trataría de complejos unidos en forma "Más íntima", que a diferencia de las enzimas glicolíticas no se pueden ensayar separadamente con "sustratos libres".

La solución al problema de la localización subcelular de las enzimas de la biosíntesis de isoprenoides, requiere el aislar plastidios intactos para verificar si la existencia de estas enzimas en la fracción soluble corresponde a una doble distribución subcelular o se debe a un artificio del proceso de aislamiento.

Nos encaminamos con estos resultados a unificar el criterio citológico muy conocido en enzimas de origen animal, con los procesos químicos que conducen a la síntesis de la amplia diversidad de moléculas isoprenoides en plantas.

1. 1980

2. 1981

3. 1982

4. 1983

5. 1984

6. 1985

7. 1986

8. 1987

9. 1988

10. 1989

11. 1990

12. 1991

13. 1992

14. 1993

15. 1994

16. 1995

17. 1996

18. 1997

19. 1998

20. 1999

5. BIBLIOGRAFIA

1. 1980

2. 1981

3. 1982

4. 1983

5. 1984

6. 1985

7. 1986

8. 1987

9. 1988

10. 1989

11. 1990

12. 1991

13. 1992

14. 1993

15. 1994

16. 1995

17. 1996

18. 1997

19. 1998

20. 1999

- Adams, S.R. and Heinstein, P. (1973) *Phytochemistry* 12, 2167.
- Agranoff, B.W., Eggerer, H., Henning, U. and Lynen, F. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 326.
- Allen, C.M., Alworth, W., Mc Crae, A. and Bloch, K. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 1895.
- Ambid, C., Moisseeff, M. and Fallot, J. (1983) *Physiol. Vég.* 21, 87.
- Ames, B.N. (1966) en "Methods in enzymology" Vol. III p.116 (Neufeld, E.F. and Ginsburg, V., eds.) Academic Press, New York.
- Anastasis, P., Freer, I., Gilmore, Ch., Mackie, H., Overton, K. and Swanson, S. (1982) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 268,
- Anderson, D.D., Norgard, D.W. and Porter, J.W. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* 88, 68.
- Archer, B.L., Barnard, D., Lockbam, E., Cornforth, J., Cornforth, R.H. and Popják, G. (1966) *Proc. Royal Soc.* 163 B, 519.
- Archer, B.L. and Audley, B.G. (1967) *Adv. Enzymol.* 29, 221 (Nord, F.F., ed.) Interscience, New York-London.
- Archer, B.L. and Audley, B.G. (1973) en "Phytochemistry" Vol. II, p.310 (Miller, L.P., ed.) Van Nostrand-Reinhold, Princeton, New Jersey.
- Baba, T. and Allen, C.M. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 200, 474.
- Banthorpe, D.V., Charlwood, B.V. and Francis, M., J., D. (1972) *Chemical Reviews* 72, 115.
- Banthorpe, D.V., Bucknall, G.A., Doonan, H.J., Doonan, S. and Rowan, M.G. (1976) *Phytochemistry* 15, 91.
- Banthorpe, D.V., Modawi, B.M., Poots, I. and Rowan, M.G. (1978) *Phytochemistry* 17, 1115.
- Banthorpe, D.V. and Poots, I. (1979) *Phytochemistry* 18, 1297.

Banthorpe, D.V., Long, D.R.S. and Pink, C.R. (1983) *Phytochemistry* 22, 2459.

Banthorpe, D.V., Bunton, C.A., Cori, O. and Francis, M.J.O. (1985) *Phytochemistry* 24, 251.

Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R., Jacques, P. and de Duve, C. (1964) *Biochem.J.* 92, 179.

Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. and Berthet, J. (1974) *J.Cell. Biol.* 61, 188.

Bennet, R.D., Norman, S.M. and Maier, V.P. (1984) *Phytochemistry* 23, 1913.

Beyer, P., Kreuz, K. and Kleinig, H. (1980) *Planta* 150, 435.

Beytia, E., Valenzuela, P. and Cori, O. (1969) *Arch.Biochem. Biophys.* 129, 346.

Bosabalidis, A. and Tsekos, I. (1982 a) *Protoplasma* 112, 55.

Bosabalidis, A. and Tsekos, I. (1982 b) *Protoplasma* 112, 63.

Bradford, M.M. (1976) *Anal.Biochem.* 72, 248.

Camara, B., Bardat, F. and Monéger, R. (1982) *Eur.J.Biochem.* 127, 255.

Camara, B., Bardat, F., Dogbo, D., Brangeon, J. and Monéger, R. (1983) *Plant Physiol.* 73, 94.

Cane, D.E. (1980) *Tetrahedron* 36, 1109.

