

Tesis de Posgrado

Estudios de regulación enzimática en sistemas fotosintéticos

Stein, Mariana

1988

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

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

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

Cita tipo APA:

Stein, Mariana. (1988). Estudios de regulación enzimática en sistemas fotosintéticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2200_Stein.pdf

Cita tipo Chicago:

Stein, Mariana. "Estudios de regulación enzimática en sistemas fotosintéticos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2200_Stein.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

TESIS
2200
ej.2

120

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"ESTUDIOS DE REGULACION ENZIMATICA EN SISTEMAS
FOTOSINTETICOS"

Autor: MARIANA STEIN

Director: RICARDO A. WOLOSIUK

Lugar de trabajo: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
"FUNDACION CAMPOMAR"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

AÑO 1988

2.200

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Augusto García y su grupo de "Fotosíntesis", por haberme iniciado en el mundo de la investigación.

Al Dr. Luis F. Leloir y a los miembros del Consejo Directivo, por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto y recibir sus enseñanzas.

Al Dr. Ricardo A. Wolosiuk, quien dirigió esta tesis con gran responsabilidad y mucha paciencia; por enseñarme con sabiduría y humildad, desde la práctica diaria, lo que significan el rigor científico y la pasión por conocer un poco más.

A los Dres. Armando Parodi, Clara Krisman, Marcelo Dankert y Luis Quesada, por el estímulo brindado en las distintas etapas de mi paso por "Campomar".

Al Dr. Juan Accorinti, Consejero de Estudios, por su apoyo en la elección de los cursos de doctorado.

A mis compañeros de laboratorio, por las horas de trabajo compartidas y, especialmente, a Cecilia Hertig, por los buenos momentos de amistad.

A todos los compañeros del I.I.B., por la colaboración, el estímulo y las discusiones y, en particular, a Angeles Zorreguieta, Marcelo Tolmasky, Alberto Ochoa, Armando Parodi, Diana Tolmasky, Marcela Ferraro, Tony Coira, Roxana Chamorro, Patricia Marini, Daniel Boscoboinik, Viviana Lepek, Angel Cataldi, Juan José Miret, Marcela Ferrer, Marta Blumenfeld, Olga Castro y Laura Bover porque, con mucho té y mate, humor y amistad, hicieron cálidos mis días en el Instituto.

A Manuel Gidekel, por haberme transmitido tan generosamente sus conocimientos de informática. A Karina Werthein y a mi padre, porque amablemente me facilitaron la computadora y la impresora con que terminé de escribir la presente tesis.

Al Prof. Norberto Malarini, por su constante y eficaz disposición para la confección de los dibujos, y por las amenas charlas mantenidas.

A Alejandra Raimondi, Susana Raffo y Marta Bravo por su eficiente apoyo técnico y permanente cordialidad.

A Soledad Gimenez, Margarita Mazzardi, Mary B. de Iozzolino, Beile Wolf, Tilda Saba, Manon Angel, Aida Pelman, Francisco Irusta, Jorge Pinto, Néstor Del Castillo y Salvador Genovese, por su amable colaboración.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos y a mi familia porque cada uno, y a su manera, estuvo presente en el desarrollo de este trabajo. Una mención especial para Daniel Tarnopolsky, mi marido, porque sin su permante apoyo, estímulo y paciencia esta tesis no habría visto la luz.

ABREVIATURAS

Ao.5:	Concentración de efector requerida para alcanzar la mitad de la máxima actividad específica.
Ac-/ACh:	Acetato, ácido acético.
AMP:	Adenosina-5-fosfato.
ATP:	5'-Adenosina trifosfato.
ATPasa:	Adenosina trifosfatasa.
β -met (2-met):	β -mercaptoetanol.
Chl:	Clorofila
CTAB:	Bromuro de cetiltrimetilamonio.
DEAE-:	Dietilaminoetil-.
DHAP:	Dihidroxiacetona fosfato.
DTT:	Ditiotreitol.
E_o' :	Potencial redox standard a pH: 7 y 25°C
E4P:	Eritrosa-4-fosfato.
EDTA:	Etilendiamino tetraacetato.
EGTA:	Etilenglicol-bis-(β -aminoetil eter)-N, N, N', N', tetraacetato.
F2,6BP:	Fructosa-2,6-bisfosfato.
F6P:	Fructosa-6-fosfato.
FAD:	Flavin adenín dinucleótido.
FBP:	Fructosa-1,6-bisfosfato.
FBPasa:	Fructosa-1,6-bisfosfatasa.
Fd:	Ferredoxina.
FPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
GAP:	Gliceraldehído-3-fosfato.
GAPD:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GluBP:	Glucosa-1,6-bisfosfato.

GTP:	5'-Guanosina trifosfato
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Presión.
I _{0.5} :	Concentración de un compuesto que provoca 50% de inhibición.
NAD ⁺ , NADH:	Formas oxidada y reducida del nicotín amin dinucleótido.
NADP ⁺ , NADPH:	Formas oxidada y reducida del nicotín amin dinucleótido 2'-fosfato.
P ₂ GA:	1,3-difosfoglicerato.
PGA:	3-fosfoglicerato.
Pi:	Fosfato inorgánico.
PRK:	Fosforribuloquinasa.
QAE-:	Diethyl-(2-hidroxi-propil)aminoetil-.
R5P:	Ribosa-5-fosfato.
Ru5P:	Ribulosa-5-fosfato.
RuBisCO:	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/ Oxigenasa.
RuBP:	Ribulosa-1,5-bisfosfato.
S _{0.5} :	Concentración de sustrato (o cofactor) requerida para alcanzar la mitad de la máxima actividad específica.
S7P:	Sedoheptulosa-7-fosfato.
SBP:	Sedoheptulosa-1,7-bisfosfato.
SBPasa:	Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa.
SDS:	Dodecil sulfato de sodio.
TEMED:	N, N, N', N'tetrametiletilediamina.
Tris:	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
Xu5P:	Xilulosa-5-fosfato.

INDICE

1. INTRODUCCION

1.1. Fotosíntesis: Concepto general.	1
1.2. Organismos fotosintéticos.	2
1.2.1. Diferencias morfológicas.	2
1.2.2. Diferencias bioquímicas.	4
1.2.3. Impacto de la fotosíntesis oxigénica.	4
1.3. Bioquímica de la fotosíntesis.	6
1.3.1. Captación de la luz.	7
1.3.2. Pigmentos accesorios en cianobacterias: los fico- bilisomas.	11
1.3.3. Fotosistema II.	13
1.3.4. Complejo Citocromo bf.	16
1.3.5. Fotosistema I.	17
1.3.6. Esquema Z de la Fotosíntesis.	19
1.3.7. Fotofosforilación.	21
1.3.8. Fotofosforilación cíclica.	23
1.4. Utilización de los productos primarios de la fotosín- tesis.	27
1.4.1. Asimilación fotosintética del CO ₂ .	27
1.4.1.1. Ciclo reductivo de las pentosas-fosfato o de Benson-Calvin.	27
1.4.1.2. Enzimas del ciclo de Benson-Calvin.	30
1.5. Regulación enzimática del ciclo de Benson-Calvin.	37
1.5.1. Activación por luz.	37
1.5.1.1. Estudios "in vivo" y con cloroplastos aislados.	38
1.5.1.2. Estudios con sistemas enzimáticos.	40
1.5.1.2.1. Mecanismos mediados por reducción.	40

1.5.1.2.2. Mecanismos mediados por efectores.	47
1.5.1.2.3. Mecanismos mediados por iones.	50
1.5.1.2.4. Activación enzimática por modificaciones hidrofóbicas.	52
1.5.1.3. Interacción de los mecanismos moduladores mediados por la luz.	53
1.5.2. Desactivación en la oscuridad.	55

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Purificación de la FBPasa de cloroplastos de espinaca.	58
2.1.1. Cromatografía en columna de DEAE-Celulosa.	59
2.1.2. Cromatografía en columna de Hidroxiapatita.	59
2.1.3. Cromatografía en columna de QAE-Sephadex A-25.	60
2.2. Determinación de la actividad FBPasa de cloroplastos de espinaca.	63
2.2.1. Ensayo en una etapa.	63
2.2.2. Ensayo en dos etapas.	64
2.3. Marcado de la FBPasa de cloroplastos de espinaca por (1-C ¹⁴)-Iodoacetamida y posterior digestión triptica.	64
2.4. Purificación de Tiorredoxina de cloroplastos de espinaca.	65
2.5. Purificación de la NADP-Glicaraldehído-3-P Deshidrogenasa de cloroplastos de espinaca.	66
2.6. Determinación de la actividad NADP-Gliceraldehído-3-P Deshidrogenasa.	67
2.7. Preparación de membranas de cloroplastos de espinaca.	68

2.8. Cianobacterias.	69
2.8.1. Cultivo de la cianobacteria <u>Anabaena</u> sp 7119.	69
2.8.2. Cosecha de las cianobacterias.	70
2.8.3. Tratamiento de las cianobacterias con tolueno.	71
2.8.4. Activación de la FBPasa de cianobacterias por la luz.	71
2.9. Purificación de la FBPasa de la cianobacteria <u>Anabaena</u> sp 7119.	72
2.9.1. Homogenización y Fraccionamiento con ácido.	72
2.9.2. Cromatografía en columna de DEAE-Celulosa.	72
2.9.3. Cromatografía en columna de QAE-Sephadex A-25.	73
2.9.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución.	75
2.10. Determinación de la actividad FBPasa de <u>Anabaena</u> sp 7119.	75
2.11. Purificación de la Gliceraldehido-3-P Deshidrogenasa de la cianobacteria <u>Anabaena</u> sp 7119.	77
2.12. Determinación de clorofila.	77
2.13. Determinación de proteínas.	77
2.14. Purificación de los reactivos.	78
2.15. Electroforesis en geles de Poliacrilamida.	78
2.16. Isoelectroenfoque.	80
2.17. Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) de los fragmentos tripticos derivados de la FBPasa de cloroplastos de espinaca.	81
2.18. Espectroscopia diferencial en el ultravioleta.	82
2.19. Preparación de antisuero de conejo contra la FBPasa de cloroplastos de espinaca.	84
2.19.1. Ensayos de reacción inmunológica.	85
2.19.1.1. Inmunodifusión.	85
2.19.1.2. Inmunolectrodifusión.	86

2.19.1.3. Inmunoelectroforesis bidimensional.	87
---	----

3. RESULTADOS

3.1. FBPasa de cloroplastos de espinaca.	
3.1.1. Efecto de los aniones caotrópicos en la activación y actividad de la FBPasa de cloroplastos de espinaca.	89
3.1.1.1. Efecto de diversos aniones caotrópicos en la activación de la FBPasa.	92
3.1.1.2. Efecto del Tricloroacetato en la activación y actividad de la FBPasa.	93
3.1.1.2.1. Requerimientos para la activación de la FBPasa por tricloroacetato.	96
3.1.1.2.2. Estudios cinéticos sobre la FBPasa tratada con tricloroacetato.	104
3.1.1.2.3. Cromatografía de la FBPasa en Superose 12.	112
3.1.1.3. Espectros diferenciales al ultravioleta inducidos por modificadores en la FBPasa.	114
3.1.1.4. Cromatografía en HPLC de la FBPasa digerida con tripsina.	117
3.1.1.5. S-carboxiamidometilación de la FBPasa.	119
3.1.1.6. Discusión.	124
3.1.2. Estudios estructurales sobre la activación de la FBPasa.	131
3.1.2.1. Efecto de reductores y agentes desnaturalizantes sobre la exposición de grupos -SH en la FBPasa.	133

3.1.2.2.	S-carboxiamidometilación dependiente de los moduladores en la FBPasa.	136
3.1.2.3.	Discusión.	141
3.2.	NADP-Gliceraldehido-3-P Deshidrogenasa de cloroplastos de espinaca.	
3.2.1.	Modulación de la actividad NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa por aniones caotrópicos.	144
3.2.1.1.	Estimulación de la actividad específica de la NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa, por aniones caotrópicos.	146
3.2.1.2.	Efecto de los aniones caotrópicos en la fase catalítica de la NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa.	151
3.2.1.3.	Activación concertada de la NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa.	153
3.2.1.4.	Efecto de los aniones caotrópicos en la estructura cuaternaria de la NADP-Gliceraldehido -3 -P deshidrogenasa.	154
3.2.1.5.	Discusión.	158
3.2.2.	Caracterización en las membranas de los cloroplastos de un mecanismo desactivador de la NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa.	161
3.2.2.1.	Presencia en las membranas de los cloroplastos de un inhibidor de la forma regulatoria de la NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa.	162
3.2.2.2.	Efecto del tratamiento con acetona sobre el inhibidor.	168

3.2.2.3. Efecto de la luz sobre la inhibición de la enzima mediada por membranas de cloroplastos.	170
3.2.2.4. Discusión.	174
3.3. FBPasa de la cianobacteria <u>Anabaena</u> sp 7119.	
3.3.1. Activación de la FBPasa de <u>Anabaena</u> sp por la luz.	175
3.3.2. Ensayos de purificación.	176
3.3.3. Punto isoeléctrico.	180
3.3.4. Regulación de la FBPasa de <u>Anabaena</u> sp 7119.	182
3.3.4.1. Efecto de los azúcares-bisfosfato.	187
3.3.4.2. Efecto de los cationes bivalentes.	191
3.3.4.2.1. Comparación de los efectos de los cationes biva- lentes y trivalentes entre la enzima proveniente de <u>Anabaena</u> sp y la de cloroplastos de espinaca.	191
3.3.4.3. Efecto de tioles.	194
3.3.4.4. Efecto del AMP.	197
3.3.4.5. Actividad SBPasa asociada a la fracción de FBPasa de <u>Anabaena</u> sp 7119.	199
3.3.4.6. Efecto del pH.	201
3.3.4.7. Efecto de la temperatura.	201
3.3.4.8. Efecto de solventes y detergentes.	204
3.3.5. Discusión.	207
4. <u>CONCLUSIONES Y RESUMEN</u>	213
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	218

1. INTRODUCCION

1.1. FOTOSINTESIS: CONCEPTO GENERAL

Toda la vida en nuestro planeta Tierra depende de manera casi absoluta de la energía solar que llega a la biósfera y que es parcialmente convertida (solo el 0.1%) en energía química por el reino vegetal durante el proceso de la fotosíntesis.

El término fotosíntesis literalmente significa construir o ensamblar por luz y es el proceso mediante el cual plantas superiores, algas y ciertos tipos de bacterias sintetizan compuestos orgánicos a partir de materia prima inorgánica en presencia de luz (Hall y Rao, 1987).

Desde un punto de vista bioenergético, es el mecanismo por el cual la energía lumínica incidente en un sustrato adecuado (pigmento fotorreceptor) es transducida a energía electrónica la cual, a través de transportadores específicos de electrones (ordenados en una membrana), es luego transducida a energía redox, originando poder reductor, y a energía química, generando ATP.

A partir de la generación de ATP y poder reductor (NADPH), que son los productos primarios de la fotosíntesis, resultan entonces asimilados los elementos biológicos primordiales (carbono, nitrógeno, azufre) en azúcares, aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos. Estos, a su vez, constituyen los compuestos moleculares básicos que, por polimerización, dan origen a los componentes mayoritarios del material celular: polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Losada et al, 1987).

Por su parte, el hombre satisface el 90% de sus demandas de calor, luz y potencia utilizando, como fuente de energía productos de la fotosíntesis actual y pasada: madera, que constituye 1/6 del requerimiento energético anual en el mundo (Hall, 1979), y materiales combustibles de origen fósil (carbón, petróleo, gas natural), los cuales son productos de descomposición de material biológico originado hace millones de años atrás (Hall y Rao, 1987).

1.2. ORGANISMOS FOTOSINTETICOS

Existe una gran variedad de organismos, desde procariotas a eucariotas, capaces de llevar a cabo la fotosíntesis. Si bien el proceso es básicamente el mismo en todo el espectro biológico, se observan diferencias importantes, tanto morfológicas como bioquímicas.

1.2.1. Diferencias morfológicas:

Para poder llevar a cabo la fotosíntesis resulta esencial la presencia de un fotorreceptor en un sistema de membranas. Es en estos sistemas donde ocurre la captación de la luz (a través de los pigmentos fotosintéticos), el transporte de electrones, y la síntesis de ATP, ya que los componentes responsables de dichos procesos forman parte de las membranas, ya sea, como componentes intrínsecos (parte constitutiva) o como factores extrínsecos (asociaciones variables).

En los organismos eucariotas, las membranas fotosintéticas son estructuras altamente diferenciadas,

denominadas tilacoides, rodeadas por una envoltura de doble membrana, dando origen a una organela subcelular: el cloroplasto. El espacio interno que queda entre los tilacoides y la envoltura, es el estroma, el cual contiene a las enzimas específicas de la asimilación del CO₂, del sulfato y del nitrato. Los tilacoides se diferencian a partir de la membrana interna del cloroplasto y se estructuran de dos maneras: a) en forma de sacos achatados y apilados, generando las granas y b) como vesículas que interconectan las granas, denominadas tilacoides de estroma. Los cloroplastos, cuya forma y número varía con la especie, son generalmente estructuras bicóncavas, de 1-3 µm de ancho por 5-7 µm de largo de eje principal (Hooper, 1984). Dado que el cloroplasto contiene en su estroma a las enzimas responsables de los procesos de asimilación, constituye una estructura celular capaz de llevar a cabo todo el proceso fotosintético independientemente del resto de la célula; dicha capacidad funcional fue demostrada trabajando con las organelas aisladas (Allen et al, 1955). Este concepto, hoy en día fuera de discusión, fue objeto de severas controversias a lo largo de todo el siglo (Arnon, 1987).

En los procariotas, las membranas fotosintéticas son invaginaciones más o menos complejas, según la especie, de la membrana interna del microorganismo. En las cianobacterias estas membranas alcanzan un nivel de organización tal que se diferencian de la membrana interna y por ello también se las denomina tilacoides. Las enzimas del ciclo de la asimilación del CO₂ se hallan en el único compartimento, el citoplasma, junto con todos los demás componentes del interior celular.

1.2.2. Diferencias bioquímicas:

Las principales diferencias bioquímicas entre los grupos fotosintéticos se hallan esquematizadas en la tabla A. Se observa que tales diferencias se basan en: i) el compuesto dador de electrones que restaura el estado redox de la clorofila fotooxidada, ii) los pigmentos que captan la energía lumínica, y iii) los hidratos de carbono que se sintetizan como sustancias de reserva.

1.2.3. Impacto de la fotosíntesis oxigénica:

La aparición en el reino vegetal de la fotosíntesis oxigénica, o sea, de la capacidad de utilizar al H_2O como reductor, está acompañada por una mayor complejidad de los sistemas pigmento-proteína (fotosistemas) que captan y transducen la energía lumínica. Mientras que en las bacterias verdes y púrpuras hay un solo tipo de fotosistema que funciona en forma cíclica, en todos los demás organismos, proclorofitas, cianobacterias y eucariotas, existen dos fotosistemas (I y II) que actúan en serie. En el fotosistema II, el H_2O constituye el reductor de la clorofila oxidada en el centro de reacción; restaurándola a su estado basal para iniciar un nuevo fotociclo, con la concomitante liberación de O_2 .

La generación de O_2 tuvo un gran impacto en el posterior desarrollo evolutivo de los seres vivos. Dado que este es tóxico, como lo demuestra la extrema sensibilidad de las bacterias anaeróbicas al mismo, su

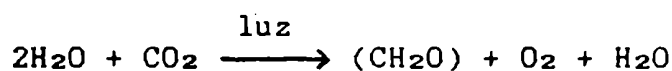
Tabla A: ORGANISMOS FOTOSINTETICOS

COMPUESTO DADOR DE e ⁻	PIGMENTOS	SUSTANCIAS DE RESERVA
SH ₂ , H ₂	bacterioclorofilas a-e carotenoides	
SH ₂ , H ₂ , etanol, acetato, β-OH-butirico, isopropanol.		
H ₂ O	clorofila a ficobiliproteínas β-carotenos zeaxantina	glucógeno
H ₂ O	clorofilas a y b	
H ₂ O	clorofilas a y c carotenoides	laminarina paramilon β-1,3-glucano
H ₂ O	clorofilas a y c ficobiliproteínas carotenoides	almidón amilopectina
H ₂ O	clorofilas a y b	almidón amilopectina α-1,4-glucano

presencia ha ejercido una fuerte presión de selección favoreciendo la adquisición de mecanismos de defensa. Por otra parte, la asequibilidad de O₂ ofreció la oportunidad de ampliar el rango de los metabolismos oxidativos, con lo cual el rendimiento energético de los nutrientes orgánicos aumentó significativamente (Hooper, 1984).

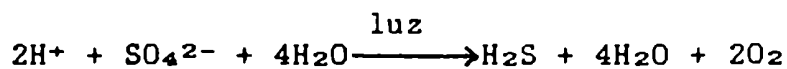
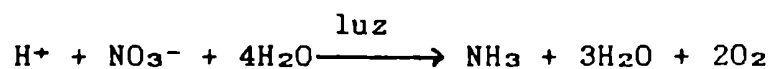
1.3. BIOQUIMICA DE LA FOTOSINTESIS

En la siguiente ecuación, sumamente simplificada, suele resumirse generalmente el proceso fotosintético en proclorofitas, cianobacterias y plantas eucarióticas:



donde (CH₂O) es un hidrato de carbono.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la energía captada de la luz también es utilizada en los procesos de fijación de nitrógeno y azufre:



Del análisis de estas reacciones surge que la fotosíntesis es un proceso reductivo en el cual los aceptores finales de electrones son el CO₂, el NO₃⁻ y el SO₄²⁻ (Losada et al, 1987).

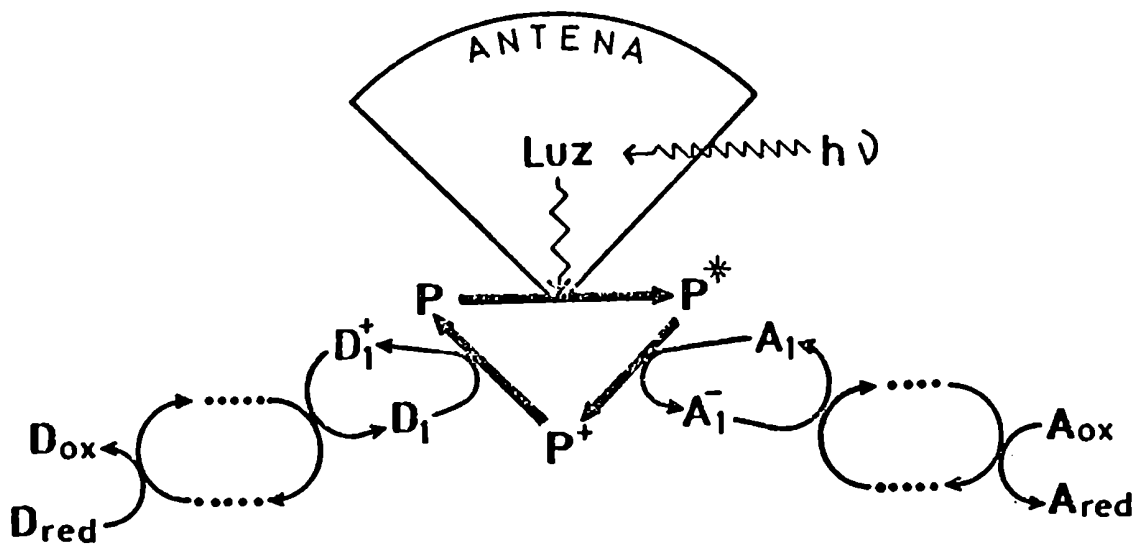
1.3.1. Captación de la luz

El primer paso en la fotosíntesis es la absorción de luz por la clorofila, una porfirina con un ión Mg coordinado, lo que provoca la excitación electrónica de la misma. La energía acumulada por el electrón en su estado excitado es entonces transferida, por resonancia, de una molécula de clorofila a otra, dentro de un complejo pigmento-proteína que se denomina antena (light harvesting complex, (LHC)), mediante interacciones electromagnéticas directas. Esto implica que existe superposición entre el espectro de absorción del compuesto aceptor y el espectro de emisión del respectivo dador. De esta manera, la energía radiante alcanza a un par de moléculas de clorofila, ubicadas en una región especial de la membrana, donde produce la separación de cargas. Este sitio, donde la energía radiante es convertida en un potencial eléctrico, constituye el centro de reacción. La mayoría de las moléculas de clorofila absorben luz, pero solo una pequeña proporción de estas, las del centro de reacción, median la transducción de la energía lumínica en la generación de un potencial redox (Figura A). En comparación con las reacciones fotoquímicas que ocurren en la antena (tiempo medido en picosegundos), las del centro de reacción son más "lentas" (del orden de picosegundos).

La fotosíntesis oxigénica requiere la interacción de dos reacciones lumínicas. Ambas pueden ser llevadas a cabo por luz de longitudes de onda menores de 680 nm, pero solo una por longitudes de onda mayores. Dichas reacciones

luminicas ocurren en los fotosistemas I y II. El fotosistema I puede ser excitado por longitudes de onda menores de 700 nm, y genera un reductor fuerte que conduce a la formación del NADPH. El fotosistema II, que requiere longitudes de onda menores de 680 nm, produce un oxidante fuerte que lleva a la formación de O₂. En este proceso, el fotosistema I produce un oxidante débil, mientras que el fotosistema II da origen a un reductor débil. La interacción de estas especies en las membranas fotosintéticas resulta en la generación de un gradiente de protones transmembrana con la subsecuente formación de ATP (Figura B).

Figura A: ESQUEMA DE LA ACCION DE LA LUZ SOBRE UN FOTOSISTEMA



P: pigmento, clorofila del centro de reacción: (Chl)_{CR}

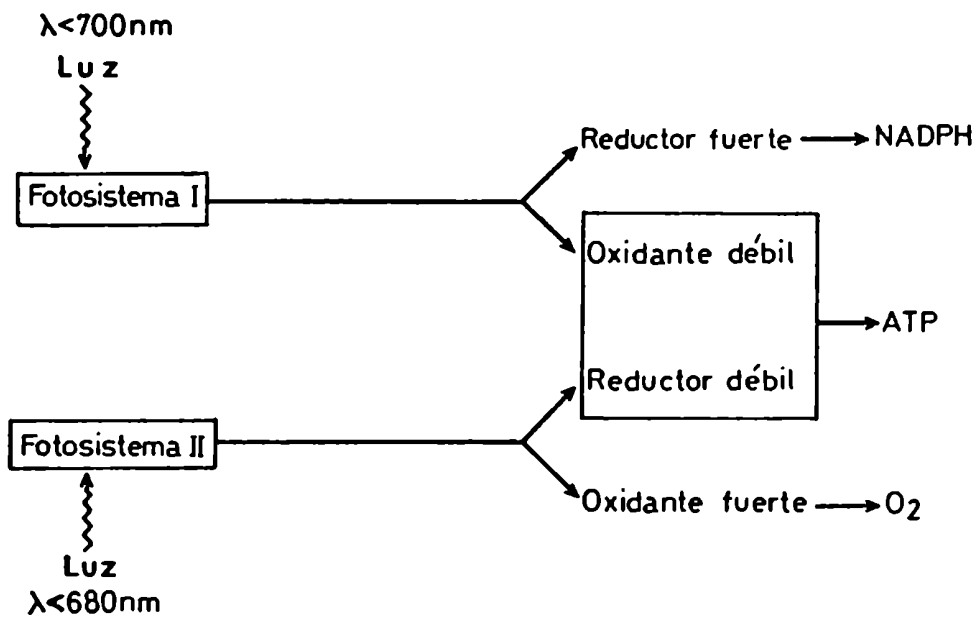
P*: (Chl)_{CR} excitado

P+: (Chl)_{CR} oxidado

A: aceptor de electrones

D: donador de electrones

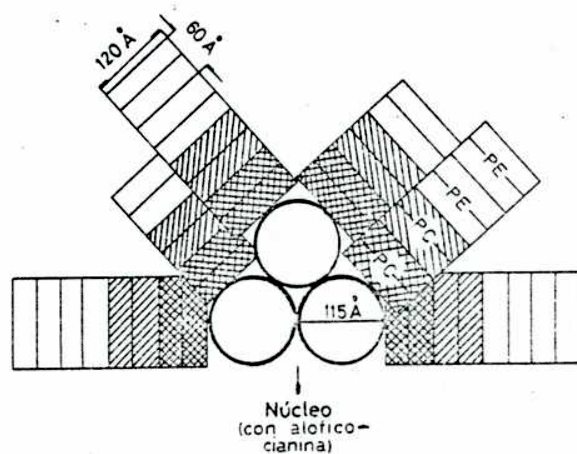
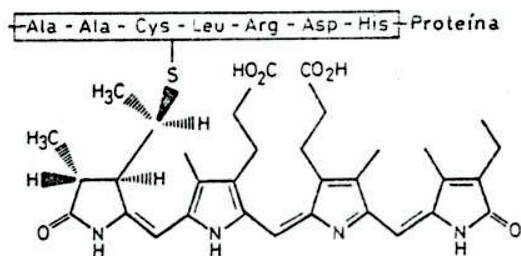
Figura B: ESQUEMA DE LA INTERACCION ENTRE
LOS FOTOSISTEMAS I Y II EN LA FOTOSINTESIS OXIGENICA



1.3.2. Pigmentos accesorios en cianobacterias: los ficobilisomas

Es muy poca la luz roja o azul que alcanza a los organismos acuáticos que habitan a más de un metro de profundidad, ya que dichas longitudes de onda son absorbidas por el agua y por las clorofilas de los organismos que se encuentran más cerca de la superficie. Sin embargo, las cianobacterias y algas rojas poseen unos complejos denominados ficobilisomas que les permiten captar la luz verde y amarilla que se filtra. Dichos ficobilisomas se encuentran unidos a la superficie externa de las membranas tilacoidales, donde actúan como antena colectora de luz para canalizar la energía de excitación hacia el centro de reacción del Fotosistema II (Glazer, 1984). Estos complejos tienen su máximo de absorción en la región que va desde 470 a 650 nm, o sea, en el valle del espectro de absorción de la clorofila a cuyos picos se encuentran a 430 y 680 nm, aproximadamente. Estructuralmente, como se esquematiza en la figura C₁, constituyen un complejo supramolecular de ficobiliproteínas (polipéptidos unidos a grupos bilinas) y proteínas de unión sin grupos prostéticos. Cada ficobilisoma contiene cientos de moléculas de ficobiliproteínas siendo aloficocianina, ficocianina y ficoeritrina, los componentes mayoritarios. En la figura C₂ se observa la estructura del grupo prostético de la ficocianina. La variedad de ficobiliproteínas, con diferentes propiedades espectrales, facilita que estos complejos absorban en un rango tan amplio de la porción visible del espectro de radiación. La

Figura C: ESTRUCTURA DE LOS FICOBILISOMAS

C₁C₂

C₁: Diagrama esquemático de un ficobilisoma de la cianobacteria *Synechocystis* 6701, conteniendo un núcleo formado por aloficocianina y aloficocianina B del cual emergen estructuras laterales formadas por complejos de ficoeritrina (PE) y ficocianina (PC) con polipéptidos. El núcleo se encuentra unido a las membranas tilacoidales.

