

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Informe de Trabajo Final de Graduación

**ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN DE CLOROFILAS
EN *Arabidopsis thaliana*: CARACTERIZACIÓN DE
Mg-DEQUELATASA**

IIB-INTECH (CONICET-UNSAM)

Agustín Büchert

CARTAGO, 2006

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Informe de Trabajo Final de Graduación

**ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN DE CLOROFILAS
EN *Arabidopsis thaliana*: CARACTERIZACIÓN DE
Mg-DEQUELATASA**

Agustín Büchert



CARTAGO, 2006

ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN DE CLOROFILAS EN *Arabidopsis thaliana*: CARACTERIZACIÓN DE Mg-DEQUELATASA

Agustín Büchert*

RESUMEN

El conocimiento actual sobre la dequelatación del magnesio durante la degradación de clorofilas es escaso y los resultados son contradictorios. En el presente trabajo se detectó y caracterizó la actividad Mg-dequelatasa (MDS) en extractos de hojas de *Arabidopsis thaliana*, utilizando clorofilina como sustrato. Se determinó la Km aparente de la actividad, así como la temperatura y pH óptimos, efecto de activadores e inhibidores y de reguladores del crecimiento. A pesar de presentar algunas similitudes con compuestos MDS de baja masa molecular reportados en la literatura para otros sistemas, en *A. thaliana* la actividad se debería a un compuesto diferente.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, clorofilina, degradación de clorofilas, feofórbido, MDS, Mg-dequelatasa, senescencia.

* Informe final de trabajo de graduación, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN DE CLOROFILAS EN *Arabidopsis thaliana*: CARACTERIZACIÓN DE Mg-DEQUELATASA

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Miembros del tribunal



Dr. Gustavo Martínez
IIB-INTECH
DIRECTOR



Dr. Marcos Civello
IIB-INTECH
CO-DIRECTOR / LECTOR

MSc. Johnny Peraza
ITCR
PROFESOR ASESOR

DEDICATORIA

A mi hermano Juan Pablo, por su
fundamental apoyo durante mi formación
personal y profesional.

A la memoria de mi viejo, Lothar Augusto Büchert

AGRADECIMIENTOS

- Principalmente quiero agradecer a mis directores, los doctores Gustavo Martínez y Marcos Civello, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, así como por el apoyo profesional, la formación académica y el agradable ambiente de trabajo.
- A mis compañeros de la UB4 (Hernán, Claudia, Naty, Cheta y Marina) por hacer que cada día de trabajo fuera tan interesante y por la amigable paciencia durante mi proceso de aprendizaje.
- A los demás compañeros del IIB-INTECH, especialmente a Alejandro, Prolino, Alet, Marina, el esposo de Marina, Naty, Pochy, Analía S., Mariela, Gon y otros más, por los consejos técnicos, riegos de plantas, mates a la madrugada, cenas elaboradas, momentos de dispersión, viajes al pueblo, festejos varios, el embudo cariñoso, etc. etc.
- A los profesores del TEC, especialmente de la Escuela de Biología a Johnny Peraza, Vladimir Villalba, Jaime Brenes, Dora Flores y Claudia Zúñiga; de la escuela de Química a Juan Carlos Salas, Floria Roa y Walter Vargas. Y un especial desagrado a la profesora Alma Deloya Martínez, que me cae muy muy muy pero muy mal.
- A Juan Pablo, por que sin él no hubiera podido hacer nada de esto. Te debo todo lo que tengo y lo que puedo llegar a ser.
- Al resto de mi familia, por el apoyo a la distancia y por los hermosos sobrinos que tengo.
- A Naty, que es una parte importantísima en mi vida y me ayudó a sobrellevar cada día, haciéndolo mejor que el anterior. Todo va a salir bien.

- A los compas del TEC, José, Diana, Evelyn, J. David, Fabián y demás compañeros y birreros empedernidos, por la amistad y el apoyo mutuo durante el proceso de estudios en el TEC.
- A Percival Gnocci, por el apoyo incondicional durante mis estudios y porque sin su compañía todo hubiera sido mucho más difícil.
- A la Cervecería de Costa Rica, por los maravillosos productos que lanza al mercado.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS	4
INDICE GENERAL	6
INDICE DE FIGURAS	10
INDICE DE ANEXOS	12
INTRODUCCIÓN.....	13
REVISIÓN DE LITERATURA.....	16
1. Senescencia.....	16
2. Clorofilas.....	17
3. Degradación de clorofilas.....	21
3.1. Primera etapa de la degradación de clorofilas	23
3.1.1. Defitilación	23
3.1.2 Dequelatación de magnesio.....	25
3.1.3. Otras modificaciones de la primera etapa	26
3.2. Segunda etapa de la degradación de clorofilas	27
3.2.1. Ruptura del anillo macrocíclico.....	27
3.2.2. Reducción del catabolito rojo de clorofila	28
3.2.3. Modificaciones al catabolito primario fluorescente de clorofila	28
3.3. Otras reacciones y mecanismos relacionados.....	29
3.3.1. Conversión de clorofila b a clorofila a	29
3.3.2. Decoloración oxidativa de la clorofila.....	30

3.3.3. Degradación extracloroplástica de clorofilas	30
OBJETIVOS	32
Objetivo General.....	32
Objetivos Específicos.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Material vegetal	33
2. Preparación de los extractos para medir actividad MDS	33
3. Preparación del sustrato (clorofilina) para las medidas de actividad.....	33
4. Medida de la actividad MDS	34
5. Determinación del Km aparente	34
6. Medidas de actividad MDS en función de la temperatura	35
7. Medidas de actividad MDS en función del pH.....	35
8. Determinación de la estabilidad térmica de la actividad MDS	35
9. Capacidad de MDS de atravesar filtros y membranas	36
10. Medidas de actividad MDS en presencia de activadores e inhibidores.	36
11. Cromatografía de exclusión molecular	36
12. Actividad MDS durante la senescencia.....	37
13. Efecto del tratamiento con reguladores hormonales.....	37
14. Diseño experimental	38
RESULTADOS	39
1. Actividad Mg-dequelatasa.....	39
2. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad MDS	42
3. Capacidad de atravesar filtros y membranas	43

4. Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad MDS	44
5. Determinación de la masa molecular mediante cromatografía de exclusión molecular	47
6. Actividad MDS durante la senescencia.....	48
7. Efecto de reguladores hormonales sobre la actividad MDS durante la senescencia	49
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES.....	58
RECOMENDACIONES	59
BIBLIOGRAFÍA.....	60
ANEXO 1: Presentaciones a congresos.....	63

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Actividad MDS obtenida utilizando diferentes concentraciones de sustrato en la mezcla de reacción.40

Cuadro 2. Cálculo del Km aparente de la actividad MDS utilizando clorofilina como sustrato, para las tres repeticiones realizadas.....41

Cuadro 3. Efectos de diferentes compuestos en la mezcla de reacción sobre la actividad MDS.45

Cuadro 4. Curva de calibración para la determinación de la masa molecular de MDS utilizando la resina Sephacryl S-100 HR.....47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las clorofilas vegetales.....	18
Figura 2. Espectro de absorción las clorofilas a y b.	19
Figura 3. Resumen de la vía biosintética de las clorofilas.....	20
Figura 4. Senescencia en <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
Figura 5. Vía de degradación de clorofilas en hojas senescentes.....	22
Figura 6. Compartimentalización de la vía de degradación de la clorofila.	24
Figura 7. Variación de los picos de absorción de una solución de clorofilina provocada por la adición de un extracto enzimático de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
Figura 8. Cinética de saturación de la actividad MDS.	40
Figura 9. Representación doble recíproca del modelo de Michaelis-Menten para determinar el Km aparente de la actividad MDS.....	41
Figura 10. Efecto de la temperatura sobre la actividad MDS.	42
Figura 11. Efecto del pH del medio de reacción sobre la actividad MDS.....	43
Figura 12. Actividad MDS de un extracto crudo antes y después de ser dializado contra buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,5 M pH 7,2 utilizando membranas de corte de 10000 Da.....	44
Figura 13. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de MgCl_2 , KCl y HgCl_2 sobre la actividad MDS.....	45
Figura 14. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de EDTA sobre la actividad MDS.....	46
Figura 15. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de H_2O_2 y glutatión reducido sobre la actividad MDS.....	46

Figura 16. Curva de calibración de la columna para la cromatografía de exclusión molecular utilizando la resina Sephacryl S-100 HR.....	47
Figura 17. Cromatograma obtenido utilizando la resina Sephacryl S-100 HR.....	48
Figura 18. Variaciones en la actividad MDS a través de la senescencia inducida....	49
Figura 19. Aspecto de las hojas tratadas con reguladores del crecimiento durante la senescencia inducida.....	50
Figura 20. Efecto de 6-BAP y etileno sobre la actividad MDS.	51
Figura 21. Evolución del contenido de clorofilas y de la actividad MDS durante la senescencia inducida en hojas de <i>A. thaliana</i> tratadas con reguladores del crecimiento.....	52
Figura 22. Póster presentado en el congreso XLI de SAIB, Buenos Aires, Diciembre 2005.....	64

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Presentaciones a congresos.....63

INTRODUCCIÓN

La clorofila es una de las moléculas clave para la fotosíntesis, proceso de central importancia para el mantenimiento de la vida en nuestro planeta. Se estima que aproximadamente $1,2 \times 10^9$ toneladas de clorofila son degradadas anualmente en todo el planeta. La mayor parte de este proceso ocurre en las hojas de los árboles caducifolios, aunque también hay degradación de clorofilas durante la maduración de los frutos, la senescencia de distintos órganos y el recambio normal de las clorofilas de órganos no senescentes. A pesar de la magnitud de este proceso, hasta hace cerca de una década, los conocimientos respecto a los mecanismos enzimáticos involucrados en el catabolismo de este compuesto eran escasos.

Durante la senescencia de las hojas, los cloroplastos sufren una desorganización de sus membranas tilacoidales y una simultánea degradación de clorofilas. Matile *et al* (1999) han propuesto una ruta catabólica para dicha degradación cuyas primeras etapas ocurren dentro del cloroplasto. Se ha propuesto como primera reacción la hidrólisis de la unión entre el fitol y el anillo tetrapirrólico de la clorofila generando clorofílido. El clorofílido es a su vez degradado por Mg-dequelatasa, lo cual libera Mg^{+2} y produce feofórbido. En la siguiente etapa el feofórbido es transformado en un tetrapirrol lineal por la feofórbido *a* oxigenasa y exportado fuera del cloroplasto. Los siguientes productos del catabolismo son almacenados en vacuolas, y la naturaleza de los mismos varía de acuerdo a la especie. Este mecanismo general podría presentar variantes o excepciones cuando se estudia en otras especies.

La segunda enzima del catabolismo, Mg-dequelatasa, ha sido asociada a las membranas tilacoidales (Vicentini *et al*, 1995), pero los intentos de purificación han sido infructuosos (Matile *et al*, 1999). Más aún, en *Chenopodium album* se ha detectado una Mg-dequelatasa con sorprendentes propiedades, una masa molecular menor a 5000 Da y una elevada estabilidad térmica (Shioi *et al*, 1996), lo cual explicaría la dificultad de purificar esta “enzima”. Más recientemente, se demostró que en frutillas la actividad Mg-dequelatasa está asociada a un compuesto que se

comporta de manera diferente según la fuerza iónica del medio en el cual se halla. Se determinó además que el compuesto presenta una masa molecular cercana a 2100 Da, es inhibido por cisteína y su actividad se reduce luego del tratamiento con una proteasa (proteínasa K), por lo que se sugiere que el mismo puede ser un péptido de muy baja masa molecular (Costa *et al*, 2002). Suzuki *et al* (2005) reportaron la presencia de una sustancia de baja masa molecular y de una proteína, ambas con actividad Mg-dequelatasa, en extractos de rábano. La sustancia de baja masa molecular es diferente en sus características al compuesto encontrado en frutilla y los resultados sugieren que no es un grupo que se separa fácilmente de la proteína más grande, sino que son compuestos diferentes e independientes. Estos resultados indican la necesidad de profundizar la caracterización e identificación de la sustancia responsable de dicha actividad en otros sistemas.

El conocimiento de la vía de degradación de clorofilas y de la actividad biológica de las enzimas que regulan el proceso posee una potencial aplicabilidad tanto para la industria como para la agricultura. Si se pudiera reducir la velocidad de la degradación de clorofila, ya sea mediante manipulación génica o utilizando inhibidores de baja masa molecular, se podría mantener el color verde y apariencia fresca de plantas enteras u otro material vegetal, así como incrementar la productividad de los cereales mediante un retraso de la senescencia y una extensión de los períodos de asimilación de carbono. Igualmente, la manipulación de la vía de degradación de la clorofila podría aumentar la tolerancia a patógenos de plantas de alto valor agronómico. El entendimiento de las propiedades bioquímicas de estas enzimas puede ser útil para manipularlas y ajustar sus características químicas y fisiológicas, o para examinar el efecto de inhibidores sobre su actividad y función biológica.

En el presente trabajo se realizará una caracterización y determinación de la masa molecular de Mg-dequelatasa, el compuesto involucrado en la eliminación del ión Mg^{2+} de las clorofilas. Este componente de la vía catalítica de la clorofila es el responsable de la pérdida del color verde en las plantas, por lo que el conocimiento

sobre su bioquímica es de especial importancia en el estudio de los factores determinantes en la vida poscosecha de las hortalizas. El trabajo se llevará a cabo en *Arabidopsis thaliana*, el sistema que actualmente se utiliza como modelo en los estudios de fisiología vegetal.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Senescencia

La muerte de grupos específicos de células es una parte esencial del crecimiento y desarrollo de las plantas superiores. La senescencia es el último paso del desarrollo de todos los órganos de una planta, incluyendo hojas, tallos, raíces, flores y frutos; es un tipo de muerte celular programada, que se define como la muerte relativamente lenta de los tejidos al final de su ciclo de vida. La senescencia involucra un desarmado organizado de los componentes celulares del tejido senescente y permite una recuperación máxima de nutrientes (especialmente nitrógeno y fósforo), para ser reciclados a las partes sobrevivientes de la planta. Este proceso por lo general sigue a la maduración de órganos y ocurre sin que haya crecimiento o morfogénesis. En algunos casos puede ser muy rápida y tomar menos de un día, o bien ser un proceso lento que dure meses o años (Buchanan *et al*, 2000).

