

EXPRESIÓN DEL TRANSPORTE DE ÁCIDOS C₄-DICARBOXÍLICOS (ADCs) EN *RHIZOBIUM TROPICI*.

Batista, S. y Martínez-Drets, G.

Depto. Bioquímica, IIBCE. Montevideo, Uruguay. Unidad Asociada a la Facultad de Ciencias. E-mail: silvia@iibce.edu.uy

Los rizobios pueden establecer asociaciones simbióticas con leguminosas. Durante este proceso, la planta forma nódulos radicales que alojan los rizobios diferenciándose como bacteroides. En la etapa culminante del programa de diferenciación, el bacteroide es capaz de reducir el N₂ a amonio. La planta incorpora el nitrógeno reducido y, como contrapartida, suministra al huésped con fuentes de energía y poder reductor. Los ADCs son una fuente esencial de nutrientes para los bacteroides, y mutantes incapaces de expresar la permeasa para ADCs (*dctA*), inducen nódulos inefectivos (Fix⁻). Las bacterias de *R. tropici* pueden asociarse con diversas leguminosas incluyendo *Phaseolus* y *Leucaena leucocephala*. Se construyó un mutante (GA1) de *R. tropici* CIAT899, incapaz de expresar el gen *dctA*. A diferencia de los mutantes *dctA* de otros rizobios, GA1 es capaz de crecer en succinato pero no en fumarato ni malato. El succinato es incorporado mediante un sistema activo secundario. La actividad de transporte aumentó al disminuir el pH, lo que sugiere que el succinato se transporta en forma de monoanión. En comparación con la cepa salvaje, GA1 expresa una reducida actividad nitrogenasa (Fix[±]). Por inserción del Tn5 en GA1, se aislaron dos mutantes incapaces de crecer en succinato. El análisis de secuencias de ADN, sugiere que el transposón se habría insertado en los genes *dctB* y *dctD*. Estos genes codifican un sistema regulador de dos componentes, responsable de la expresión del gen *dctA*. En este trabajo se discute la expresión del sistema alternativo para el transporte de succinato, y su posible importancia fisiológica.

Financiado por IFS, Suecia.

PROTEINAS CON MULTIPLES SITIOS DE UNION AL COBRE EN *SINORHIZOBIVM*

Castro-Sowinski, S.¹, Rosconi, F.¹, Franco-Fraguas, L.², Peixoto, L.¹, Carbó, A.¹ y
Martínez-Drets, G.¹

¹ Departamento de Bioquímica del IIBCE. Unidad Asociada a la Facultad de Ciencias. Av. Italia 3318, Montevideo-Uruguay. Email: scs@iibce.edu.uy,

² Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química, CC 1157, Montevideo-Uruguay.

Las proteínas con múltiples sitios de unión al cobre (PMSCu) están ampliamente distribuidas tanto en bacterias, hongos, plantas como en mamíferos. En esta familia de proteínas se encuentran la laccasa, manganeso-oxidasa, ferroxidasa, proteínas de homeostasis a cobre, ceruloplasmina y ascorbato oxidasa. Se ha descrito que *S. meliloti* expresa una proteína de homeostasis al cobre (Reeve et al., 2002. Mol. Microbiol. 43, 981-991), una proteína con actividad del tipo laccasa (Castro-Sowinski, et al., 2002. FEMS Microbiol. Lett. 209, 119-125) y la enzima nitrito reductasa (Toffanin et al., 1996. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4019-4025), todas con varios sitios de unión al cobre. La laccasa de *Sinorhizobium* se produce durante la fase de crecimiento estacionaria, cuando se agrega cobre al medio de cultivo, pudiendo oxidar varios sustratos orgánicos. Los estudios de electroforesis en condiciones nativa sugieren la presencia de varias isoenzimas. La purificación de esta enzima se realizó por cromatografía de afinidad mediante metales inmovilizados. La utilización de columnas de Cu-IDA-Sepharose y posterior electroforesis semi-preparativa permitió purificar las diferentes isoenzimas para su estudio de MS (MALDI-TOF). Los análisis en BLAST y de filogenia de varias PMSCu señalaron a una probable oxido-reductasa de rizobio como posible gen codificante de la laccasa. La construcción de un plásmido suicida pero movilizable al rizobio, con el gen interrumpido por un cassette con resistencia a kanamicina (derivado de Tn5) permitió la obtención de un mutante en este gen. Próximamente se realizarán estudios de MS y la caracterización exhaustiva del mutante.