C₂: estructura química del grupo prostético de una ficobiliproteína, la ficocianina.

energía lumínica colectada por las ficobiliproteínas que absorben a cortas longitudes de onda, es transferida a aquellas que absorben a longitudes mayores y luego a la clorofila del centro de reacción del fotosistema II, en una secuencia de excitación que, en cianobacterias, es la siguiente:

ficoeritrina→ficocianina→aloficocianina→
→centro de reacción

El arreglo geométrico de las ficobiliproteínas, dentro de los ficobilisomas, y sus propiedades espectrales, aseguran que la eficiencia en la transferencia de energía sea mayor al 95%. Por lo tanto, la presencia de ficobilisomas otorga a los organismos que los poseen la posibilidad de ocupar nichos ecológicos que otros organismos no podrían soportar.

1.3.3. Fotosistema II:

El Fotosistema II es un gran complejo pigmento-proteína que atraviesa la membrana tilacoidal. Presenta más de 10 cadenas polipeptídicas y está constituido por un sistema "antena" o "colector de luz", un centro de reacción, un complejo generador de O₂ y una cadena de transporte de electrones. Tanto en el centro de reacción como en el sistema antena, las clorofilas se hallan estrechamente asociadas a las cadenas polipeptídicas.

La excitación electrónica, inducida por la luz, es canalizada desde las clorofilas a y b del complejo antena hacia la clorofila a constituyente del centro de reacción (P680). El estado excitado de este centro de reacción

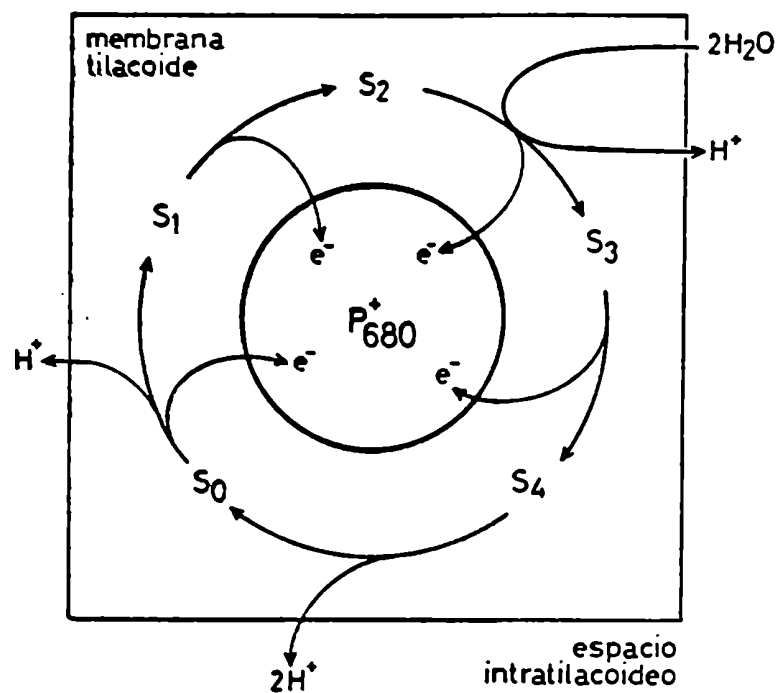
(P680*) es un fuerte reductor que, en los 15-30 picosegundos que siguen a su excitación, pierde un electrón, por transferencia a la Feofitina (una porfirina en la cual el Mg central ha sido sustituido por 2 H). El centro de reacción se transforma en el catión P680+ y la feofitina, en el correspondiente anión. De esta manera, la mayor parte de la energía contenida en el fotón absorbido es conservada en la separación de cargas.

En un paso posterior, la feofitina reduce una Plastoquinona que se encuentra asociada a una proteína, denominada Qa, la cual, a su vez, reduce a otra Plastoquinona unida a otro sitio, Qb. La Plastoquinona en Qa, ya sea en su forma oxidada o reducida, se encuentra siempre unida a la proteína, en tanto que la Plastoquinona de Qb, que constituye un componente móvil en la membrana, migra cuando recibe el segundo electrón, tomando dos H⁺ del espacio extratilacoidal. En este punto, la energía de dos fotones ha sido almacenada en el potencial reductor de la Plastoquinona reducida (QH₂). QH₂ entrega sus electrones a una cadena de transporte de electrones que está ligada a la reducción del fotosistema I.

Por otra parte, el catión P680+ del Fotosistema II, que es un fuerte oxidante, provoca la oxidación del H₂O, con el consiguiente desprendimiento de O₂ y la liberación de H⁺ en el espacio intratilacoidal. Para ello, es necesaria la participación de una cadena de transporte de electrones que incluye al complejo de oxidación del H₂O. La enzima que causa la oxidación del H₂O contiene 4 iones Mn en su centro catalítico. Este complejo de Mn es oxidado por el P680+ mediante una secuencia de 4 etapas mediante las cuales se

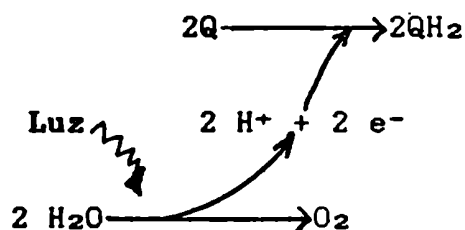
logra la liberación de 1 mol de O_2 a partir de 2 moles de H_2O ; como consecuencia, se obtienen 4 moles de H^+ (Figura D).

Figura D: ESQUEMA DE LA OXIDACION DEL H_2O POR EL FOTOSISTEMA II



S_0 - S_4 : Estados redox del Sistema de Oxidación de H_2O

Así, la reacción completa del Fotosistema II puede resumirse de la siguiente manera:



donde Q y QH₂ representan la Plastoquinona en sus estados oxidado y reducido, respectivamente.

Así, el fotosistema II transfiere electrones desde el H₂O hacia su aceptor, la plastoquinona, en una reacción que está favorecida termodinámicamente por la energía provista por la luz en la excitación del P680.

1.3.4. Complejo Citocromo bf:

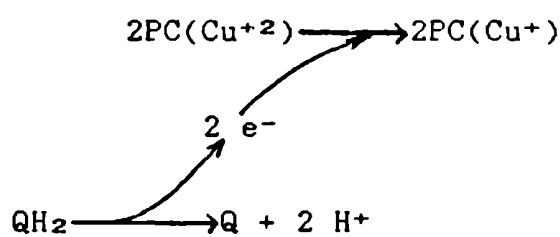
Los electrones fluyen desde el fotosistema II al fotosistema I mediante el citocromo bf. El citocromo bf cataliza la transferencia de electrones desde el plastoquinol (QH₂) hacia la plastocianina y bombea los protones hacia el espacio intratilacoidal.

El complejo citocromo bf contiene 4 subunidades: un citocromo f (34 kDa), un citocromo b₅₅₉ con dos grupos hemo (23 kDa), una proteína Fe-S (20 kDa) y una cadena polipeptídica de 17 kDa. Este complejo, que abarca la membrana desde una cara a la otra, guarda relación con la citocromo reductasa de mitocondrias (la citocromo reductasa bombea protones a través de la membrana mitocondrial interna, catalizando la reducción del citocromo c, una

proteína soluble, por el ubiquinol). Los mecanismos de reacción de estos complejos son también similares. Incluso, se ha visto que sus secuencias aminoácidas tienen, aproximadamente, 40% de homología.

Los electrones fluyen desde el centro Fe-S del complejo citocromo bf hacia la plastocianina, una proteína soluble de 11 kDa. El centro redox de la plastocianina es un ión cobre coordinado a las cadenas laterales de una cisteína, una metionina y dos histidinas.

Esta etapa se puede resumir así:



donde PC es la Plastocianina.

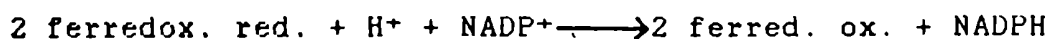
1.3.5. Fotosistema I:

Las actividades del fotosistema II y el complejo citocromo bf resultan en la reducción de la plastocianina y en la generación un gradiente de protones entre ambos lados de la membrana. El siguiente paso en la transferencia de electrones está mediado por un complejo transmembrana de más de 13 cadenas polipeptídicas (>800 kDa): el fotosistema I. La luz es canalizada desde una antena accesoria (LHC I), conteniendo 70 moléculas de clorofila a y b, y una antena núcleo, con 130 moléculas de clorofila a, hacia el centro de reacción del Fotosistema I (P700). Al igual que en el

fotosistema II, el evento primario en el centro de reacción es la separación de cargas inducida por la luz. Un electrón es transferido desde el P700* a un aceptor clorofila llamado A₀, para formar A₀⁻ y P700⁺. El P700⁺ captura un electrón de la plastocianina reducida para retornar a su estado basal (P700), encontrándose en condiciones de ser excitado nuevamente. Por su parte, A₀⁻ representa la biomolécula más reductora que se conozca (E₀' = -1,1 V). El electrón de A₀⁻ es transferido a A₁ y, de ahí, a una serie de centros ferro-sulfurados, que constituyen los grupos prostéticos de ciertas proteínas pertenecientes al fotosistema I. El paso final es la reducción de una proteína soluble de 12 kDa (la ferredoxina) conteniendo un centro activo 2Fe-2S. En los cloroplastos, esta reacción ocurre en la cara estromática de la membrana tilacoidal. Así, la reacción neta catalizada por el fotosistema I es:



Finalmente, dos moléculas de ferredoxina son necesarias para la conversión de una molécula de NADP⁺ en NADPH. Esta reacción es catalizada por la enzima Ferredoxina-NADP reductasa, una flavoproteína cuyo grupo prostético es el FAD:

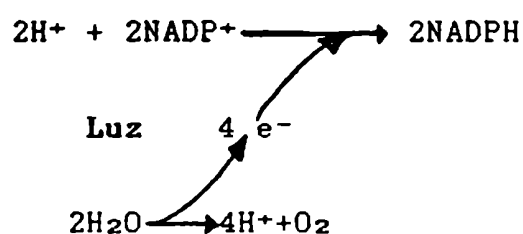


Dado que esta reacción ocurre en el lado estromático, la toma de un protón para la reducción del NADP⁺ contribuye a

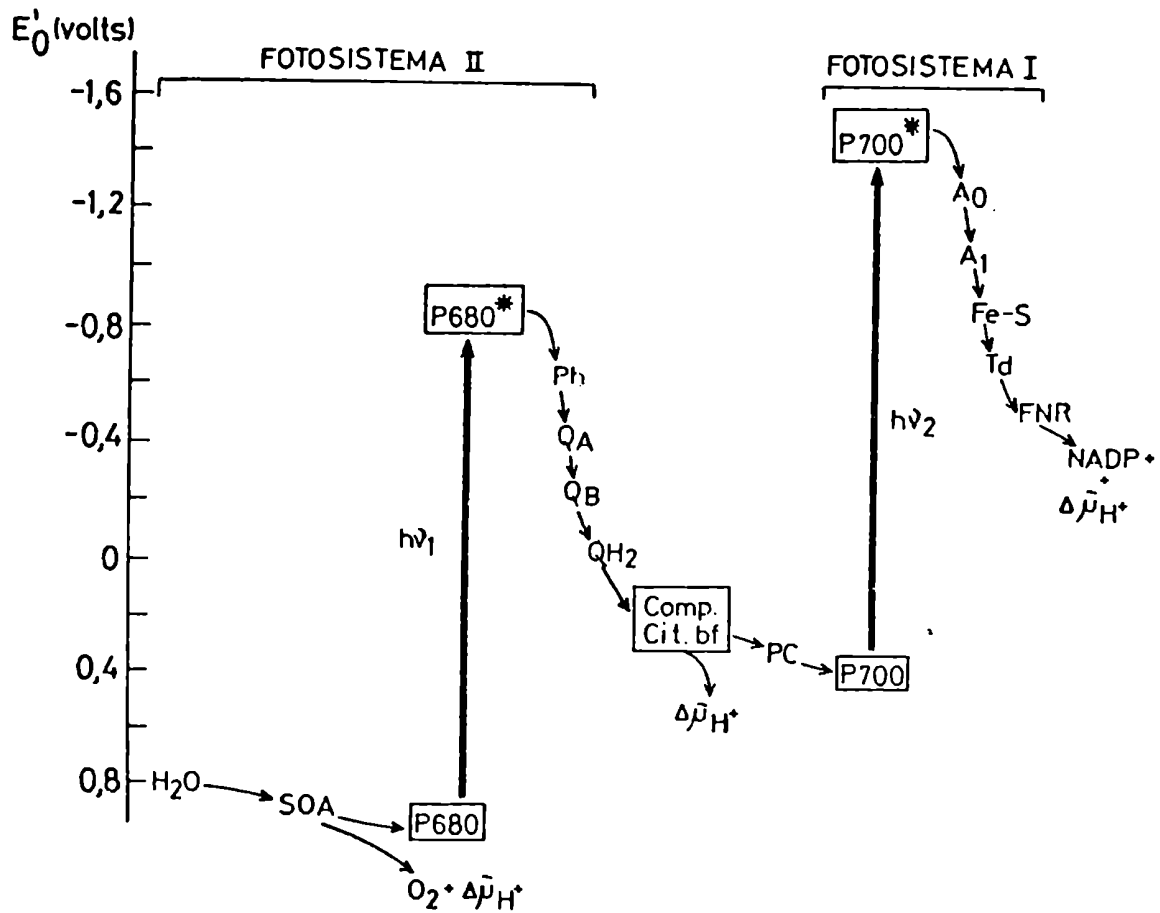
potenciar la generación del gradiente de pH a través de la membrana tilacoidal.

1.3.6. Esquema Z de la Fotosíntesis:

La reacción neta llevada a cabo por el fotosistema II, el citocromo bf y el fotosistema I es:



En esencia, la luz facilita que los electrones fluyan desde el H₂O hacia el NADPH y una fuerza protón-motriz lo haga a través de la membrana tilacoidal. Esta vía se denomina esquema Z y fue propuesta por Hill y Bendall en 1960 (Figura E) (Haliwell, 1978).

Figura E: ESQUEMA Z DE LA FOTOSINTESIS

Ph: Feofitina
 QA y QB: sitios proteicos de la Plastoquinona
 QH₂: Plastoquinona reducida
 PC: Plastocianina
 A₀ y A₁: Aceptores clorofilicos de e⁻
 Fd: Ferredoxina
 FNR: Ferredoxina NADP-reductasa
 $\Delta\bar{\mu}H^+$: potencial electroquímico del protón
 S.O.A.: sistema de oxidación de H₂O
 Fe.S: sulfoferroproteína unida a la membrana

(Según Blankenship y Prince, 1985)

1.3.7. Fotofosforilación:

La síntesis de ATP durante el proceso fotosintético se denomina Fosforilación fotosintética o Fotofosforilación y, en los cloroplastos, fue descubierta por Daniel Arnon en 1954 (Arnon et al, 1954).

En 1966, Jägendorf mostró que los cloroplastos podían sintetizar ATP en la oscuridad si previamente se generaba un gradiente de pH a través de la membrana tilacoidal (Jägendorf y Uribe, 1966). Este experimento dió sustento a la hipótesis de Mitchell (Mitchell, 1961), según la cual la síntesis de ATP es conducida por una diferencia en el potencial electroquímico del protón (fuerza protón-motriz) entre dos compartimentos separados por una membrana. En efecto, Mitchell propuso que el transporte de electrones y la síntesis de ATP estaban acoplados por un gradiente de protones a través de la membrana. En su modelo, la transferencia del poder reductor provoca una distribución asimétrica de protones entre ambos lados de la membrana, generando una diferencia de pH y una diferencia de potencial eléctrico. Estas dos componentes conforman la fuerza protón-motriz, mediante la cual el complejo ATPasa lleva a cabo la síntesis de ATP, en bacterias, mitocondrias y cloroplastos. Ciertamente, la transferencia de electrones a través de los fotosistemas I y II, y del complejo citocromo bf, produce un gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal. En los cloroplastos, el espacio intratilacoidal se vuelve marcadamente ácido por la acción de la luz: pH cercano a 4; en tanto, el gradiente de protones a través de la

membrana es de aproximadamente 3.5 unidades de pH. Sin embargo, en el caso particular de los cloroplastos, el potencial eléctrico, como componente del potencial electroquímico del protón, no tiene la importancia que presenta en mitocondrias puesto que las membranas tilacoidales son bastante permeables al Cl^- y al Mg^{2+} . Por lo tanto, la incorporación de protones al espacio intratilacoidal va acompañado por un pasaje en la misma dirección de Cl^- (transporte symporter) o de Mg^{2+} en la dirección opuesta, en una relación $\text{Mg}^{2+}:\text{H}^+ = 1:2$ (transporte antiporter). De manera que, mantenida la electroneutralidad en los espacios intra- y extratilacoidal, una diferencia de 3.5 unidades de pH genera una fuerza protón-motriz de 0.2 V o, en otros términos, un $\Delta G = -4.8$ kcal/mol.

El complejo enzimático que lleva a cabo la producción de ATP, ATPsintasa, muestra similitud estructural en bacterias, cloroplastos y mitocondrias. Está constituido por una estructura proteica transmembranosa compuesta por dos factores, F_0 y F_1 (CF_0 y CF_1 , en cloroplastos). El CF_1 , que aparece como una protuberancia esférica en los análisis por microscopía electrónica, se encuentra localizado en el lado estromático de la membrana tilacoidal y contiene el sitio que cataliza la síntesis (hidrólisis) de ATP. Está constituido por cinco subunidades proteicas diferentes en la siguiente relación: $\alpha_3\beta\tau\delta\epsilon$. Las subunidades α y β contienen los sitios de unión y de catálisis para ATP y ADP. La subunidad δ une CF_1 con CF_0 , y τ controla el flujo de protones. La subunidad ϵ inhibe la actividad catalítica en la oscuridad a fin de evitar la hidrólisis del ATP, ya que la enzima actúa en las dos direcciones. El factor CF_0 se

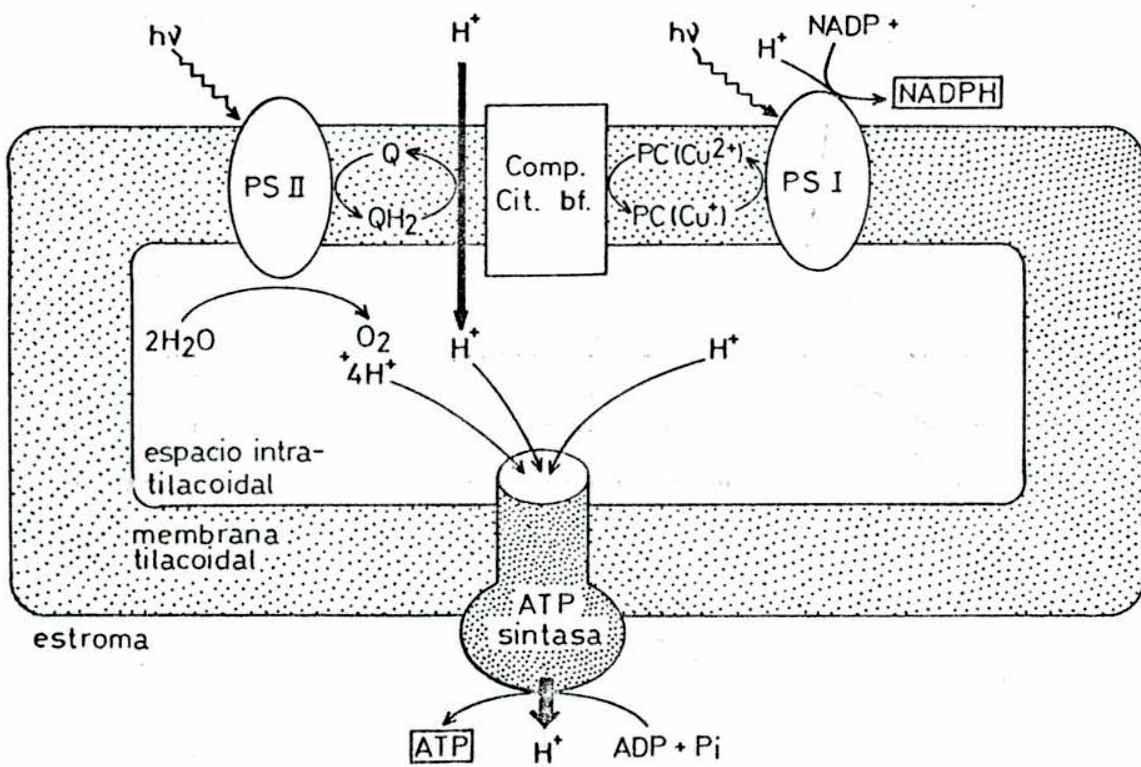
halla incluido en la membrana y está constituido por tres tipos de subunidades, las que formarían un canal a través del cual pasarían los protones desde el interior del tilacoide hacia el estroma. Según la hipótesis quimiosmótica, la energía contenida en la fuerza protón-motriz es la que utiliza la ATPsintasa para generar ATP, cuando los H^+ pasan a través de dicho canal del CF_0 disipando el gradiente de pH. Dado que el CF_1 se encuentra en el lado estromático de la membrana tilacoidal, el ATP sintetizado es liberado en el estroma del cloroplasto (ver figura F).

1.3.8. Fotofosforilación cíclica:

Una vía alternativa para los electrones provenientes del P700, el centro de reacción del fotosistema I, contribuye a la versatilidad de la fotosíntesis. El muy bajo potencial de la ferredoxina facilita la reducción del citocromo bf en lugar del $NADP^+$. Los electrones, entonces, fluyen hacia la forma oxidada del P700 a través de la plastocianina. Este flujo cíclico de electrones, en el cual no se oxidan sustratos ni se generan productos reducidos, conduce únicamente al transporte de protones por el complejo citocromo bf. Una vez generado el gradiente de protones, se cuenta con el potencial necesario para la síntesis de ATP. Este proceso, denominado fotofosforilación cíclica (figura H), produce ATP sin la concomitante síntesis de NADPH; en consecuencia, no participa el fotosistema II ni hay liberación de O_2 . La fotofosforilación cíclica ocurre cuando el $NADP^+$ es inasequible para aceptar electrones ya que la

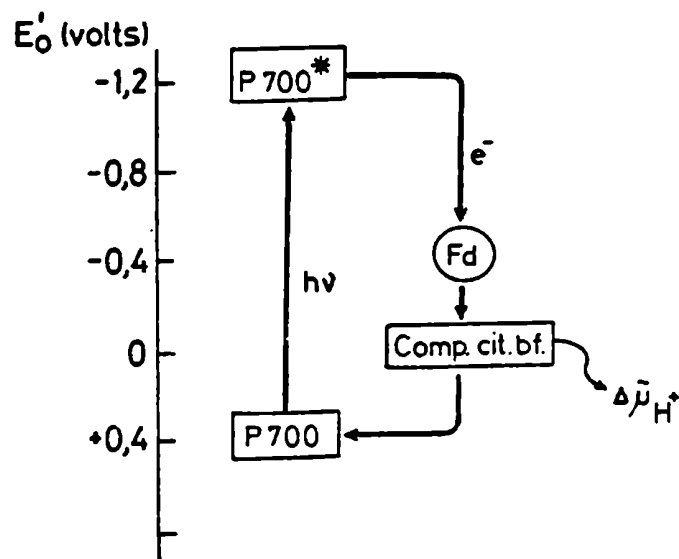
relación NADPH/NADP es alta, o cuando aumenta el consumo de ATP por requerimientos del metabolismo (Andreo y Vallejos, 1984).

Figura G: ESQUEMA DEL ORDENAMIENTO DE LOS FOTOSISTEMAS I Y II, EL CITOCROMO bf Y LA ATPsintasa EN LA MEMBRANA DEL TILACOIDE



PS II: Fotosistema II
 PS I: Fotosistema I
 $PC(Cu^{2+})$: Plastocianina, forma oxidada
 Q: Plastoquinona
 QH_2 : Plastoquinona reducida

Figura H: TRANSPORTE CICLICO DE ELECTRONES



Fd: Ferredoxina
Comp.cit. bf: Complejo citocromo bf
 $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$: Potencial electroquímico del protón

1.4. UTILIZACION DE LOS PRODUCTOS PRIMARIOS DE LA FOTOSINTESIS

Como se mencionara, los productos primarios de la fotosíntesis (ATP y NADPH), sintetizados en el estroma del cloroplasto, son posteriormente utilizados por el metabolismo celular para asimilar elementos biológicos primordiales. Estos elementos, el carbono, el azufre y el nitrógeno, son captados en su estado de oxidación máximo, bajo las formas de CO_2 , SO_4^{2-} y NO_3^- , respectivamente.

Dado el objetivo de la presente tesis (Regulación enzimática del Ciclo de Benson-Calvin), se discutirá en la siguiente sección solamente la vía de la asimilación fotosintética del CO_2 , la cual se produce a través del ciclo reductivo de las pentosas-fosfato o Ciclo de Benson-Calvin.

1.4.1. Asimilación fotosintética del CO_2

1.4.1.1. Ciclo reductivo de las pentosas-fosfato o de Benson-Calvin

Si bien las primeras hipótesis acerca de que las plantas asimilan CO_2 en luz datan del siglo XVIII (Ingenhousz, 1779 y 1796), y las evidencias de síntesis de almidón y azúcares como resultado de la iluminación provienen del siglo XIX (Sachs, 1863; Boehm, 1883), todo esto pudo ser confirmado recién hacia el año 1950, con la implementación de las técnicas de marcado radioactivo (Ruben y Kanen, 1941), cromatografías en papel (Martin y Synge, 1952) y autorradiografía (Fink y Fink, 1948).

Trabajando con suspensiones del alga *Chlorella* sp, Benson, Calvin y colaboradores encontraron que el 3-PGA era el primer compuesto marcado radioactivamente luego que las células fueran iluminadas en presencia de $^{14}\text{CO}_2$, lisadas en etanol a 80°C y que los productos solubles formados se cromatografiaran en papel (Benson et al, 1950). El hallazgo de la Ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) (Benson, 1951; Bassham et al, 1954), un azúcar cuya presencia en sistemas biológicos era desconocida, y las determinaciones cinéticas, permitieron postular que este azúcar bisfosfato era el aceptor del CO_2 (Benson et al, 1950; Bassham et al, 1954; Calvin y Massini, 1952). La reacción de carboxilación de la RuBP fue confirmada simultáneamente por los laboratorios de Calvin (Quayle et al, 1954) y Horecker (Weissbach et al, 1954). Luego del PGA, secuencialmente fueron marcándose las triosas-monofosfato y los azúcares mono- y bisfosfato. Cuando los cultivos eran privados de CO_2 se acumulaba RuBP y disminuía el PGA. En posteriores ensayos de degradación se determinó la cantidad de ^{14}C en cada posición del PGA y se observó que, a tiempos cortos, la marca radioactiva se hallaba en el C-1 en tanto que, a tiempos prolongados, se hallaba igualmente distribuida entre los 3 carbonos. Todas estas características dieron la base para postular una vía cíclica en la cual el PGA es el primer producto de la asimilación fotosintética del CO_2 (figura I).

Como se destaca en el esquema, una vuelta del ciclo requiere 3 moles de ATP y dos de NADPH, cuya síntesis es mediada por el transporte fotosintético de electrones.

Estudios similares mostraron que, en cloroplastos aislados, el CO₂ es asimilado en azúcares y almidón con el simultáneo desprendimiento de O₂ (Arnon, 1955; Allen et al, 1955). Como se adelantara en la sección 1.2.1., estos datos complementados con el hallazgo de que el cloroplasto aislado producía ATP, corroboraron definitivamente que dicha organela, en presencia de luz como única fuente de energía, lleva a cabo en forma autónoma todo el proceso de la fotosíntesis.

El ciclo de Benson-Calvin se encuentra presente en todas las células eucarióticas fotosintéticas, así como también en cianobacterias y bacterias fotosintéticas (Norris et al, 1955; Uffen, 1976; Stoppani et al, 1955). La única excepción la constituirían las bacterias verdes sulfurosas (Chlorobiaceae) en las que la asimilación del CO₂ se efectúa mediante el ciclo reductivo de los ácidos tricarbónicos (Buchanan y Sirevag, 1976).