La senescencia es un proceso altamente regulado, durante el cual se activan algunas vías metabólicas a la vez que otras dejan de funcionar. La senescencia comienza con una fase de iniciación, la cual involucra la activación e inactivación de varios genes. Esta fase inicial es inducida por una cascada de transducción de señales vinculada a varios estímulos, como señales hormonales y ambientales, o en respuesta al ataque de patógenos. También involucra una alteración del estado redox de los tejidos. Posteriormente comienza una fase de reorganización, en la que se presenta una rediferenciación controlada de las estructuras celulares y se activan vías de recuperación de materiales. Ocurre un cambio de metabolismo autótrofo a uno heterótrofo, detoxificación de tejidos y rediferenciación reversible de organelas. Finalmente, una fase terminal provoca los síntomas más comunes de la muerte celular, tales como acumulación de antibióticos, liberación de radicales libres, eliminación de metabolitos y pérdida irreversible de la integridad y viabilidad celular. La integridad de las membranas subcelulares y la compartimentalización de las vías bioquímicas se conservan hasta tarde en la fase terminal (Buchanan *et al*, 2000).

La senescencia en hojas y frutos se caracteriza por los dramáticos cambios que ocurren en las principales organelas, particularmente en los plastidios. Los plastidios son las organelas más importantes en las células vegetales y la red interconectada que se crea por sus diferentes formas (amiloplastos, cloroplastos, etioplastos, etc.) es determinante para el desarrollo de las células y los tejidos. Los cloroplastos caracterizan los tejidos foliares sanos, pero también cumplen un rol importante durante la senescencia. Se puede decir que la senescencia en las células del mesófilo es un proceso homólogo a la diferenciación de cloroplastos a cromoplastos en la maduración de frutos, ya que los cloroplastos sufren un proceso de transición que los transforma en gerontoplastos, una forma de plastidio específica de la senescencia cuyo metabolismo es exclusivamente catabólico. Los gerontoplastos en desarrollo persisten y se mantienen intactos a través de la senescencia foliar, luego pierden volumen y densidad como consecuencia de pérdidas extensivas de componentes estromales y de tilacoides, e incrementa el número y tamaño de plastoglóbulos lipofílicos. Por lo tanto, un gerontoplasto completamente desarrollado consiste en una cubierta todavía intacta que envuelve cierto número de plastoglóbulos de gran tamaño. Se sabe que el desarrollo de los gerontoplastos se encuentra bajo control nuclear y que la expresión de genes codificados en los plástidos tiene un papel menor. En la senescencia de algunas especies, el ADNct es extensamente degradado antes de que comience la diferenciación a gerontoplastos; sin embargo, en muchas especies, la senescencia foliar es reversible, indicando que los gerontoplastos maduros retienen suficiente información genética como para revertirse a cloroplastos (Matile *et al*, 1999; Thomas *et al*, 2003).

2. Clorofilas

El tejido con mayor actividad fotosintética en las plantas superiores es el mesófilo de las hojas. Las células del mesófilo contienen numerosos cloroplastos, los cuales poseen los pigmentos verdes especializados en la absorción de la luz, las clorofilas.

Este compuesto es vital para la fotosíntesis y es uno de los compuestos orgánicos de baja masa molecular más complejos y abundantes presentes en la naturaleza (Buchanan *et al*, 2000; Takamiya *et al*, 2000).

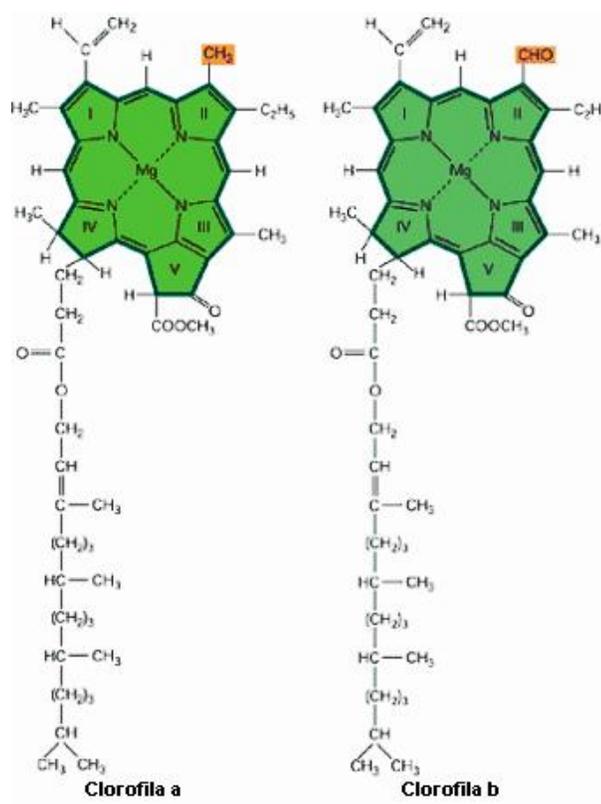


Figura 1. Estructura de las clorofilas vegetales. La clorofila a posee un grupo CH₃, mientras que la clorofila b posee un grupo CHO en la misma posición. Tomado de: Buchanan *et al*, 2000.

La gran mayoría de los organismos fotosintéticos posee alguna de las variantes de este pigmento. Las moléculas de clorofila están formadas por un anillo tetrapirrólico (porfirina), estructura similar al grupo prostético hemo encontrado en la hemoglobina y los citocromos. La clorofila une un ión magnesio en el centro de su anillo tetrapirrólico y posee una larga cadena lateral hidrofóbica de 20 carbonos unida al mismo, conocida como fitol. Esta última característica hace que la molécula sea

extremadamente no polar (ver figura 1). Los dos tipos principales de clorofilas son la clorofila *a* y la clorofila *b*, que difieren en que la primera posee un grupo metilo donde la segunda posee un formilo. Esta pequeña diferencia en estructura química provoca un considerable cambio en el espectro de absorción de ambos compuestos (ver figura 2). La absorbancia también se ve afectada por la unión no covalente de la clorofila con proteínas encontradas en la membrana fotosintética. La clorofila posee una coloración verde ya que absorbe radiación electromagnética de manera más efectiva a las longitudes de onda de 430 nm (azul) y 680 nm (rojo) del espectro de luz visible de manera más efectiva que la luz verde (Buchanan *et al*, 2000; Taiz y Zeiger, 1998).

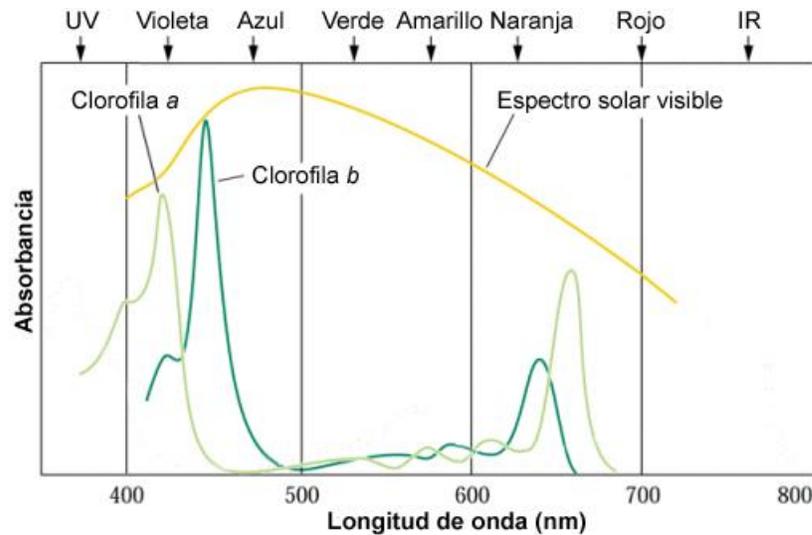


Figura 2. Espectro de absorción las clorofilas *a* y *b*. Se muestra el espectro de luz solar visible. Modificado de: Buchanan *et al*, 2000.

En la ruta biosintética de la clorofila, el primer precursor identificado es el ácido δ -aminolevulínico (ALA), que tanto en plantas como en cianobacterias es producido a partir del glutamato en una serie de reacciones que involucran la unión del ácido glutámico a una molécula de ARN de transferencia (ARNt^{Glu}). En los siguientes

pasos de la vía anabólica, ocurre la formación del complejo protoporfirina IX, sobre el cual actúa la enzima magnesio quelatasa, la cual agrega el átomo central de magnesio, para formar Mg-protoporfirina. Posteriormente se forma el clorofíido *a*, que funciona como sustrato para la enzima clorofila sintetasa, encargada de agregar el fitol, para formar clorofila *a*. La clorofila *b* se sintetiza a partir de la clorofila *a* recién producida por acción de la enzima clorofila *a* oxigenasa; sin embargo, se ha encontrado clorofíido *b* en tejidos etiolados, sugiriendo que la clorofila *b* también puede formarse independientemente de la producción de clorofila *a* (Buchanan *et al*, 2000; Schoefs y Bertrand, 1997). La ruta biosintética de las clorofilas se resume en la figura 3.

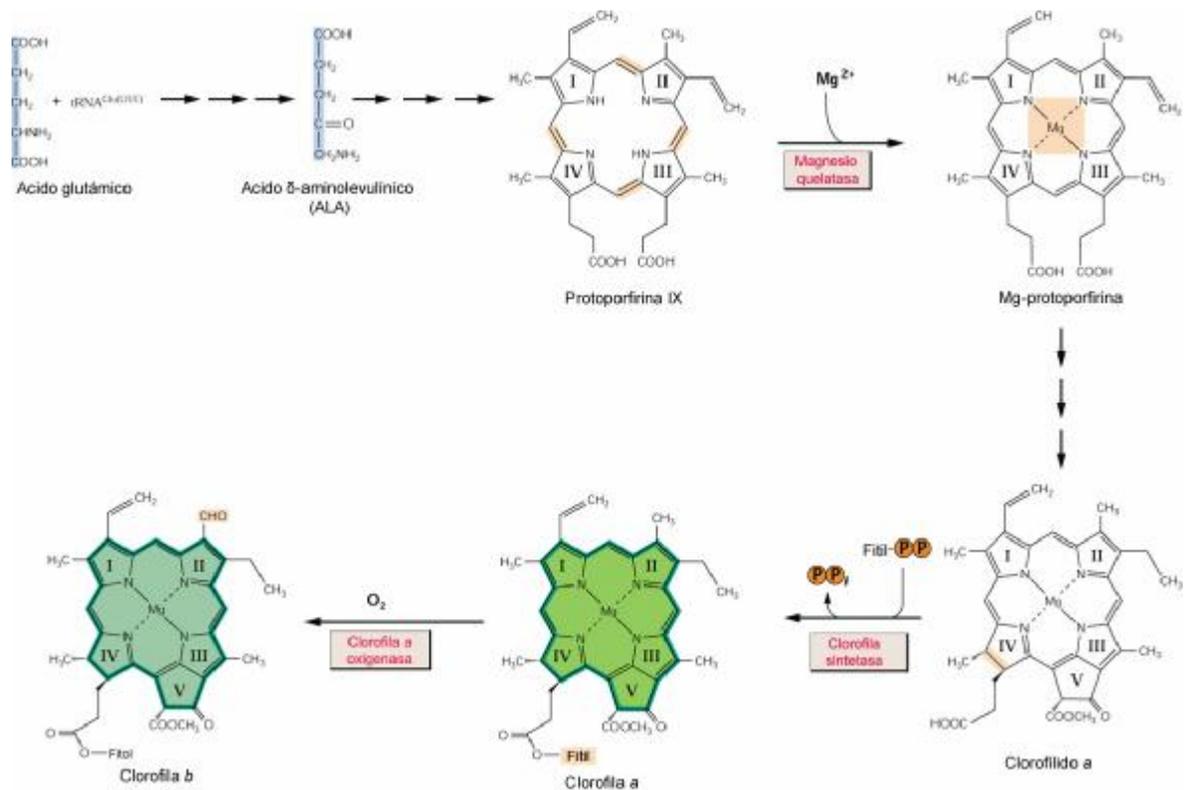


Figura 3. Resumen de la vía biosintética de las clorofilas. Modificado de: Buchanan *et al*, 2000.

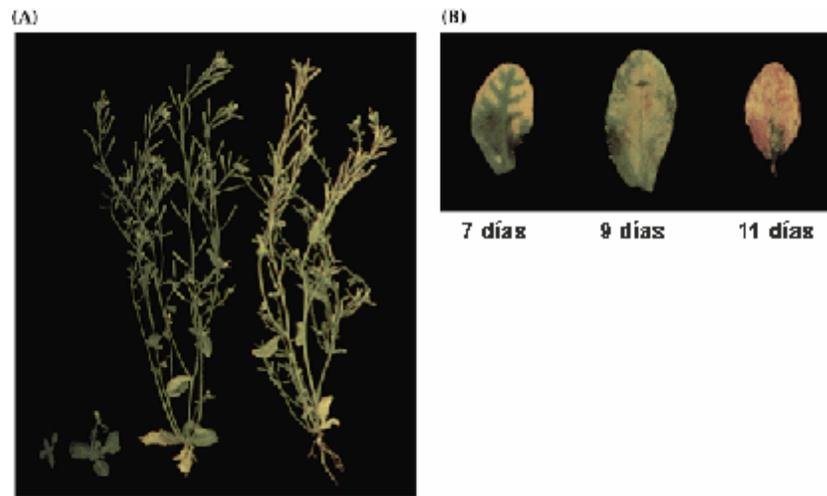


Figura 4. Senescencia en *Arabidopsis thaliana*. (A) Desarrollo de plantas a diferentes tiempos después de la germinación, con evidente amarillamiento en los estadios más tardíos. (B) Cambios en las hojas de la roseta basal, 7, 9 y 11 días después de finalizada la expansión foliar. Tomado de: Buchanan *et al*, 2000.