MODIFICACIÓN QUÍMICA DE PROTEÍNAS: DIFERENTES ESTRATEGIAS PARA LA CREACIÓN DE GRUPOS TIOL Y ESTRUCTURAS TIOL-REACTIVAS

Ovsejevi, K.¹, Manta, C.¹, Grazú, V.^{1,2}, Cuadra, K.¹, Betancor, L.¹ y Batista-Viera, F.¹

¹Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química

²Unidad Asociada de Bioquímica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias

Los grandes avances en el conocimiento de la estructura de proteínas han permitido desarrollar modificaciones químicas selectivas en las mismas. La modificación de la estructura de las proteínas se puede llevar a cabo mediante reacciones de óxido-reducción sobre grupos disulfuro de dichas macromoléculas. Los puentes disulfuro cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína, debido a esto para evitar alteraciones mayores de la estructura nativa es imprescindible trabajar en condiciones moderadas y fácilmente controlables. De esta forma se busca afectar solamente aquellos disulfuros que no sean críticos para mantener la estructura y la actividad biológica de la proteína. En este trabajo se proponen dos alternativas para la modificación de proteínas: i) el uso de agentes reductores en fase sólida y ii) la formación de óxidos de disulfuro utilizando el agente oxidante monoperoxifalato de magnesio. La reducción se lleva a cabo con la finalidad de generar grupos tiol en la proteína. Dichos grupos son los más reactivos que se pueden encontrar en estas macromoléculas, debido a la gran nucleofilicidad del correspondiente ión tiolato. Por otro lado, cuando se oxidan proteínas que contienen grupos disulfuro con monoperoxifalato de magnesio, éstas adquieren la propiedad de unir tioles. Este es el caso de la queratina, proteína insoluble seleccionada por su alto contenido en grupos disulfuro y de las proteínas solubles inmunoglobulinas. La formación de estructuras tiol y tiol-reativas en biomoléculas posibilita la conjugación de las mismas mediante reacciones de intercambio tiol-disulfuro. Esta reacción es una forma especial de alquilación (S-alquilación), fácilmente reversible y por ello muy utilizada en cromatografía covalente. Estas proteínas modificadas son de gran utilidad para la preparación de bioconjugados con variadas aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo: i) bioconjugados insolubles proteína-soporte (β -galactosidasa de *K. lactis* inmovilizada en agarosa) y ii) bioconjugados solubles proteína-proteína (β -galactosidasa-inmunoglobulina).

APLICACIONES DE LAS INTERACCIONES LECTINA-CARBOHIDRATO A LA BIOTECNOLOGÍA EN FASE SOLIDA DE GLICOCOMPUESTOS DE ALTO VALOR AGREGADO, Y A LA BUSQUEDA DE LECTINAS EN PLANTAS AUTOCTONAS

Franco Fraguas, L.

Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química, CC 1157, Montevideo, URUGUAY. Email: lfranco@fq.edu.uy

Las lectinas son proteínas que poseen al menos un dominio que interacciona específica y reversiblemente con carbohidratos. En forma inmovilizada, constituyen importantes herramientas para la purificación de glicocompuestos. Debido a su alto valor biotecnológico nos hemos interesado en el polisacárido capsular de la cepa 14 de *Streptococcus pneumoniae* (CPS-14), el cual constituye uno de los factores principales de virulencia de esta bacteria. Hemos utilizado adsorbentes comerciales para su purificación, logrando importantes resultados con lectina de soja (*Glycine max*) inmovilizada, optimizando la purificación del CPS-14 a escala de laboratorio (1). A efectos de reducir costos y mejorar las propiedades del adsorbente, hemos diseñado una estrategia completa de síntesis incluyendo la purificación por afinidad de la lectina a partir de harina de soja y su inmovilización en agarosa mediante procesos optimizados (2). Se han logrado buenos niveles de producción del polisacárido puro y las columnas pueden reutilizarse hasta 4 veces sin disminución de la capacidad. También estamos interesados en la búsqueda de posibles nuevas fuentes de lectinas en plantas autóctonas. Hemos analizado más de 30 extractos acuosos con varios resultados positivos. Dada la importancia económica de la producción de papa en nuestro país, se profundizó en los resultados obtenidos con extractos de *Solanum commersonii*, una especie salvaje tuberosa cuyo centro de distribución es nuestro país. Hemos purificado una lectina con especificidad para quito-compuestos, presente en extractos de tubérculos y de hojas. Actualmente estamos realizando su caracterización y evaluación de posible actividad antimicrobiana, particularmente contra *Ralstonia solanacearum*, un fitopatógeno de la especie cultivada.

(1) N. Suárez, L. Franco Fraguas, E. Texeira, H. Massaldi, F. Batista and F. Ferreira, *Applied Environm. Microbiol.*, 67, 2001, 969-971.

(2) L. Franco Fraguas, A. Plá, F. Ferreira, H. Massaldi, N. Suárez and F. Batista, *J. Chromatogr.*, 2002 (en prensa).