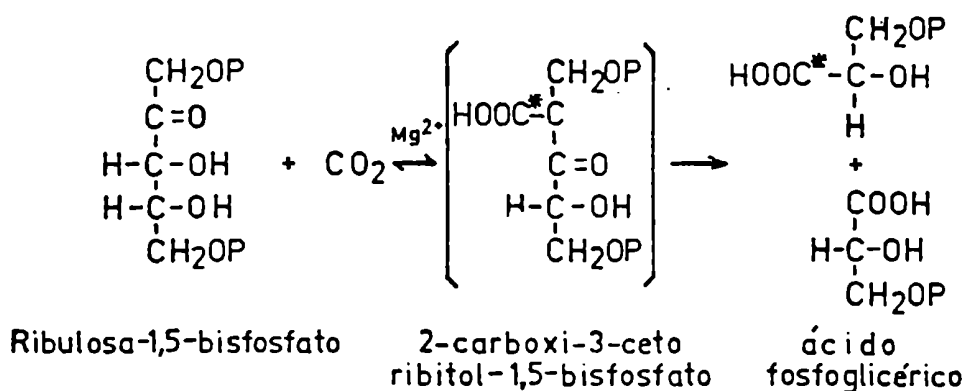
1.4.1.2. Enzimas del ciclo de Benson Calvin

El ciclo reductivo de las pentosas-fosfato se puede dividir en cuatro etapas o fases:

- 1) Fase de carboxilación.
- 2) Fase de reducción.
- 3) Fase de regeneración.
- 4) Fase de síntesis o de utilización de productos.

1) Fase de Carboxilación:

Esta fase consiste en la carboxilación de la Ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), que es un azúcar bisfosfato de cinco carbonos (Quayle et al, 1954; Weissbach et al, 1954), generando un producto intermediario de 6 carbonos, el 2-carboxi-3-ceto-ribitol-1,5-bisfosfato (Siegel y Lane, 1973). Dicho compuesto se escinde luego para dar dos moléculas de PGA.



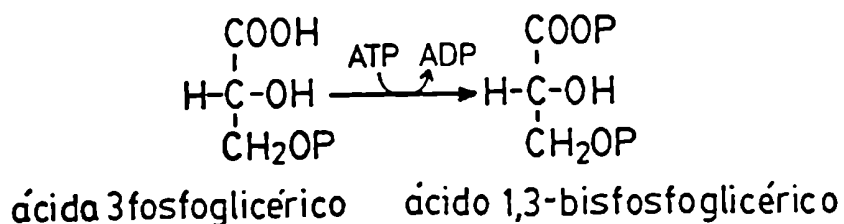
La enzima responsable de esta reacción es la Ribulosa-1,5-bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa (RuBisCO), y es quizá la proteína más abundante en toda la naturaleza. En plantas superiores es un hexadecámero donde se distinguen dos tipos de monómeros, los S (Small, pequeños) de 14.000 de P.M., y los L (Large, grandes) de 56.000 de P.M. Los 8 monómeros S conforman la subunidad S, a la que se le atribuyen funciones regulatorias y, además, es codificada por el genoma del núcleo celular y su expresión génica está regulada por la luz (Flühr et al, 1985). Por su parte, los 8 monómeros L

integran la subunidad L, la cual es la porción catalítica de la RuBisCO y se encuentra codificada en el genoma del cloroplasto.

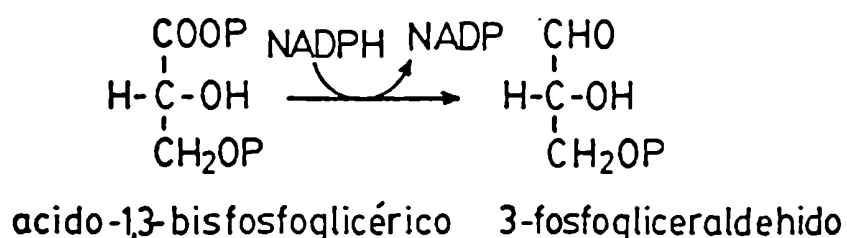
2) Fase de Reducción:

En esta fase el PGA es convertido a Gliceraldehído-3-P (GAP) en dos etapas:

a) El PGA es fosforilado mediante la Fosfogliceratoquinasa, en una reacción que requiere Mg^{2+} como cofactor y donde se consume una molécula de ATP (Pacold y Anderson, 1973)



b) El ácido 1,3-bisfosfoglicérico es reducido por el NADPH a través de la enzima NADP-Gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa. Este es el único paso reductivo del ciclo de Benson-Calvin. En plantas superiores, esta enzima tiene un peso molecular elevado (600.000), está constituida por dos tipos de subunidades y presenta, como se detallará más adelante, un comportamiento histerético (Pupillo y Giuliani-Piccari, 1975; Wolosiuk y Buchanan, 1976)



El 3-fosfogliceraldehído (GAP) así formado, se encuentra en equilibrio con su isómero, la dihidroxiacetona-P (DHAP), debido a la presencia de la enzima triosa-fosfato isomerasa (Anderson, 1971).

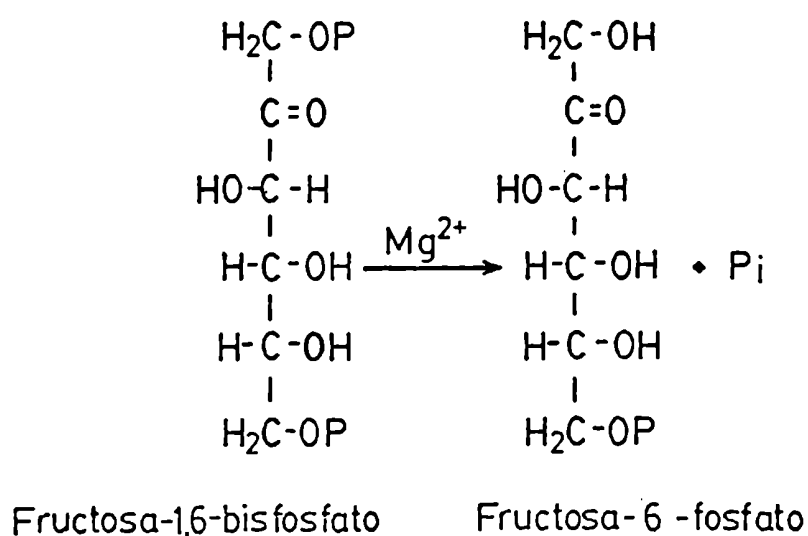
Es en esta fase donde se conserva parte de la energía generada en el transporte no cíclico de electrones, ya que en ella se consumen ATP y NADPH (1:1), con la concurrente reducción del carbono (Bassham y Krausse, 1969).

3) Fase de Regeneración:

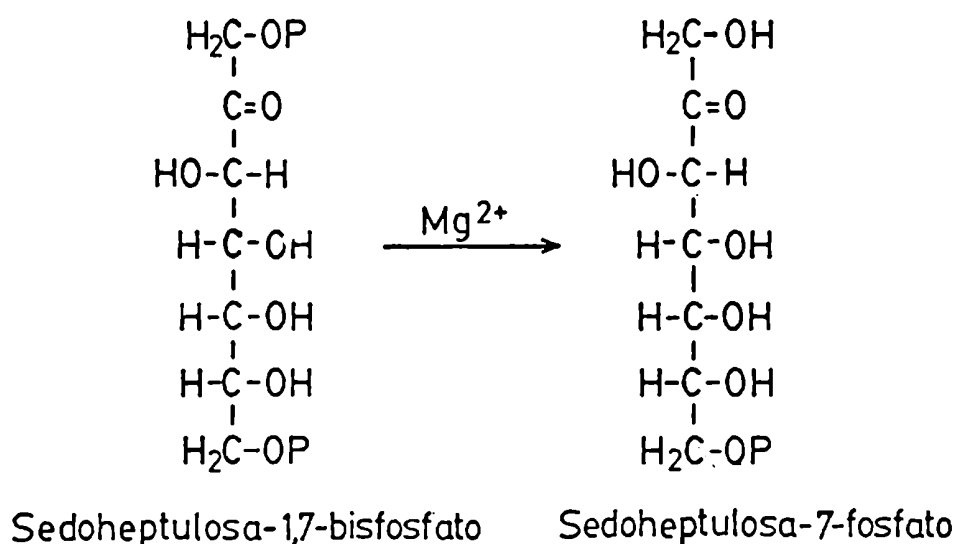
Para que el proceso cumpla con las características de un ciclo, el aceptor original debe ser regenerado. De esta manera la fijación del CO₂ se producirá en forma continua. La regeneración se produce a través de una serie de reacciones que involucran azúcares de 3,4,5,6 y 7 carbonos. Exceptuando la reacción catalizada por la Fosforribuloquinasa, no se utilizan los factores generados en luz (ATP y NADPH). Por otra parte, existen en esta fase tres etapas limitantes del ciclo:

a) Las reacciones de hidrólisis del fosfato del carbono 1 de la Fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) y de la sedoheptulosa-1,7-bisfosfato (SBP) (Preiss y Kosuge, 1970; Buchanan et al,

1971). La FBP es generada por una aldocondensación entre una molécula de GAP y una de DHAP, en presencia de la enzima Aldolasa (Brooks y Criddle, 1966). La liberación del Pi es catalizada, en presencia de Mg^{2+} , por la Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa), enzima de P.M.=160.000, cuya regulación es objeto de estudio en una parte de la presente tesis.

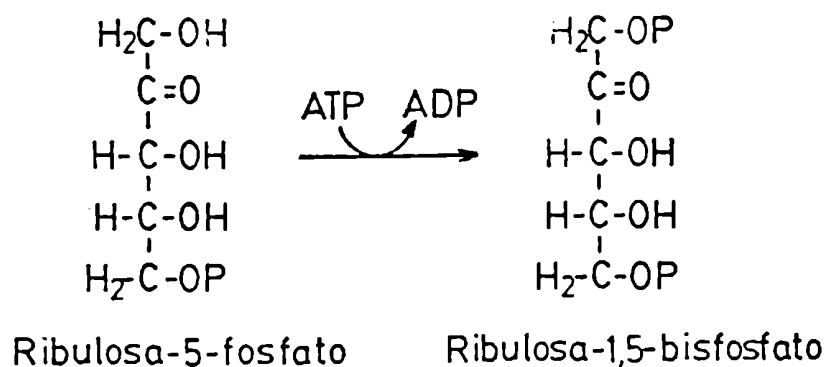


La SBP se forma por la condensación, en presencia de una aldolasa, de una molécula de Eritrosa-4-fosfato (E4P) y una de DHAP. La hidrólisis del Pi se realiza, en presencia de Mg^{2+} , ya sea a través de la FBPasa o de la SBPasa (PM=85.000).



Estas dos reacciones tienen, bajo condiciones fisiológicas, un cambio de energía libre de -7 kcal, y se trata de un punto de control metabólico.

b) La fosforilación de la ribulosa-5-fosfato. En esta reacción, catalizada por la Fosforribuloquinasa, se utiliza una molécula de ATP generado fotoquímicamente (Racker, 1955).



La reacción tiene una energía libre de -4 kcal lo que la ubica a mitad de camino entre las reacciones reversibles ($-2 < G < 0$) y las completamente irreversibles ($-10 < G < -7$). Esta etapa es otro punto de control metabólico (Bassham y Krausse, 1969).

4) Fase de Síntesis o de Utilización de Productos:

Las triosas-fosfato generadas a través del ciclo son utilizadas, mediante mecanismos de exportación, para la síntesis de sacarosa en el citoplasma y, en el cloroplasto mismo, para la síntesis del almidón u otras sustancias de reserva, si se trata de algas (Arnon, 1955; Allen et al, 1955; Gibbs y Cynkin, 1958; Kanazawa et al, 1970).

1.5. REGULACION ENZIMATICA DEL CICLO DE BENSON-CALVIN

1.5.1. Activación por luz:

Durante mucho tiempo se restringió el requerimiento de luz en la fotosíntesis a la obtención de ATP y NADPH necesarios para la asimilación del CO₂. De acuerdo con este punto de vista, la conversión de CO₂ a carbohidratos, y otros productos de las células fotosintéticas, se llevaría a cabo mediante una serie de reacciones enzimáticas, independientes de la luz, que ocurrirían en la oscuridad siempre y cuando se proveyera de ATP y NADPH al sistema. Sin embargo, contrariamente a esta visión, se han acumulado evidencias que demuestran que la fase de reducción del carbono en la fotosíntesis requiere de la luz para la activación de ciertas enzimas, las cuales son poco activas o totalmente inactivas en la oscuridad. Esta necesidad de luz para la activación no solo la presentan las enzimas directamente involucradas en la asimilación del CO₂, sino también otras relacionadas al metabolismo del sulfato, del nitrato, de la reducción de ácidos dicarboxílicos y de la síntesis de alcaloides (Buchanan, 1980). Simultáneamente, determinadas enzimas involucradas en la movilización y degradación de hexosas resultan inactivadas por la luz (Bassham y Kirk, 1968; Lendzian y Ziegler, 1970; Kachru y Anderson, 1975; Anderson et al, 1979), lo cual impide el funcionamiento de ciclos fútiles, ya que en el cloroplasto el ciclo de las pentosas-fosfato opera tanto reductiva como oxidativamente.

El efecto de la luz sobre las enzimas resulta de los cambios en el estroma originados por el funcionamiento del aparato fotosintético (Buchanan, 1980). Los estudios de activación enzimática por luz se efectuaron subsecuentemente "in vivo", en cloroplastos aislados e "in vitro".

1.5.1.1. Estudios "in vivo" y con cloroplastos aislados

La primera evidencia de activación enzimática por luz provino del laboratorio de los Ziegler (Ziegler y Ziegler, 1965). Ellos observaron que una breve iluminación de 20 min sobre hojas de habas, aumentaba cinco veces, respecto del control en oscuridad, la actividad de la NADP-Gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa, lo cual fue luego corroborado en algas y otras plantas C₃ (Steiger et al, 1971; Ziegler y Ziegler, 1966; Ziegler et al, 1965). En un principio, se pensó que la activación luminica era debida al aumento en la síntesis de enzimas provocada por los altos niveles de ATP y NADPH generados en la luz. Sin embargo, posteriores estudios utilizando inhibidores de la síntesis de proteínas demostraron que la NADP-GAPD preexistente era activada por la luz en estas condiciones (Müller et al, 1969; Ziegler et al, 1969).

Utilizando técnicas similares, se demostró que otras enzimas de la fotosíntesis son también activadas por la luz: En plantas C₄, la Piruvato Pi diquinasa y la Fosfoenolpiruvato carboxilasa (Slack, 1968); en plantas C₃ y C₄, la NADP-Malato deshidrogenasa (NADP-MDH) (Johnson y Hatch, 1970; Johnson, 1971); y en varios organismos, desde

bacterias hasta plantas superiores, la RuBisCO (Wildner y Criddle, 1969).

Paralelamente, Bassham y colaboradores, cuantificando los intermediarios fotosintéticos durante periodos de transición oscuridad-luz en el alga Chlorella, detectaron cambios en la concentración de los mismos que se deberían a un aumento de la actividad de ciertas enzimas (FBPasa, SBPasa, RuBisCO, NADP-GAPD y PrK) (Pelroy et al, 1976; Bassham, 1971; Bassham y Jensen, 1967). Análisis similares indicaron que la activación lumínica de las enzimas (la PRK, la FBPasa y la SBPasa) se extendía a la cianobacteria Aphanocapsa (Pelroy et al, 1976). Parte del trabajo de esta tesis consistió en el estudio de la FBPasa de la cianobacteria Anabaena sp la cual, como se verá en la sección 3.3.1., presentó activación por luz "in vivo".

Además, tanto "in vivo" como en cloroplastos aislados, se observó una aceleración del proceso fotosintético cuando, luego de un periodo de oscuridad se iluminó intensamente y se midió el desprendimiento de O₂ y la fijación de CO₂. Dicha inducción fue explicada en términos de activación enzimática y de formación de intermediarios del ciclo (Gibbs, 1971; Walker, 1973; Walker y Crofts, 1970).

1.5.1.2. Estudios con sistemas enzimáticos:

Dada la ausencia de un efecto directo de la luz sobre las enzimas y el hecho de que el espectro de activación fuera similar al de la fotosíntesis, se concluyó en que el sistema fotosintético de transporte de electrones mediaba en las activaciones de las enzimas (Kelly, Latzko y Gibbs, 1976; Walker, 1976; Montagnoli, 1977; Hug et al, 1980).

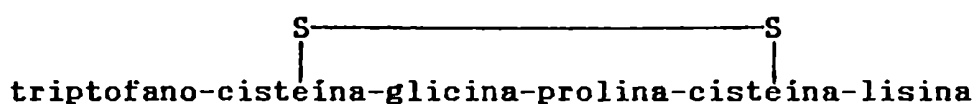
Durante la transición oscuridad-luz diversos cambios se producen en el estroma del cloroplasto. Los estudios "in vitro" con enzimas purificadas se orientaron a analizar el efecto que sobre la activación enzimática tienen aquellos componentes estromáticos cuya concentración es modificada por la luz (Walker, 1976; Montagnoli, 1977; Hug et al, 1980; Anderson, 1979; Bassham, 1979; Hatch y Slack, 1970; Latzko y Kelly, 1982).

1.5.1.2.1. Mecanismos mediados por reducción:

Existen proteínas regulatorias que juegan un rol importante en la activación de ciertas enzimas del cloroplasto. Dada su capacidad de ser reducidas en presencia de luz, dichas proteínas actúan relacionando las enzimas claves con reductores generados fotoquímicamente. La base experimental de la presencia de tales proteínas surgió en el laboratorio de Bob Buchanan hace más de 20 años (Buchanan, 1980).

En experimentos de modulación de la actividad de la FBPasa se observó que su activación por luz dependía de

la reducción de la Ferredoxina por el sistema de transporte electrónico. Luego se vió que la Ferredoxina reducida no actuaba directamente sino a través de un factor proteico. En presencia de un ditiol, el DTT, ni el sistema de transporte electrónico ni la Ferredoxina reducida eran requeridas para la activación, pero sí lo era el factor proteico. Posteriormente se estableció que el factor proteico estaba formado por dos componentes que se denominaron proteínas reguladoras de la asimilación a y b (ARPa y ARPb) (Wolosiuk y Buchanan, 1976; Buchanan et al, 1971 y 1979; Buchanan y Wolosiuk, 1976; Schürmann et al, 1976; De La Torre et al, 1979). Finalmente, Wolosiuk y Buchanan identificaron dichas componentes proteicas como Tiorredoxina y Ferredoxina-tiorredoxina reductasa. La Tiorredoxina es una proteína transportadora de hidrógenos de bajo peso molecular (12.000-15.000). Se encuentra en todos los organismos, heterótrofos o autótrofos, y el centro activo, exceptuando el caso del fago T4, es el mismo en todos los casos:



Las funciones que hasta ese momento se le conocían a la Tiorredoxina eran las de participar en: a) la biosíntesis de desoxirribonucleótidos, y b) la reducción de sulfóxido y sulfato en levaduras (Black et al, 1960; Asahi et al, 1961). La reducción de la Tiorredoxina, en un proceso mediado por el NADPH y la NADP-tiorredoxina reductasa (Holmgren et al, 1965), causa la reducción del puente

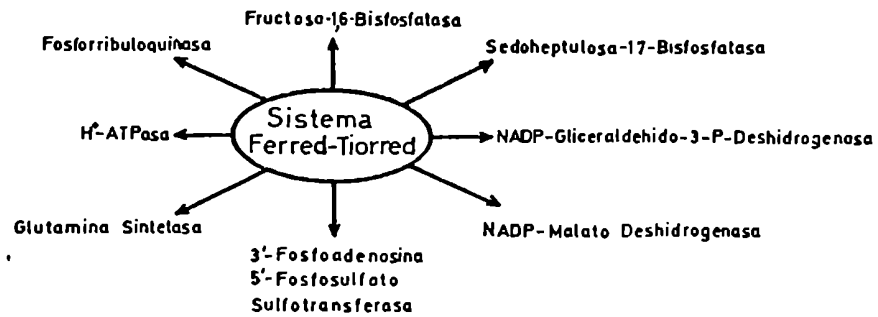
disulfuro generando 2 grupos SH- en el sitio activo (Laurent et al, 1964; Holmgren et al, 1965; Holmgren, 1981).

En los cloroplastos, la cesión de electrones del Fotosistema I a la Ferredoxina conduce a que esta sulfoferroproteína reduzca a la Tiorredoxina en presencia de la Ferredoxina-tiorredoxina reductasa. Una vez reducida, la Tiorredoxina interactúa con varias enzimas cloroplásticas, estimulando su actividad específica como se esquematiza en la figura J.

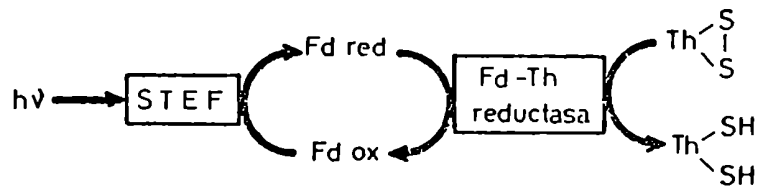
En el ciclo de Benson-Calvin son activadas por este mecanismo: la FBPasa, la SBPasa, la NADP-GAPD y la Ribulosa-5-fosfato quinasa (Ru5P-quinasa) (Schürmann y Wolosiuk, 1978; Breazeale et al, 1978; Wolosiuk y Buchanan, 1978; Wolosiuk y Schürmann, 1978). Además, resultan moduladas la malato deshidrogenasa y la fenilalanina-amonioliasa (Wolosiuk et al, 1977; Jacquot et al, 1976; Jacquot et al, 1978; Nishizawa et al, 1979).

Posteriormente, se encontraron varias formas de Tiorredoxina. En el cloroplasto existen dos tipos, la f y la m. y, aparte, hay dos en el citoplasma. La Tiorredoxina m es más efectiva en la activación de la NADP-Malato deshidrogenasa (Wolosiuk et al, 1977), en tanto que la -f lo es con otras enzimas del ciclo (FBPasa, SBPasa, NADP-GAPD, Ru5P-quinasa) (Buchanan et al, 1979). En cuanto a las Tiorredoxinas citoplasmáticas, todavía no se ha podido determinar ni su función ni su mecanismo de reducción "in vivo". La tiorredoxina de cloroplastos, reducida por DTT, también activó dos enzimas de la cianobacteria Synechococcus: la FBPasa y la 2-Fosfoadenosina 5'-

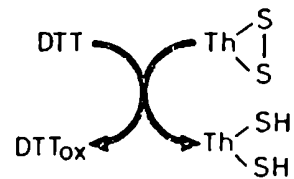
Figura J: ESQUEMA DE LA FOTOACTIVACION ENZIMATICA



Reducción Fotoquímica de la Tiorredoxina



Reducción Química de la Tiorredoxina



STEF: Sistema de transporte de electrones fotosintético
 Fd: Ferredoxina
 Th: Tiorredoxina

Fosfosulfato sulfotransferasa (Schmidt, 1979; Schmidt y Christen, 1978; Wagner et al, 1978).

En la bacteria purpúrea Rhodopseudomonas sphaeroides, hay una tiorredoxina que, reducida por el NADPH, está relacionada con la activación de la δ -aminolevulínico sintetasa, una enzima clave en la biosíntesis de porfirinas. En experimentos complementarios se observó que esta enzima puede ser activada por tiorredoxina reducida por DTT (Clement-Metral, 1979).

Actualmente, no solo se conoce a la tiorredoxina por su rol en la regulación enzimática en cloroplastos, a través de la Ferredoxina-tiorredoxina reductasa, sino también como promotora de la actividad DNA polimerasa de la proteína 5 del fago T7 (Tabor et al, 1986) y de la síntesis de fagos filamentosos (Model y Russel, 1986; Russel y Model, 1986). Es de remarcar que, en ambos casos, la Tiorredoxina no mediaría en ningún proceso de reducción. Este hecho indicaría que la Tiorredoxina presentaría también la capacidad de modificar a otras proteínas (enzimas) a través de interacciones en las que no participaría como agente redox. En tal sentido, en la presente tesis se muestran datos que sugieren una interacción estructural entre la Tiorredoxina y la FBPasa de los cloroplastos (sección 3.1.2.).

Dentro de los mecanismos dependientes de reducción para la activación de las enzimas del ciclo de Benson-Calvin, Anderson y Avron (1976) propusieron una vía alternativa según la cual factores unidos a la membrana son los responsables de dicha activación. Estos reductores, denominados LEM (Light Effect Mediators), son compuestos que

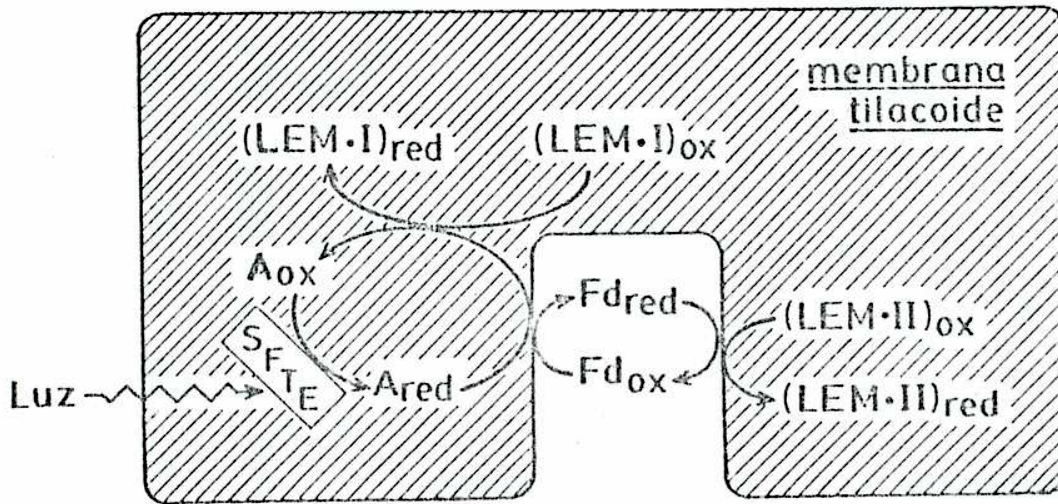
contienen cist(e)inas y se encuentran oxidados (disulfuros) en la oscuridad y reducidos (sulfhidrilos) en la luz. La reducción fotoquímica se produce en el lado oxidante del Fotosistema I, a través del transporte fotosintético de electrones. Estudios realizados utilizando inhibidores del transporte de electrones sugirieron la existencia de dos tipos de LEM, uno anterior y otro posterior al sitio de Ferredoxina (Anderson y Avron, 1976; Anderson et al, 1978) como se muestra en la Figura K.

Las enzimas modulables por el sistema LEM I son la Ru5P quinasa, la NADP-GAPD, la Malato deshidrogenasa y la Glucosa-6-P deshidrogenasa, en tanto que la FBPasa y la SBPasa lo son por el LEM II (Anderson, 1974; Anderson et al, 1978; Ben-Bassat y Anderson, 1979; Srivastava y Anderson, 1983).

La diferencia entre los sistemas Ferredoxina-Tiorredoxina y LEM I, es la presencia de un factor soluble en el primero de ellos. Sin embargo, Ashton y Anderson presentaron evidencias sobre la participación de un compuesto soluble en la activación por luz de la Malato deshidrogenasa (Ashton y Anderson, 1979). Más aun, en 1987 el mismo laboratorio presentó evidencias que indican que el compuesto soluble hallado es un complejo formado por Tiorredoxina, Ferredoxina y Ferredoxina-Tiorredoxina reductasa (Ford et al, 1987). Por lo tanto, ambos sistemas constituirían un mismo mecanismo, y la diferencia fundamental entre ambos podría ser atribuida a razones experimentales. En efecto, se ha reportado que, según sean las condiciones de ruptura de cloroplastos y de lavado de sus membranas, ciertas proteínas pueden aparecer asociadas o

no, entre sí o a la porción membranosa (Latzko y Fischer, 1979; Ben-Bassat y Anderson, 1979; Scheibe y Beck, 1979).

Figura K: FOTOACTIVACION ENZIMATICA POR SISTEMA LEM



SFTE: Sistema fotosintético de transporte de electrones
 Fd: Ferredoxina

1.5.1.2.2. Mecanismos mediados por efectores:

El almidón, las triosas-fosfato y el glicolato (intermediario en el ciclo de la fotorrespiración) constituyen los productos finales de la asimilación del CO₂ en los cloroplastos. "In vivo", el fosfato inorgánico (Pi) externo regula parcialmente la formación de dichos productos (Cockburn et al, 1967). El Pi pasa a través de la membrana cloroplástica mediante un translocador que intercambia Pi exógeno con metabolitos del ciclo de Benson-Calvin. El Pi, el GAP, la DHAP y el PGA son transportados a alta velocidad, y con alta afinidad, por este translocador. En ausencia de Pi externo, la velocidad de fotosíntesis es baja. Al aumentar la concentración de Pi en el medio se incrementa la velocidad de asimilación del CO₂ hasta un punto en que vuelve a declinar. La inhibición por altas concentraciones de Pi se origina en una disminución de la concentración estromática de intermediarios provocada por la exportación de los mismos a través del translocador (Heldt y Rapley, 1970; Werdan y Heldt, 1972).

El concepto de que efectores mediarían en la modulación de las enzimas por la luz provino de los experimentos del grupo de Ziegler con la GAPD. En extractos crudos de cloroplastos se observó que la actividad dependiente de NADP era estimulada por ATP y NADPH, a concentraciones similares a las que se alcanzan en el cloroplasto por acción de la luz (Ziegler y Ziegler, 1965; Müller, 1970; Müller et al, 1969; Heber y Santarius, 1960).