3. Degradación de clorofilas

El síntoma más claro de la senescencia en tejido foliar es la pérdida gradual del color verde a través del tiempo, provocado por la degradación de la clorofila (ver figura 4). El catabolismo de la clorofila ha sido estudiado principalmente en hojas senescentes y en frutos en maduración de un gran número de especies. La vía bioquímica de degradación de clorofilas aceptada actualmente comprende dos etapas, que se dividen al momento de la apertura del tetrapirrol macrocíclico. Los productos pertenecientes a la primera etapa (antes de romperse el anillo) mantienen total o parcialmente la coloración verde, mientras que los de la segunda etapa pierden esa coloración y son prácticamente incoloros. La primera etapa incluye modificaciones a la cadena lateral del macrociclo, la hidrólisis del residuo de fitol (defitilación), liberación de Mg^{2+} del tetrapirrol mediante desplazamiento con $2H^+$ y algunas otras modificaciones al macrociclo que varían entre especies. La segunda etapa es esencial para la característica pérdida del color verde en la senescencia. En la mayoría de los casos estudiados, no se acumulan intermediarios de la degradación en una cantidad que se

pueda apreciar, lo cual sugiere que existe una serie de reacciones catabólicas. La ruta de degradación de clorofilas se resume en las figuras 5 y 6, y se detallará a continuación (Buchanan *et al*, 2000; Hörtensteiner, 1999; Matile *et al*, 1999).

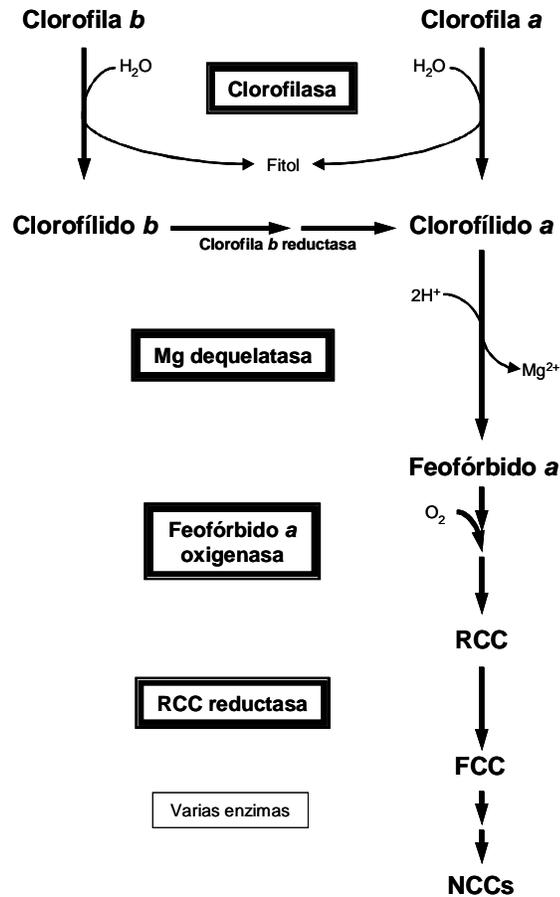


Figura 5. Vía de degradación de clorofilas en hojas senescentes. RCC: catabolitos rojos de clorofila; FCC: catabolitos fluorescentes de clorofila; NCC: catabolitos no fluorescentes de clorofila. Modificado de: Matile *et al*, 1999.

3.1. Primera etapa de la degradación de clorofilas

3.1.1. Defitilación

La enzima encargada de la eliminación del fitol de la molécula de clorofila es la clorofilasa (clorofila-clorofíido hidrolasa; EC 3.1.1.14), una de las primeras enzimas vegetales en ser estudiada. Esta enzima es una proteína hidrofóbica glicosilada asociada a las membranas del cloroplasto y otras organelas, y se caracteriza por su latencia funcional. Esta propiedad se ha observado bajo condiciones *in vitro*: en preparaciones de membranas de cloroplastos la clorofila no es defitilada a menos que las membranas sean tratadas con detergente o acetona a altas concentraciones, con el fin de desorganizarlas. Esta latencia se puede deber simplemente a la separación espacial que existe entre la misma y su sustrato, ya que la clorofila se encuentra en los complejos pigmento-proteína tilacoidales y la clorofilasa estaría localizada en la membrana plastídica. La clorofilasa cataliza la hidrólisis del enlace éster entre la clorofila y el fitol, reacción que se considera como el primer paso del catabolismo de la clorofila, ya que los productos de degradación en diferentes especies vegetales presentan principalmente estructuras no esterificadas. Los productos de la reacción son fitol y clorofíido (Benedetti y Arruda, 2002; Matile *et al*, 1999; Takamiya *et al*, 2000).

La exclusiva ubicación cloroplástica de las clorofilasas ha sido recientemente cuestionada (Takamiya *et al*, 2000; Tsuchiya *et al*, 2000). Si bien la mayoría de las proteínas con actividad clorofilasa han sido purificadas a partir de cloroplasto y algunos de sus genes codificantes presentan péptido señal que las dirigen a estas organelas, otros de los genes recientemente clonados muestran péptidos señal que dirigirían las proteínas hacia el retículo endoplásmico o vacuolas (Tsuchiya *et al*, 2000). Estos resultados establecen la posibilidad de una degradación de clorofilas por fuera del cloroplasto (ver figura 6).

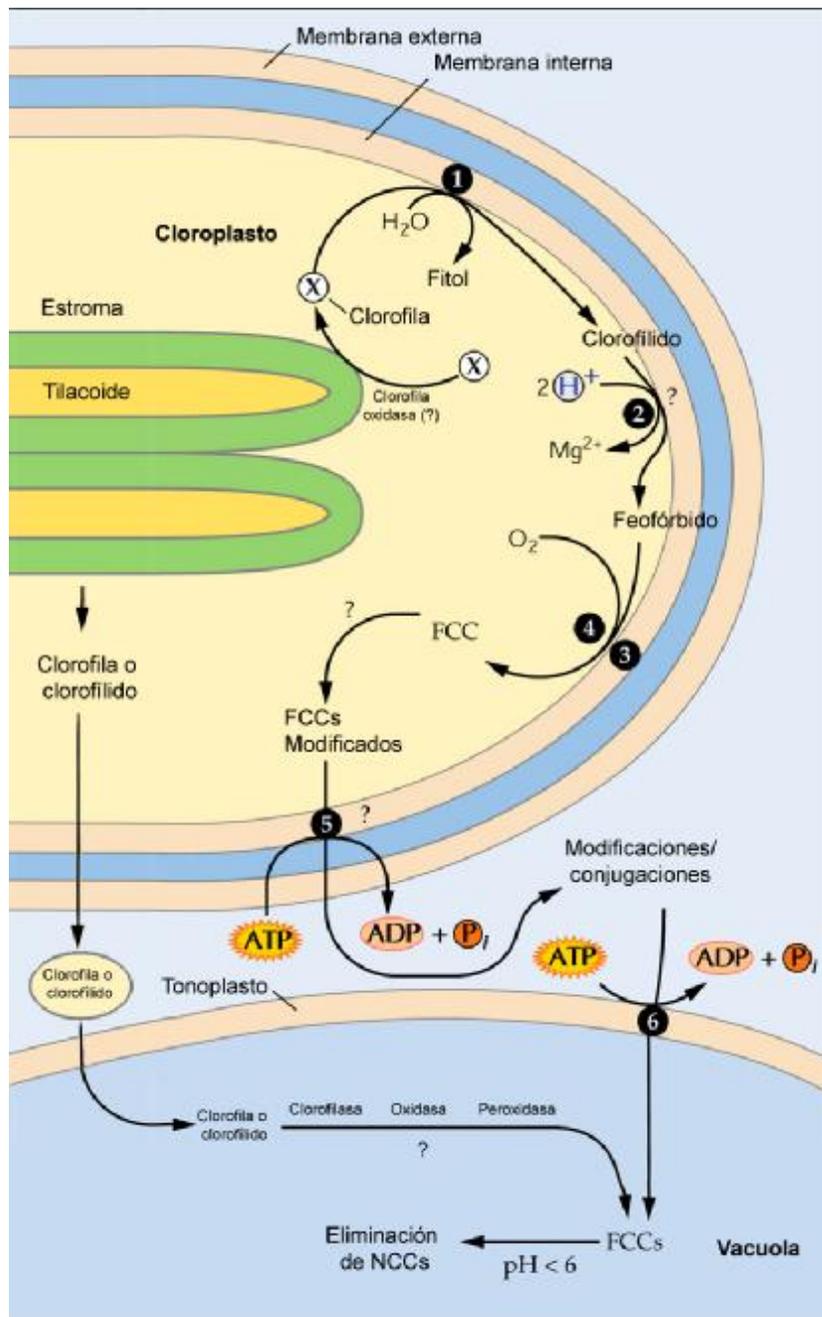


Figura 6. Compartimentalización subcelular de la vía de degradación de la clorofila. (1) Clorofilasa, (2) Mg-dequelatasa, (3) Feoforbido *a* oxigenasa, (4) FCC reductasa, (5) Translocador de catabolitos, (6) Transportador ABC. FCC: catabolitos fluorescentes de clorofila; NCC: catabolitos no fluorescentes de clorofila; X: Parte hipotética del sistema, responsable de la desorganización de los complejos pigmento-proteína tilacoidales y del transporte de las moléculas de clorofila resultantes. Modificado de: Buchanan *et al*, 2000; Takamiya *et al*, 2000.

3.1.2 Dequelatación de magnesio

La pérdida del magnesio ocurre luego de la defitilación, para dar como resultado feofórbido *a* y Mg^{2+} , a partir del clorofíido, lo cual ha sido demostrado en preparaciones tanto de algas como de plantas superiores. Sin embargo, el conocimiento actual sobre las propiedades del compuesto responsable de este paso es escaso. En un principio, la acumulación *in vivo* e *in vitro* de feopigmentos (derivados de la clorofila sin Mg^{2+}) durante la degradación de la clorofila, y el hecho de que algunas enzimas posteriores en la vía como la feofórbido *a* oxigenasa sólo actúan sobre derivados sin Mg^{2+} , sugirió la presencia de una enzima con actividad magnesio dequelatasa. Estos datos sugieren que la liberación de Mg^{2+} es un paso necesario e importante en el catabolismo de la clorofila. Sin embargo, existe escasa información sobre las propiedades de Mg-dequelatasa y los resultados son contradictorios (Costa *et al*, 2002; Matile *et al*, 1999; Takamiya *et al*, 2000).

Se ha observado que la actividad Mg-dequelatasa está asociada a las membranas de los cloroplastos. Al igual que la clorofilasa, Mg-dequelatasa parece no estar regulada durante la senescencia y poseer actividad constitutiva. Vicentini *et al* (1995) detectaron actividad Mg-dequelatasa en *Brassica napus*, estando la mayor parte asociada a tilacoides. De acuerdo a las propiedades encontradas en ese sistema, los autores sugirieron que la actividad estaría asociada a la existencia de una enzima, si bien no realizaron una purificación de la misma. Shioi *et al* (1996) reportaron que la actividad de extractos crudos de *Chenopodium album* pierden la totalidad de su actividad Mg-dequelatasa luego de tratamientos con calor, mientras que los extractos filtrados a través de membranas de 5 kDa mantuvieron toda su actividad luego de ser tratados térmicamente. Debido a estos resultados, propusieron que la actividad Mg-dequelatasa no se debe a una enzima propiamente dicha, sino a una sustancia estable al calor y de baja masa molecular. Considerando estas propiedades del compuesto responsable de la actividad, se le dio el nombre de MDS (por “*magnesium dechelating substance*”). Resultados diferentes fueron encontrados en frutilla, dónde se demostró que la actividad Mg-dequelatasa está asociada a un compuesto que en

alta fuerza iónica se comporta como una sustancia de alta masa molecular, que se inactiva por calentamiento y no atraviesa membranas de corte de 10 kDa. En cambio, a baja fuerza iónica, la actividad MDS se comporta como un compuesto de baja masa molecular (menor a 10 kDa) y termoresistente. Se encontró además que el compuesto presenta una masa molecular cercana a 2100 Da, es inhibido por cisteína y su actividad se reduce luego del tratamiento con una proteasa (proteínasa K), lo que sugiere que el mismo sería un péptido de baja masa molecular. Se ha sugerido inclusive que este compuesto estable al calor es un grupo prostético, que formaría parte de la enzima y que se disociaría fácilmente de la proteína dequelatasa. Sin embargo, más recientemente, Suzuki *et al* (2005) detectaron la presencia de dos compuestos con actividad Mg-dequelatasa en extractos de *Raphanus sativus*: uno de baja masa molecular y una proteína. A pesar de que la sustancia de baja masa molecular posee estabilidad térmica, sus otros atributos difieren del supuesto grupo prostético encontrado en frutilla mencionado anteriormente. El compuesto de *R. sativus* posee susceptibilidades diferentes a los activadores e inhibidores, es de una masa molecular menor y su actividad no se reduce al tratarse con proteínasa K, indicando que es una sustancia diferente a la encontrada en frutilla. También se comprobó que la sustancia de baja masa molecular no es un grupo que se une a la proteína, ya que al separar ambos compuestos y sumar las actividades de los mismos se obtiene la actividad total del extracto antes de la separación. El comportamiento de cada compuesto durante la senescencia y las diferentes susceptibilidades a los inhibidores indican que se trata de dos compuestos independientes entre sí (Costa *et al*, 2002; Shioi *et al*, 1996; Suzuki *et al*, 2005; Vicentini *et al*, 1995).

3.1.3. Otras modificaciones de la primera etapa

Recientemente, se ha purificado una enzima llamada “feoforbidasas”, a partir de *Chenopodium album*, la cual cataliza la hidrólisis de enlace metilester del anillo isocíclico del feofórbido. El producto de esta reacción no es estable y por lo tanto es

convertido de manera no enzimática a pirofeofórbido. Un aspecto interesante es que la enzima feoforbidasasa se ubica fuera del cloroplasto, lo cual indica que, si feofórbido *a* es el verdadero sustrato de dicha enzima, existiría una vía de degradación cuyos pasos iniciales ocurrirían fuera del cloroplasto. Esta reacción podría ser específica para ciertas especies, ya que el compuesto fue encontrado en varias pero no en todas las especies de plantas superiores utilizadas (Takamiya *et al*, 2000).