Cane, D.E. (1981) en "Biosynthesis of Isoprenoid Compounds" Vol. I, p.284 (Porter, J.W. and Spurgeon, S.L., eds.) John Wiley, New York.

Cardemil, E., Vicuña, R., Jabalquinto, A.M. and Cori, O. (1974) *Anal.Biochem.* 59, 636.

Chayet, L., Pont-Lezica, R., George-Nascimento, C. and Cori, O. (1973) *Phytochemistry* 12, 1512.

- Chayet, L., Rojas, C., Cardemil, E., Jabalquinto, A.M., Vicuña, J.R. and Cori, O. (1977) Arch.Biochem.Biophys. 180, 318.
- Chaykin, S., Low, J., Phillips, A.H., Tehen, T.T. and Bloch, K. (1958) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 44, 998.
- Clifford, K., Cornforth, J.W., Mallaby, R. and Phillips, G.T. (1971) J.Chem.Soc., Chem.Comm. p.1599.
- Cori, O. (1969) Arch.Biochem.Biophys. 135, 415.
- Cori, O., Chayet, L., Pérez, L.M., de la Fuente, M., Rojas, M.C., Portilla, G. and Vial, M.V. (1980) Mol.Biol.Biochem. Biophys. 32, 97.
- Cori, O. (1983) Phytochemistry 22, 331.
- Cramer, F. and Bohm, W. (1959) Angew. Chem. 71, 775.
- Croteau, R. and Karp, F. (1979) Arch.Biochem.Biophys. 198, 512.
- Croteau, R. and Felton, M.N. (1980) Phytochemistry 19, 1343.
- de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. (1955) Biochem.J. 60, 604.
- de la Fuente, M., Pérez, L.M., Hashagen, U., Chayet, L., Rojas, M.C., Portilla, G. and Cori, O. (1981) Phytochemistry 20, 1551.
- Dickinson, F.M. and Dalziel, K. (1967) Nature 214, 31.
- Fernández, L.A. (1978) Tesis para optar al título de Bioquímico.Univ. de Chile.
- Fiske, C.H. and Subbarow, J. (1925) J.Biol.Chem. 66, 375.
- Fottrell, P.F. (1966) Nature 210, 198.
- George-Nascimento, C. and Cori, O. (1971) Phytochemistry 10, 1803.
- Gleizes, M. (1979) These.Université de Bordeaux I.Bordeaux.

- Gleizes, M., Carde, J.P., Pauly, G. and Bernard-Dagan, C. (1980) *Plant Sci.Letters* 20, 79.
- Gleizes, M., Pauly, G., Carde, J.P., Marpeau, A. and Bernard-Dagan, C. (1983) *Planta* 159, 373.
- Goodwin, T.W. (1967) en "Terpenoids in Plants" p.1 (Pridham, J.B., ed.) Academic Press, London-New York.
- Gough, D. and Hemming, F. (1970) *Biochem.J.* 117, 309.
- Green, T.R. and West, C.A. (1974) *Biochemistry* 13, 4720.
- Heinrich, G. (1969) *Osterr.Bot.Z.* 117, 397.
- Heinrich, G. (1970) *Protoplasma* 69, 15
- Heinrich, G., Schultze, W. and Wegener, R. (1980) *Protoplasma* 103, 115.
- Helgerson, H.F., Cramer, G. and Morrè, D.J. (1976) *Plant Physiol.* 58, 548.
- Hemming, F.W. (1967) en "Terpenoids in Plants" p.223 (Pridham, J.B., ed.) Academic Press, New York-London.
- Hemming, F.W. (1970) en "Natural Substances formed biologically from Mevalonic Acid" p.105 (Goodwin, T.W., ed.) Academic Press, New York.
- Holuigue, L. (1980) Tesis para optar al titulo de Bioquímico.Univ. de Chile.
- Holloway, P.W. and Popják, G. (1967) *Biochem.J.* 104, 57.
- Jacob, G., Cardemil, E., Chayet, L., Téllez, R., Pont-Lezica, R. and Cori, O. (1972) *Phytochemistry* 11, 1683.
- Jedlicki, E., Jacob, G., Faini, F. and Cori, O.(1972) *Arch. Biochem.Biophys.* 152, 590.
- Kandutsch, A.A., Paulus, H., Levin, E. and Bloch, K. (1964) *J.Biol.Chem.* 239, 2507.
- Keenan, M.V. and Allen, C.M. (1974) *Arch.Biochem.Biophys.* 161, 375.

Kefford, J.F. and Chandler, B.V. (1970) "The Chemical constituents of Citrus fruits". Academic Press, New York and London.

Laemmlli, U.K. (1970) Nature 227, 680.

Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J.W., Fowler, S. and de Duve, C. (1968) J.Cell Biol. 37, 482.

Leighton, F., López, F., Zemelman, V., Morales, M.N. and Wal- sen, O. (1977) en "Membranous elements and movement of mole- cules". Methodological Surveys in Biochemistry. 6, 197. (Reid, E., ed.) Ellis Horwood Limited, Chichester, U.K.

Leonard, R.T. and Van Der Woude, W.J. (1976) Plant Physiol. 57, 105.

Lochmanova, A., Lochman, I. and Tvrdik, J. (1984) Cesk. Epi- demiol. Mikrobiol. Imunol. 33, 211.
c.s. Chemical Abstracts, Biochemistry Sections (1984) 101 (17) Abstr. 146534c.

Loomis, W.D. and Croteau, R. (1973) Recent Advances in Phy- tochemistry 6, 147.

Loyola, G. (1980) Tesis para optar al titulo de Bioquimi- co.Univ. de Chile.

Lozada, R. (1981) Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias.Univ. de Chile.

Lynen, F., Eggerer, H., Henning, U. and Kessel, I. (1958) Angew.Chem. 70, 738.

Lynen, F., Agranoff, B.W., Eggerer, H., Henning, U. and Mos- lein, E.M. (1959) Angew.Chem. 71, 657.

Mackie, H. and Overton, K.H. (1977) Eur.J.Biochem. 77, 101.

Mancilla, M. (1980) Tesis para optar al titulo de Bioquimi- co.Univ. de Chile.

Mann, I. (1978) Secondary Metabolism. Oxford, Clarendon Press.

- Matile, P. (1982) *Physiol.Vég.* 20, 303.
- Maudinas, B., Bucholtz, M.L., Papastephanou, C., Katiyar, S.S., Briedis, A.V. and Porter, J.W. (1975) *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 66430.
- Morré, D.J. and Buckhout, T.J.(1979) en "Plant Organelles". *Methodological Surveys in Biochemistry.* 9, 117. (reid, E., ed.) Ellis Horwood Limited, Chichester, U.K.
- Nishino, T., Ogura, K. and Seto, S. (1972) *J.Am.Chem.Soc.* 94, 6849.
- Nishino, T., Ogura, K. and Seto, S. (1973) *Biochim.Biophys. Acta* 302, 33.
- Ogura, K., Nishino, Y. and Seto, S. (1968) *J.Biochem.* 64, 168.
- Ogura, K., Nishino, T., Koyama, T. and Seto, S. (1970) *J.Am. Chem.Soc.* 92, 6036.
- Ogura, K., Koyama, T. and Seto, S. (1972 a) *J.Chem.Soc., Chem.Commun.* p.881.
- Ogura, K., Shinka, T. and Seto, S. (1972 b) *J.Biochem.* 72, 1101.
- Ogura, K., Saito, A. and Seto, S. (1974) *J.Am.Chem.Soc.* 96, 4037.
- Ohnoki, S., Suzue, G. and Tanaka, S.T. (1962) *J.Biochem.* 52, 423.
- Overton, K.H. and Roberts, F.M. (1974 a) *Biochem.J.* 144, 585.
- Overton, K. H. and Roberts, F.M. (1974 b) *Phytochemistry* 13, 2741.
- Pabel, C.C.and Mohan, M.S. (1960) *Nature* 186, 803.
- Pearce, F.L., Bands, B.C., Banthorpe, D.V., Davies, B. and Vernon, C.A. (1972) *Eur.J.Biochem.* 29, 417.
- Pérez, L.M., Taucher, G. and Cori, O. (1980) *Phytochemistry* 19, 183.

Pérez, L.M., Lozada, R. and Cori. O. (1983) *Phytochemistry* 22, 431

Pérez, L.M. and Garrido, J. (1985) *Arch.Biol.Med.Exp.* 18, 41.

Pharmacia Fine Chemicals. (1980) "Gel Filtration: Theory and Practice".Upsala, Suecia.

Plummer, D.T., Barrera, L.A. and Corredor, C. (1981) en "Introducción a la Bioquímica Práctica" p. 170 .Mc Graw-Hill Latinoamericana S.A., Bogotá.

Popják, G., Cornforth, J.W., Cornforth, R.H., Ryhage, R. and Goodman, D.W.S. (1962) *J.Biol.Chem.* 237, 56.

Popják, G., Holloway, P.W. and Baron, J.M. (1969 a) *Biochem.J.* 11, 325.

Popják, G., Holloway, P.W., Bond, R.P.M. and Roberts, M. (1969 b) *Biochem.J.* 111, 333.