Las preparaciones de GAPD obtenidas de cloroplastos de espinaca presentan varias formas enzimáticas, de las cuales solo una es susceptible a los metabolitos. Esta forma, denominada regulatoria, es con la cual se llevaron a cabo los estudios con moduladores (McGowan y Gibbs, 1974; Pupillo y Faggiani, 1979; Schülman y Gibbs, 1968; Yonuschot et al, 1970; Wolosiuk y Buchanan, 1976). Cuando con dicha forma se ensaya la reducción del NAD (metabolito no fotosintético), no hay estimulación por ATP y NADPH (Pupillo y Giuliani-Piccari, 1973 y 1975). Sin embargo, en el análisis de la actividad asociada a la reducción del NADP se observó que ATP y NADPH eran activadores y que la presencia de Pi aumentaba la afinidad por dichos efectores. Bajo estas condiciones, las concentraciones activadoras de los moduladores son las fisiológicas. Es conocido que los moduladores mencionados provocan un cambio en la estructura cuaternaria de la enzima (disociación). Sin embargo, este es un cambio lento (6 horas) respecto del que se produce sobre la actividad enzimática por moduladores o por reducción (3 min) (Pupillo y Giuliani-Piccari, 1975; Wolosiuk y Buchanan, 1976). De manera que, "a priori", no se puede saber si la disociación o el cambio conformacional que precede a la misma son los causantes de la activación de la enzima "in vivo".

Otra de las enzimas claves del ciclo, la RuBisCO, también resulta activada por ATP y NADPH (Buchanan y Schürmann, 1973; Chu y Bassham, 1974 y 1975; Lenzian, 1978). Además, puede ser activada por intermediarios del ciclo de Benson-Calvin y por el 6-Fosfogluconato, un intermediario del ciclo oxidativo de las pentosas-fosfato

(Buchanan y Schürmann, 1972, 1973 y 1973 "bis"). Posteriormente a estos trabajos se encontró que la actividad de la RuBisCO era modulada por su sustrato (CO_2), a concentraciones fisiológicas, y por su cofactor (Mg^{+2}) (Lorimer et al, 1976; Walker, 1976). La contribución de todos los efectores en el control "in vivo" de la RuBisCO todavía no es clara. Sin embargo, podría ser que, bajo condiciones fisiológicas, los efectores y los cambios en la concentración de los iones que se producen en la transición oscuridad/luz, actuaran concertadamente en la regulación de esta enzima (Bahr y Jensen, 1978; Hatch y Jensen, 1979).

La FBPasa, otra de las enzimas clave del ciclo de Benson-Calvin, es modulada por su sustrato (FBP) (Chehebar y Wolosiuk, 1980). En este caso, el peso molecular no es modificado bajo condiciones de activación; además, la enzima se vuelve menos sensible a la inhibición por reactivos a grupos -SH y al ataque por tripsina. Como se mencionara anteriormente, esta enzima es activada por tiorredoxina reducida. Cuando se analizaron los efectos de ambos moduladores en conjunto, se observó que la actividad de la FBPasa aumentaba (Wolosiuk et al, 1980); más aun, la incorporación de Ca^{+2} potenció en forma sinérgica la capacidad catalítica (Hertig y Wolosiuk, 1983). Estos datos corroboran la hipótesis de que serían varios los cambios inducidos por la luz que operan conjuntamente en la activación de las enzimas.

Fuera del ciclo de Benson-Calvin, pero en relación con la fotosíntesis, hay otra enzima del cloroplasto que es modulada por la luz a través de efectores: la ADP-glucosa pirofosforilasa. Esta enzima, que participa en la síntesis

del almidón, resulta activada por PGA e inhibida por Pi (Ghosh y Preiss, 1966; Preiss, Ghosh y Wittkap, 1967; Okita et al, 1979). De manera que cuando la relación PGA/Pi es alta (luz) se favorece la síntesis de almidón (Preiss, Ghosh y Wittkap, 1967; Okita et al, 1979; Heldt et al, 1977). Trabajos posteriores confirmaron estas conclusiones y, además, mostraron que la actividad podía ser estimulada por ATP y por reducción a través del ditiotreitól (DTT) (Kaiser y Bassham, 1979 y 1979 "bis").

1.5.1.2.3. Mecanismos mediados por iones:

En 1973 Heldt y colaboradores observaron que la iluminación de los cloroplastos produce una alcalinización en el estroma. El pH, que en oscuridad es de 7.3, aumenta a 8-8.5 en la luz (Heldt et al, 1973; Werdan et al, 1975). Como ya se describió, durante la iluminación el transporte de electrones induce el movimiento de protones desde el estroma hacia el espacio intratilacoidal, a consecuencia del cual se produce un gradiente de pH. El gradiente de pH genera la fuerza protón-motriz inductora de la fotofosforilación, afecta directamente a la velocidad de asimilación de CO₂ por el ciclo de Benson-Calvin, modifica la utilización de Pi exógeno durante la fijación de CO₂ y, por un mecanismo antiporter, provoca la movilización, desde el espacio intratilacoidal hacia el estroma, de iones Mg²⁺.

En trabajos previos, se había observado que la actividad de ciertas enzimas regulatorias de los cloroplastos era sumamente dependiente de las condiciones de pH y Mg²⁺ en el medio. Estos estudios revelaron

requerimientos de Mg^{2+} y de pH alcalino y, además, se vió que a valores críticos, pequeñas variaciones en el pH o en la concentración de Mg^{2+} provocaban grandes cambios en la actividad enzimática (Hurwitz et al, 1956; Weissbach et al, 1956; Racker, 1957; Racker y Schroeder, 1958). Más tarde, estas propiedades fueron confirmadas, con preparaciones más puras, en la FBPasa (Zimmerman et al, 1976; Buchanan et al, 1971), en la RuBisCO (Paulsen y Lane, 1966), en la PRK (Lavergne y Bismuth, 1973) y en la SBPasa (Breazeale et al, 1978).

Se han presentado evidencias de que los efectos del pH y la concentración de Mg^{2+} , sobre las enzimas del cloroplasto, están interrelacionadas y que la variación de uno de ellos modifica el requerimiento de la enzima por el otro. En este sentido, se vió que concentraciones crecientes de Mg^{2+} disminuyen el pH óptimo en preparaciones de FBPasa (Preiss, Biggs y Greenberg, 1967; Baier y Latzko, 1975; El-Badry, 1974) y RuBisCO (Sugiyama et al, 1968). Trabajos recientes (Kreimer et al, 1988) corroboraron, en cloroplastos aislados, el efecto del Ca^{2+} en la activación enzimática dependiente de la luz en la FBPasa. Estos resultados son consistentes con la idea de que flujos de H^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} inducidos por la luz determinan la regulación enzimática durante la asimilación fotosintética del CO_2 .

1.5.1.2.4. Activación enzimática por modificaciones hidrofóbicas

Aun no se sabe qué rol juega el microambiente en la regulación de la actividad enzimática. Las enzimas estromáticas, entre ellas las que forman parte del ciclo de Benson-Calvin, han sido definidas operacionalmente como "enzimas solubles" dado que permanecen en la fracción sobrenadante después de una centrifugación a 100.000 x g, cuando se realiza una ruptura osmótica de cloroplastos. Sin embargo, la posibilidad de asociaciones entre enzimas estromáticas y membranas de cloroplastos u otras proteínas, mediante interacciones no covalentes y reversibles, sugiere que su microambiente natural podría ser menos polar que el del H₂O (Masters, 1981).

Estudios realizados en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas mostraron que las constantes de activación de los efectores de la FBPasa eran menores si la preincubación de la enzima se efectuaba en presencia de solventes orgánicos (Corley y Wolosiuk, 1985). Otras enzimas, la NADP-GAPD, PRK y NADP-malato deshidrogenasa, también son activadas por cosolventes (Wolosiuk et al, 1985; Crawford et al, 1986). Más aun, a concentraciones del detergente CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) menores que la concentración micelar crítica, la NADP-GAPD presentó una fuerte activación, indicando que la enzima reaccionaría con la forma monomérica del mismo (Wolosiuk et al, 1987). En la presente tesis se discuten experimentos de activaciones enzimáticas de la FBPasa y la NADP-GAPD mediadas por aniones

caotrópicos. Los datos sugieren que la modificación de las interacciones intramoleculares hidrofóbicas de una enzima es crucial en la determinación de su actividad (secciones 3.1.1. y 3.2.1.).

1.5.1.3. Interacción de los mecanismos moduladores mediados por la luz

Se ha visto que las enzimas del ciclo de Benson-Calvin son inactivas en la oscuridad y, progresivamente, llegan a su máximo de actividad en la luz. Los estudios tienden a determinar en qué medida la conversión de una enzima de un estado inactivo a uno activo coincide con el tiempo necesario para alcanzar la velocidad máxima en la asimilación del CO₂ en la luz. También se pretende dilucidar cuales son los factores o mecanismos que modulan estas enzimas regulatorias.

Para llevar a cabo estos estudios, se definen principalmente dos diseños experimentales:

- 1) Separación de la reacción enzimática en dos etapas: una fase de modificación y otra de catálisis. Esto se debe a que las enzimas regulatorias del ciclo de Benson-Calvin, a diferencia de otras, presentan "comportamiento histerético". O sea, la velocidad de conversión de una forma inactiva a una activa es más lenta que la velocidad de catálisis. De manera que estas enzimas, por preincubación con un activador, eliminan la fase de latencia observada en el ensayo de actividad catalítica. Frieden denominó a estas proteínas "enzimas histeréticas" (Frieden, 1970 y 1971).

2) Tratamiento de la actividad enzimática como enzima regulatoria alostérica clásica. El modulador se une a un sitio separado físicamente del involucrado en la catálisis, regulando la actividad mediante un aumento o una disminución de la velocidad máxima y/o de las constantes de afinidad.

Estos estudios se llevaron a cabo trabajando con cloroplastos enteros, con extractos o con enzimas purificadas. La primera evidencia experimental "in vitro" sobre la interacción de mecanismos reguladores mediados por luz, surgió cuando la FBPasa fue activada conjuntamente por el sistema Ferredoxina-tiorredoxina y FBP (Wolosiuk, Perelmuter y Chehebar, 1980). En un estudio posterior, el agregado de un metal bivalente (Ca^{2+}) al medio de preincubación aumentó la afinidad de la enzima por el FBP (Hertig y Wolosiuk, 1983) y, finalmente, se estableció que la disminución de la polaridad del medio en la fase de modificación contribuía a una mayor estimulación (Corley y Wolosiuk, 1985). Para realizar estos estudios, se preincubó a la FBPasa con sus moduladores en ausencia de Mg^{2+} , el cual es requerido como cofactor enzimático. El incremento en la velocidad de catálisis de la enzima previamente activada es más pronunciado cuando el ensayo de actividad se lleva a cabo a concentración de Mg^{2+} y pH considerados fisiológicos en el cloroplasto iluminado. La separación del ensayo enzimático en dos etapas fue importante en la FBPasa dado que permitió establecer el efecto dual del Ca^{2+} . Efectivamente, mientras que en la fase de modificación es un activador, en la fase de catálisis es un potente inhibidor. Esta dualidad sugiere que "in vivo" existiría una separación

espacial o temporal de las dos fases de la enzima. Resultados similares se hallaron con la SBPasa (Woodrow y Walker, 1980; Wolosiuk et al, 1985). Otro caso de dualidad se observó en el efecto de las poliaminas sobre la FBPasa; estos compuestos son inhibidores de la activación, pero no tienen efecto en la catálisis (Corley et al, 1983). En otra enzima histerética del ciclo, la NADP-GAPD, Müller observó que la actividad específica era afectada por la acción de DTT y NADPH, y por ATP y Mg^{2+} (Müller, 1970). Por otra parte, Wolosiuk y Buchanan informaron que presenta activación concertada por ATP, NADPH y Pi. Con posterioridad a ambos estudios se encontró que la actividad de esta enzima es modificada por efecto concertado de efectores y Tiorredoxina, así como también alterando la hidrofobicidad del medio (Wolosiuk et al, 1986).

Estudiando la activación de la RuBisCO, Lorimer y colaboradores, establecieron que la enzima reaccionaría primero con el CO_2 y luego, y en forma rápida, con el Mg^{2+} , formando un complejo ternario cuya actividad final es incrementada por el aumento del pH (Lorimer et al, 1976).

Por lo tanto, las evidencias presentadas indican que la luz ejercería su efecto a través de diversos mecanismos, los cuales podrían operar conjuntamente "in vivo".

1.5.2. Desactivación en la oscuridad:

Un aspecto importante de la regulación enzimática mediada por la luz, que aun no está suficientemente aclarado, es la reconversión de las enzimas a un estado

menos activo. La existencia de un mecanismo activador mediado por la luz sugiere que en la oscuridad debería ocurrir la desactivación.

En el caso de los mecanismos mediados por efectores y por iones, la situación parece clara por cuanto la oscuridad revierte los cambios inducidos por la luz en las respectivas concentraciones. Estos cambios afectan particularmente a la FBPasa, la SBPasa, la NADP-GAPD, la RuBisCO y la PRK.

Para los mecanismos de activación mediados por reducción la desactivación enzimática implica un proceso oxidativo. Wolosiuk y Buchanan propusieron que la FBPasa, la PRK y la fenilalanina amonio liasa pueden desactivarse por glutatión oxidado (GSSG) o dehidroascorbato (Schürmann y Wolosiuk, 1978; Wolosiuk y Buchanan, 1977; Wolosiuk y Buchanan, 1978 "bis"; Nishizawa et al, 1979). Ambos compuestos son sintetizados en el cloroplasto en la oscuridad (Grodén y Beck, 1979; Wolosiuk y Buchanan, 1977). Alternativamente, Walker y Leegood propusieron que el sistema Ferredoxina-tiorredoxina cataliza un proceso reversible, tanto de reducción como de oxidación de la FBPasa, dado que la enzima es inactivada por aceptores de electrones tales como el O_2 , el NO_2^- y el oxalacetato (Leegood y Walker, 1980). Por otro lado, Charles y Halliwell observaron la desactivación por H_2O_2 de la FBPasa previamente reducida por tratamiento con tioles (Charles y Halliwell, 1980).

Una vía diferente fue propuesta por Porras y Heldt, sobre la base de trabajos realizados con cloroplastos enteros: la FBPasa sería inhibida por el Ca^{2+} , ya sea

directa o indirectamente, por disminuir, mediante un mecanismo de intercambio a través de la envoltura del cloroplasto, la concentración de Mg^{2+} en el estroma (Portis y Heldt, 1976). Por su parte, Charles y Halliwell proponen que la FBPasa se desactivaría por el aumento en la concentración de H^+ y Ca^{2+} en el estroma (1980 "bis").

Para la NADP-Malato deshidrogenasa, Wolosiuk y Buchanan (Wolosiuk et al, 1977) postulan la presencia de un oxidante unido a la membrana, el cual solo sería funcional en la oscuridad.

Para la NADP-GAPD no se había encontrado hasta el momento ningún mecanismo de desactivación (Buchanan, 1980). En esta tesis se describe la presencia de un factor en las membranas de los cloroplastos capaz de desactivar la forma regulatoria de la enzima (sección 3.2.2.).

Las enzimas mencionadas presentan comportamiento histerético, tanto en los procesos de activación como en los de desactivación (Buchanan, 1980).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. PURIFICACION DE LA FBPasa DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA

Los pasos iniciales de la purificación de la FBPasa de cloroplastos de espinaca se realizaron según métodos descriptos previamente (Buchanan et al, 1971; Schürmann y Wolosiuk, 1978).

Aproximadamente 10 kg de hojas de espinaca adquirida en el mercado local fueron lavadas con agua corriente y posteriormente congeladas. El homogenato se preparó desmenuzando las hojas congeladas en buffer Tris-ClH 30 mM (pH: 7.9), conteniendo EDTA 0.1 mM, (a temperatura ambiente), en una proporción de 1 l por cada 500 gr de hojas, y homogenizándolas por 3 minutos en Waring blender. El homogenato se filtró a través de dos capas de muselina y el pH del filtrado se ajustó a 4.5 con ácido fórmico. La suspensión se centrifugó a 6.000 x g durante 10 minutos. La fracción sobrenadante se conservó para posterior purificación de tiorredoxina. El precipitado, que contenía la actividad FBPasa, se resuspendió en buffer Tris-ClH 30 mM (pH: 7.9) y EDTA 0.1 mM (1/5 del volumen del homogenato) y se ajustó el pH a 6.5 con hidróxido de amonio. La suspensión se congeló a -20°C y en este estado se pudo mantener hasta 6 meses.

Luego de descongelada, la suspensión se centrifugó a 6.000 x g durante 20 minutos, se descartó el precipitado verde y la fracción sobrenadante se sometió a un fraccionamiento salino con sulfato de amonio sólido. La fracción que precipitó entre 35% y 85% de saturación, fue

resuspendida en buffer Acetato de Na 50 mM (pH:5.5) (1/10 del volumen del sobrenadante de la fracción congelada) y posteriormente dializada en forma exhaustiva contra este mismo buffer (2 a 3 cambios).

2.1.1. Cromatografía en columna de DEAE-Celulosa

El dializado se clarificó por centrifugación a 105.000 x g durante 30 minutos. Descartado el precipitado, la fracción sobrenadante se sembró en una columna de DEAE-celulosa (2.5 cm x 15 cm), previamente equilibrada en buffer Acetato de Na 50 mM (pH:5.5), conteniendo ClNa 0.15 M. Luego de lavar la columna con el buffer de equilibrio (2 a 3 volúmenes de columna), la elución de la enzima se realizó con 10-20 volúmenes de columna de un gradiente de ClNa de 0.15 a 0.4 M en el mismo buffer. Las fracciones con actividad FBPasa, las cuales eluyeron aproximadamente con 0.3 M de ClNa, se juntaron y concentraron por ultrafiltración en equipo Amicon, utilizando una membrana Diaflo PM-30, hasta 1/20 del volumen original.

2.1.2. Cromatografía en columna de Hidroxiapatita

Dado que la electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (con SDS) de la preparación precedente reveló la presencia de varias proteínas, se introdujo, como nuevo paso de purificación, la cromatografía en columna de hidroxiapatita (Slaifstein y Wolosiuk, 1983, datos no publicados). El concentrado anterior fue dializado contra buffer Tris-ClH 30 mM (pH:7.3)

y, luego de una clarificación por ultracentrifugación a 105.000 x g durante 30 minutos, la fracción sobrenadante fue sembrada en una columna de hidroxiapatita (2 cm x 6 cm) previamente equilibrada con buffer Tris-ClH 30 mM (pH:7.3) y sulfato de amonio 200 mM. La columna fue primero lavada con buffer de equilibrio (4 volúmenes de columna), luego la FBPasa fue eluida con un gradiente lineal de 20 a 200 mM de fosfato de potasio (pH: 7.3), en buffer Tris-ClH 30 mM (pH:7.3) (20 a 30 volúmenes de columna) y, finalmente, se lavó con fosfato de potasio 500 mM (pH:7.3) (4 volúmenes de columna) en el mismo buffer. Las fracciones con actividad FBPasa, que eluyeron con 130 mM del buffer de fosfato de potasio, fueron juntadas y concentradas por ultrafiltración de la misma manera que la preparación anterior. El concentrado fue dializado contra buffer Acetato de Na 50 mM (pH:5.5) y esta fracción, que se mantiene por varios meses a -20°C sin pérdida aparente de actividad, fue sometida a un posterior paso de purificación.

2.1.3. Cromatografía en columna de QAE-Sephadex A-25

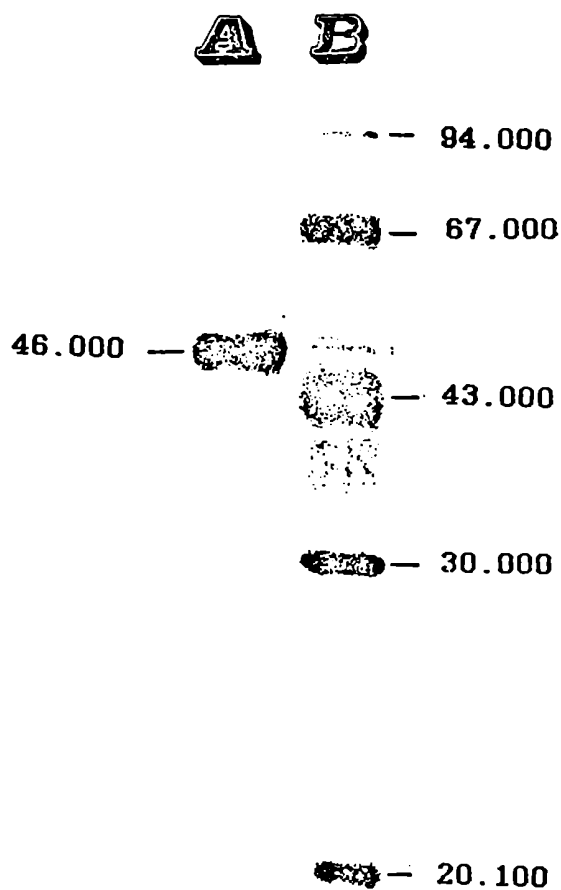
Al controlar el grado de pureza de la preparación proveniente de la cromatografía en columna de Hidroxiapatita, mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (con SDS) se observó una banda de bajo peso molecular que era importante cuantitativamente. Por ello, se realizó una cromatografía en columna de QAE-Sephadex A25 (2 cm x 7 cm) equilibrando con buffer Acetato de Na 50 mM (pH:5.5). Se sembraron 25 ml de muestra (1.8 mg/ml) y se lavó primeramente con 200 ml del

buffer de equilibrio y luego con un gradiente de 500 ml de 0 a 400 mM de ClNa en buffer. Finalmente, se hizo una elución con 100 ml de ClNa 0.8 M en buffer. Las fracciones fueron de 6.5 ml y la actividad enzimática eluyó con 150 mM de ClNa aproximadamente. Las fracciones más activas se juntaron y se concentraron por ultrafiltración como en las cromatografías anteriores. El retenido de la ultrafiltración se dializó 12 horas contra buffer Acetato de Na 50 mM (pH: 5.5) y se conservó a -20°C durante varios meses. Con esta preparación se realizaron los ensayos de modificación por agentes caotrópicos.

La homogeneidad de la muestra puede observarse en la figura 1, donde se ve que cuando se efectúa la electroforesis, en gel de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (con SDS), de la muestra proveniente de la cromatografía en QAE-Sephadex, se revela una sola banda cuyo peso molecular es de 46.000.

Figura 1: ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS DE

LA FBPasa



Las condiciones experimentales se detallan en la sección 2.15. Canal a: enzima purificada (30 μ g); Canal b: marcadores de peso molecular (ver sección 2.15.).

2.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FBPasa DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA.

La actividad FBPasa de cloroplastos de espinaca se determinó en un ensayo de una o dos etapas, de acuerdo a procedimientos previos (Hertig y Wolosiuk, 1983; Corley y Wolosiuk, 1985).

2.2.1. Ensayo en una etapa:

En el caso de las fracciones originadas en la purificación de la FBPasa, 10-50 μ l de fracción se incubaron a 23°C durante 20 minutos en una solución que contenía, en un volumen total final de 1 ml: buffer Tris-ClH (pH: 7.9) (50 μ moles), Cl_2Mg (10 μ moles), FBP (3 μ moles) y EGTA (0.1 μ mol). La reacción se detuvo por el agregado de reactivo de Chen (Chen et al, 1956), para estimar el Pi liberado.

La presencia de fosfato en las fracciones provenientes de las cromatografías en columnas de Hidroxiapatita, imposibilita el uso del procedimiento anterior. Por ello, la actividad FBPasa se determinó por un método espectrofotométrico que valora la F6P formada. La mezcla de reacción contenía 2 unidades de Glu-6-P deshidrogenasa de levadura, 5 unidades de fosfoglucosaisomerasa de levadura, y los siguientes componentes (en μ moles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 50; Cl_2Mg , 10; FBP, 3; EGTA; 0.1 y NADP, 1 (volumen total final: 1 ml). La reacción enzimática fue seguida en forma continua, por el cambio de absorbancia a 340 nm, en un espectrofotómetro Gilford 2000, con un registrador acoplado.

2.2.2. Ensayo en dos etapas:

La enzima fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de buffer Tris-ClH 0.1 M (pH: 7.9) con los modificadores que se indican en el experimento respectivo. La velocidad de hidrólisis de la FBP se midió a 23°C inyectando alicuotas de solución de enzima en la mezcla de reacción que contenía buffer Tris-ClH (pH: 7.9) (50 μ moles), FBP (0.8 μ mol), Cl₂Mg (1 μ mol) y EGTA (0.1 μ mol), en un volumen total final de 1 ml. Transcurrido el tiempo de la reacción catalítica se agregó el reactivo de Chen (Chen et al, 1956).

2.3. MARCADO DE LA FBPasa DE CLOROPLASTOS POR (1-¹⁴C)- IODOACETAMIDA Y POSTERIOR DIGESTION TRIPTICA

La FBPasa de los cloroplastos (52 μ g) fue incubada a 23°C durante 10-20 minutos en 0.1 ml de buffer Tris-ClH 0.1 M (pH: 7.9), conteniendo los modificadores apropiados. Luego, se agregó 0.1 ml de (1-¹⁴C)-Iodoacetamida 12 mM (act. sp.= 1.6 Ci/mol) y las muestras fueron nuevamente incubadas durante 60 minutos a 23°C. Tanto los modificadores de bajo peso molecular como el exceso de Iodoacetamida radioactiva fueron eliminados por diálisis contra buffer Tris-ClH 30 mM (pH:7.6), durante 12 horas, a 4°C. La proteólisis se llevó a cabo a 30°C, incubando 0.2 ml del dializado con 5 μ g de Tripsina de páncreas bovino (disuelta en H₂O a pH: 3), durante 15 minutos. Para frenar la digestión triptica se agregó 5 μ g de Inhibidor de Tripsina de soja (disuelto en buffer Tris-ClH 50 mM a pH: 7.6). Cada muestra fue posteriormente liofilizada y, finalmente, resuspendida en 50 μ l de buffer desnaturalizante para ser sometidas a

electroforesis en geles de poliacrilamida. El buffer desnaturizante y la técnica de electroforesis se detallan en la sección 2.15. de este capítulo.

2.4. PURIFICACION DE TIORREDOXINA DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA.

Los pasos iniciales de purificación de tiorredoxina se realizaron de acuerdo al método ya descrito (Wolosiuk et al, 1979).

A la fracción sobrenadante, correspondiente al fraccionamiento con ácido fórmico de un homogenato de hojas de espinaca (ver sección 2.1.), se le ajustó el pH a 7.6 con NH_4OH . El volumen de esta fracción se redujo a 1/10 del inicial mediante liofilización y, posteriormente, se calentó a 80°C durante 3 minutos. Una vez a temperatura ambiente, se lo centrifugó la fracción calentada a $20.000 \times g$, durante 20 minutos, descartándose el precipitado. La fracción sobrenadante se dializó contra buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9), durante 16 horas, luego se sembró en una columna de DEAE-celulosa, previamente equilibrada con buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9), y la fracción que eluyó de la columna (mezcla de Tiorredoxina-m y -f) con el buffer de equilibrio, fue la que se utilizó para los ensayos posteriores.

2.5. PURIFICACION DE LA NADP-GLICERALDEHIDO-3-P DESHIDROGENASA DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA.

La purificación de esta enzima se realizó de acuerdo al método descrito por Wolosiuk y Buchanan (Wolosiuk y Buchanan, 1976).

Las hojas frescas de espinaca (500 gr.) se lavaron y se mantuvieron durante 1 hora a 0°C. Luego se cortaron y se colocaron en un vaso de licuadora que contenía 1 l. de buffer Tris-ClH 0.1 M (pH: 7.9); EDTA 10 mM, β -MET 0.1% y ClNa 15 mM. Se homogeneizó durante 3 minutos a 0°C y se filtró la suspensión obtenida a través de dos capas de muselina. El residuo fue descartado y el filtrado se centrifugó a 11.000 x g durante 20 minutos. El precipitado se descartó y a la fracción sobrenadante se le agregó sulfato de amonio sólido (0.24 mg/ml), se mantuvo bajo agitación durante 15 minutos y se centrifugó, a 11.000 x g por 20 minutos. El precipitado se descartó y a la fracción sobrenadante se le agregó, nuevamente, sulfato de amonio (0.135 mg/ml), se agitó durante 20 minutos y se centrifugó a 11.000 x g durante 20 minutos. La fracción sobrenadante de esta segunda precipitación se deshechó y el precipitado se resuspendió en 120 ml de buffer Tris-ClH 0.1 M (pH: 7.9), EDTA 10 mM y β -MET 0.01%. Al resuspendido se le agregó un volumen equivalente de acetona a -15°C y se centrifugó a 37.000 x g durante 5 minutos, a -15°C. Se descartó la fracción sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 ml de buffer Tris-ClH 50 M (pH: 7.9), EDTA 1 mM y β -MET 0.1%, se lo mantuvo bajo agitación durante 15 minutos y se centrifugó a 37.000 x g por 10 minutos. El precipitado

obtenido mediante esta centrifugación fue descartado y la fracción sobrenadante (90 ml) se sembró en una columna de DEAE-celulosa (2 x 10 cm) equilibrada con el buffer anterior. A las fracciones con máxima concentración de proteínas, eluidas con el lavado de la columna, se las juntó y se les agregó sulfato de amonio sólido (0.5 mg/ml). Se agitó durante 15 minutos y se centrifugó a 30.000 x g por 15 minutos. La fracción sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 3-5 ml de buffer Tris-ClH 0.1 M (pH: 7.9, EDTA 10 mM y β -MET 0.01%). La suspensión se centrifugó a 100.000 x g por 30 minutos, y se descartó el precipitado. La fracción sobrenadante se sembró en una columna de Biogel A 1.5 m (2 x 70 cm) que se eluyó con el buffer anterior. Las fracciones con actividad de NAD-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa se juntaron y concentraron por ultrafiltración en un equipo Amicon mediante una membrana Diaflo PM-30. La fracción resultante, que contenía la forma regulatoria de la enzima, fue conservada hasta 10 días a 4°C.