Otra posible ruta alternativa de degradación es la formación de feofitinas. Estos compuestos son derivados fitilados de la clorofila sin el Mg^{2+} , con lo que se mantienen liposolubles pero de coloración amarilla. Se ha descrito la acumulación de estos compuestos durante la senescencia inducida de hojas de perejil (Amir-Shapira *et al*, 1987) y la senescencia poscosecha de inflorescencias inmaduras de brócoli (Costa, 2005). Más aún, el único derivado de clorofila detectado en hojas amarillas de *Ginkgo biloba* fue la feofitina *a* (Tang *et al*, 2000). Estos resultados sugieren que la remoción de Mg^{2+} podría ocurrir antes de la hidrólisis del fitol. Sin embargo, hasta el momento, los ensayos *in vitro* con Mg-dequelatasa mostraron que la eliminación del Mg^{2+} ocurre solo en derivados defitilados de la clorofila (Shioi *et al*, 1996), aunque podría existir la eliminación del Mg^{2+} *in vivo*. Otros posibles mecanismos podrían incluir alguna enzima no descrita actualmente o algún proceso no enzimático (ver punto 3.3.3).

3.2. Segunda etapa de la degradación de clorofilas

3.2.1. Ruptura del anillo macrocíclico

El paso de apertura del anillo tetrapirrólico es determinante para la pérdida del color verde en los tejidos. La enzima feofórbido *a* oxigenasa es un componente de la membrana interna de los cromoplastos y gerontoplastos, que cataliza la ruptura oxigenolítica del anillo entre el C4 y el C5, mediante la adición de dos átomos de oxígeno y cuatro átomos de hidrógeno. El producto de esta reacción es el primer

compuesto incoloro identificable, catabolitos rojos de clorofila o RCC (por “*red chlorophyll catabolites*”). La expresión de esta monooxigenasa requiere la presencia de ferredoxina reducida y NADPH y ambos compuestos se hallan presentes en el gerontoplasto, pero no en tejido presenescente. Esto indica que la actividad de feofórbido *a* oxigenasa es crucial para esta ruta catabólica, ya que su actividad sólo se detecta durante la senescencia, al contrario de otras enzimas de la vía que presentan expresión constitutiva (Hörtensteiner, 1999; Pruzinska *et al*, 2003; Takamiya *et al*, 2000).

3.2.2. Reducción del catabolito rojo de clorofila (RCC)

Acoplada a la reducción de la oxigenasa que abre el anillo, se encuentra la reacción catalizada por la enzima RCC reductasa, la cual reduce el puente metino del catabolito rojo de clorofila. Esta enzima localizada en el estroma produce un compuesto incoloro fluorescente, denominado catabolito primario fluorescente de clorofila o pFCC (por “*primary fluorescent chlorophyll catabolite*”). Esta reacción requiere la presencia de ferredoxina y ausencia de oxígeno; esto indica que las reacciones de RCC reductasa y la de feofórbido *a* oxigenasa están muy cercanamente relacionadas, ya que la reacción de la oxigenasa consume oxígeno y mantiene el microambiente anaerobio para la reductasa. Se cree que la RCC reductasa podría tener algún otro rol en cloroplastos no senescentes o en raíces, debido a su presencia en estos tejidos y a la expresión exclusiva de la feofórbido *a* oxigenasa en los gerontoplastos (Takamiya *et al*, 2000; Wüthrich *et al*, 2000).

3.2.3. Modificaciones al catabolito primario fluorescente de clorofila (pFCC)

El catabolito primario fluorescente de clorofila (pFCC) es convertido a catabolito fluorescente de clorofila (FCC) mediante varias modificaciones que varían entre

especies, tales como demetilación e hidroxilación, y algunos catabolitos son exportados del gerontoplasto al citosol mediante un translocador dependiente de ATP de la membrana. Las enzimas involucradas en estos pasos aún no han sido identificadas, aunque se sabe que estas reacciones provocan un incremento en la solubilidad de los catabolitos. Se considera que los FCC modificados son transportados a la vacuola mediante translocadores dependientes de ATP en el tonoplasto y luego son convertidos a los catabolitos no fluorescentes de clorofila (NCC, por “*non fluorescent chlorophyll catabolites*”), mediante un reacomodo de dobles enlaces en el anillo pirrónico IV y su puente metino adyacente. Esta tautomerización ocurre de manera no enzimática bajo condiciones ligeramente ácidas, y por lo tanto es probable que ocurra al ser exportados a la vacuola. Las estructuras de los NCC demuestran que ciertos grupos carboximetilo podrían ser demetilados, acción posiblemente llevada a cabo por una metilesterasa. No está completamente claro si son desechados sin mayor degradación; sin embargo, recientemente se han identificado tres productos de degradación de derivados monopirrónicos en cotiledones y hojas senescentes de varias especies. Aún no se conoce si la formación de estos compuestos *in vivo* se produce a través de un mecanismo enzimático (Matile *et al*, 1999; Takamiya *et al*, 2000).

3.3. Otras reacciones y mecanismos relacionados

3.3.1. Conversión de clorofila b a clorofila a

La clorofila *b* es un pigmento accesorio de los complejos recolectores de luz en plantas superiores, algas y algunos procariotas fotosintéticos, y representa hasta el 30% de las clorofilas totales. A pesar de su relativa abundancia, en plantas superiores sólo se han encontrado catabolitos de la clorofila *a* y ninguno de su forma *b*. Esto indica que podría existir una reversión de clorofila *b* a clorofila *a* al inicio de la vía de degradación, lo cual es respaldado por varias observaciones. Por ejemplo, la cantidad de NCC que se forman durante la senescencia representa la totalidad de la clorofila

degradada; la enzima feofórbido *a* oxigenasa sólo toma al feobórbido *a* como sustrato, mientras que el feofórbido *b* es un inhibidor competitivo; la inhibición de feofórbido *a* oxigenasa provoca la acumulación de ambas formas de clorofilido, pero sólo de feofórbido *a*. Estos resultados sugieren la presencia de una enzima “clorofila *b* reductasa”. Este compuesto parece estar formado por dos componentes: una enzima dependiente de NADPH, que produce un intermediario 7-hidroxi y una segunda reductasa que depende de la presencia de ferredoxina reducida. Pruebas para determinar la especificidad de sustrato indican que este paso ocurre luego de la defitilación, como se muestra en la figura 5 (Folly y Engel, 1999; Hörtensteiner, 1999; Matile *et al*, 1999; Takamiya *et al*, 2000).

3.3.2. Decoloración oxidativa de la clorofila

Existen reportes de inducción de degradación de clorofilas en lisados de cloroplastos o extractos de hojas utilizando oxidación o peroxidación con compuestos fenólicos y peróxido de hidrógeno, y mediante lipoxigenación con ácido linolénico, proceso llamado “decoloración oxidativa de la clorofila”. Inclusive en algunas especies se ha observado que el incremento en actividad peroxidasa u oxidasa se correlaciona con la pérdida de color verde de semillas y cotiledones. Sin embargo, en estos casos, sólo se han identificado unos pocos intermediarios formados por ruptura del anillo macrocíclico (Takamiya *et al*, 2000).

3.3.3. Degradación extracloroplástica de clorofilas

Trabajos realizados con hojas senescentes de soja mostraron la presencia de plastoglobulos en los cloroplastos (Guiamét *et al*, 1999). Estos plastoglobulos contienen clorofilas intactas junto con proteínas tilacoidales y son eliminados del cloroplasto senescente y transportados hacia las vacuolas. En esta locación puede

ocurrir la degradación de clorofilas por alguno de los mecanismos previamente mencionados: a) defitilación por acción de clorofilasas con localización vacuolar tal como se describe en 3.1.1.; b) decoloración oxidativa por la presencia de peroxidasas y altas concentraciones de peróxido de hidrógeno en la vacuola; c) pérdida no enzimática del Mg^{2+} por el bajo pH presente en la vacuola (Guiamét *et al*, 1999).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Contribuir al conocimiento del rol de Mg-dequelatasa en la vía de degradación de clorofilas en *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos Específicos

- Caracterizar la actividad Mg-dequelatasa en *Arabidopsis thaliana*.
- Analizar la evolución de la actividad de Mg-dequelatasa durante la senescencia de hojas de *Arabidopsis thaliana* en presencia y ausencia de reguladores hormonales del proceso.
- Determinar la masa molecular del compuesto responsable de la actividad Mg-dequelatasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* var. Col0 cultivadas bajo un fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad, a una temperatura de 22-24 °C y una intensidad lumínica de 150-200 $\mu\text{Einstein/m}^2$ (400-700 nm). El riego del material vegetal se realizó con solución Hoagland al 50%. Para todos los ensayos se utilizaron hojas de estadios similares de desarrollo, las que fueron utilizadas inmediatamente o congeladas en $\text{N}_2(l)$ y almacenadas a -80 °C hasta su utilización.

2. Preparación de los extractos para medir actividad MDS

Se trituró 1 g de hojas de *A. thaliana* en nitrógeno líquido y el triturado se agregó a 10 ml de un buffer de extracción de la siguiente composición: NaH_2PO_4 0,05 M y Na_2HPO_4 0,05 M (pH 7,2); Triton X-100 0,1 % (v/v); polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v). Se mantuvo en agitación a 4 °C durante una hora y luego se centrifugó a 13200xg y 4 °C durante 20 minutos. Se descartó el precipitado y el sobrenadante (“extracto crudo”) se almacenó a -20 °C (por un período de no más de 20 días). En algunos casos, se realizó una precipitación con sulfato de amonio del extracto crudo, llevándolo primero al 40% y luego al 90% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El precipitado de 90% fue resuspendido en buffer fosfato (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4) 0,05 M, pH 7,2 y almacenado a -20 °C.

3. Preparación del sustrato (clorofilina) para las medidas de actividad

Como sustrato de la reacción enzimática se utilizó clorofilina, la cual se obtuvo a partir de hojas de acelga (*Beta vulgaris* var. Cicla L.) o espinaca (*Spinacea oleracea* L.), en base al método de Vicentini *et al* (1995). El material vegetal se adquirió de

proveedores locales. Se homogenizaron 30 g de hojas frescas en 100 ml de acetona 80% v/v utilizando un Omnimixer (Oci Instruments) a 0 °C. La suspensión resultante se filtró a través de papel de filtro y en el filtrado se llevó a cabo la extracción de clorofilas agregando 20 ml de hexano como solvente de extracción. A la fase orgánica, conteniendo las clorofilas, se agregó 1 ml de KOH 30% (p/v) en metanol y se dejó reaccionar durante 3 horas en oscuridad. Luego de este tiempo se procedió a centrifugar la muestra durante 15 minutos a 7000xg. El precipitado obtenido (clorofilina) se llevó a pH 9 utilizando tricina 1 M y se almacenó a -20 °C. Los valores de concentración de clorofilina se obtuvieron mediante la determinación de la absorbancia de las soluciones a 686 nm ($Abs_{686} 0,200 = 98 \text{ nM}$; Costa *et al.*, 2002).

4. Medida de la actividad MDS

Para las medidas de actividad Mg-dequelatasa se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 40 μl de extracto enzimático; 50 μl de solución de clorofilina; 610 μl de buffer tris-tricina 0,05M con Triton X-100 0,1%, pH 8,8. El pH final de la mezcla fue de 8,8. Se midió el aumento en la absorbancia a 686 nm utilizando un espectrofotómetro Hitachi U-2000. Las cinéticas enzimáticas se realizaron a 50 °C. Para cada medida se realizó un blanco sin extracto enzimático, para determinar la liberación no específica de Mg^{2+} , la cual fue sustraída de los valores obtenidos en las mediciones. La actividad enzimática se expresó en términos de aumento en absorbancia a 686 nm por unidad de tiempo.

5. Determinación del K_m aparente

Se hicieron cinéticas enzimáticas utilizando diferentes cantidades de clorofilina, manteniendo constante el volumen de extracto enzimático. Se utilizaron mezclas de reacción con los siguientes volúmenes de solución de clorofilina: 5, 10, 15, 20, 30,

40, 60 y 100 μ l. En base a los resultados obtenidos se calculó el K_m aparente de la actividad MDS, mediante la representación doble recíproca del modelo de Michaelis-Menten.

6. Medidas de actividad MDS en función de la temperatura

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad MDS, se prepararon mezclas de reacción como se indica en 4. Las medidas de actividad se llevaron a cabo incubando dichas mezclas a 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60 y 70 °C.

7. Medidas de actividad MDS en función del pH

Se midió actividad de extractos enzimáticos a diferentes valores de pH utilizando la mezcla de reacción indicada en 4, agregando HCl 2 M para ajustar el pH. Los valores de pH aproximados a los cuales se midió la actividad MDS fueron: 4; 6,6; 7,0; 7,4; 7,8; 8,5; 8,8. Se utilizó una solución NaCl 1 M y agua destilada para equilibrar la fuerza iónica de las muestras, manteniendo el pH deseado.

8. Determinación de la estabilidad térmica de la actividad MDS

Para determinar la estabilidad de los extractos enzimáticos a altas temperaturas, se incubaron diferentes alícuotas de extracto crudo a 100 °C durante diferentes tiempos y posteriormente se midió la actividad MDS como se indica en 4.

9. Capacidad de MDS de atravesar filtros y membranas

Se dializaron diferentes alícuotas de extractos contra buffer fosfato 0,05 M (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 ; pH 7,2) utilizando membranas de corte de 10000 Da por un período de 12 horas, cambiando el buffer una vez luego de dos horas de iniciado el experimento. Las membranas para diálisis fueron preparadas según el protocolo de Sambrook *et al* (1989). Por otro lado se procedió a la ultrafiltración de 1 ml de extracto crudo y del precipitado de 40-90% de sulfato de amonio, utilizando concentradores de corte de 10000 Da y centrifugando a 6000xg por aproximadamente 90 minutos. Finalmente, se midió actividad de los dializados y de los filtrados y sus correspondientes residuos como se indica en 4.