Popják, G. (1970) en "The Enzymes" 3rd.Ed. Vol.2. p.116. (Boyer, P.D., ed.) Academic Press, New York-London.

Popják, G., Edmond, J., Wong, S.M. and Williams, V.P. (1971) *J.Biol.Chem.* 246, 6254.

Potty, V.H. and Bruemmer, J.H. (1970) *Phytochemistry* 9, 1003.

Poulouse, A.J. and Croteau, R. (1978) *Arch.Biochem.Biophys.* 191, 400.

Poulter, C.D. and Rilling, H.C. (1976) *Biochemistry* 15, 1079.

Poulter, C.D. and Satterwhite, D.M. (1977) *Biochemistry* 16, 5470.

Poulter, C.D. and Rilling, H.C. (1978) *Acc.Chem.Res.* 11, 307.

Poulter, C.D. and Rilling, H.C. (1981) en "Biosynthesis of Isoprenoid Compounds" Vol.I p.162 (Porter, J.W. and Spurgeon, S.L., eds.) John Wiley, New York.

- Price, C.A. (1983) en "Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells". (Hall, J.L. and Moore, A.L., eds.) Cap.1. Academic Press, New York.
- Rasmussen, R.A. (1978) "Special report : Isoprene plant species list" .Oregon graduate center, 19600 N.W. Walter Road, Beaverton, Oregon 97005.
- Reed, B.C. and Rilling, H.C. (1975) *Biochemistry* 14, 50.
- Reed, B.C. and Rilling, H.C. (1976) *Biochemistry* 15, 3739.
- Richards, J.H. and Hendrickson, J.B. (1964) en "The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins" p.12. W.A. Benjamin Inc., New York.
- Rilling, H.C. and Bloch, K. (1959) *J.Biol.Chem.* 234, 1424.
- Robinson, D.R. and West, C.A. (1969) *Biochemistry* 9, 80.
- Rogers, L.J., Shah, S.P.J. and Goodwin, T.W. (1966 a) *Biochem.J.* 100, 14c.
- Rogers, L.J., Shah, S.P.J. and Goodwin, T.W. (1966 b) *Biochem.J.* 99, 381.
- Roland, J.C., Lembi, C.A. and Morré, D.J. (1972) *Stain Technology* 47, 195.
- Sagami, H., Ogura, K. and Seto, S. (1977) *Biochemistry* 16, 4616.
- Sagami, H., Ogura, K. and Seto, S. (1978) *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 85, 572.
- Sagami, H. and Ogura, K. (1981) *J.Biochem.* 89, 1573.
- Seigler, D., Price, P.W. (1976) *Amer.Nat.* 110, 101.
- Shah, D.H., Cleland, W.W. and Porter, J.W. (1965) *J.Biol. Chem.*240, 1946.
- Shine, W.E. and Loomis, W.D. (1974) *Phytochemistry* 13, 2095.

- Smith, M. and Khorana, H.G. (1963) en "Methods in Enzymology" Vol. VI p.651 (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds.) Academic Press, New York.
- Spurgeon, S.L., Sathyamoorthy, N. and Porter, J.W. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 230, 446.
- Stadtman, E.R., Novelli, G.G. and Lipman, F. (1951) J. Biol. Chem. 191, 365.
- Stahl, E. and Jork, H. (1965) en "Thin Layer Chromatography" (Stahl, E., ed.) Cap. B. Springer-Verlag y Academic Press.
- Takahashi, T. and Ogura, K. and Seto, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4539.
- Takahashi, T. and Ogura, K. (1981) J. Biochem. 89, 1581.
- Tolbert, N.E. (1971) Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 45.
- Tolbert, N.E. (1974) en "Methods in Enzymology" Vol. XXXI p.743. Academic Press, New York.
- Umbreit, W.W., Burnis, R.H. and Sauffer, J.P. (1959) en "Manometric Techniques" p.272 Burgess Publ. Co., Minn. USA.
- Ureta, T. (1978) Current Top. Cell. Reg. 13, 233.
- Ureta, T. (1985) Arch. Biol. Med. Exp. 18, 9.
- Van Der Woude, W.J., Lembi, C.A., Morrè, D.J., Kidinger, J.A. and Ordin, L. (1974) Plant Physiol. 54, 333.
- Vial, M.V. (1980) Tesis para optar al título de Bioquímico. Univ. de Chile.
- Weber, K. and Osborne, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406.
- Widmaier, R., Howe, J. and Heinstein, P. (1980) Arch. Biochem. Biophys. 200, 609.
- Williamson, F.A., Morrè, D.J. and Jaffee, M.J. (1975) Plant Physiol. 56, 738.
- Witting, L.A. and Porter, J.W. (1959) J. Biol. Chem. 234, 2841.