2.6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD NADP-GLICERALDEHIDO-3-P DESHIDROGENASA.

La actividad enzimática se ensayó en dos etapas de acuerdo al método descripto (Wolosiuk y Buchanan, 1976; Wolosiuk y Hertig, 1983).

La enzima fue preincubada a 23°C durante 10 minutos en un volumen final de 0.1 ml de una solución que contenía buffer Tris-ClH (pH: 7.9) (10 μ moles), en presencia o en ausencia de los moduladores cuyo efecto se deseó

determinar. Luego, la mezcla se inyectó en una solución que contenía 5 unidades de PGA-quinasa y los siguientes componentes (en μ moles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 50; Cl_2Mg , 10; PGA, 1; ATP, 5; NAD(P)H, 0.12; en un volumen de 0.9 ml. La reacción enzimática fue seguida por el cambio de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Gilford 2000.

En los experimentos donde se ensayó la dirección oxidativa de la enzima, la mezcla de reacción contenía (en μ moles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 50; Na_2HAsO_3 , 20; EDTA, 2; gliceraldehído-3-P, 0.14 y NAD(P), 1. El volumen total fue de 1 ml.

2.7. PREPARACION DE MEMBRANAS DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA.

Los cloroplastos fueron preparados por el método descrito por Karlberer et al (Karlberer et al, 1967).

7 hojas de espinaca fresca fueron cortadas y colocadas en un vaso de licuadora que contenía una solución isotónica para obtener cloroplastos aislados (buffer Tris-ClH 30 mM a pH: 7.9, sacarosa 0.33 M y ácido ascórbico 2 mM), se homogenizó durante 15 segundos y la suspensión se filtró a través de dos capas de gasa centrifugándose el filtrado a 5.000 x g durante 60 segundos. El precipitado conteniendo la fracción de cloroplastos, se resuspendió en la solución isotónica para ser nuevamente centrifugado a 5.000 x g durante 1 minuto. El precipitado, así lavado, se resuspendió en una solución hipotónica cuya composición fue: buffer Tris-ClH 30 mM (pH: 7.9), β -MET 0.1% y ClNa 20 mM. En esta solución hipotónica los cloroplastos estallan liberando a la solución las proteínas estromáticas (solubles). Por

ello, luego de una centrifugación a 10.000 x g durante 5 minutos, se obtuvo un precipitado que estaba constituido mayoritariamente por membranas tilacoides, el cual fue resuspendido en un volumen mínimo de buffer Tris-ClH 30 mM (pH: 7.9).

2.8. CYANOBACTERIAS

2.8.1. Cultivo de la cianobacteria Anabaena sp 7119

La cepa de Anabaena sp 7119 fue cedida por el Dr. Bob B. Buchanan y pertenece a la colección de la Division of Molecular Plant Biology, Universidad de California, Berkeley (EEUU).

Las cianobacterias fueron cultivadas , en el medio descripto por Allen y Arnon (Arnon et al, 1974):

ClNa 11.7 gr/l	10 ml/l solución
SO ₄ Mg.7H ₂ O 12.4 gr/l	10 ml/l solución
Cl ₂ Ca.2H ₂ O 1.5 gr/l	10 ml/l solución
*PO ₄ HK ₂ .3H ₂ O 45.7 gr/l	10 ml/l solución
NO ₃ K 1M	20 ml/l solución
CO ₃ HNa 0.1M	5 ml/l solución
SO ₄ Fe.7H ₂ O 5.5 gr/l +	
+ EDTA 8.8 gr/l pH:3	1 ml/l solución
Solución de micronutrientes	1 ml/l solución

Composición de la solución de micronutrientes:

En 1 l de solución:

BO ₃ H ₃	2.86 gr
Cl ₂ Mn.4H ₂ O	1.81 gr
SO ₄ Zn.7H ₂ O	0.222 gr

$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079 gr
$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.26 gr
VO_3Na	0.239 gr
$\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0403 gr

*La solución de PO_4HK_2 se esterilizó aparte y se mezcló con el medio en el momento de la siembra.

Cultivos en agar fueron transferidos a 250 ml de medio y se dejaron desarrollar fototróficamente con agitación magnética bajo una atmósfera de N_2/CO_2 (98%/2%), con iluminación permanente (provista por dos tubos fluorescentes de 20 wátios cada uno, situados a 15 cm. de distancia del medio de cultivo), a 28°C. El cultivo se mantuvo en esas condiciones por 7 días, pasados los cuales se inoculó en 1 l. de medio fresco. Al cabo de otros 7 días, en que se mantuvieron las condiciones del gas, la temperatura y la iluminación, las cianobacterias fueron transferidas a 15 l. de medio fresco y se mantuvieron por otros 20 días bajo las condiciones experimentales antes descritas.

Para su mantenimiento, las cianobacterias fueron repicadas en un medio de cultivo sólido cuya composición fue de agar al 1% en el medio líquido mencionado.

2.8.2. Cosecha de las cianobacterias

Las cianobacterias fueron cosechadas a temperatura ambiente, en una centrifugadora de flujo continuo Sharples. Luego de 3 lavados con buffer Tris-ClH 20 mM (pH: 7.9) y centrifugación a 4°C, a 10.000 x g durante 10 min., el

precipitado celular, como masa húmeda, se conservó a -70°C hasta su uso.

2.8.3 Tratamiento de las cianobacterias con tolueno

A 0.6 ml de una suspensión de cianobacterias, cuya concentración de clorofila fue de 0.04 mg/ml (ver sección 2.12) se le agregaron 0.3 ml de Tolueno. Se agitó durante 3 minutos, se dejó reposar en hielo por 10 minutos y luego se retiró la fase inferior (cianobacterias) con pipeta Pasteur. Este tratamiento se efectuó inmediatamente antes de cada uno de los experimentos correspondientes.

2.8.4. Activación de la FBPasa de cianobacterias por la luz

Se cosecharon 250 ml de un cultivo de cianobacterias y se lavaron varias veces con buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9). Finalmente, se resuspendieron en un pequeño volumen de este buffer (4-6 ml).

Para realizar el ensayo, se colocó la suspensión en un vaso fermentador termostatizado con agua a 23°C . La luz se suministró desde la parte inferior del vaso con una lámpara de 100 watos. La agitación de la suspensión se efectuó con varilla de vidrio y, a los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de 0.5 ml, las cuales fueron tratadas de acuerdo a lo especificado en la sección 3.3.1. de Resultados.

2.9 PURIFICACION DE LA FBPasa DE LA CIANOBACTERIA Anabaena sp 7119.

2.9.1 Homogenización y fraccionamiento con ácido

A las cianobacterias, que habían sido conservadas a -70°C , se les adicionó 3 ml de buffer A (Tris-ClH 50 mM a pH: 7.9, EDTA 0.5 mM, DTT 2 mM) por cada litro de cultivo original. Una vez resuspendidas, las células se sometieron dos veces a 11.000 psi en una French-Press. La suspensión obtenida se centrifugó a 12.000 x g durante 20 minutos, descartándose el precipitado. El pH de la fracción sobrenadante se ajustó a 4.5 por el agregado de ácido fórmico, y se centrifugó inmediatamente a 12.000 x g durante 10 minutos, descartándose el sobrenadante.

El precipitado se resuspendió en buffer A y, mediante la adición de sulfato de amonio sólido, se realizó un fraccionamiento entre 40% y 65% de saturación. El precipitado final se resuspendió en 1/10 del volumen de homogeneización y se dializó 12 horas contra buffer A conteniendo, además, Cl_2Mg 1 mM y ClNa 15 mM.

2.9.2. Cromatografía en columna de DEAE-Celulosa

A fin de eliminar material precipitable, el dializado se centrifugó a 105.000 x g durante 30 minutos. La fracción sobrenadante resultante se sembró en una columna de DEAE-celulosa y se eluyó sucesivamente con: i) buffer (Tris-ClH 50 mM (pH:7.3), DTT 5 mM, EDTA 0.5 mM); ii) un

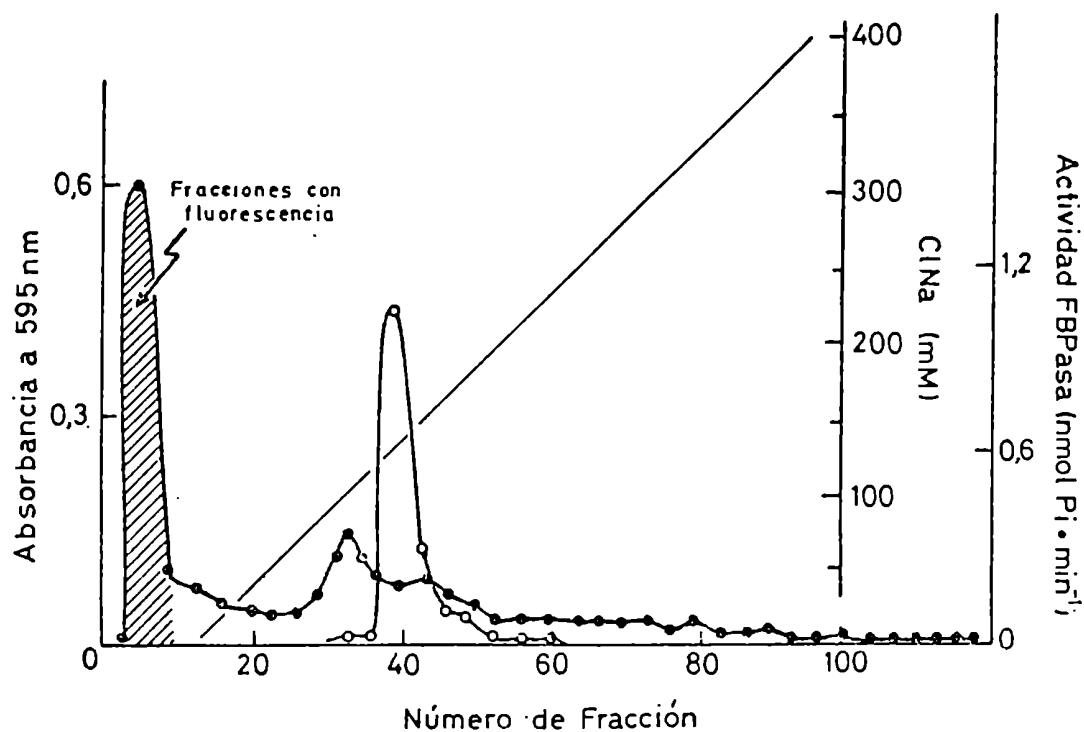
gradiente lineal de ClNa (0 a 400 mM) en buffer B; y iii) ClNa 0.8 M en buffer B.

Las fracciones con máxima actividad de FBPasa, que eluyeron con 0.23 M de ClNa aproximadamente, se juntaron y se concentraron por ultrafiltración con un equipo Amicon utilizando una membrana Diaflo PM-30. El retenido, una vez dializado por 12 horas contra buffer B, se conservó a -15°C. Con alicuotas de esta muestra, a la que se denominó preparación de DEAE, se realizaron posteriores ensayos de purificación así como estudios cinéticos y de regulación.

2.9.3. Cromatografía en columna de QAE-Sephadex A-25

Se sembraron 3 ml de la preparación de DEAE (3 mg prot./ml) en una columna de QAE-Sephadex A25 (1 x 10 cm), previamente equilibrada con buffer B conteniendo ClNa 50 mM. Luego de un lavado con 40 ml de la solución precedente, se eluyó con un gradiente lineal de 140 ml de ClNa (50 a 400 mM) en el buffer B y, finalmente, se lavó con 20 ml de ClNa 1 M en buffer B. Las fracciones con máxima actividad, que eluyeron con 130 mM de ClNa aproximadamente (Figura 2), se juntaron y se concentraron a 1/3 del volumen original por ultrafiltración, con el mismo equipo y membrana que en el caso de la preparación de DEAE. Esta muestra concentrada fue dializada durante 12 horas contra buffer Tris-ClH 50 mM (pH:7.3); 2mM DTT; 0.5 mM EDTA y posteriormente conservada a -20°C; a la enzima así obtenida se la denominó preparación de QAE.

Figura 2: CROMATOGRAFIA EN QAE-SEPHADEX DE LA FBPasa DE
Anabaena sp



—○— Actividad FBPasa

—●— Proteínas

La cromatografía se llevó a cabo como se indica en la sección 2.9.3. Se colectaron fracciones de 1.5 ml y se determinó la actividad enzimática de las mismas como se detalla en la sección 2.10. Las proteínas fueron dosadas por el método de Bradford (Bradford, 1976) y se grafican en escala arbitraria. La fluorescencia de las ficobiliproteínas se estimó por observación directa, utilizando un Chromatovue Cabinet (Ultraviolet Products Inc., New Jersey).

2.9.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución

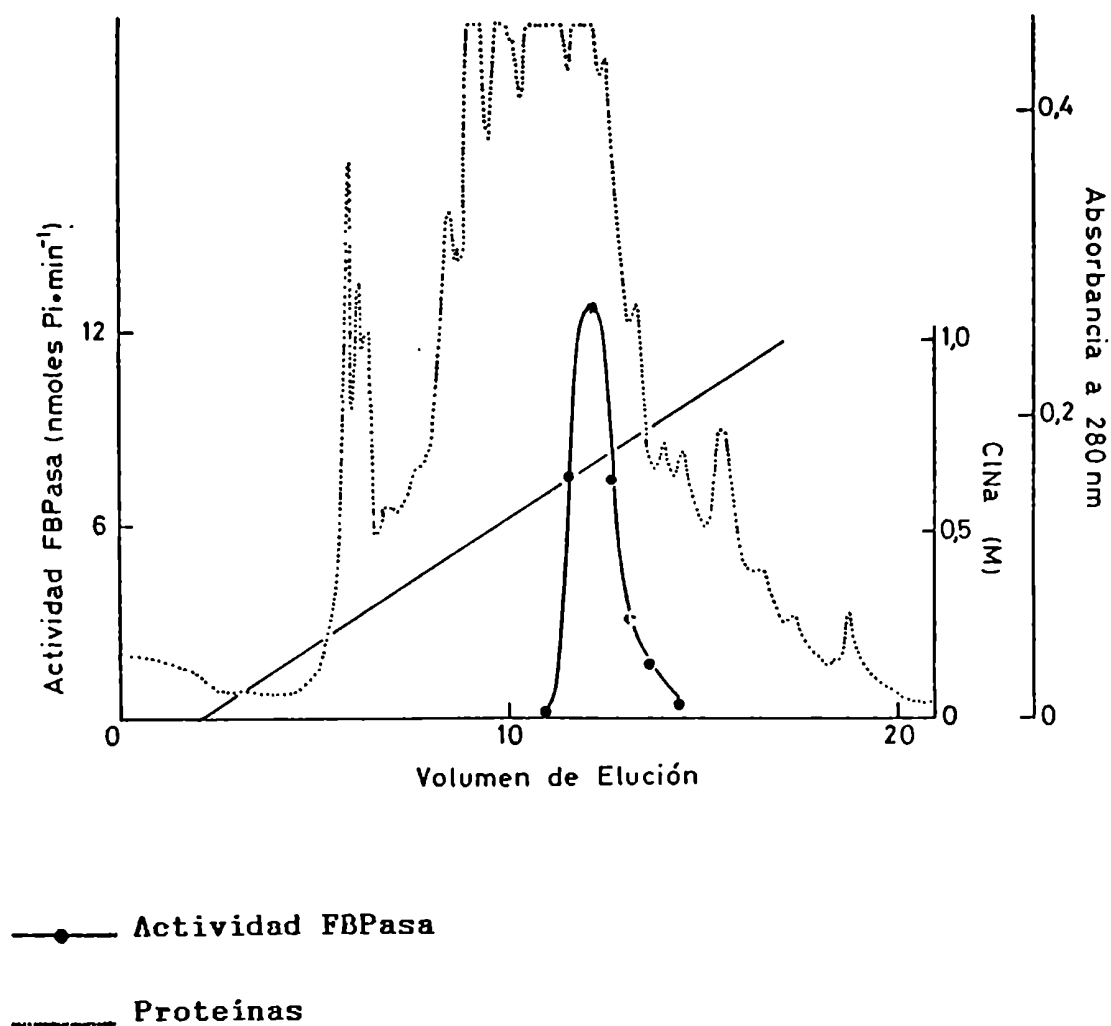
Para llevar a cabo esta cromatografía, se dializó primero la preparación de QAE (0.4 ml) contra Trietanolamina-acético 20 mM (pH:7.4) conteniendo DTT 1 mM, y el dializado fue luego filtrado por una membrana Millipore (0.45 μ m). La muestra se sembró en una columna Mono-Q HR 5/5 (0.5 x 5 cm, Pharmacia), y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) se efectuó a una presión de 800 psi y a un flujo de 3 ml/min. Se eluyó con el buffer de equilibrio, luego con un gradiente de Acetato de Sodio (0 a 1 M) en buffer y el lavado final se efectuó con Acetato de Sodio 1 M (también en buffer). Las fracciones con actividad FBPasa (Figura 3) se juntaron y se concentraron por ultrafiltración en un equipo Amicon utilizando una membrana Diaflo PM-30.

2.10. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FBPasa DE Anabaena sp 7119.

La actividad FBPasa fue determinada en 1 ml de medio que, salvo indicación, además de la fracción enzimática (20-100 μ g de proteína), contenía en micromoles: buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 100; Cl₂Mg, 10; Fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), 2.5; Ditiotreitól (DTT), 5; EGTA, 0.1.

La incubación se efectuó a 23°C, durante 20 minutos (salvo otra indicación) y el fosfato liberado se estimó de acuerdo al método de Chen et al (Chen et al, 1956).

Figura 3: CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION DE LA
FBPasa DE Anabaena sp



Las condiciones cromatográficas se detallan en la sección 2.9.4. Las proteínas fueron directamente dosadas por el detector del equipo de FPLC a 280 nm. La actividad enzimática se determinó como se indica en la sección 2.10.

2.11. PURIFICACION DE LA GLICERALDEHIDO-3-P DESHIDROGENASA DE LA CIANOBACTERIA Anabaena sp 7119

Todos los pasos fueron efectuados a 4°C. Cianobacterias provenientes de un cultivo de 8 litros (en un volumen compactado de 15 ml) fueron lavadas con 40 ml de buffer A (Tris-ClH 50 mM a pH: 7.9, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM), luego resuspendidas en 25 ml del mismo buffer y, finalmente, se lisaron sus células en una French Press sometiéndolas dos veces a 11.000 p.s.i. La suspensión se centrifugó a 30.000 x g, por 20 min; el precipitado fue descartado y la fracción sobrenadante fue fraccionada con sulfato de amonio sólido entre 30% y 90% de saturación. El precipitado final fue resuspendido en 5 ml del buffer A y posteriormente dializado contra 3 litros del mismo buffer. Este dializado fue utilizado como preparación enzimática de cianobacterias.

2.12. DETERMINACION DE CLOROFILA

La concentración de clorofila de las fracciones de membrana se determinó mediante el método de Arnon (Arnon, 1949).

2.13. DETERMINACION DE PROTEINAS

En las fracciones provenientes de las cromatografías en columna, la estimación del contenido proteico se realizó espectrofotométricamente determinando la absorbancia a 280 nm (Layne, 1957). Cuando el volumen de

dichas fracciones fue pequeño (< 0.3 ml), se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Finalmente, la concentración proteica de las muestras puras o parcialmente puras se determinó según el método de Lowry et al (Lowry et al, 1951), utilizando seroalbúmina bovina para realizar la curva de calibración.

2.14. PURIFICACION DE LOS REACTIVOS

Con el fin de extraer cationes bi- o trivalentes que fuesen posibles contaminantes de las soluciones de FBP, DTT y de sales de cationes monovalentes, las mismas fueron tratadas con resina Chelex-100, según el método descrito (Hertig y Wolosiuk, 1983; Willard et al, 1969). En algunos casos, la FBP fue posteriormente tratada con carbón activado para adsorber los productos de oxidación del azúcar así como el Pi liberado por hidrólisis.

Todos los reactivos fueron preparados con agua deionizada que fue posteriormente destilada.

2.15. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se realizaron corridas electroforéticas bajo condiciones desnaturalizantes en geles planos verticales, utilizando el método ya descrito (Laemmli, 1970) con algunas modificaciones.

La placa de gel fue discontinua, esto es, formada por dos zonas con diferente concentración de acrilamida y diferente pH. La parte inferior del gel (gel separador) midió 8 cm de altura por 1.5 mm de espesor y su composición

fue la siguiente: acrilamida 12% ó 15% (P/V), bisacrilamida 0.22% ó 0.27% (P/V), SDS 0.1 % (P/V) en buffer Tris-ClH 200 mM (pH:8.8). La polimerización se efectuó por el agregado de TEMED 0.025% (V/V) y persulfato de amonio 0.033% (P/V). La parte superior (gel concentrador) midió 2 cm de altura por 1.5 mm de espesor y contenía: acrilamida 5% (P/V), bisacrilamida 0.13% (P/V), SDS 0.1% (P/V) en buffer Tris-ClH 62 mM (pH:6.8); se polimerizó agregando TEMED 0.05% (V/V) y persulfato de amonio 0.1% (P/V).

Para ser sometidas a electroforesis, las muestras, fueron primero dializadas contra agua destilada, luego liofilizadas y finalmente, resuspendidas en 0.05-0.1 ml del buffer desnaturalizante (buffer Tris-ClH 50 mM (pH:6.8), SDS 1% [P/V], β -MET 2%, Urea 8 M y azul de bromofenol 0.002% [P/V]). En el caso de los fragmentos tripticos se suprimió el paso de diálisis. Las muestras, fueron calentadas a 100°C durante 3 minutos y luego sembradas en los respectivos canales del gel. La cantidad total de proteína sembrada por canal fue 5-80 μ g, dependiendo del grado de pureza de la fracción. La solución en los compartimentos anódico y catódico fue Tris-glicina 25 mM (pH:8.8), SDS 0.1% (P/V). Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a temperatura ambiente manteniendo la potencia constante (2-2.5 watos), durante 3-3.5 horas.

Los marcadores de peso molecular utilizados fueron: fosforilasa b de músculo de conejo (94.000), albúmina de suero bovino (67.000), albúmina de clara de huevo (43.000), anhidrasa carbónica de eritrocito bovino (30.000), inhibidor de tripsina de soja (20.100) y α -lactalbúmina de leche de vaca (14.000).

Al término de la electroforesis, los geles fueron fijados y teñidos en la siguiente solución: Azul Brillante de Coomassie 0.15% (P/V), metanol 45.5% (V/V) y ácido acético 9% (V/V). Al cabo de 12 horas se efectuaron varios lavados con la solución decolorante (metanol 20% [V/V] y ácido acético 7% [V/V]).

Con el fin de determinar la radioactividad en las proteínas (péptidos), los geles, una vez fijados y teñidos, fueron secados al vacío y expuestos a una película Kodak X-O-MAT durante 7-14 días a -70°C . El revelado de las placas radiográficas se realizó utilizando reveladores y reactivos comerciales.

2.16. ISOELECTROENFOQUE

Para determinar el punto isoeléctrico de la FBPasa de *Anabaena* sp se utilizó el método de isoelectroenfocado (Pharmacia Fine Chemicals, 1982).

Se cubrió una placa de vidrio de 22 cm x 9 cm con una capa de Sephadex G-200 Superfine, cuyo espesor fue 2 mm. El gel contenía anfólitos de origen comercial (rango de pH:3-10) en una concentración de 5% (V/V). Se preenfocó la placa a 500 V y 11 mA durante 60 minutos. Luego se retiró, con espátula, una banda de 5 mm de ancho por 7 cm de largo, a la altura de la mitad de la placa y perpendicular a la dirección de la corriente eléctrica. Esta banda de gel se homogeneizó con 0.7 ml de una preparación de DEAE (1.5 mg prot./ml) y se volvió a colocar sobre la placa, en el mismo sitio.

El isoelectroenfoque se inició a 500 V y 11 mA, fijando la potencia eléctrica constante. Duró 6 horas y la temperatura fue de 4°C.

Una vez finalizada la corrida se fraccionó el gel en 30 bandas. A cada fracción del gel se la colocó en un tubo de ensayo y se le agregó 0.5 ml de agua bidestilada, se agitó, se retiró una alícuota de 50 µl (para determinar el pH, previa dilución a 1 ml) y al resto se le adicionó 0.1 ml de buffer Tris-ClH 1M (pH:7.9) para uniformar el pH. Finalmente, el contenido de cada tubo se filtró a través de pipetas Pasteur conteniendo lana de vidrio (de manera que las partículas de Sephadex quedaran retenidas), efectuando un lavado con 0.5 ml de ClNa 50 mM. En las fracciones obtenidas la actividad FBPasa se determinó como se describe en la sección 2.10. En mediciones independientes, se estableció que el gradiente de pH formado fue lineal entre 3.6 y 8.7.

2.17 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC) DE LOS FRAGMENTOS TRIPTICOS DERIVADOS DE LA FBPasa DE CLOROPLASTOS

Los productos de la digestión triptica de la FBPasa de cloroplastos se filtraron a través de discos de Millipore (0.45 µm) y fueron luego separados por HPLC.

La columna utilizada fue una Synchronpak AX-300 de 4.6 x 100 mm. La elución se realizó con un gradiente lineal, iniciando con acetonitrilo/acetato de trietilamonio 10 mM (pH:6.05) (75:25) y aumentando la proporción relativa de acetato de trietilamonio a una velocidad de 1.2% por minuto. El flujo fue de 1 ml/min y se colectaron fracciones de 0.5

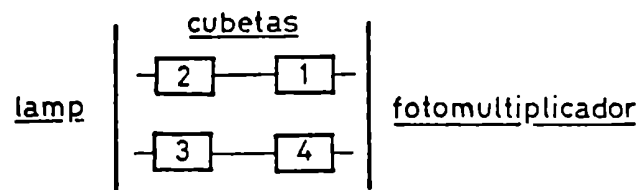
ml. La radioactividad se midió en contador de centelleo líquido.

2.18. ESPECTROSCOPIA DIFERENCIAL EN EL ULTRAVIOLETA

Los espectros se obtuvieron utilizando cuatro celdas rectangulares de cuarzo (paso de luz = 1 cm) ubicadas en el accesorio "tandem" de un espectrofotómetro de doble haz Hitachi 220-A.

Como se indica en el Esquema 1, las cubetas 1 y 2 se alinearon en el paso de luz correspondiente a la posición de referencia mientras que las cubetas 3 y 4 se alinearon en el compartimento de muestra. Las cubetas 1 y 4 contenían modificadores y perturbantes en tanto que las 2 y 3, solución de buffer Tris-ClH 0.1 M (pH: 7.9). La línea de base se corrigió electrónicamente en el intervalo de longitudes de onda en el cual se operó. En las cubetas 2 y 4 se inyectaron cantidades apropiadas de enzima, y un igual volumen de agua se agregó a las cubetas 1 y 3. El contenido de las celdas se mezcló por agitación manual y los espectros fueron registrados secuencialmente en intervalos definidos.

Esquema 1: ORDENAMIENTO DE LAS CUBETAS EN EL
ESPECTROFOTOMETRO DE DOBLE HAZ



<u>Cubeta</u>	<u>Agregados</u>	<u>Agregados</u>		
1	DEAE-SH, Fru-1,6-P ₂ , Ca ²⁺ , anión caotrópico	Corrección de la línea de base	H ₂ O	Registro del espectro
2	buffer		FBPasa	
3	buffer		H ₂ O	
4	DEAE-SH, Fru-1,6-P ₂ , Ca ²⁺ , anión caotrópico		FBPasa	

DEAE-SH: Dietilaminoetanotiol

Fru-1,6-P₂: FBP

El detalle de las concentraciones respectivas, se encuentra en la leyenda de la figura correspondiente (sección 3.1.1.3. de Resultados).

2.19. PREPARACION DE ANTISUERO DE CONEJO CONTRA LA FBPasa DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA

Se preparó antisuero de conejo contra la FBPasa de los cloroplastos de espinaca. Para ello, se efectuaron inyecciones subcutáneas de 1 mg de la proteína pura en una suspensión conteniendo el adyuvante de Freund. Se realizaron 4 inoculaciones: las dos primeras con un intervalo de 30 días y luego, cada 10 días. Las extracciones de sangre se iniciaron 10 días después de la última inyección, obteniendo 20-25 ml por vez. Se efectuó el siguiente tratamiento:

A.- La sangre extraída fue incubada durante 1-2 hs a 37°C para permitir su coagulación y luego, a 4°C durante 16 horas. Se separó, por decantación, el coágulo y el suero se centrifugó durante 5 min. a 3.000 g, separando la fracción sobrenadante.

B.- A la fracción sobrenadante se le agregó un volumen similar de una solución saturada de sulfato de amonio (pH: 7), se dejó en reposo 20 minutos y se centrifugó a 18.000 x g por 20 minutos. La fracción sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió con buffer Tris-ClH 20 mM (pH: 7.3), conteniendo ClNa 150 mM (1/2 del volumen previo al agregado del sulfato de amonio).