10. Medidas de actividad MDS en presencia de activadores e inhibidores.

Se incluyeron diferentes compuestos en distintas concentraciones en la mezcla de reacción con el fin de evaluar su efecto sobre la actividad MDS. Se agregaron al medio de reacción los siguientes compuestos, con sus respectivas concentraciones finales: EDTA (1/5/20/40 mM), KCl (1/5/10 mM), MgCl_2 (1/5/10 mM), HgCl_2 (1/5/10 mM), H_2O_2 (1/5/10 mM) y Glutación reducido (0,1/0,5/1/5/10 mM).

11. Cromatografía de exclusión molecular

Se utilizó un sistema para filtración en gel BioLogic LP (BioRad), con una columna de 40 x 1,6 cm empacada con Sephacryl S-100 HR (Amersham Biosciences). Se empleó buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M (pH 7,2) para equilibrar la columna y como fase móvil para la corrida. Se sembró 1-1,5 ml de muestra (extracto crudo), se eluyó a un flujo de 0,6 ml/min y se recogieron fracciones de 1 ml. El sistema tenía incorporado un espectrofotómetro que permitió realizar una medición continua de la absorbancia a 280 nm. La actividad MDS se midió en las distintas fracciones

utilizando la siguiente mezcla de reacción: 150 µl muestra, 50 µl de solución de clorofilina y 500 µl de buffer tris-tricina 0,05 M con Triton X-100 0,1%, pH 8,8.

La columna se calibró utilizando los siguientes marcadores de masa molecular conocida (Amersham Biosciences): Blue Dextran (2000 kDa), Albúmina (62,9 kDa), Ovoalbúmina (47,6 kDa), Quimiotripsinógeno (19,4 kDa) y Ribonucleasa (15,6 kDa).

12. Actividad MDS durante la senescencia

Para evaluar el progreso de la actividad MDS en relación a la senescencia, se cosecharon hojas de *A. thaliana* en estadios de desarrollo similares y se colocaron en placas Petri junto con un algodón humedecido en agua destilada y en oscuridad. El material vegetal se mantuvo en estas condiciones a una temperatura de 22-24 °C durante 1-5 días. Se tomaron muestras diariamente, se realizaron extractos crudos como se indica en 2 y se midió la actividad MDS.

13. Efecto del tratamiento con reguladores hormonales

Se cosecharon hojas de *A. thaliana* en estadios similares de desarrollo y se trataron con dos reguladores del crecimiento diferentes: BAP (6-bencilaminopurina) y etileno. Para esto se prepararon soluciones 100 ppm de BAP o Ethrel (ácido-2-cloroetilfosfónico; generador de etileno *in situ*), conteniendo 0,1% DMSO y 0,5% Tween 20. Como control se utilizó una solución conteniendo 0,1% DMSO y 0,5% Tween 20. Las hojas se sumergieron en las soluciones durante 10 minutos y luego se colocaron en placas Petri y se almacenaron tal como se indica en 11. Durante el período de incubación se tomaron muestras a distintos tiempos, se realizó un extracto enzimático y se cuantificaron las clorofilas presentes. Para esto último se realizó una extracción total de clorofilas utilizando dimetilformamida, para luego medir la absorbancia del extracto a 647 y 664,5 nm (Inskeep y Bloom, 1985).

14. Diseño experimental

Todos los ensayos se realizaron al menos tres veces. En cada ensayo, las medidas de actividad se hicieron por triplicado y se calcularon las medias con sus respectivas desviaciones estándar. Dado que se observó siempre la misma tendencia, sólo se muestran los resultados de la primera experiencia.

RESULTADOS

1. Actividad Mg-dequelatasa

Con el fin de detectar actividad Mg-dequelatasa, se realizaron extractos de hojas de *Arabidopsis thaliana* a partir de tejido fresco, los cuales se utilizaron para medir actividad MDS según el método de Vicentini *et al* (1995). Para ello se enfrentaron los extractos enzimáticos con la clorofilina a una temperatura de 50 °C y se realizaron mediciones del espectro de absorción de la mezcla de reacción a diferentes tiempos. Los principales cambios detectados fueron una disminución a 642 nm y un incremento a 686 nm en función del tiempo de incubación, como se puede observar en la figura 7. Un descenso del pico de absorción a 642 nm también se observó al acidificar un volumen de clorofilina con HCl concentrado. Estos cambios en la absorbancia no se presentaron en ausencia del extracto enzimático. Dado que el aumento a 686 nm era mayor que el descenso a 642, la actividad MDS se expresó como el cambio de absorbancia a 686 nm a través del tiempo.

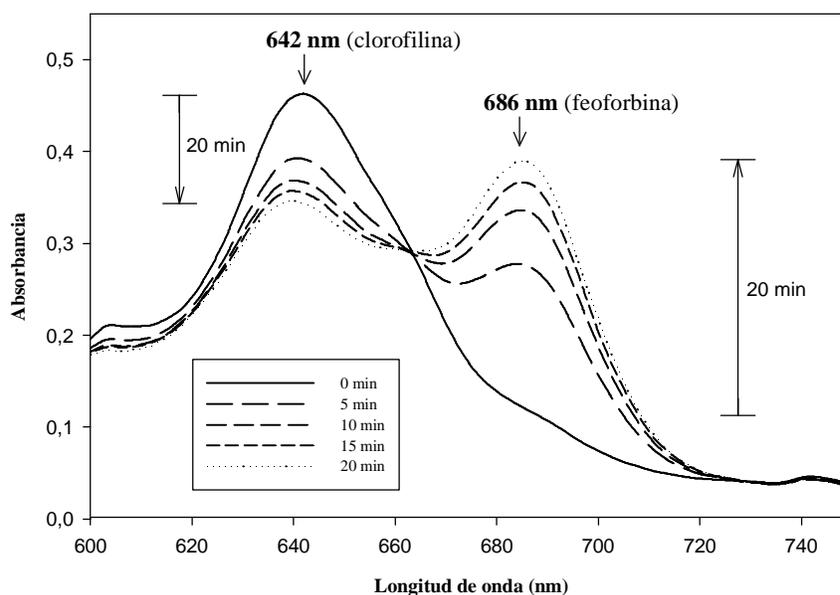


Figura 7. Variación de los picos de absorción de una solución de clorofilina provocada por la adición de un extracto enzimático de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

Por otro lado, se hicieron modificaciones a la mezcla de reacción original con el fin de ensayar la actividad utilizando diferentes cantidades de sustrato. Las concentraciones de clorofilina utilizadas se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Actividad MDS obtenida utilizando diferentes concentraciones de sustrato en la mezcla de reacción.

Clorofilina (Abs_{686nm})	Actividad MDS (ΔAbs_{686nm} · seg⁻¹)
0,02700	0,00006 ± 0,00001
0,03100	0,00014 ± 0,00003
0,03250	0,00014 ± 0,00002
0,03433	0,00021 ± 0,00001
0,04467	0,00033 ± 0,00002
0,06567	0,00035 ± 0,00002
0,07733	0,00053 ± 0,00001
0,13100	0,00067 ± 0,00002

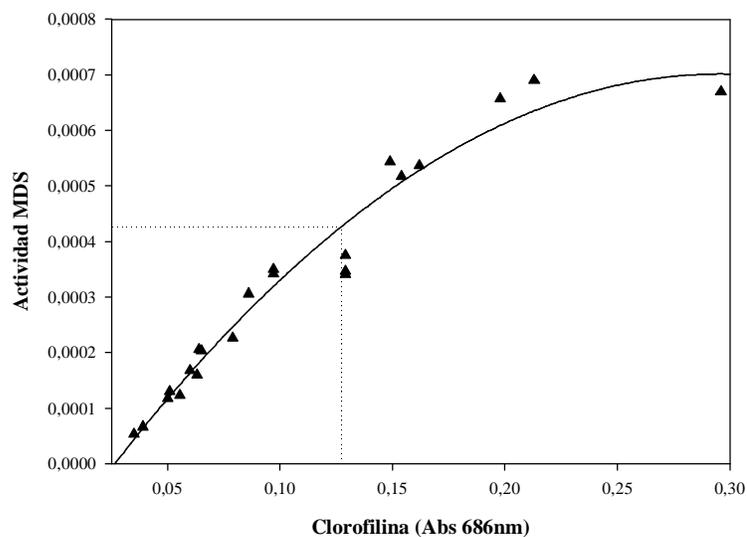


Figura 8. Cinética de saturación de la actividad MDS. La concentración de clorofilina se estimó según la absorbancia inicial de la mezcla de reacción a 686 nm.

De esta manera se pudo graficar el aumento en actividad correspondiente al incremento en la concentración del sustrato. Dicha gráfica se muestra en la figura 8. En la figura 9 se muestra la representación doble recíproca del modelo de Michaelis-Menten (inversa de la concentración de sustrato expresada en absorbancia inicial a

686 nm versus la inversa de la velocidad inicial de reacción). Utilizando los valores de pendiente y de ordenada al origen para la recta de regresión lineal mostrados en la figura 9, se puede calcular el K_m aparente como se muestra en el cuadro 2. La recta mostrada en la figura 9 corresponde a la primera repetición del ensayo.

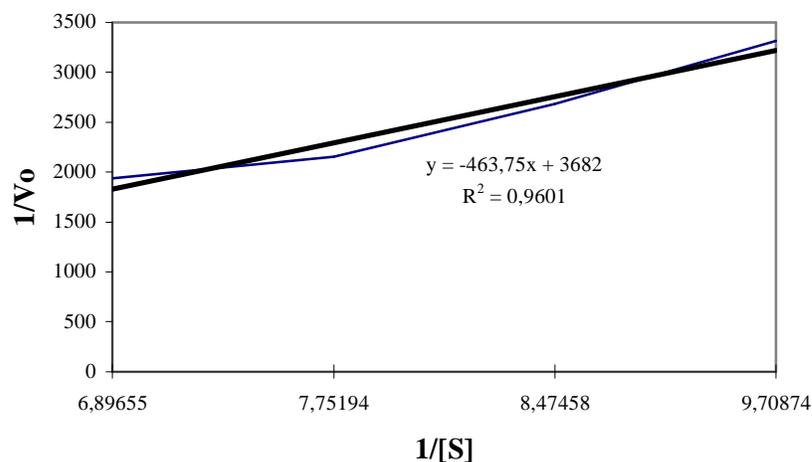


Figura 9. Representación doble recíproca del modelo de Michaelis-Menten para determinar el K_m aparente de la actividad MDS. [S]= Concentración de clorofilina medido en absorbancia a 686 nm al inicio de la reacción; V_o = velocidad inicial de reacción.

Cuadro 2. Cálculo del K_m aparente de la actividad MDS utilizando clorofilina como sustrato, para las tres repeticiones realizadas.

Parámetro	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
$b=1/V_{max}$ =	3682	1161,4	7792,7
V_{max} =	0,0003	0,0009	0,0001
m =	463,75	147,86	990,53
$K_m (Abs_{686})$ =	0,126	0,127	0,127

Nota: b = ordenada al origen; m = pendiente; V_{max} = velocidad máxima inicial; K_m = constante de Michaelis-Menten (Lehninger *et al*, 1993).

A partir de los cálculos anteriormente mostrados se pudo estimar un valor de K_m aparente correspondiente a $0,1268 \pm 0,0007$ (expresado en Abs_{686}) para la actividad MDS en *Arabidopsis thaliana*, lo cual correspondería a un valor de aproximadamente $62,13 \pm 0,34$ nM ($Abs_{686nm} 0,200 = 98$ nM; Costa *et al*, 2002).

2. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad MDS

Se prepararon mezclas de reacción y se midió la actividad MDS a diferentes temperaturas, con el fin de observar el efecto de dicho factor sobre la actividad. Se observó un incremento constante de la actividad a medida que se elevó la temperatura, alcanzando un máximo alrededor de los 50 °C, temperatura a partir de la cual la actividad comenzó a descender, como se puede observar en la figura 10. Al incubar el extracto crudo a 100 °C por 5 minutos o más, se observó una pérdida total de la actividad MDS.

Para determinar la relación entre el pH del medio y la actividad MDS se agregaron distintas cantidades de HCl 2 M para proporcionar a la mezcla de reacción los valores de pH deseados, así como NaCl para equilibrar la fuerza iónica. De esta manera, las variaciones en actividad se debieron exclusivamente al pH del medio y no a diferencias en fuerza iónica. Se observó un máximo de actividad en valores de pH cercanos a 7, con la actividad disminuyendo a valores tanto menores como mayores a éste, presentando actividad nula en valores extremos, como se aprecia en la figura 11.

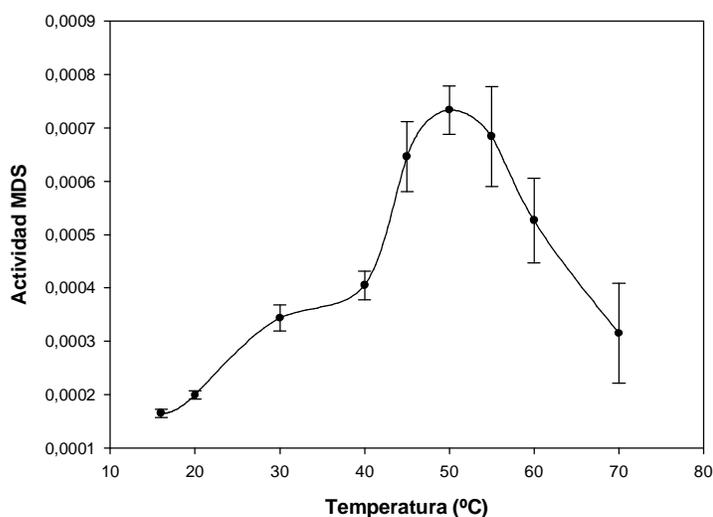


Figura 10. Efecto de la temperatura sobre la actividad MDS.