C.- El precipitado resuspendido fue nuevamente tratado con sulfato de amonio como se indica en el procedimiento B.

Esta fracción purificada del suero se pudo conservar por varios meses a -20°C.

2.19.1. Ensayos de reacción inmunológica

Los ensayos de reacción antígeno-anticuerpo realizados fueron los siguientes:

- 1) Inmunodifusión (Ouchterlony)
- 2) Inmunoelectrodifusión
- 3) Inmunoelectroforesis bidimensional

2.19.1.1 Inmunodifusión:

Se cubrieron portaobjetos con agar al 0.5% (P/V) evaporando hasta sequedad en estufa a 50°C. Esta primer capa sirvió de mordiente. Luego se colocó agar al 1% (P/V) en buffer Tris-ClH 20 mM (pH: 7.3), ClNa 150 mM. Una vez gelificado se efectuaron 6 orificios de 1 mm de diámetro, con pipeta Pasteur, equidistantes a un orificio central también de 1 mm de diámetro. En el orificio central se sembró el antisuero (1-2 μ l) y en los periféricos, diferentes diluciones de la solución de FBPasa a ensayar (2-3 μ l). Se permitió la difusión durante 48-72 hs. en cámara húmeda, luego se lavaron exhaustivamente las placas con una solución de ClNa 0.9% (P/V) y con agua destilada a fin de extraer el exceso de antígeno y anticuerpo. La tinción se efectuó con la misma solución colorante de Azul Brillante de Coomassie utilizada para los geles de poliacrilamida durante 1 hora. La decoloración también se llevó cabo con la solución decolorante de los geles.

En la figura 4-1 se observan las bandas de precipitación de la FBPasa de cloroplastos de espinaca y su antisuero.

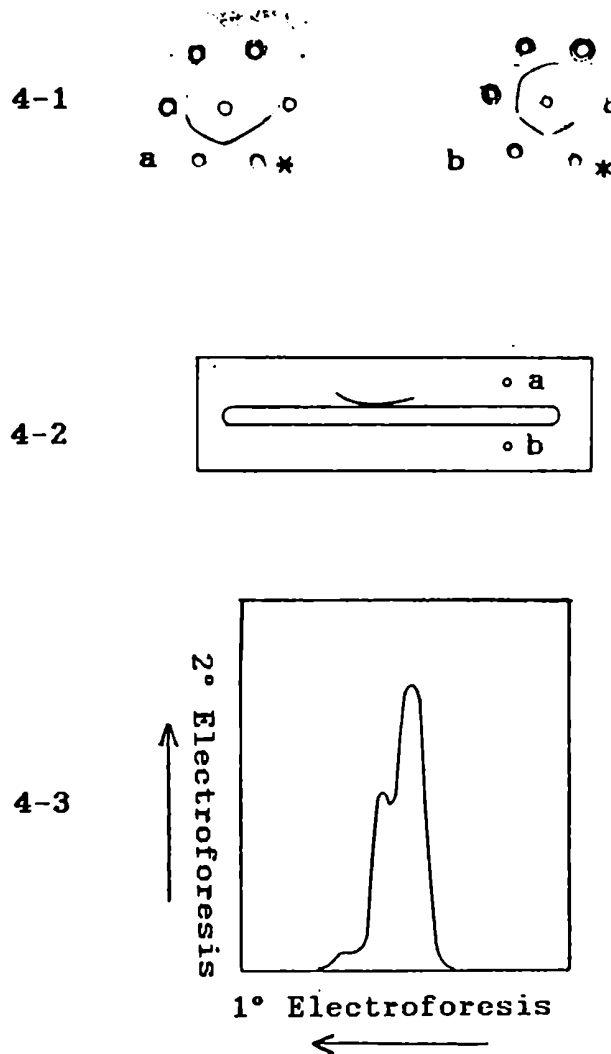
2.19.1.2. Inmunoelectrodifusión:

Se prepararon las placas con agar de la misma manera que para la inmunodifusión, salvo que el agar se disolvió en agua simplemente. Se efectuaron dos orificios cerca de uno de los bordes de la placa y, entre ambos, en el sentido longitudinal se abrió una cavidad de 2 mm de ancho y 65 mm de largo donde, luego de la electroforesis, se colocó el antisuero para la inmunodifusión. En los orificios se sembraron 5 µl de las soluciones de FBPasa de cloroplastos de espinaca (1.7 mg prot./ml) y de FBPasa de cianobacterias (2 mg prot./ml). Luego, se llevó a cabo la electroforesis a temperatura ambiente, utilizando Tris-glicina 50 mM (pH: 8.6) como buffer de corrida. La corriente aplicada fue de 5 mA por portaobjeto. Finalizada la corrida, se sembró el antisuero en la canaleta central y se dejó difundir durante 24 hs. en cámara húmeda a temperatura ambiente. El lavado y el revelado se efectuaron igual que en el caso de la inmunodifusión salvo que las placas fueron secadas en estufa, entre papeles de filtro, antes de ser teñidas. Como se observa en la figura 4-2, un arco de precipitación apareció en la zona correspondiente a la FBPasa de los cloroplastos, en tanto que no se visualiza reacción cruzada con la enzima proveniente de la cianobacteria Anabaena sp 7119.

2.19.1.3 Inmunoelectroforesis bidimensional:

Se llevó a cabo en papel de acetato de celulosa (7.5 x 6 cm) Titan-III (Helena Lab.). Para la corrida en la primera dimensión se sembraron 4-5 μ l de solución de FBPasa de cloroplastos (1.7 mg prot./ml), conteniendo Azul de Bromofenol como indicador, cerca de una de las esquinas del papel. Finalizada esta corrida, se sembraron 15-20 μ l del antisuero, homogenizándolo en toda la superficie del papel no involucrada en la primer electroforesis. Luego se volvió a colocar el papel en la cuba pero rotándolo 90° respecto de la vez anterior. Ambas corridas se realizaron a 180 voltios usando, como buffer de corrida, Tris-glicina 50 mM (pH: 8.6). Finalmente, el papel fue lavado con ClNa 0.9% (P/V) y agua destilada y teñido con solución de Azul Brillante de Coomassie. Se decoloró de la misma forma que en los experimentos anteriores. En la figura 4-3 se observan tres arcos de precipitación que podrían corresponder al tetramero, dímero y monómero de la enzima, considerando que el pH de la electroforesis favorece su disociación.

Figura 4: ENSAYOS DE LAS FBPasas DE CLOROPLASTOS Y DE
Anabaena sp 7119 CON ANTISUERO DE CONEJO



4-1: Ensayo de Outcherlony: en los orificios centrales se sembraron 5 μ l de solución de FBPasa de cloroplastos (1.7 mg/ml), diluida al 1/4 (a) y al 1/8 (b). En cada uno de los orificios periféricos se sembraron 5 μ l de solución de antisuero, en diluciones crecientes a partir del orificio marcado (*), en el sentido de las agujas del reloj (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 y 1/64).

4-2: Inmunolectroforesis: a) sitio de siembra de la FBPasa de cloroplastos y b) sitio de siembra de la FBPasa de *Anabaena sp 7119*.

4-3: Inmunolectroforesis bidimensional de la FBPasa de cloroplastos y su antisuero.

3. RESULTADOS

3.1. FBPasa DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA

3.1.1. EFECTO DE LOS ANIONES CAOTROPICOS EN LA ACTIVACION Y ACTIVIDAD DE LA FBPasa DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA

La estructura del agua es uno de los factores que determina la conformación de las proteínas globulares en solución estabilizando una dada conformación por interacción con los grupos polares. Por su parte, la contribución a la estabilidad de la proteína de los grupos apolares se origina en su interacción, termodinámicamente desfavorable, con el agua (interacción hidrofóbica) (Nemethy, 1986). Los solventes orgánicos, menos polares que el agua, particionan entre la fase acuosa y las regiones hidrofóbicas ubicadas ya sea en la superficie como en el interior de la proteína (Arakawa y Goddette, 1985). De esta manera, la incorporación de cosolventes establece un nuevo tipo de interacciones no covalentes donde la forma nativa de una molécula de proteína adquiere otra configuración tridimensional. Otra vía para perturbar la conformación de proteínas es la incorporación al medio de altas concentraciones de iones con baja densidad de carga. Estos iones, denominados caotrópicos por Hatefi y Hanstein (1969), alteran la estructura del agua favoreciendo, en consecuencia, la transferencia de regiones apolares alojadas en el interior de las proteínas hacia la fase acuosa (Von Hippel y Wong, 1964; Hanstein et al, 1971). En el caso particular de una enzima, los cambios mediados

por cosolventes o por aniones caotrópicos conducen a configuraciones cuyas propiedades cinéticas son diferentes respecto de las del estado nativo.

Las enzimas regulatorias del estroma del cloroplasto son consideradas solubles sobre una base operacional; esto es, permanecen en el sobrenadante luego de centrifugar a 100.000 x g una suspensión de cloroplastos rotos osmóticamente. Por otra parte, la actividad de varias de estas enzimas es modificada por el efecto de la luz sobre la cadena de transporte electrónico fotosintético, lo cual provoca un cambio tanto en la distribución de iones y metabolitos como en el estado redox del sistema Ferredoxina-Tiorredoxina (Buchanan et al, 1979; Anderson, 1979; Kelly y Latzko, 1982). Estudios "in vitro" revelaron que la actividad enzimática está constituida por dos procesos: la conversión de la enzima a una forma más activa y la reacción catalítica (Wolosiuk y Buchanan, 1976; Wolosiuk y Hertig, 1983). En el proceso de activación de las enzimas clave del cloroplasto (Fructosa-1,6-bisfosfatasa, Fosforribuloquinasa, NADP-Gliceraldehido-3-P-deshidrogenasa, NADP-Malato-deshidrogenasa) un cosolvente provoca la aparición de formas con alta actividad (Corley y Wolosiuk, 1985; Wolosiuk et al, 1985; Crawford et al, 1986; Wolosiuk et al, 1986; Wolosiuk, 1986). En particular, la actividad específica de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos aumenta cuando la enzima es preincubada con ditiotreitól, fructosa-1,6-bisfosfato y Ca^{2+} en presencia de un solvente orgánico. Dicha estimulación, que proviene de una reducción en el $A_{0.5}$ para fructosa-1,6-bisfosfato, se asemeja a la observada previamente con tiorredoxina-f de cloroplasto (Hertig y

Wolosiuk, 1983) y tiorredoxina-m (Schürmann et al, 1985); sin embargo, en forma diferente a la tiorredoxina, la cual es funcional en la reducción de puentes disulfuro de la proteína (Holmgren, 1981), los solventes orgánicos no están involucrados en procesos redox. Por otro lado, la estimulación de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos, y otras enzimas regulatorias del cloroplasto, por solventes orgánicos correlaciona con el carácter hidrofóbico del cosolvente (coeficiente de partición octanol/agua) (Helmer et al, 1968; Lea et al, 1971). Si se considera que la modificación de las interacciones hidrofóbicas de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos es crucial en la estimulación de la actividad específica, entonces los procedimientos (químicos o físicos) que influyen la posición relativa de regiones apolares en la enzima podrían aumentar su actividad.

Sobre la base de los efectos de los iones caotrópicos, tanto en compuestos no polares de bajo peso molecular como en proteínas (Edelhoch et al, 1976), se consideró interesante analizar su acción en las etapas que constituyen la reacción de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos: activación y catálisis. En el presente capítulo se muestra que los aniones caotrópicos estimulan la actividad específica de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos en un proceso que requiere ditiotreitól, fructosa-1,6-bisfosfato y Ca^{2+} . El ordenamiento de estos aniones, de acuerdo a la concentración requerida para la máxima estimulación de la actividad enzimática, se asemeja a la serie liotrópica de Hofmeister. Dicha serie caracteriza otros efectos en ciertas biomoléculas (Von Hippel y Wong,

1964). Por otra parte, las sales neutras inhibieron la velocidad de la hidrólisis de la fructosa-1,6-bisfosfato. Estos datos junto con resultados previos indican que la modificación de las interacciones hidrofóbicas intramoleculares contribuye en forma significativa al proceso de activación de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos (Wolosiuk, 1986).

3.1.1.1. EFECTO DE DIVERSOS ANIONES CAOTROPICOS EN LA ACTIVACION DE LA FBPasa

La actividad de la FBPasa de cloroplastos, ensayada a bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} , resulta estimulada por la preincubación de la enzima con DTT, un azúcar bisfosfato, un catión bivalente y, ya sea tiorredoxina o un solvente orgánico (Hertig y Wolosiuk, 1983; Corley y Wolosiuk, 1985). Por otro lado, la incorporación de tiorredoxina o comolvente en la mezcla de reacción para el ensayo de actividad no produce ningún efecto o disminuye, respectivamente, la velocidad de hidrólisis de la FBP. Por ello, para encarar el estudio del efecto de los aniones caotrópicos en la reacción de la FBPasa de los cloroplastos, inicialmente se los ensayó en la fase de modificación. Así, luego de preincubar la enzima con los moduladores (DTT, FBP, Ca^{2+}) en presencia de concentraciones variables de caotrópicos, se ensayó la actividad FBPasa a bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} . La figura 5 muestra que las sales de sodio estimularon a la FBPasa de cloroplastos, dependiendo dicha activación de la concentración de las mismas, e inhibieron a concentraciones

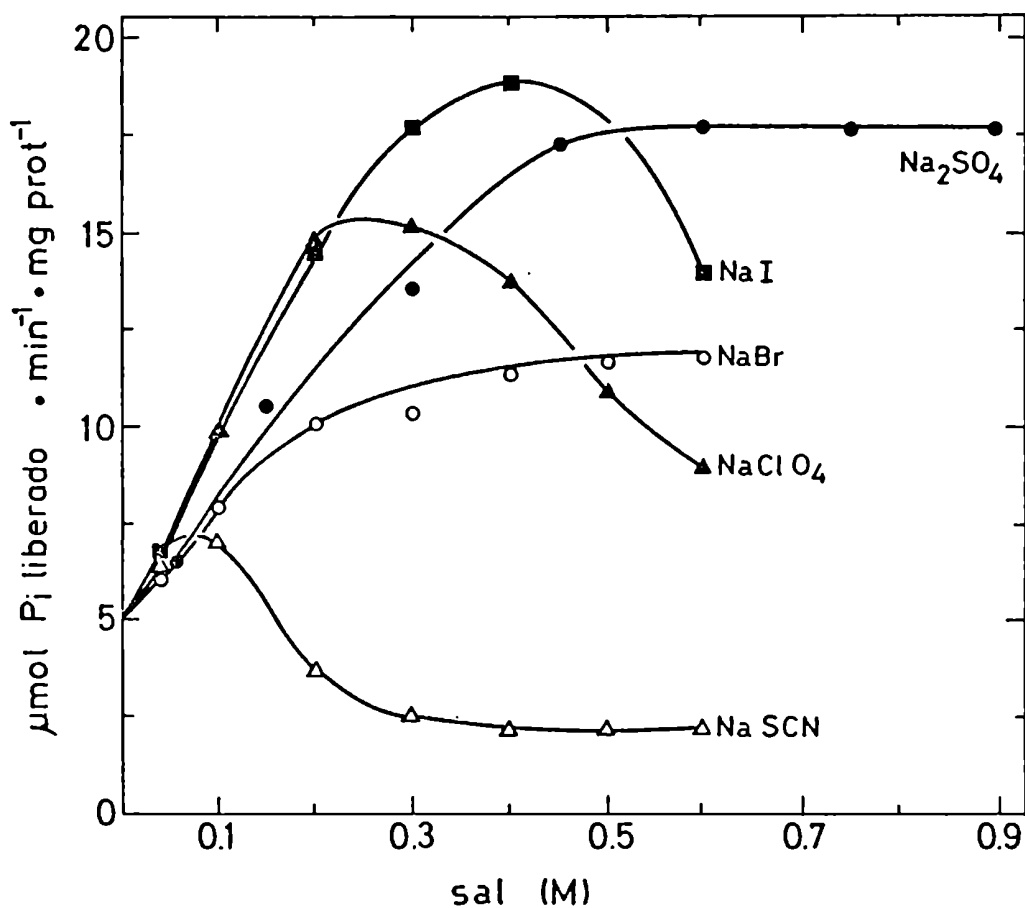
mayores que las óptimas. La actividad específica de la FBPasa de cloroplastos aumentó 1.5, 3, 4, 2.5 y 3.5 veces a 0.07 M, 0.25 M, 0.4 M, 0.5 M y 0.6 M de SCN^- , ClO_4^- , I^- , Br^- y SO_4^{2-} , respectivamente. Disponiendo las concentraciones molares para lograr la máxima estimulación enzimática se observó que el efecto de los aniones caotrópicos en el proceso de la activación enzimática sigue la serie liotrópica (Hofmeister): $\text{SCN}^- < \text{ClO}_4^- < \text{I}^- < \text{Br}^- < \text{SO}_4^{2-}$.

3.1.1.2. EFECTO DEL TRICLOROACETATO EN LA ACTIVACION Y ACTIVIDAD DE LA FBPasa

En estudios anteriores, la separación de las fases de activación y catálisis mostró que estas reacciones responden de manera diferente a tratamientos químicos o físicos (Corley y Wolosiuk, 1985; Wolosiuk, 1986; Hertig y Wolosiuk, 1983). Por ello, se realizó un ensayo comparativo del efecto de un anión caotrópico modelo (tricloroacetato de sodio) en ambas fases. El tricloroacetato de sodio fue elegido, para este y los posteriores ensayos, por producir la máxima activación, por su extrema estabilidad y por la ausencia de reacciones secundarias.

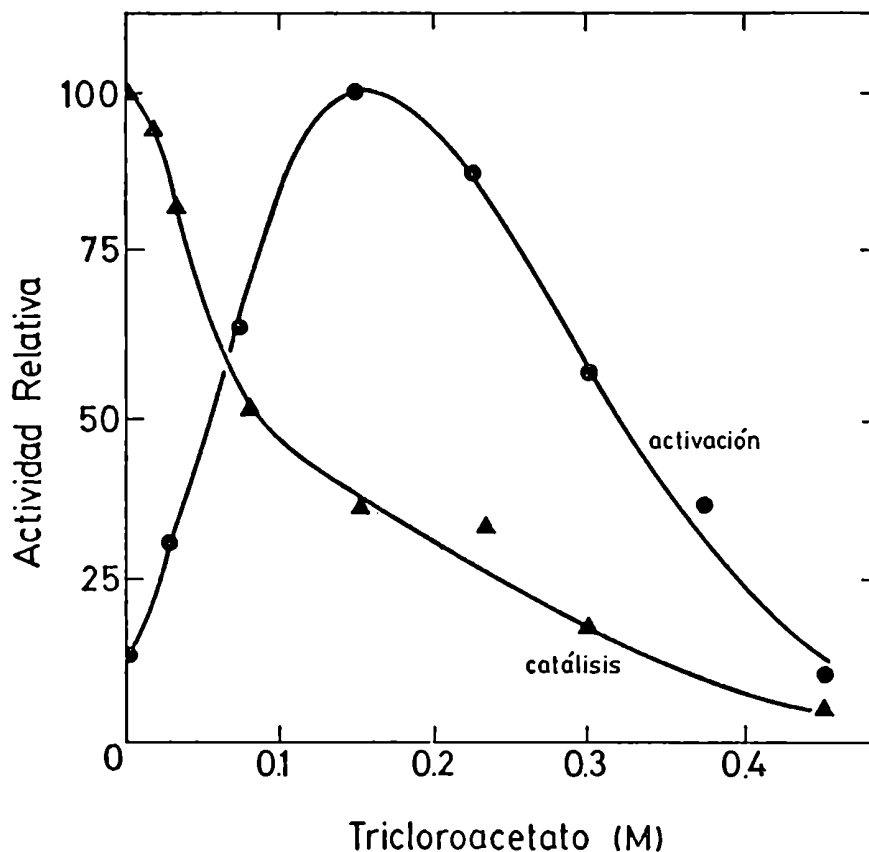
Se observa en la figura 6 que, en la fase de modificación de la enzima, una concentración de 0.15 M de tricloroacetato de sodio produjo la máxima estimulación. Sin embargo, cuando la enzima fue preincubada en presencia de DTT 5 mM, FBP 1.6 mM, Ca^{2+} 0.05 mM y tricloroacetato de sodio 0.15 M durante 10 min y luego

Figura 5: EFFECTO DE VARIOS ANIONES CAOTROPICOS EN LA ACTIVACION DE LA FBPasa



La enzima (30μg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-Cl⁻ (pH: 7.9), 10; DTT, 1; FBP, 0.4; Cl₂Ca, 0.005; y la respectiva sal de sodio, según se indica. A los 10 minutos se inyectó cada muestra en la mezcla de reacción para determinar la actividad FBPasa, como se describe en la sección 2.2.2. de materiales y métodos. Dado que una variable cantidad de sal acompaña a la muestra que se inyecta, su concentración se mantuvo constante en la fase catalítica agregando previamente las cantidades apropiadas para que la concentración final fuera 12 mM.

Figura 6: EFEECTO DEL TRICLOROACETATO EN LA ACTIVACION Y LA ACTIVIDAD DE LA FBPasa



Activación: 30 μg de FBPasa fueron preincubados a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; DTT, 1; FBP, 0.16; Cl_2Ca , 0.005; y tricloroacetato de sodio, según se indica. A los 10 minutos se inyectó cada muestra en mezcla de reacción para determinar actividad FBPasa como se describe en la sección 2.2.2. Durante la catálisis, la concentración de tricloroacetato se mantuvo constante en 9 mM. Actividad control: 18 $\mu\text{moles Pi liberado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$

Catálisis: la preincubación se efectuó como en el experimento arriba mencionado, fijando la concentración de tricloroacetato en 150 mM. A los 10 minutos se inyectó cada muestra en la mezcla de reacción conteniendo concentraciones crecientes de tricloroacetato, según se indica. Actividad control: 22 $\mu\text{moles Pi liberado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$

inyectada en mezcla de reacción conteniendo concentraciones crecientes del anión caotrópico, la velocidad de hidrólisis disminuyó obteniéndose un I_{0.5} de 0.1 M. Por lo tanto, mientras una concentración de 0.15 M de tricloroacetato de sodio inhibió la catálisis, en la fase de modificación favoreció la máxima estimulación de la actividad específica.

En experimentos paralelos se examinaron otras sales de sodio en la fase catalítica: los I_{0.5} para ClNa, BrNa e INa fueron: 50 mM, 55 mM y 90 mM respectivamente. En consecuencia, en relación con los efectos en la cinética de la FBPasa de cloroplastos, las sales neutras se comportaron como los solventes orgánicos: estimularon la actividad específica pero inhibieron la catálisis.

3.2.1.2.1. REQUERIMIENTOS PARA LA ACTIVACION DE LA FBPasa POR TRICLOROACETATO

Tal como en la estimulación de la FBPasa mediada por solventes orgánicos o por tiorredoxina, el efecto de los aniones caotrópicos fue estrictamente dependiente de la presencia de un azúcar-bisfosfato, un catión bivalente y un tiol. Ello implica que tres diferentes familias químicas pueden ser analizadas por separado.

Como se observa en la tabla 1, solo la FBP, entre varios metabolitos fosforilados, fue efectiva en el proceso de activación de la enzima. Otro azúcar-bisfosfato, la fructosa-2,6-bisfosfato, pudo ser utilizado en lugar de la FBP pero su efecto se discutirá en la siguiente sección.

Tabla 1: EFEECTO DE COMPUESTOS FOSFORILADOS EN LA ACTIVACION
DE LA FBPasa POR TRICLOROACETATO

AGREGADO EN LA PREINCUBACION	ACTIVIDAD RELATIVA
Ninguno	16.1
FBP	100
RuBP	25.9
SBP	19.3
GluBP	23.7
ATP	22.6

La enzima (30 μg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; DTT, 1; Cl_2Ca , 0.005; tricloroacetato de sodio, 15; y los compuestos fosforilados que se indican, en una concentración de 2.5 mM. A los 10 minutos se inyectó en la mezcla de reacción para medir la actividad FBPasa como se describe en la sección 2.2.2. de materiales y métodos.
Actividad control: 15 $\mu\text{moles Pi liberado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$

Entre los cationes bivalentes, el mayor grado de activación se obtuvo con el Ca^{2+} , el cual fue reemplazado por Cu^{2+} y Mn^{2+} y no por Cd^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} ni Sr^{2+} (tabla 2).

Finalmente, en el caso de los tioles, se vió que la efectividad de estos está influenciada por otros grupos en la molécula. Así, se observa en la tabla 3 que la activación lograda con un monotiol cargado positivamente (2-dietilaminoetanotiol) superó a la obtenida con dos ditiolos (ditiotreitól y 2,3-dimercaptoetanol), mientras que ditiolos con cargas negativas (2,3-dimercaptosuccinato y ditiopropionato) fueron inefectivos como activadores.

La curva de tiempo para el proceso de activación, graficada en la figura 7, muestra que, luego de un retardo de 2 minutos, la actividad específica de la FBPasa aumentó con el tiempo de preincubación alcanzando su máximo después de los 30 minutos. A su vez, la enzima activada no modificó sustancialmente su actividad aun dos horas después de que la concentración del tricloroacetato, y la de alguno de sus efectores, fuera reducida 20 veces por dilución, como se observa en la figura 8. Sin embargo, luego de una diálisis exhaustiva contra buffer Tris-ClH 30 mM (pH: 7.9) la FBPasa se tornó inactiva, recuperando su capacidad hidrolítica solamente por una nueva preincubación con sus efectores y el anión caotrópico. Se ve en la tabla 4 que dicha recuperación no alcanzó los valores originales. Esto se debería al tratamiento prolongado de la enzima a pH alcalino, lo que provoca su disociación con la consiguiente inactivación enzimática.

Tabla 2: EFECTO DE CATIONES BIVALENTES EN LA ACTIVACION DE LA FBPasa POR TRICLOROACETATO

AGREGADO EN LA PREINCUBACION	ACTIVIDAD RELATIVA
Ninguno	0
Cl ₂ Ca	100
Cl ₂ Cd	3
Cl ₂ Co	0
Cl ₂ Mn	10.5
Cl ₂ Ba	0
Cl ₂ Hg	0
SO ₄ Cu	28.35
(NO ₃) ₂ Sr	1.5

La enzima (30 µg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo (en µmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; DTT, 1; FBP, 0.16; tricloroacetato de sodio, 15; y los cationes bivalentes que se indican en cada caso, en una concentración de 0.05 mM. A los 10 minutos se inyectó en la mezcla de reacción para medir la actividad FBPasa como se describe en la sección 2.2.2. de materiales y métodos.
Actividad control: 15 µmoles Pi liberado.min⁻¹.mg prot⁻¹

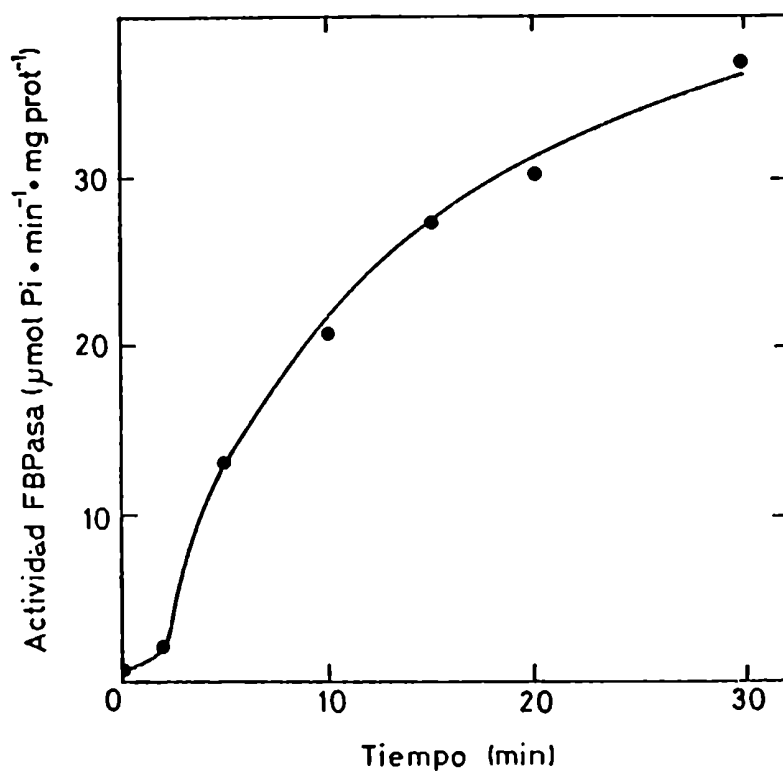
Tabla 3: EFECTO DE TIOLES EN LA ACTIVACION DE LA FBPasa POR TRICLOROACETATO

AGREGADO EN LA PREINCUBACION	ACTIVIDAD RELATIVA
Ninguno	26
Ditiotreitol	100
2,3-dimercaptopropanol	61
dimercaptopropionato	27
2,3-dimercaptosuccinato	10
2-dietilaminoetanotiol	175
1-tioglicerol	41
2-mercaptoetanol	19
L-cysteina	19
Glutati3n reducido	16

La enzima (30 μg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una soluci3n conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; FBP, 0.16; Cl_2Ca , 0.005; tricloroacetato de sodio, 15; y, segun se indica, un ditiol, 0.25; o un monotiol, 0.5. A los 10 minutos se inyect3 en la mezcla de reacci3n para medir la actividad FBPasa como se describe en la secci3n 2.2.2. de materiales y m3todos.

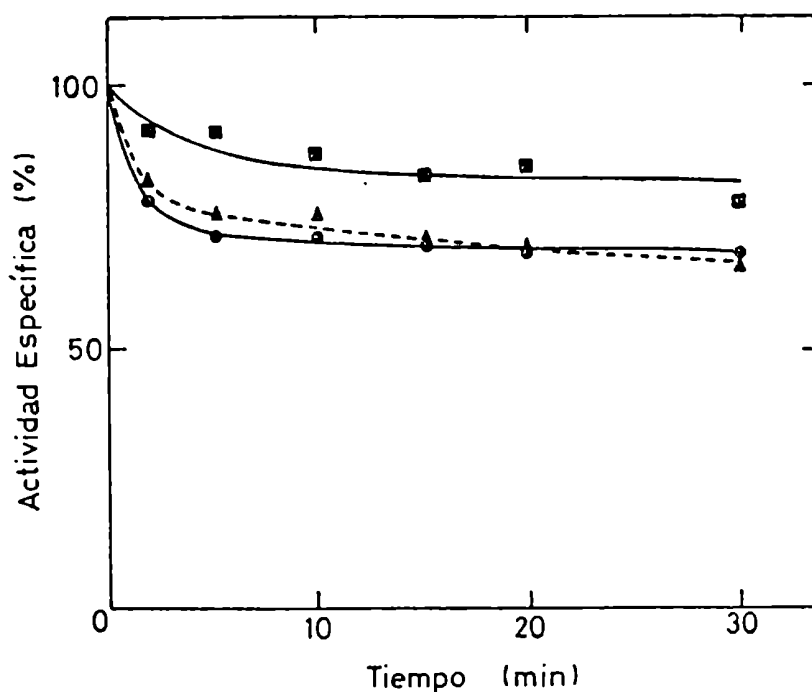
Actividad control: 15 $\mu\text{moles Pi liberado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$

Figura 7: CURVA DE TIEMPO PARA LA ACTIVACION DE LA FBPasa
POR TRICLOROACETATO



La enzima (30 μg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; DTT, 1; FBP, 0.16; Cl_2Ca , 0.005; tricloroacetato de sodio, 15. Luego de los tiempos que se indican, se inyectó una alícuota en la mezcla de reacción para determinar la actividad FBPasa como se describe en la sección 2.2.2. de materiales y métodos.

Figura 8: EFFECTO DE LA DILUCION DE MODULADORES EN LA ACTIVACION DE LA FBPasa POR TRICLOROACETATO



La enzima (65 μg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; DTT, 0.5; FBP, 0.04; Cl₂Ca, 0.005; tricloroacetato de sodio, 15. A los 10 minutos, una alícuota se inyectó en una solución donde se mantenía la concentración de los moduladores, omitiendo la presencia de: FBP (●), Ca²⁺ (▲), DTT (■), (volumen final: 2 ml). A los tiempos señalados, alícuotas de 0.1 ml se incubaron en la mezcla de reacción para medir la actividad FBPasa, como se detalla en la sección 2.2.2. de materiales y métodos.

Tabla 4: REVERSIBILIDAD DE LA ACTIVACION DE LA FBPasa POR TRICLOROACETATO

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD RELATIVA
Preincubación con tricloroacetato 150 mM	100
Diálisis de la enzima activada contra Tris-ClH 30 mM (pH: 7.9)	3
Preincubación de la enzima dializada con tricloroacetato 150 mM	20

La enzima (35 μg) fue preincubada a 23°C en 0.4 ml de una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 40; DTT, 2; FBP, 0.32; Cl_2Ca , 0.020; tricloroacetato de sodio, 60. A los 20 minutos, una alícuota fue utilizada para medir actividad FBPasa y el resto de la muestra fue dializado 12 horas contra buffer Tris-ClH 30 mM (pH: 7.9). Luego, se le determinó actividad FBPasa al dializado, mientras que 0.16 ml del mismo fueron nuevamente preincubados en una solución cuya composición fue idéntica a la descrita más arriba. A los 20 minutos, una alícuota se inyectó en mezcla de reacción para la determinación de la actividad FBPasa como se describe en la sección 2.2.2. de materiales y métodos.

Actividad control: 17.3 $\mu\text{moles Pi liberado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$

3.1.1.2.2. ESTUDIOS CINÉTICOS SOBRE LA FBPasa TRATADA CON TRICLOROACETATO

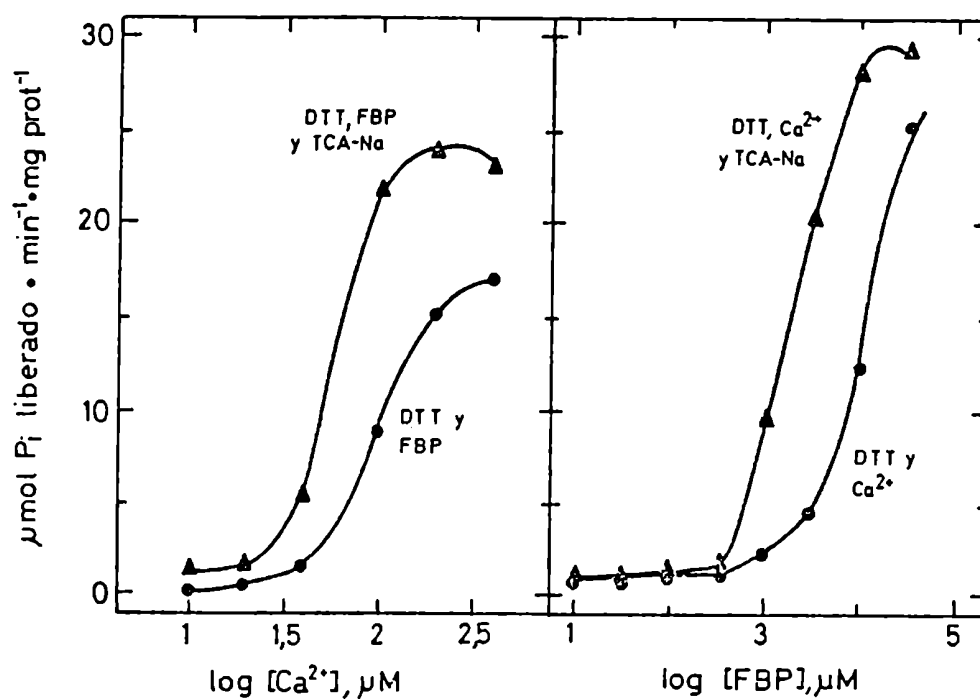
Dado el diseño experimental, un compuesto que ejerce su acción tanto en la fase de modificación como en la de catálisis, presenta dos constantes cinéticas (una por cada fase). Por ello se estudió el efecto de los aniones caotrópicos sobre las constantes cinéticas de los moduladores, cofactores y sustratos en los dos procesos que componen la reacción de la FBPasa de los cloroplastos.

El efecto de FBP y Ca^{2+} sobre la actividad específica de la FBPasa se muestra en la figura 9: 0.15 M de tricloroacetato de sodio disminuyó el $A_{0.5}$ para FBP de 6 mM a 1 mM, en tanto que, para el Ca^{2+} , el $A_{0.5}$ se redujo de 80 μM a 30 μM . En consecuencia, el efecto del anión caotrópico fue similar al de los solventes orgánicos: aumentó la actividad específica de la enzima por disminución de las constantes cinéticas de los moduladores.

Por otro lado, luego de preincubar a la FBPasa en presencia y en ausencia del anión caotrópico, se analizó el efecto que dicho tratamiento tenía sobre los $S_{0.5}$ para FBP y Mg^{2+} , en la etapa catalítica. Como se observa en la figura 10, cuando se incorporó el tricloroacetato en la mezcla de preincubación (activación), el $S_{0.5}$ para FBP disminuyó de 1.5 mM a 0.5 mM, en tanto que el $S_{0.5}$ para Mg^{2+} decayó de 1.1 mM a 0.7 mM.

En contraste con el efecto estimulador en la fase de modificación, las sales neutras inhibieron la velocidad de catálisis (figura 6). Con el fin de establecer

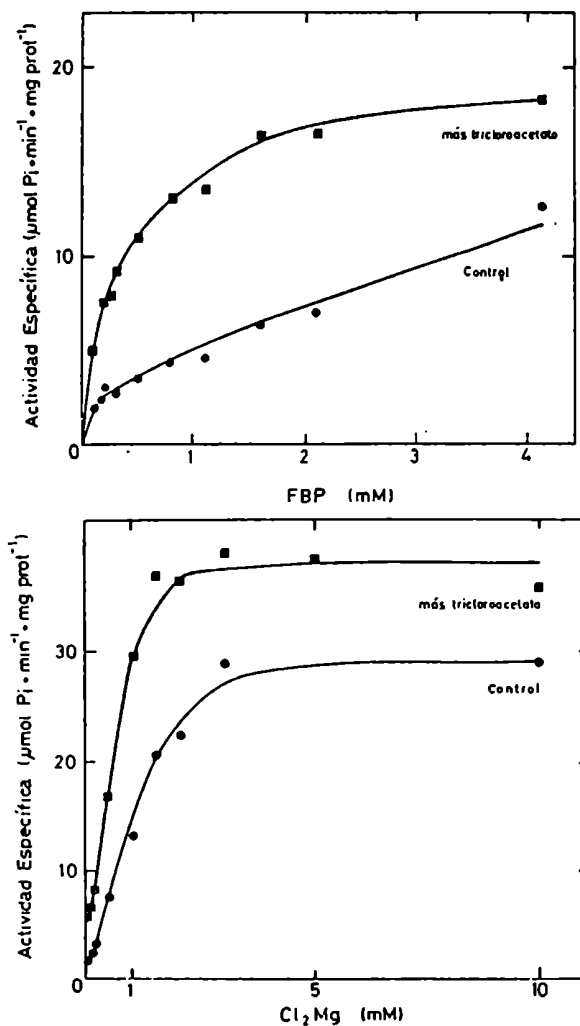
Figura 9: EFEECTO DE DTT, FBP, Ca^{2+} Y TRICLOROACETATO EN LA ACTIVACION DE LA FBPasa



A: la enzima (30 μg) fue preincubada durante 10 minutos a 23°C , en concentraciones variables de Ca^{2+} , en 0.1 ml de una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; DTT, 1; FBP, 0.1; y, según se indica, tricloroacetato de sodio, 15. Luego de la preincubación, una alícuota se inyectó en la mezcla de reacción para medir la actividad FBPasa como se describe en la sección 2.2.2. de materiales y métodos.

B: exceptuando que la concentración de FBP fue variable, según se indica, y que la concentración de Ca^{2+} fue 0.05 mM, las condiciones experimentales fueron las mismas que en A.

Figura 10: EFECTO DE FBP y Mg^{2+} EN LA FASE CATALITICA DE LA
FBPasa ACTIVADA POR TRICLOROACETATO

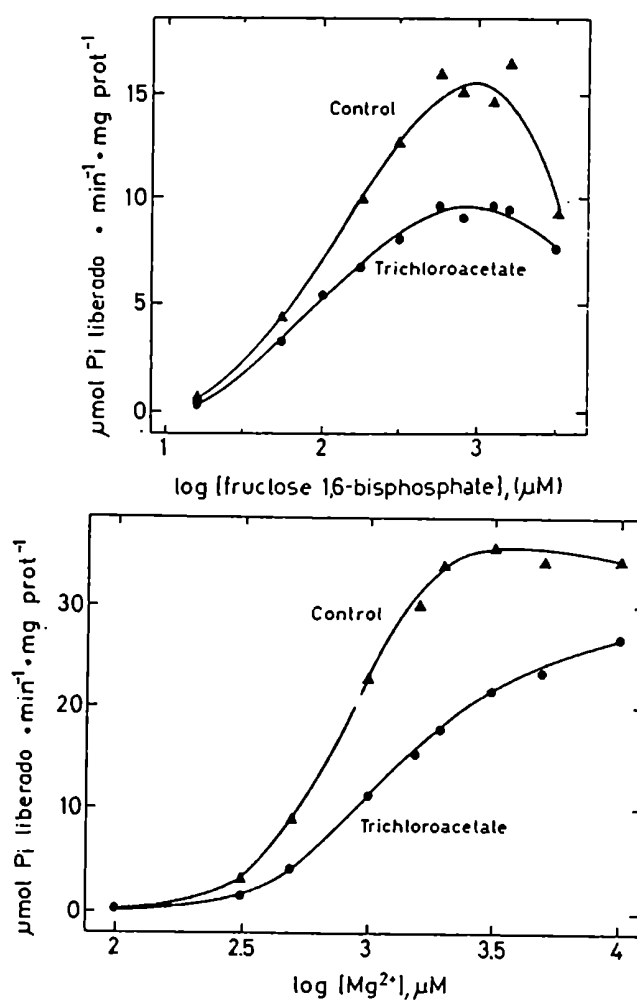


La enzima (20 μg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; DTT, 0.25; FBP, 0.04; Cl₂Ca, 0.005; y, según se indica, trichloroacetato de sodio, 15. A los 10 minutos se inyectó la muestra en mezcla de reacción para determinar actividad FBPasa, como se describe en la sección 2.2.2. de materiales y métodos, salvo que la concentración de FBP o de Mg^{2+} , según se detalla en las figuras, fue variable.

si la disminución de la velocidad de hidrólisis mediada por la sal reflejaba un cambio en la V_{\max} o en el $S_{0.5}$ para FBP y Mg^{2+} , se ensayó la actividad catalítica de la FBPasa en presencia y en ausencia de tricloroacetato 0.1 M. Como se observa en la figura 11, la mayor diferencia en catálisis se halló en la V_{\max} ; ni el $S_{0.5}$ para FBP (0.2 mM) ni el $S_{0.5}$ para Mg^{2+} (0.8 mM) fueron apreciablemente modificados por el efecto del tricloroacetato.

Por otro lado, y dada la semejanza molecular que existe entre la FBP y la Fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6BP), se encaró el estudio de este metabolito, tanto como posible modulador en la fase de modificación así como eventual sustrato en la fase de catálisis. En un primer ensayo, que se muestra en la tabla 5, se vió que la F2,6BP podía reemplazar a la FBP en el proceso de activación, siendo el $A_{0.5} = 0.3$ mM (figura 12). Finalmente, se estudió el efecto de la F2,6BP, en activación y catálisis, en presencia de FBP. Se observa en la figura 13 que la F2,6BP modificó levemente la activación por FBP. Sin embargo, no solo fue inefectiva como sustrato sino que inhibió la hidrólisis de FBP. El $I_{0.5}$ para la F2,6BP (0.095) es semejante tanto al obtenido con la FBPasa ensayada a alto pH y a altas concentraciones de Mg^{2+} como al que se halló cuando la enzima fue previamente activada con tiorredoxina (Gottschalk et al, 1982; Cadet et al, 1987).

Figura 11: EFEECTO DE FBP, Mg^{2+} Y TRICLOROACETATO EN LA FASE CATALITICA DE LA FBPasa ACTIVADA POR TRICLOROACETATO



La enzima (30 μg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; DTT, 0.25; FBP, 0.04; Cl_2Ca , 0.005; tricloroacetato de sodio, 15. A los 10 minutos, se inyectaron alícuotas en la mezcla de reacción para determinar la actividad FBPasa, como se describe en la sección 2.2.2. de materiales y métodos, conteniendo concentraciones variables de FBP o de Mg^{2+} y en presencia o en ausencia de tricloroacetato de sodio 0.1 M.

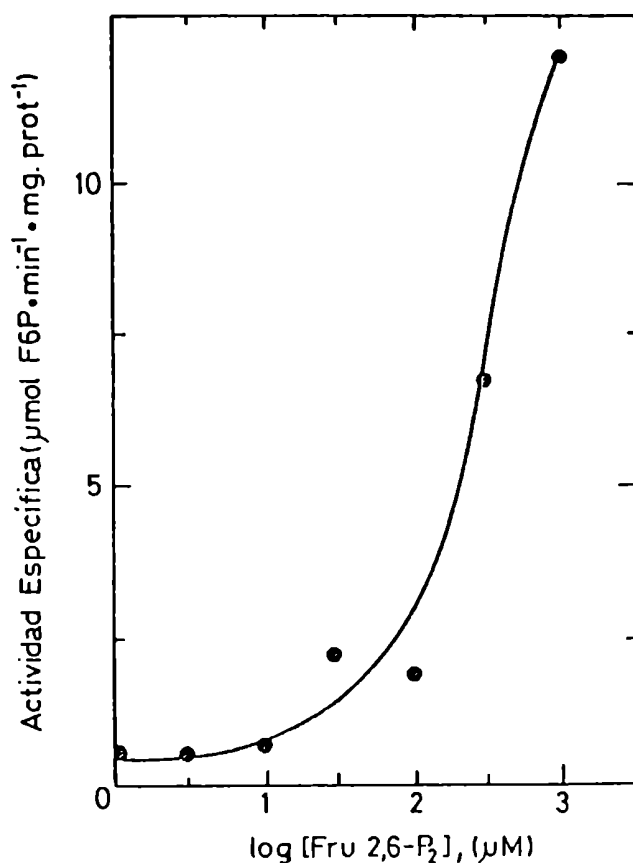
Tabla 5: EFECTO DE FBP y F2,6BP EN LA ACTIVACION DE LA
FBPasa POR TRICLOROACETATO

AGREGADO EN LA PREINCUBACION	ACTIVIDAD RELATIVA
Ninguno	4.25
FBP	100
F2,6BP	42.5
FBP + F2,6BP	119.1

La enzima (13 μg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; DTT, 0.25; Cl_2Ca , 0.005; tricloroacetato de sodio, 15; y, según se indica: FBP, 0.08 y F2,6BP, 0.05. A los 15 minutos, se inyectaron alicuotas en la mezcla de reacción para determinar la actividad FBPasa como se describe en la sección 2.2.2. de materiales y métodos.

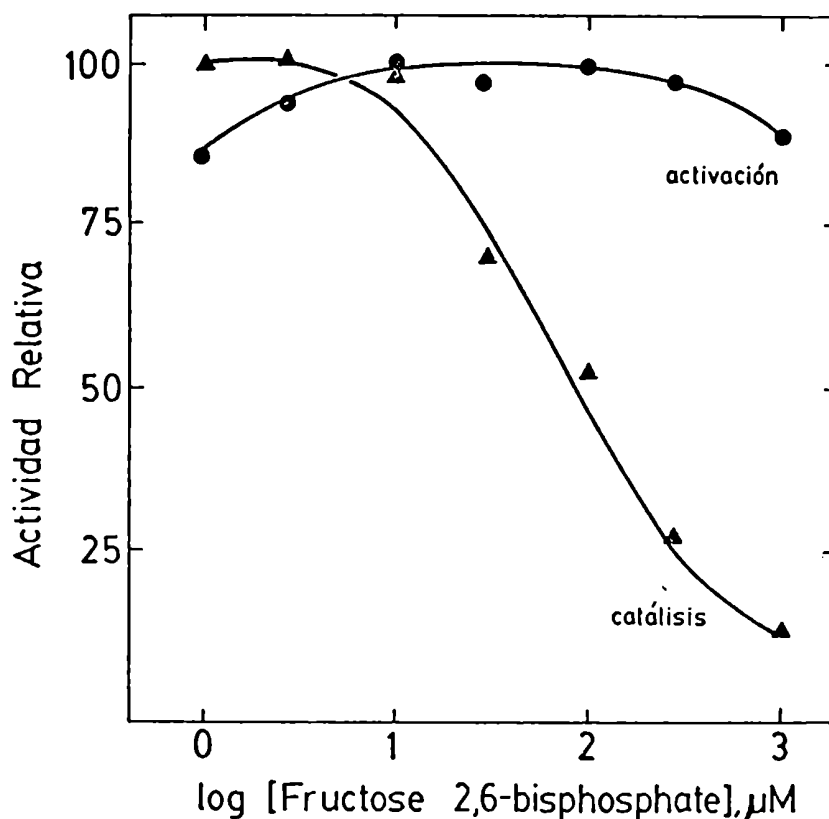
Actividad control: 2.2 $\mu\text{moles Pi liberado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$

Figura 12: EFECTO DE LA F2,6BP EN LA PREINCUBACION DE LA
FBPasa CON TRICLOROACETATO, DTT Y Ca²⁺



La enzima (13 μg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; DTT, 0.25; Cl₂Ca, 0.005; tricloroacetato de sodio, 15; y, según se indica, concentraciones variables de F2,6BP. A los 15 minutos, se inyectaron alícuotas en la mezcla de reacción para determinar la actividad FBPasa, valorando la F6P formada según el método espectrofotométrico, siguiendo el cambio de absorbancia a 340 nm. Dicha mezcla de reacción contenía (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 50; Cl₂Mg, 1; FBP, 0.8; EGTA, 0.1; NADP, 0.5; y Glu-6-P deshidrogenasa de levadura, 2 unidades y fosfoglucoisomerasa de levadura, 5 unidades.

Figura 13: EFECTO DE LA F2,6BP EN LA ACTIVACION Y ACTIVIDAD
DE LA FBPasa



Activación: la FBPasa fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; DTT, 0.5; FBP, 0.04; Cl_2Ca , 0.005; tricloroacetato de sodio, 15; y F2,6BP, según se indica. A los 10 minutos de preincubación, una alícuota de la solución se inyectó en la mezcla de reacción para determinar la actividad FBPasa como se describe en la sección 2.2.2. de materiales y métodos. La concentración de F2,6BP durante el ensayo de actividad se mantuvo en 22 μM .

Actividad control: 38 $\mu\text{moles Pi liberado. min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$

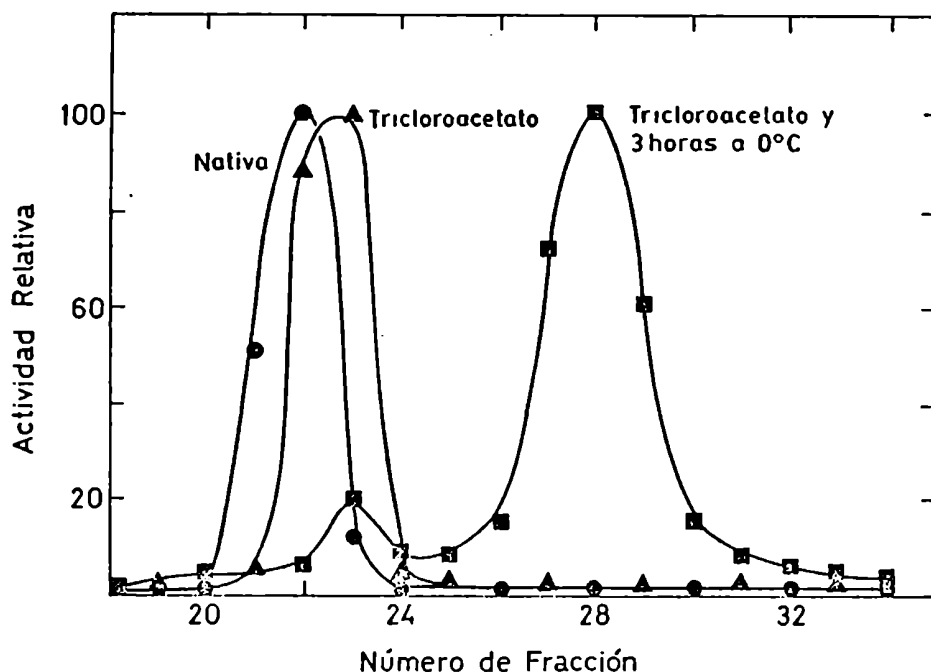
Catálisis: la FBPasa fue activada a 23°C en 0.1 ml de la solución arriba mencionada, omitiendo la presencia de F2,6BP. Luego de 10 minutos de preincubación una alícuota de la solución se inyectó en mezcla de reacción conteniendo, según se indica, concentraciones variables de F2,6BP.

Actividad control: 43 $\mu\text{moles Pi liberado. min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$

3.1.1.2.3. CROMATOGRAFIA DE LA FBPasa EN COLUMNAS DE SUPEROSE 12

Dado que la FBPasa de cloroplastos se disocia a pH mayores de 8.5 (Lázaro et al, 1975; Buchanan et al, 1976) y que, por otra parte, los aniones caotrópicos alteran el estado de asociación de las proteínas (Holtzer et al, 1960; Herskovits et al, 1981), se decidió analizar si existía modificación de la estructura cuaternaria de la enzima en presencia del sistema activador. Para ello, se incubó la enzima a 23°C con DTT 5 mM, FBP 1.6 mM, Ca²⁺ 0.05 mM y tricloroacetato de sodio 0.15 M, luego se sembró la solución en una columna de Superose 12 (FPLC), y finalmente, se eluyó a 23°C con un buffer que contenía los moduladores y el tricloroacetato. Como se ve en la figura 14, aunque el volumen de elución relativo (volumen de elución de la muestra/volumen de exclusión) para la FBPasa activada con el anión caotrópico fue levemente mayor que el que se deduce para la enzima nativa (1.48 vs. 1.41), ambos perfiles de elución normalizados fueron simétricos y cubrieron áreas similares bajo la curva. La diferencia observada en los volúmenes de elución, en la Superose 12, sería debida a cambios en las propiedades hidrodinámicas de la proteína, ya sea por una modificación conformacional de la misma o por variaciones en las características del eluyente. Por el contrario, cuando la enzima activada fue incubada durante 3 hs a 0°C, previo a ser sembrada en la columna, el volumen relativo fue de 1.84; al bajar la temperatura, aumenta el pH provocándose la disociación de la enzima. Cuando el mismo

Figura 14: CROMATOGRAFIA EN SUPEROSE 12 DE LA FBPasa TRATADA
CON TRICLOROACETATO



FBPasa tratada con tricloroacetato: la enzima (104 μg) fue activada a 23°C durante 20 minutos como se detalla en la sección 3.2.1.2.3. Una muestra de la solución (0.08 ml) fue sembrada en una columna de Superose 12 (1 x 30 cm) ya sea inmediatamente o luego de una segunda preincubación a 0°C durante 3 hs. La columna fue equilibrada con buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9), DTT 2.5 mM, FBP 0.8 mM, Cl₂Ca 0.1 mM, EGTA 0.01 mM y tricloroacetato de sodio 150 mM. Ambas columnas fueron eluidas con el buffer de equilibrio (flujo: 0.9 ml.min⁻¹) y la actividad de las fracciones se determinó en una mezcla de reacción conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 50; Cl₂Mg, 10; FBP, 1.6; y EGTA, 0.1 (volumen final: 1 ml). Luego de 10 minutos el Pi liberado fue estimado de acuerdo al método de Chen et al (1956). Las actividades control para el tetramero () y el dímero () de la FBPasa fueron: 75 y 36 nmoles Pi liberado.min⁻¹.ml fracción⁻¹.

FBPasa nativa: la enzima (104 μg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de buffer Tris-acetato 100 mM (pH: 7.9); luego de 20 minutos, la mezcla (0.08 ml) se sembró en la columna de Superose 12 preequilibrada en este buffer. La elución se efectuó con el mismo buffer y se determinó la actividad en las fracciones preincubando a 23°C alicuotas de las mismas en una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; DTT, 0.25; FBP, 0.08; Cl₂Ca, 0.005; y tricloroacetato de sodio, 15 (volumen final: 0.1 ml). A los 10 minutos una muestra fue inyectada en mezcla de reacción para determinar actividad como se describe en la sección 2.2.2. de materiales y métodos. Actividad control: 44 nmoles Pi liberado.min⁻¹.ml fracción⁻¹. El volumen muerto de la columna corresponde al de la elución del Blue Dextran.

experimento se realizó en BioGel Ao.5 m se hallaron resultados similares, pero surgieron dificultades con la cromatografía de la enzima nativa dado que esta se inactivaba (por disociación) a lo largo del experimento, que era más lento y se efectuaba a 4°C (el pH del buffer Tris-ClH aumenta a 8.5 cuando la temperatura disminuye a 4° C).

La conclusión de estos resultados es que la estimulación de la FBPasa por aniones caotrópicos no implica una modificación de la estructura cuaternaria de la enzima, proceso que tampoco ocurre en las activaciones producidas por tiorredoxina o solventes orgánicos.

3.1.1.3. ESPECTROS DIFERENCIALES AL ULTRAVIOLETA INDUCIDOS POR MODULADORES EN LA FBPasa

Dado que el efecto que produce el tricloroacetato sobre la enzima no es una disociación (o asociación), se diseñaron experimentos conducentes a establecer los cambios producidos por la modificación conformacional. Un sistema experimental para detectar cambios conformacionales es la Espectrofotometría Diferencial en el Ultravioleta (Herskovits y Sorensen, 1968 y 1968 "bis").

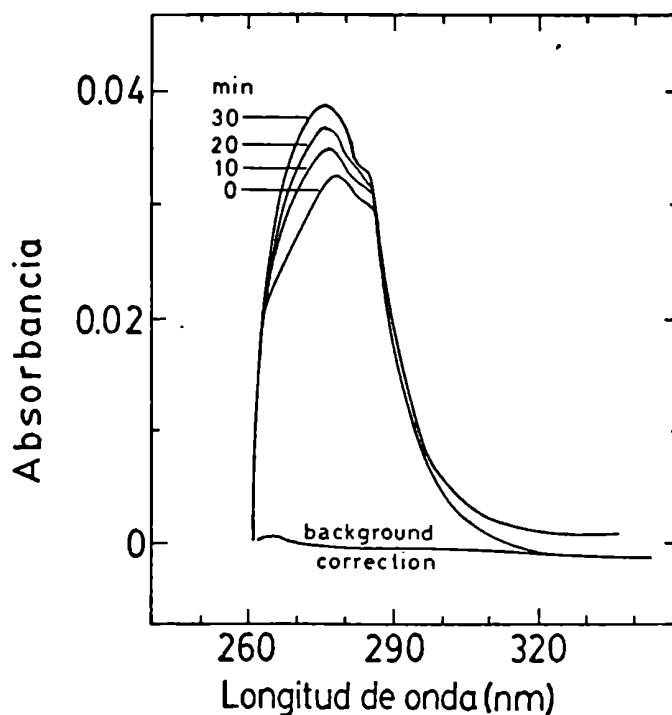
Para definir mejor el efecto de los perturbantes en los espectros, se colocaron cubetas en "tandem" en un espectrofotómetro de doble haz como se indica en Materiales y Métodos. En el compartimento de referencia se ubicaron dos celdas: una con FBPasa disuelta en buffer Tris-ClH y otra conteniendo 2-dietilaminoetanol, FBP, Ca^{2+} y tricloroacetato; en el compartimento de muestra, una de las celdas contenía la enzima con todos sus moduladores y la

otra, solamente buffer. En estos estudios se utilizó el 2-dietilaminoetanotiol en lugar de ditioneitol ya que, en experimentos previos llevados a cabo sin enzima, se observaron cambios espectrales alrededor de 280 nm cuando el DTT fue mezclado con los moduladores.