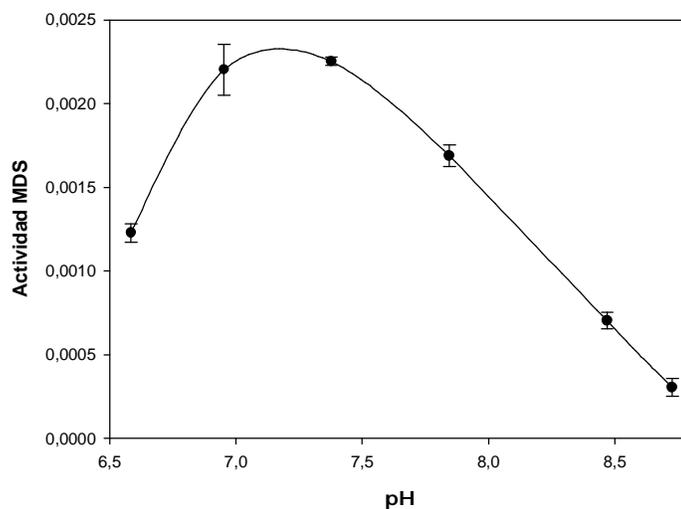


Figura 11. Efecto del pH del medio de reacción sobre la actividad MDS.

3. Capacidad de atravesar filtros y membranas

Se procedió a dializar un volumen de extracto crudo por un período de 12 horas contra buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,5 M pH 7,2 utilizando membranas de corte de 10000 Da. Luego de este periodo, se midió actividad MDS del dializado y del extracto sin dializar como referencia. Se observó que luego de ser dializado la actividad MDS del extracto incrementó aproximadamente en un 50%, como se puede ver en la figura 12.

En el caso en que se ultrafiltró un volumen de extracto crudo utilizando concentradores con membranas de corte de 10000 Da, no se observó actividad en el filtrado, debido a que la totalidad de la actividad se mantuvo en el residuo que no atravesó la membrana.

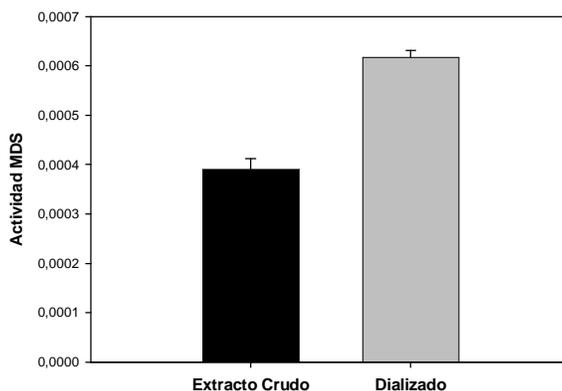


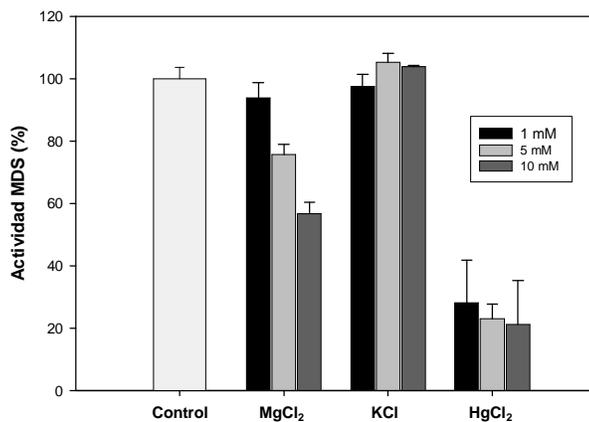
Figura 12. Actividad MDS de un extracto crudo antes y después de ser dializado contra buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,5 M pH 7,2 utilizando membranas de corte de 10000 Da.

4. Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad MDS

Se incluyeron varios compuestos a diferentes concentraciones con el fin de determinar su efecto sobre la actividad MDS. Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 3 y en las figuras 13, 14 y 15. En el caso del MgCl_2 se observó una disminución en la actividad MDS al aumentar la concentración del mismo, partiendo de una inhibición casi nula a partir de la concentración 1 mM. Para el caso del KCl, se observaron valores de actividad muy similares al control en todas las concentraciones ensayadas. El HgCl_2 tuvo un fuerte efecto inhibitorio en todas las concentraciones utilizadas. Al agregar EDTA al medio de reacción, se observó una clara activación de la actividad MDS, que fue dependiente de la concentración, como se muestra en la figura 14. El glutatión reducido provocó una disminución en la actividad MDS que también fue dependiente de la concentración. Finalmente, el H_2O_2 causó una activación de la actividad MDS a bajas concentraciones. Sin embargo, la activación disminuye al aumentar la concentración de H_2O_2 , como se puede observar en la figura 15.

Cuadro 3. Efecto de diferentes compuestos en la mezcla de reacción sobre la actividad MDS.

Compuesto	Concentración (mM)	% actividad MDS
Control		100%
MgCl₂	1	94%
	5	76%
	10	57%
KCl	1	97%
	5	105%
	10	104%
HgCl₂	1	28%
	5	23%
	10	21%
EDTA	1	92%
	5	117%
	20	141%
	40	171%
Glutación reducido	0,1	79%
	0,5	28%
	1	16%
	10	0%
H₂O₂	1	139%
	5	113%
	10	81%

**Figura 13.** Efecto de la adición de diferentes concentraciones de MgCl₂, KCl y HgCl₂ sobre la actividad MDS.

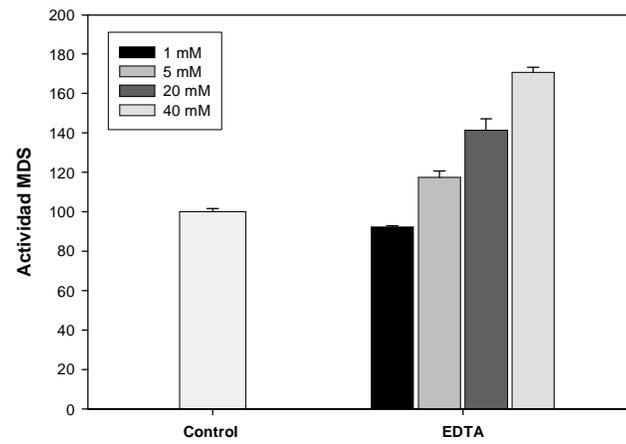


Figura 14. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de EDTA sobre la actividad MDS.

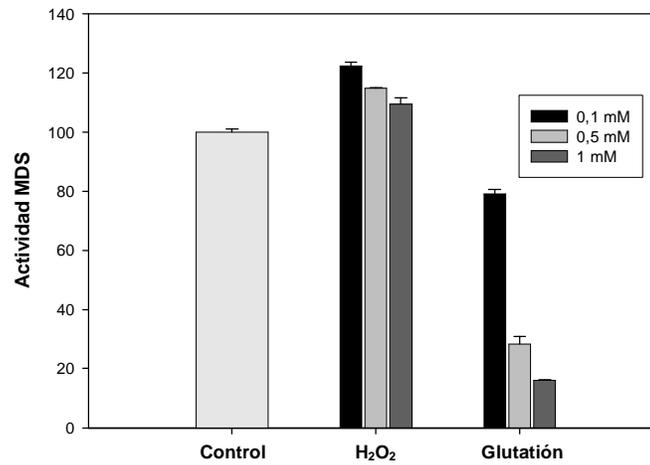


Figura 15. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de H₂O₂ y glutatión reducido sobre la actividad MDS.

5. Determinación de la masa molecular mediante cromatografía de exclusión molecular

Con el fin de determinar la masa molecular del compuesto responsable de la actividad MDS, se realizó una cromatografía de exclusión molecular de un volumen de extracto crudo, utilizando Sephacryl S-100 HR como fase estacionaria. Esta resina posee un tamaño de partículas de 25-75 μm y el rango de separación para proteínas globulares es de 1 a 100 kDa. Como fase móvil se utilizó buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M, pH 7,2. La curva de calibración se muestra en la figura 16 y en el cuadro 4. Se detectó una fracción con actividad a un volumen de elución (V_e) de 45,1 ml, que corresponde a una masa molecular de 25,95 kDa, como se muestra en la figura 17.

Cuadro 4. Curva de calibración para la determinación de la masa molecular de MDS utilizando la resina Sephacryl S-100 HR.

	V_e (ml)	K_{av}	MM (kDa)	Log MM
Ribonucleasa	50,25	0,387	15,6	1,193
Quimiotripsinógeno	46,13	0,302	19,4	1,288
Ovoalbúmina	40,88	0,193	47,6	1,678
Albúmina	37,50	0,124	62,9	1,799
V_o: 31,50				
V_t: 80				

V_e = volumen de elución; V_o = volumen muerto (V_e para el Blue Dextran 2000); V_t = volumen total de la columna; $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$; MM= masa molecular (Amersham Biosciences, 2002).

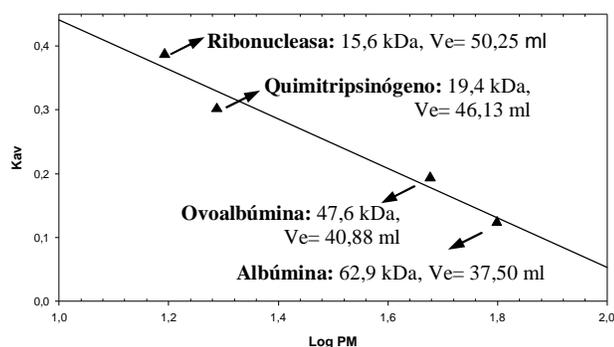


Figura 16. Curva de calibración de la columna para la cromatografía de exclusión molecular utilizando la resina Sephacryl S-100 HR.

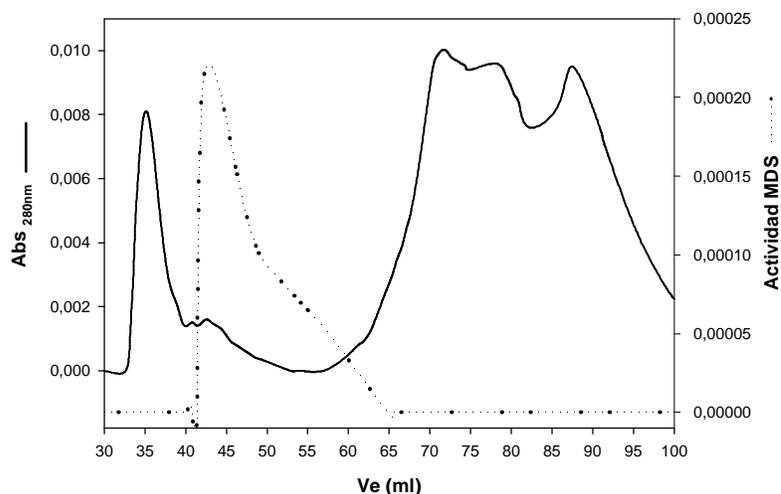


Figura 17. Cromatograma obtenido utilizando la resina Sephacryl S-100 HR. Se muestra la absorbancia a 280 nm y la actividad MDS de las respectivas fracciones.

6. Actividad MDS durante la senescencia

Se tomaron hojas de *A. thaliana* y se colocaron en condiciones de humedad para evitar deshidratación y de oscuridad para inducir la senescencia. Se midió actividad MDS de las hojas recién cosechadas como control (día 0) y luego cada día, hasta el día 5. Los resultados se muestran en la figura 18. Se detectó un incremento gradual de la actividad MDS a partir del día 0 y hasta el día 4, donde se alcanza un máximo de actividad, momento a partir del cual la actividad comienza a disminuir. A simple vista la pérdida gradual de la coloración verde en las hojas con el pasar de los días fue evidente; luego del día 4, las hojas poseían una coloración totalmente amarilla.

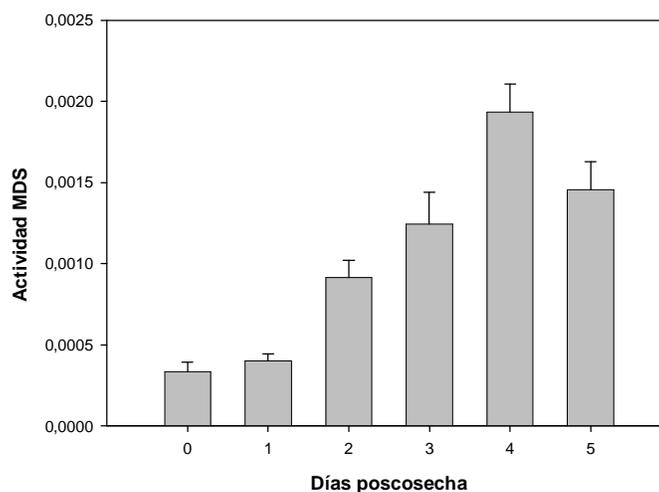


Figura 18. Variaciones en la actividad MDS a través de la senescencia inducida.

7. Efecto de reguladores hormonales sobre la actividad MDS durante la senescencia

Para medir el efecto de una citoquinina (6-bencilaminopurina, o BAP) y etileno sobre la actividad MDS durante la senescencia, se trataron hojas cosechadas con soluciones de BAP y de Ethrel, una sustancia que libera etileno al entrar en contacto con los tejidos. Las hojas fueron colocadas en oscuridad para inducir la senescencia. Se tomaron hojas a diferentes tiempos para realizar extracciones con el objeto de medir actividad MDS y cuantificar el contenido de clorofila. El aspecto de las hojas durante el ensayo para cada tratamiento se muestra en la figura 19. Se puede observar una clara pérdida del color verde de las hojas control y tratadas con etileno, mientras que las hojas tratadas con BAP mantuvieron su coloración verde por mayor tiempo. Los resultados de la cuantificación de clorofilas y las medidas de actividad MDS se muestran gráficamente en las figuras 20 y 21.

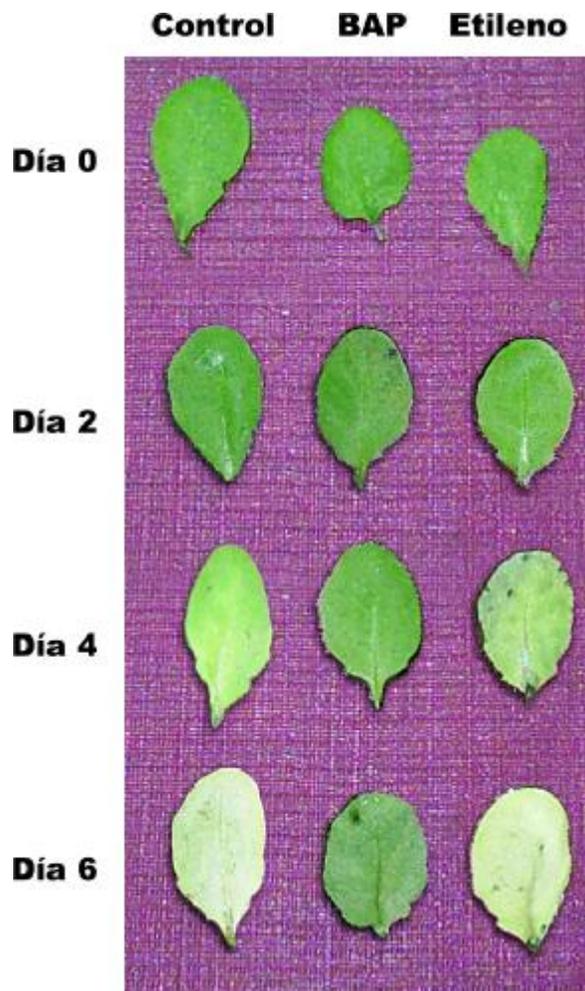


Figura 19. Aspecto de las hojas tratadas con reguladores del crecimiento durante la senescencia inducida.

Con respecto al contenido de clorofilas se observa un claro descenso con el paso del tiempo. Las muestras control y las tratadas con etileno disminuyen de manera constante, siendo el contenido siempre menor en el caso del tratamiento con etileno. Las hojas tratadas con BAP también sufrieron un descenso en el contenido de clorofilas, pero mucho menos marcado que en los otros dos casos. La actividad MDS se incrementó durante la senescencia para todos los tratamientos. En el caso del tratamiento con etileno se observó que desde el día 2 la actividad MDS fue un 100% mayor en las hojas tratadas que en los controles. Sin embargo, en los días posteriores

los niveles de actividad fueron inferiores a los controles, llegando a estar muy similares sobre el final del ensayo. En cuanto al tratamiento con BAP, el incremento de actividad se detiene en el día 4, para mantenerse constante hasta el día 6. En los días 4 y 6, los niveles de actividad en las muestras tratadas con BAP fueron bastante menores que en los otros dos tratamientos. En la figura 21 se muestra una representación conjunta de la variación de la actividad MDS y del contenido de clorofilas en función del tiempo de senescencia inducida. En este gráfico se pueden observar los puntos de intersección entre el incremento de actividad y el descenso del contenido de clorofilas. El primer punto de intersección corresponde a las muestras tratadas con etileno, luego las muestras control y finalmente las muestras tratadas con BAP.

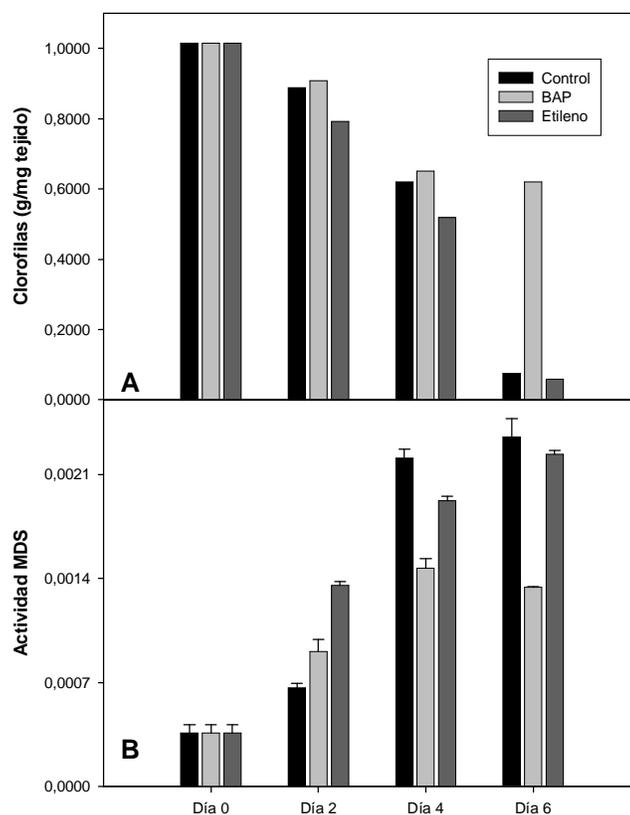


Figura 20. Efecto de 6-BAP y etileno sobre la actividad MDS. (A) Evolución del contenido de clorofilas para cada tratamiento; (B) Actividad MDS durante la senescencia inducida para cada tratamiento.

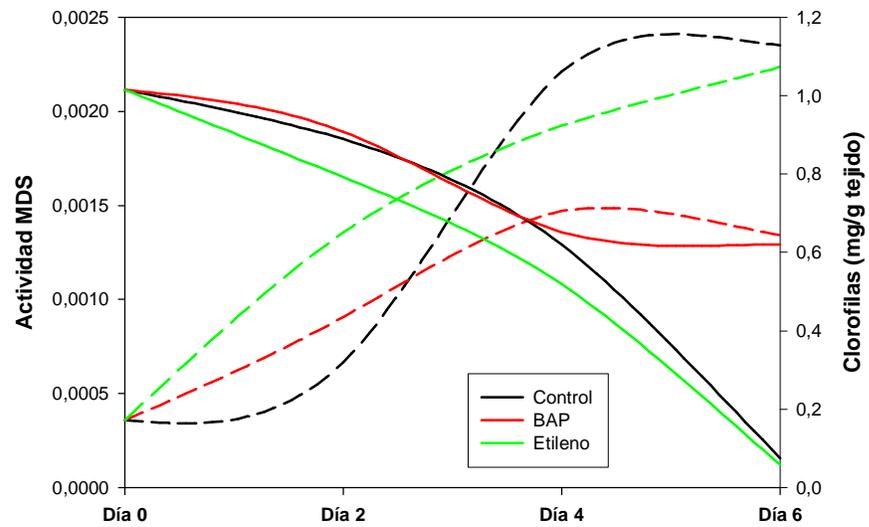


Figura 21. Evolución del contenido de clorofilas y de la actividad MDS durante la senescencia inducida en hojas de *A. thaliana* tratadas con reguladores del crecimiento.

DISCUSIÓN

En los últimos años, se han delineado los aspectos más generales de la vía de degradación de las clorofilas (Matile *et al*, 1999; Takamiya *et al*, 2000). El primer paso consiste en la defitilación de la clorofila, catalizado por la clorofilasa (EC 3.1.1.14). Luego, se remueve el átomo central de magnesio del clorofíido, punto que se considera de gran importancia en el proceso de decoloración foliar durante la senescencia, ya que es el primer paso irreversible de la vía catabólica. Previamente se había demostrado la presencia de compuestos diferentes que parecen ser responsables de la actividad Mg-dequelatasa. En frutilla, se reportó la presencia de un compuesto de baja masa molecular que podría asociarse o disociarse de otro compuesto de naturaleza proteica y de mayor masa molecular (Costa *et al*, 2002). Por otro lado, se han encontrado en extractos de rábano otros dos compuestos con actividad, uno de baja masa molecular (pero diferente al de frutilla) que sería independiente de otra proteína de mayor masa molecular (Suzuki *et al*, 2005).

En el presente trabajo se detectó la actividad MDS utilizando el método de Vicentini *et al* (1995). Para esto se realizaron extractos crudos de hojas de *Arabidopsis thaliana*, utilizando un buffer fosfato para la extracción y los mismos se enfrentaron con preparaciones de clorofilina (Mg-clorofilina *a*), un derivado de la clorofila que se obtiene mediante la saponificación completa de los ésteres de dicha molécula, actualmente utilizado como sustrato para medir actividad Mg-dequelatasa *in vitro*. El método se basa en la observación de que la clorofilina es convertida enzimáticamente en feoforbina, un compuesto similar a los feofórbidos, pero derivado de la clorofilina, que puede ser detectado espectrofotométricamente a una longitud de onda de aproximadamente 686 nm (Vicentini *et al*, 1995). Se observó una variación en los picos de absorción al incubar la muestra de reacción (figura 7), debido a una disminución de la concentración de sustrato (clorofilina, absorbe a 642 nm) y un aumento en la concentración de producto (feoforbina, absorbe a 686 nm), indicando la presencia de actividad MDS en el extracto crudo. También se observó una modificación similar en los picos de absorción al agregar HCl concentrado a una

muestra de clorofilina. La presencia de ácidos en concentraciones elevadas produce una liberación no enzimática del Mg^{2+} presente en el sustrato. Este ensayo prueba que el pico de absorbancia a 686 nm corresponde a la presencia de feoforbina.

La afinidad del compuesto MDS en *A. thaliana* por el sustrato (clorofilina), se midió mediante la determinación del K_m aparente de la reacción. El resultado obtenido (aproximadamente 62 nM) es bastante bajo, lo cual indica una alta afinidad de la enzima por el sustrato. En el caso de *B. napus* (Vincentini *et al*, 1995) y de frutilla (Costa *et al*, 2002) se reportaron también afinidades altas por el sustrato. Los datos de K_m aparente ofrecen escasa información respecto a la actividad Mg-dequelatasa *in vivo*, dado que la clorofilina no es el sustrato natural, y tanto el clorofírido como la clorofila no están disponibles en solución, sino que se encuentran acomplejados con proteínas de unión a clorofila. Sin embargo, los datos de K_m indicarían que la actividad MDS en *Arabidopsis thaliana* se comporta como una enzima.

La temperatura óptima encontrada para la reacción (50 °C) corresponde a la actividad *in vitro*. Los resultados obtenidos de temperatura y pH óptimos para la reacción (ver figuras 10 y 11, respectivamente), fueron similares a los reportados para las actividades MDS en extractos de brócoli (*Brassica oleracea*) y frutilla (*Fragaria x ananassa*), utilizando el mismo buffer de extracción. Sin embargo, en estos dos sistemas mencionados, la actividad MDS presentó características peculiares: en estas dos especies, la actividad MDS se perdió al dializar los extractos con membranas de corte de 10 kDa y en el caso de la frutilla solamente, se perdió también al ultrafiltrar con membranas del mismo corte. Cuando se ultrafiltraron extractos de brócoli no se perdió actividad debido a la alta fuerza iónica (ver introducción, 3.1.2). Para corroborar si la actividad MDS en *A. thaliana* posee también estas características, se hicieron pruebas de diálisis y ultrafiltración. Se encontró que la actividad no se perdió al ultrafiltrar y se observó un incremento en la actividad luego de dializar (figura 12). Esto indica que se trataría de un compuesto con una masa molecular superior a los 10 kDa, ya que no pudo atravesar los poros de las membranas, a diferencia de lo encontrado en los otros dos sistemas. Cabe mencionar que los extractos dializados

presentaron mayor actividad que los originales, lo cual podría deberse a la eliminación de una sustancia inhibidora de bajo peso molecular (menor que 10 kDa), presente en el extracto crudo, durante el proceso de diálisis. Tanto en frutilla como en brócoli, se reportó que el compuesto de baja masa molecular responsable de la actividad MDS a baja fuerza iónica es termoestable, lo que llevó a los autores de dichos trabajos a proponer la presencia de un grupo prostético. En el caso de *A. thaliana*, se observó que la actividad MDS se pierde completamente al incubar los extractos a 100 °C por 5 minutos, por lo que el compuesto sería termolábil, indicando que el mismo es probablemente de naturaleza proteica.

Los resultados de las pruebas con activadores e inhibidores fueron similares a las reportadas para frutilla (Costa *et al*, 2002), brócoli (Costa, 2005) y colza (Vicentini *et al*, 1995). El EDTA provocó un incremento de la actividad MDS (figura 14). Al agregar $MgCl_2$, la actividad disminuyó, mientras que con KCl no hubo variaciones considerables en la actividad (figura 15). Esto último indica que el responsable de la inhibición ocasionada por el $MgCl_2$ es el ión Mg^{2+} y no el ión Cl^- . Al incrementar la concentración del ión Mg^{2+} , que es un producto de la reacción enzimática, se produjo una disminución en la actividad; al secuestrarlo, mediante el EDTA que funciona como un agente quelante del Mg^{2+} , la actividad aumentó. Este es un comportamiento típico de retroinhibición o inhibición por productos de la actividad enzimática. El $HgCl_2$ disminuyó considerablemente la actividad (figura 13), lo cual sugiere la presencia de al menos un grupo $-SH$ en el sitio activo de la enzima, tal como fue sugerido por Vicentini *et al* (1995). La posible presencia de grupos $-SH$ se complementa con la observación del efecto del H_2O_2 y el glutatión reducido sobre la actividad MDS (figura 15). El H_2O_2 , que es un agente oxidante, provoca un incremento de actividad a bajas concentraciones, mientras que el glutatión, que actúa como agente reductor, provoca una inhibición de la actividad, a las mismas concentraciones. Esto indica que el estado redox es importante en la actividad, teniendo efecto posiblemente sobre la conformación de los mencionados grupos $-SH$.

Los resultados de diálisis y ultrafiltración encontrados en frutilla y brócoli indicaron que el compuesto responsable de la actividad MDS se trataría de un compuesto de tamaño pequeño, corroborado por la medida de su masa molecular igual a 2,18 kDa realizada mediante cromatografía de exclusión molecular (Costa *et al*, 2002; Costa, 2005). Por lo tanto se decidió estimar la masa molecular del compuesto equivalente en *A. thaliana*, utilizando una metodología similar. Se halló la máxima actividad MDS en la fracción correspondiente a 25,95 kDa, indicando que se trataría de un compuesto diferente al de brócoli y frutilla, ya que posee una masa molecular considerablemente superior. El poseer la mencionada masa molecular prácticamente descarta la posibilidad de que se trate de un grupo prostético o algún otro compuesto similar de tamaño muy pequeño.

Se comparó la actividad de un extracto crudo preparado a partir de hojas frescas con otros extractos preparados a partir de hojas con diferentes tiempos de senescencia. Los resultados muestran que la actividad MDS se incrementa gradualmente, hasta llegar a un máximo (a los 4 días de senescencia inducida; figura 18) y luego desciende. De esto se puede deducir que el compuesto con actividad MDS está relacionado con el proceso, y que si bien la actividad es detectable en hojas presenescentes, la misma se incrementa durante la degradación de clorofilas por efecto de la senescencia. Las hojas en senescencia presentaron una evidente disminución en su coloración verde, hasta llegar a una coloración amarilla.

Se realizaron pruebas con reguladores del crecimiento vegetal para evaluar el efecto de dichos compuestos sobre la actividad MDS durante la senescencia. También se midió el contenido de clorofilas como un parámetro de seguimiento del proceso de senescencia. Con el paso del tiempo hubo un claro descenso del contenido de clorofilas, acompañado por un incremento en la actividad MDS. El etileno produjo una aceleración del proceso de senescencia (figura 20), detectándose el comienzo del descenso en el contenido de clorofilas simultáneo a los controles, pero avanzando de manera más acelerada. En el caso del tratamiento con BAP, se hace evidente el efecto de retraso de la senescencia que poseen las citoquininas, ya que la tasa de

disminución del contenido de clorofilas fue mucho menor en estas hojas (figuras 19 y 20). Con respecto a la actividad MDS, el etileno tuvo un efecto marcado. Los niveles de actividad no fueron muy superiores a los controles, pero se observó que el incremento de actividad se inició antes en las hojas tratadas con Ethrel. En el caso de las muestras tratadas con BAP, se observó un aumento de la actividad, pero en niveles inferiores al control, sugiriendo una inhibición del incremento de la actividad MDS importante pero no completa. En el gráfico de líneas que se muestra en la figura 21, se observan los puntos de intersección entre las curvas que indican el descenso en la cantidad de clorofilina y el incremento en actividad MDS. Se puede observar que el primer punto de intersección se presenta para el tratamiento con etileno, demostrando la aceleración del proceso ocasionada por este compuesto. El último punto de intersección que aparece es el del tratamiento con BAP, indicando el efecto inhibitorio de la actividad MDS durante la senescencia. El punto de intersección para el control se ubicó en una zona intermedia de los dos tratamientos mencionados.

CONCLUSIONES

- El compuesto MDS en el sistema utilizado posee una considerable afinidad por el sustrato artificial empleado (clorofilina) bajo condiciones *in vitro*.
- Al ensayar las medidas de actividad con concentraciones crecientes de sustrato se obtiene una cinética de saturación típica de actividad enzimática.
- El compuesto con actividad MDS podría poseer grupos –SH en su sitio activo, es inhibido por la presencia de uno de los productos de la reacción (Mg^{2+}) y es susceptible al estado redox del medio en que se encuentra.
- El compuesto responsable de la actividad Mg-dequelatasa de *A. thaliana* posee una masa molecular de aproximadamente 26 kDa.
- Si bien algunas características del compuesto MDS encontrado en *Arabidopsis thaliana* son similares a las reportadas en frutilla, brócoli y colza, se trata de compuestos con diferente masa molecular, por lo cual son diferentes.
- La actividad MDS en *Arabidopsis thaliana* posee temperatura y pH óptimos similares a los de la misma actividad en frutilla y brócoli.
- La actividad MDS incrementa con la senescencia hasta llegar a un máximo y luego disminuye.
- El etileno actúa como un acelerador de la actividad MDS durante la senescencia, mientras que el BAP (citoquinina) ejerce un efecto inhibitorio.
- Las modificaciones en el proceso de senescencia ejercidas por el etileno y por BAP (aceleración e inhibición, respectivamente), dan lugar a cambios en la actividad MDS.
- A partir de las conclusiones anteriores, se podría deducir que la actividad Mg-dequelatasa en *A. thaliana* se debe a la presencia de una proteína con actividad enzimática, y no de un compuesto de baja masa molecular.

RECOMENDACIONES

- Con el fin de determinar el rol del compuesto MDS en la degradación *in vivo* de clorofilas en *A. thaliana*, es necesario ensayar su afinidad por el sustrato natural, utilizando clorofílido *a* como sustrato en el ensayo de actividad MDS.
- Para caracterizar con mayor profundidad la actividad MDS en *A. thaliana* (o cualquier otro sistema), es necesario purificar a homogeneidad el compuesto responsable de dicha actividad, lo cual aún no ha sido realizado exitosamente en ningún sistema.
- Una vez purificado, secuenciar el producto proteico y con la información obtenida diseñar cebadores para clonar su ADNc. De esta forma se podría caracterizar su expresión bajo diferentes condiciones.

BIBLIOGRAFÍA

- AMERSHAM BIOSCIENCES. 2002. Gel Filtration Calibration Kits. Manual de instrucciones. Amersham Biosciences UK. 24 pp.
- AMIR-SHAPIRA, D.; GOLDSCHMIDT, E.; ALTMAN, A. 1987. Chlorophyll catabolism in senescing plant tissues: In vivo breakdown intermediates suggest different degradativa pathways for Citrus fruit and parsley leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:1901-1905.
- BENEDETTI, C.; ARRUDA, P. 2002. Altering the Expression of the Chlorophyllase Gene *ATHCOR1* in Transgenic Arabidopsis Caused Changes in the Chlorophyll-to-Chlorophyllide Ratio. *Plant Physiology.* 128:1255–1263,
- BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists. EEUU. 1368 pp.
- COSTA, M.; CIVELLO, P.; CHAVES, A.; MARTÍNEZ, G. 2002. Characterization of Mg-dechelatase activity obtained from *Fragaria x ananassa* fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 40:111-118.
- COSTA, M. 2005. Análisis de la senescencia postcosecha de brócoli- Efecto de la aplicación de tratamientos físicos. Tesis doctoral. UNLP, Buenos Aires, Argentina. 204 pp.
- FOLLY, P.; ENGEL, N. 1999. Chlorophyll b to Chlorophyll a Conversion Precedes Chlorophyll Degradation in *Hordeum vulgare* L. *Journal of Biological Chemistry.* 274(31): 21811–21816.
- GUIAMÉT, J.; PICHERSKY, E.; NOODÉN, L. 1999. Mass exodus from senescing soybean chloroplasts. *Plant and Cell Physiology.* 40(9):986-992.

- INSKEEP, P.; BLOOM, R. 1985. Extinction Coefficients of Chlorophyll *a* and *b* in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone. *Plant Physiol.* 77, 483-485.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. 1993. *Principles of Biochemistry*, Segunda Edición. Worth Publishers. New York, EEUU. 1013 pp.
- MATILE, P.; HÖRTENSTEINER, S.; THOMAS, H. 1999. Chlorophyll Degradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:67–95.
- HÖRTENSTEINER, S. 1999. Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cell. Mol. Life Sci.* 56:330–347.
- PRUZINSKA, A.; TANNER, G.; ANDERS, I.; ROCA, M.; HÖRTENSTEINER, S. 2003. Chlorophyll breakdown: Pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron–sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA.* 100(25):15259-15264.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning; a Laboratory Manual*. Segunda edición. EEUU, Cold Spring Harbor Laboratory Press. p.E-39.
- SCHOEFS, B.; BERTRAND, M. 1997. *Handbook of Photosynthesis*. Editado por Mohammad Pessarakli. Merceel Dekker. EEUU. pp 49-69.
- SHIOI, Y.; TOMITA, N.; TSUCHIYA, T.; TAKAMIYA, K. 1996, Conversion of chlorophyllide to pheophorbide by Mg.dechelating substance in extracts of *Chenopodium album*. *Plant Physiol. Biochem.* 34(1):41-47.
- SUZUKI, T.; KUNIEDA, T.; MURAI, F.; MORIOKA, S.; SHIOI, Y. 2005. Mg-dechelation activity in radish cotyledons with artificial and native substrates, Mg-chlorophyllin *a* and chlorophyllide *a*. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:459–464

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 1998. Plant Physiology, segunda edición. Sinauer. EEUU. 792 pp.
- TANG, L.; OKAZAWA, A.; FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. 2000. Removal of Mg-dechelatase is a major step in the chlorophyll-degrading pathway in *Ginkgo biloba* in the process of autumnal tints. Z. Naturforsch. 55c:923-926.
- TAKAMIYA, K.; TSUCHIYA, T.; OHTA, H. 2000. Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? Trends in Plant Science. 10(5):426-431.
- THOMAS, H.; OUGHAM H.; WAGSTAFF, C.; STEAD, A. 2003. Defining senescence and death. Journal of Experimental Botany. 54(385):1127-1132.
- VICENTINI, F.; ITEN, F.; MATILE, P. 1995. Development of an assay for Mg_dechelatase of oilseed rape cotyledons, using chlorophyllin as the substrate. Physiol. Plant. 94:57-63.
- WÜTHRICH, K.; BOVET, L.; HUNZIKER, P.; DONNISON, I.; HÖRTENTEINER, S. 2000. Molecular cloning, functional expression and characterization of RCC reductase involved in chlorophyll catabolism. The Plant Journal. 21(2):189-198.

ANEXO 1: Presentaciones a congresos

Durante la realización del presente trabajo se realizó la siguiente presentación a congreso:

Título: Chlorophyll Degradation in *Arabidopsis thaliana*: Detection and Characterization of Mg-Dechelatase Activity.

Autores: Büchert, Agustín; Civello, Pedro and Martínez, Gustavo.

Congreso: XLI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. 3-6 de diciembre, 2005. Pinamar, Buenos Aires, Argentina. Publicación de resumen. Presentación de póster.

Resumen publicado en: Biocell. Vol. 29 (supl.) p. 177.

CHLOROPHYLL DEGRADATION IN *Arabidopsis thaliana*: DETECTION AND CHARACTERIZATION OF Mg-DECHELATASE ACTIVITY



Büchert, Agustín; Civello, Marcos and Martínez, Gustavo.

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), UNSAM-CONICET, Camino Circunvalación Laguna Km. 6, B7130IWA, Chascomús, Argentina. Email: abuchert@intech.gov.ar.

INTRODUCTION

The loss of chlorophyll is the preferred parameter for describing the yellowing of senescing leaves or color changes in ripening fruits. The generally accepted pathway for chlorophyll degradation includes the release of Mg^{2+} . This reaction is catalyzed by Mg-dechelatase, but detailed knowledge about the properties of this enzyme is scarce. Previous works have demonstrated that Mg-dechelatase is a low molecular weight compound and that it is relatively stable at high temperatures.

OBJECTIVES

- Contribute to the knowledge about the role of Mg-dechelatase in the catabolic pathway of chlorophyll.
- Characterize Mg-dechelatase activity in *Arabidopsis thaliana*.
- Analyze the evolution of Mg-dechelatase activity throughout leaf senescence.

MATERIALS AND METHODS

1. Enzyme extracts were obtained from *Arabidopsis thaliana* var. Col0, using an extraction buffer containing sodium phosphate, Triton X-100, PVPP and cysteine.
2. Total chlorophylls were extracted from *Spinacea oleracea* leaves using 80% acetone and partitioning with hexanes. KOH in methanol was added to saponificate all esters in chlorophyll, producing *chlorophyllin*, an artificial derivate used as a substrate for the reaction.
3. Mg-dechelatase activity was measured spectrophotometrically by observing the increase in absorbance at 686 nm, the wavelength at which the Mg release is detected. The measurements were performed at 55°C using a tris-tricine buffer.
4. Optimal reaction conditions were determined adjusting pH, temperature and substrate concentration. For the optimal pH determination, the ionic strength of all reaction mixtures was equilibrated. Heat stability and capacity to filter through 10 KDa membranes was also assayed. To determine the changes in activity during senescence, fresh *A. thaliana* leaves were stored in darkness at 24°C for 1-5 days.
5. Each experiment was repeated three times and since the same trend was found, only results from the first experience are shown.

RESULTS

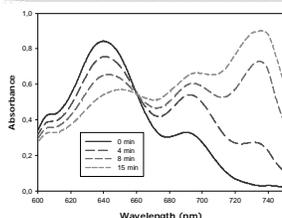


Fig. 1. Changes in absorbance throughout the reaction catalyzed by Mg-dechelatase

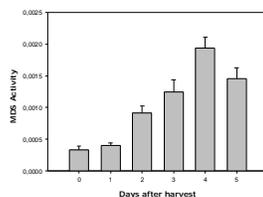


Fig. 2. MDS activity in extracts obtained from artificially-induced senescent leaves.

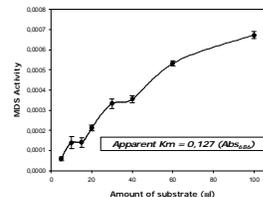


Fig. 3. MDS activity in accordance to substrate concentration and apparent K_m .

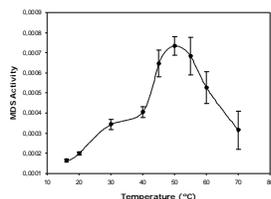


Fig. 4. Determination of optimal temperature for the reaction.

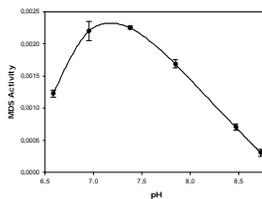


Fig. 5. Changes in MDS activity at different pH values.

Table 1. Capacity of the extracts to filter through 10 KDa cut-off membranes, thermal stability and $(NH_4)_2SO_4$ precipitation.

Sample	MDS Activity
Crude extract	0,0025 ± 0,0001
Crude extract heated at 100°C for 5 minutes	Non detectable
10 KDa cut-off membrane residue	0,0010 ± 0,0002
10 KDa cut-off membrane filtrate	Non detectable
Crude extract	0,0003 ± 0,0001
40-90% $(NH_4)_2SO_4$	0,0014 ± 0,0002

CONCLUSIONS

- Unlike in other systems, Mg-dechelatase obtained from *Arabidopsis thaliana* appears to be a thermolabile compound of a molecular weight over 10 KDa.
- Mg-dechelatase activity increases with senescence, until reaching a maximum and then decreases.
- The optimal pH and temperature for the enzyme activity were 7.2 and 50°C, respectively. The apparent K_m value was 0,127 (Ab_{686}).