Como se observa en la figura 15, en un primer barrido espectral (tiempo arbitrario cero) apareció un pico de absorbancia principal a 278 nm y uno menor, pero distinguible, a 283 nm. Luego de 30 minutos, estos picos se desplazaron gradualmente a 275 nm y 281 nm, respectivamente. Dado que los desplazamientos de las curvas fueron cualitativos, ellos indicarían distintos estados conformacionales de la proteína con diferentes exposiciones de los grupos cromóforos. Esta cinética de exposición de los cromóforos intrínsecos de la FBPasa es congruente con la idea de que varios estados de la enzima, estructuralmente diferentes entre sí, preceden a la forma activa.

Sobre la base de: a) estudios de compuestos modelos y proteínas (Herskovits y Sorensen, 1968 "bis") y b) la estructura primaria (parcialmente conocida) de la FBPasa de cloroplastos (Marcus et al, 1986), estos cambios pueden ser atribuidos a modificaciones en la posición relativa de los residuos triptofano y tirosina en la molécula de la enzima.

Figura 15: ESPECTRO DIFERENCIAL AL ULTRAVIOLETA DE LA FBPasa
PROVOCADO POR MODULADORES Y ANIONES CAOTROPICOS

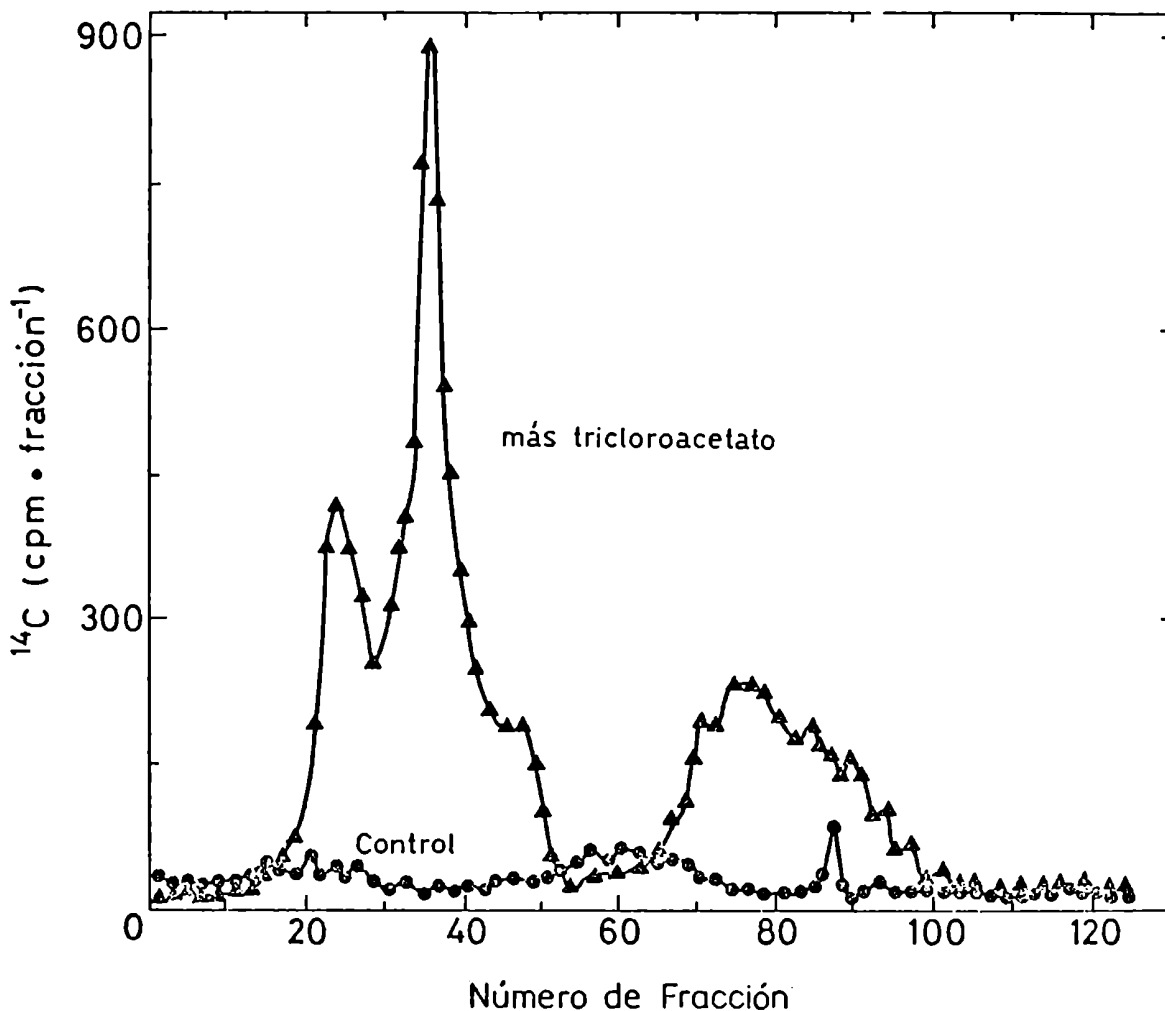


Las cubetas espectrofotométricas fueron ordenadas como se describe en la sección 2.18. de materiales y métodos. En cada una de las cuatro cubetas se agregó 100 μ moles de buffer Tris-ClH (pH: 7.9) mientras que las celdas 1 y 4 contenían, además (en μ moles): 2-dietilaminoetanotiol, 10; FBP, 0.8; Cl_2Ca , 0.1; y tricloroacetato de sodio, 150 (volumen final: 0.8 ml). Luego de la inyección de 0.2 ml de solución de FBPasa (1.7 mg/ml), en las cubetas 2 y 4, y de 0.2 ml de H_2O , en las cubetas 1 y 3, se registraron secuencialmente los espectros a intervalos de 10 minutos.

3.1.1.4. CROMATOGRAFIA EN HPLC DE LA FBPasa DIGERIDA CON TRIPSINA

Otro ensayo que dió un indicio sobre un posible cambio conformacional fue el efectuado utilizando la técnica de HPLC sobre los derivados provenientes de una digestión con tripsina de la FBPasa. Para ello, la enzima fue tratada por 30 minutos con tricloroacetato de sodio 0.15 M y, luego de mezclarla con [1-¹⁴C]-Iodoacetamida, la incubación se prolongó por 60 minutos más. La enzima, luego de la diálisis contra buffer Tris-ClH 60 mM (pH: 7.9), se incubó con tripsina durante 30 minutos deteniendo la proteólisis por el agregado de inhibidor de tripsina de soja. Los péptidos resultantes fueron separados por HPLC en una columna de intercambio iónico débil (Synchropack AX-300). La radioactividad de las fracciones derivadas de la cromatografía se midió en un contador de centelleo líquido. Como se observa en la figura 16, la FBPasa tratada con tricloroacetato fue más reactiva a la iodoacetamida que la no tratada. La posibilidad de que la enzima nativa no produjera péptidos marcados por ser insensible a la digestión triptica se comprobó por experimentos paralelos: en ninguno de los ensayos, donde se utilizó [1-¹⁴C]-iodoacetamida, hubo incorporación de radioactividad en la enzima nativa (ver tabla 6). Más aún, como se verá más adelante, muestras sometidas primero a proteólisis y luego a electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes, revelaron la presencia de varios péptidos de peso molecular menor al del monómero de la FBPasa,

Figura 16: SEPARACION POR HPLC DE LOS PEPTIDOS TRIPTICOS DERIVADOS DE LA FBPasa TRATADA CON [1-C¹⁴]-IODOACETAMIDA



En un tubo de ensayo se secó bajo atmosfera de N₂ 0.025 ml de [1-C¹⁴]-Iodoacetamida (actividad específica: 24 Ci/mol; 100 µCi/ml). Paralelamente, la FBPasa (700 µg) fue preincubada a 23°C en 0.3 ml de buffer Tris-ClH 0.2 M (pH: 7.9) conteniendo tricloroacetato de sodio 150 mM, como se indica. Luego de 30 minutos la solución de enzima fue i) inyectada en la Iodoacetamida radioactiva secada, ii) agitada fuertemente, iii) incubada por 60 minutos a 25°C, y iv) dializada, con dos cambios de buffer, contra 2 litros de Tris-ClH 60 mM (pH: 7.9). Una fracción del dializado (0.06 ml) se incubó con 0.006 ml de tripsina de pancreas bovino (1 mg/ml) e incubada por 20 minutos a 25°C. La proteólisis fue detenida por el agregado de 6 µg de inhibidor de tripsina de soja, y la mezcla fue inmediatamente congelada. Las muestras fueron descongeladas y analizadas por HPLC, como se indica en la sección 2.17. de materiales y métodos. La cantidad de péptidos tripticos marcados sembrados en la columna de HPLC fue equivalente a 50 µg de FBPasa.

salvo en el caso de la enzima nativa que presentó el monómero intacto.

3.1.1.5. S-CARBOXIAMIDOMETILACION DE LA FBPasa

Los estudios sobre enzimas regulatorias del estroma del cloroplasto ponen énfasis en los cambios del estado de los residuos cist(e)ina porque potencialmente estos grupos serían modificados por la luz (Buchanan et al, 1979; Anderson, 1979; Kelly y Latzko, 1982). Es por ello que, para obtener mayor información sobre los cambios conformacionales asociados al proceso de activación, se analizaron los grupos tioles expuestos, tanto en la FBPasa nativa como activada, midiendo la reactividad de la enzima a la iodoacetamida.

Los resultados se presentan en la tabla 6 y se observa que cuando la FBPasa fue preincubada en presencia de DTT (2.5 mM), FBP (0.8 mM), Ca^{2+} (0.05 mM) y tricloroacetato de sodio (0.15 M), aparecieron marcados 5 grupos sulfhidrilos por molécula de enzima, mientras que solo 2 grupos por molécula se visualizaron si alguno de los moduladores estaba ausente en la mezcla de preincubación. Más aun, y de acuerdo a los resultados previos (ver control en la figura 16), no se detectó radioactividad en la enzima nativa tratada a pH: 7.9 con [1- ^{14}C]-Iodoacetamida.

En la secuencia parcial de aminoácidos de la FBPasa de cloroplastos (Marcus et al, 1986) se reportó la presencia de 3 residuos sulfhidrilos por subunidad. Si los tratamientos indicados en la tabla 6 conducen a diferentes conformaciones de la FBPasa entonces distintos grupos tioles

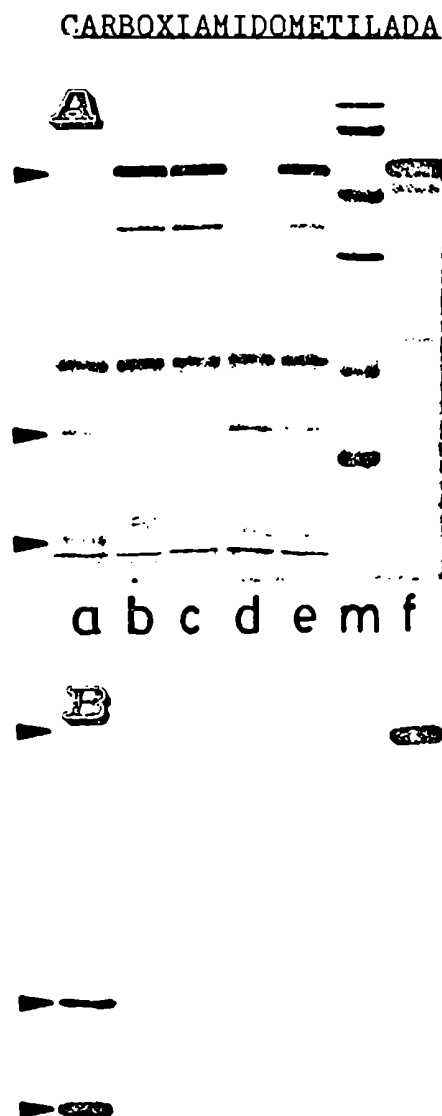
Tabla 6: EFEECTO DE DTT, FBP, Ca²⁺ Y TRICLOROACETATO EN EL
MARCADO DE LA FBPasa CON [1-¹⁴C]-IODOACETAMIDA

CONDICIONES DE PREINCUBACION	MOL IODOACETAMIDA/ MOL FBPasa
Completo	5.3
menos DTT	2.1
menos FBP	2.1
menos Ca ²⁺	2.4
menos tricloroacetato	2.0
Enzima nativa	0.4

La FBPasa (91 µg) fue preincubada a 23°C durante 15 minutos en 0.1 ml de una solución conteniendo, según se indica (en µmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; DTT, 0.25; FBP, 0.08; Cl₂Ca, 0.005; y tricloroacetato de sodio, 15. En la condición "completo menos Ca²⁺" se agregó 0.02 µmol de EGTA, mientras que la "enzima nativa" fue incubada en buffer Tris-ClH en ausencia de los moduladores. Luego se adicionó 0.1 ml de [1-¹⁴C]-Iodoacetamida 12.2 mM (actividad específica: 2.4 Ci/mol), y la incubación continuó por 60 minutos más. El exceso de Iodoacetamida radioactiva se separó de la enzima carboxiamidometilada dializando las muestras toda la noche contra buffer Tris-ClH 30 mM (pH: 7.6). La radioactividad de las muestras fue medida en un contador de centelleo líquido.

se expondrían para reaccionar con la Iodoacetamida. Por lo tanto, para caracterizar estos residuos, se sometió a la enzima S-carboxiamidometilada a proteólisis y se analizaron los productos por electroforesis. En este ensayo, las muestras dializadas del experimento anterior fueron primero tratadas con tripsina durante 30 minutos a 30°C, luego liofilizadas y finalmente se sembraron en un gel de poliacrilamida para efectuar una electroforesis a pH:8.8 y en presencia de SDS. El gel, teñido con Azul Brillante de Coomasie, mostró que la FBPasa tratada con todos los moduladores fue totalmente digerida por la tripsina (Figura 17-A, calle a); un patrón de proteína similar se observó cuando se omitió el DTT en la primera incubación (calle d). Por el contrario, la proteólisis fue parcial cuando la preincubación se llevó a cabo en ausencia ya sea de Ca²⁺, FBP o tricloroacetato (Figura 17-A, calles b, c y e). Así, el efecto concertado de un azúcar-bisfosfato, un catión bivalente y un anión caotrópico favoreció una isomerización tal de la FBPasa que resultó en una enzima más sensible a la digestión triptica. Por otro lado, luego de la proteólisis, dos polipéptidos (pesos moleculares 11.000 y 16.000) fueron fuertemente marcados por la [1-¹⁴C]-Iodoacetamida solo cuando la FBPasa fue previamente incubada con todos los moduladores (Figura 17-B, calle a). Ambos polipéptidos de 11.000 y 16.000 daltons, también se marcaron cuando la FBPasa se preincubó con DTT, FBP, Ca²⁺ y, ya sea, tiorredoxina-m de cloroplastos o un solvente orgánico (2-propanol), como se verá en la sección 3.1.2. Por otra parte, aunque la omisión de alguno de los moduladores en la preincubación disminuyó la consecuente

Figura 17: ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS
DE LOS FRAGMENTOS TRIPTICOS DERIVADOS DE LA FBPasa



Las muestras de enzima carboxiamidometilada (volumen: 0.2 ml), provenientes del experimento de la tabla 6, luego de la diálisis, fueron incubadas a 30°C con 5 µg de tripsina de pancreas bovino. Luego de 15 minutos, se agregaron 5 µg de inhibidor de tripsina de soja (disuelto en buffer Tris-ClH 50 mM a pH: 7.6), y las muestras fueron liofilizadas y, posteriormente tratadas para efectuar una electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (con SDS) como se detalla en la sección 2.15. de materiales y métodos. La FBPasa fue preincubada (ver otros detalles experimentales en la Tabla 6) con el sistema completo (calle a); menos Ca²⁺ (calle b); menos FBP (calle c); menos DTT (calle d); menos tricloroacetato de sodio (calle e); con el sistema completo pero sin efectuar proteólisis (calle f). Calle m: marcadores de peso molecular (ver sección 2.15.).

S-carboxiamidometilación de los grupos tioles de la enzima, un análisis semicuantitativo de la distribución de la radioactividad reveló que la incorporación de ^{14}C en la proteína de 16.000 daltons fue mayor cuando el DTT o el tricloroacetato fueron los moduladores excluidos.

Estos datos indican que la acción concertada de la FBP, el Ca^{2+} , el tricloroacetato y el DTT favoreció la exposición de: a) grupos tioles, y b) puentes disulfuro, reducidos por el ditiotreitól.

3.2.1.6. DISCUSION

Tal como en otras enzimas del cloroplasto, la reacción de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa está constituida por dos procesos: la activación de la proteína y la catálisis (Wolosiuk y Hertig, 1983). Para aumentar la actividad específica de la enzima se requieren un tiol, un azúcar-bisfosfato y un catión bivalente; la tiorredoxina de cloroplasto (-f o -m) participa en esta activación disminuyendo el $Ao.s$ para FBP, mientras que el $Ao.s$ para el Ca^{2+} cambia levemente (Hertig y Wolosiuk, 1983; Schürmann et al, 1985). Asimismo, cambios en la composición del medio también favorecen la acción de los moduladores (Corley y Wolosiuk, 1985). Dado que la estimulación por solventes orgánicos correlaciona con el coeficiente de partición octanol/agua (Wolosiuk, 1986; Helmer et al, 1968; Lea et al, 1971), parecería que los cambios que potencian el carácter hidrofóbico del cosolvente favorecen las modificaciones de interacciones intramoleculares (hidrofóbicas) mediadas por tioles y moduladores.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que la incorporación de altas concentraciones de sales neutras, desencadenó una respuesta similar a la de tiorredoxina o solventes orgánicos en la actividad específica de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa. La remoción de todos los moduladores disminuyó la estimulación de la actividad específica de la enzima a su valor basal. El ordenamiento de los aniones sobre la base de la concentración requerida para la máxima estimulación de la actividad específica de la FBPassa sigue la serie liotrópica

de Hofmeister: $\text{SCN}^- < \text{ClO}_4^- < \text{I}^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^- < \text{SO}_4^{2-}$. Se han observado ordenamientos similares de estos aniones estudiando su efecto en otras características de ciertas biomoléculas (Von Hippel y Wong, 1964; Collins y Washabaugh, 1985). Por ejemplo, en el desplazamiento de las temperaturas de transición (helix coil) del colágeno y del ADN, y en el cambio conformacional de la Ribonucleasa inducido térmicamente. Una explicación unificadora sería que los aniones caotrópicos alteran la estructura del agua facilitando la incorporación a la solución de grupos o compuestos que son excluidos de la misma en condiciones estrictamente acuosas. Sobre esta base, bajas concentraciones de caotrópicos favorecen cambios estructurales en la FBPasa, mediante los cuales la enzima es activada por concentraciones fisiológicas de moduladores, mientras que a altas concentraciones prevalece la conocida capacidad desnaturizante de estos compuestos.

Los experimentos de filtración en geles demuestran que no ocurren procesos de disociación (o asociación) de la proteína, cuando esta es tratada con todos los moduladores a temperatura ambiente y a pH: 7.8. Por otra parte, el control por los moduladores de:

- la sensibilidad de la enzima al ataque por tripsina,
- la exposición de grupos tioles,
- los cambios en la posición relativa de residuos tirosina o triptofano,

son una evidencia de que la isomerización reversible de la enzima disminuye el $A_{0.5}$ tanto para la FBP como para el Ca^{2+} . Cuando la FBPasa fue preincubada con diferentes moduladores, estudios estructurales y cinéticos revelaron

ciertas diferencias. Así, la FBPasa de cloroplastos preincubada con FBP, Ca^{2+} y tricloroacetato, en presencia o en ausencia de DTT, no mostró diferente sensibilidad al ataque por tripsina: sin embargo, solo la enzima tratada con todos los moduladores fue catalíticamente activa. Más aun, la forma activa de la FBPasa incorporó mayores niveles de radioactividad a partir de la $[1-^{14}\text{C}]$ -Iodoacetamida, que la enzima preincubada en ausencia de DTT. Además, la FBPasa incubada en ausencia de FBP, Ca^{2+} , o tricloroacetato fue, no solo menos sensible a la digestión triptica, sino menos reactiva a la Iodoacetamida, e inefectiva en la hidrólisis de la FBP.

La exposición de grupos tioles en la FBPasa, los cuales son relevantes en el control de la actividad redox, se usó en estos experimentos como otra manera de detectar cambios conformacionales. La enzima nativa no tuvo grupos titulables por Iodoacetamida mientras que, dependiendo de los moduladores utilizados en la preincubación, distintos grupos $-\text{SH}$ se tornaron accesibles a la S-carboxiamidometilación. Conclusiones similares se presentan en el trabajo de Aragnol et al (1985) a partir del análisis de las velocidades de reacción de la enzima con ácido dithiobis(nitrobenzoico). En nuestros experimentos fue evidente que las condiciones de preincubación para obtener la mayor actividad específica fueron aquellas que produjeron la mayor exposición de grupos $-\text{SH}$. Por otro lado, en presencia de los moduladores, los aniones caotrópicos provocaron cambios rápidos en el espectro diferencial al U.V. no ligados a altas actividades específicas, mientras que los posteriores desplazamientos de los máximos en el

espectro, y el aumento en la absorbancia correlacionaron con el aumento de la actividad. De esta manera, los cambios en la posición relativa de grupos tirosina y triptofano, mediados por moduladores, en la FBPasa fueron indicadores de por lo menos dos etapas, una rápida y otra(s) lenta(s), las cuales precedieron a la forma catalíticamente activa de la enzima. Estos resultados corroboran la idea de que una o más formas inactivas de la FBPasa, conformacionalmente diferentes a la del estado nativo, preceden a la aparición de la forma activa (Wolosiuk, Perelmuter y Chehebar, 1980).

Las tiorredoxinas de cloroplastos, los solventes orgánicos y los aniones caotrópicos fueron funcionales en la activación concertada de la FBPasa de cloroplastos disminuyendo las constantes cinéticas de los moduladores (Corley y Wolosiuk, 1985; Hertig y Wolosiuk, 1983). En este proceso, grupos tioles aparentemente similares fueron accesibles a la modificación química por Iodoacetamida. Los solventes orgánicos y los aniones caotrópicos disminuyen las interacciones hidrofóbicas en las proteínas y, además, no están involucrados en reacciones redox. Por otra parte, aunque la tiorredoxina actúa como una disulfuro óxido-reductasa (Holmgren, 1981), y esta función ha sido considerada en la regulación de enzimas del cloroplasto, también ejerce efectos no relacionados con ciclos redox. Así, se describió su participación en la promoción de la actividad DNA-polimerasa 5'-3' de la proteína del gen 5 del bacteriófago T7 (Tabor et al, 1986) y en la producción de fagos filamentosos (Model y Russek, 1986). La analogía existente entre los moduladores artificiales y fisiológicos de la FBPasa (y otras enzimas del cloroplasto) conduce a

postular que un rol de la tiorredoxina en la regulación es la modificación de ciertas interacciones intramoleculares no covalentes de la enzima. En este sentido, los experimentos de cromatografías de afinidad llevados a cabo por Pla y López-Gorgé (1981) confirman lo antedicho ya que sus resultados sugieren la existencia de interacciones hidrofóbicas entre la FBPasa de cloroplastos y la tiorredoxina. Más aun, Schürmann et al (1986) mostraron que el área estructural involucrada en la interacción proteína-proteína, tanto en la tiorredoxina de E. coli como en la tiorredoxina-m de cloroplastos, contiene una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos.

Aunque la fructosa-2,6-bisfosfato no es un metabolito del estroma cloroplástico (Cseke y Buchanan, 1986), su efecto dual en la FBPasa de cloroplastos demuestra, como se había visto previamente con el Ca^{2+} (Hertig y Wolosiuk, 1983), que la modulación de los procesos de activación y catálisis es diferente. Por otro lado, ni el DTT ni la tiorredoxina de cloroplasto alteran la velocidad de hidrólisis de FBP en la enzima activa; la ausencia de un cambio significativo en la velocidad de catálisis por tiorredoxina evidencia que la interacción proteína-proteína es específica para la activación e inefectiva en la catálisis. El análisis de los procesos que constituyen la actividad de la FBPasa de cloroplastos revela que los aniones caotrópicos no semejan en todos los aspectos a la tiorredoxina reducida y sí muestran similitud con los solventes orgánicos: las sales neutras estimulan la actividad específica de la FBPasa e inhiben la velocidad de hidrólisis de la FBP. La posibilidad de que la inhibición se

ejerza sobre la formación del complejo enzima-sustrato. parece remota ya que los $S_o.s$, para el sustrato (FBP) y el cofactor (Mg^{2+}), permanecieron constantes. Dado que las concentraciones de sales requeridas para la inhibición de la catálisis descarta la posibilidad alternativa de desnaturalización de la enzima, es probable que la disminución de la $V_{máx}$ exprese cambios sutiles en el estado de transición del complejo enzima-sustrato. En este aspecto, el efecto de los aniones caotrópicos en la fase catalítica de la FBPasa es similar al de las inhibiciones observadas con otras enzimas (Massey, 1953; Fridovich, 1963; Greaney y Romero, 1979; Griffith et al, 1986); sin embargo, y en contraste con estas, la enzima del cloroplasto exhibió una característica adicional: la activación.

Los resultados obtenidos en los estudios efectuados en la regulación de otras enzimas del cloroplasto muestran semejanzas con los datos presentados sobre la FBPasa. La NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa y la NADP-Malato deshidrogenasa son dos enzimas claves cuya actividad específica es estimulada por la luz "in vivo" y por tioredoxina "in vitro" (Ziegler y Ziegler, 1965; Wolosiuk y Buchanan, 1978; Johnson, 1971; Wolosiuk et al, 1977). Aunque estas dos enzimas resultan activadas como la FBPasa tanto por solventes orgánicos como por aniones caotrópicos, los requerimientos para la estimulación de la actividad específica conforman una característica de cada enzima (Wolosiuk et al, 1985, 1986 y 1987; Crawford et al, 1986). No se necesita ningún modulador para aumentar la actividad de la NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa aun cuando la presencia de un cosolvente o un anión caotrópico disminuye

el A_{o.s} para otros moduladores (Pi, ATP, NADPH) (Wolosiuk et al, 1986 y 1987; sección 3.2.1. de la presente tesis); por otro lado, tanto el DTT como la tiorredoxina-m se requieren estrictamente en la activación de la NADP-Malato deshidrogenasa (Crawford et al, 1986). Para estas enzimas, la concentración de solventes orgánicos y aniones caotrópicos, estimuladora para la actividad, correlaciona con el coeficiente de partición octanol/agua y la serie de Hofmeister, respectivamente. De esta manera, y aunque la activación de las enzimas del estroma del cloroplasto es el resultado de un conjunto de procesos (reducción, interacción enzima-modulador[es]), la modificación de interacciones hidrofóbicas constituye en estas proteínas un mecanismo importante en el control de su actividad.

3.1.2. ESTUDIOS ESTRUCTURALES SOBRE LA ACTIVACION DE LA FBPasa

Datos previos (Hertig y Wolosiuk, 1980 y 1983; Corley y Wolosiuk, 1985) y los resultados presentados en el capítulo anterior indican que la actividad específica de la FBPasa de cloroplastos es estimulada por preincubación con DTT, FBP, Ca^{2+} y, ya sea, una proteína del cloroplasto (tiorredoxina) o perturbantes no fisiológicos (solventes orgánicos y aniones caotrópicos). La tiorredoxina de cloroplastos, el 2-propanol y el tricloroacetato disminuyen el $\text{A}_{0.5}$ para FBP y modifican levemente el $\text{A}_{0.5}$ para el Ca^{2+} . Además, dichos sistemas no alteran la estructura cuaternaria de la enzima y aumentan el número de grupos -SH reactivos. Estos estudios indicaron que la reducción de puentes disulfuro en la FBPasa de los cloroplastos correlaciona con el aumento de actividad (Pradel et al, 1981; Aragnol et al, 1985; Droux et al, 1987).

Aunque en cloroplastos, como en otros sistemas, la tiorredoxina participa como transportador de H en ciclos SH-/-S-S- (Buchanan et al, 1979; Scheibe, 1981; Holmgren, 1985), los otros modificadores enzimáticos, o sea, los solventes orgánicos y los aniones caotrópicos, no participan en reacciones redox: el grado de activación de la FBPasa mediada por cosolventes correlaciona con el coeficiente de partición octanol/agua de cada solvente (Lea et al, 1971; Corley y Wolosiuk, 1985), en tanto que la concentración de anión caotrópico necesaria para la máxima estimulación enzimática correlaciona con la serie liotrópica (Hofmeister) (sección 3.1.1.1. de esta tesis). Tanto los cosolventes como

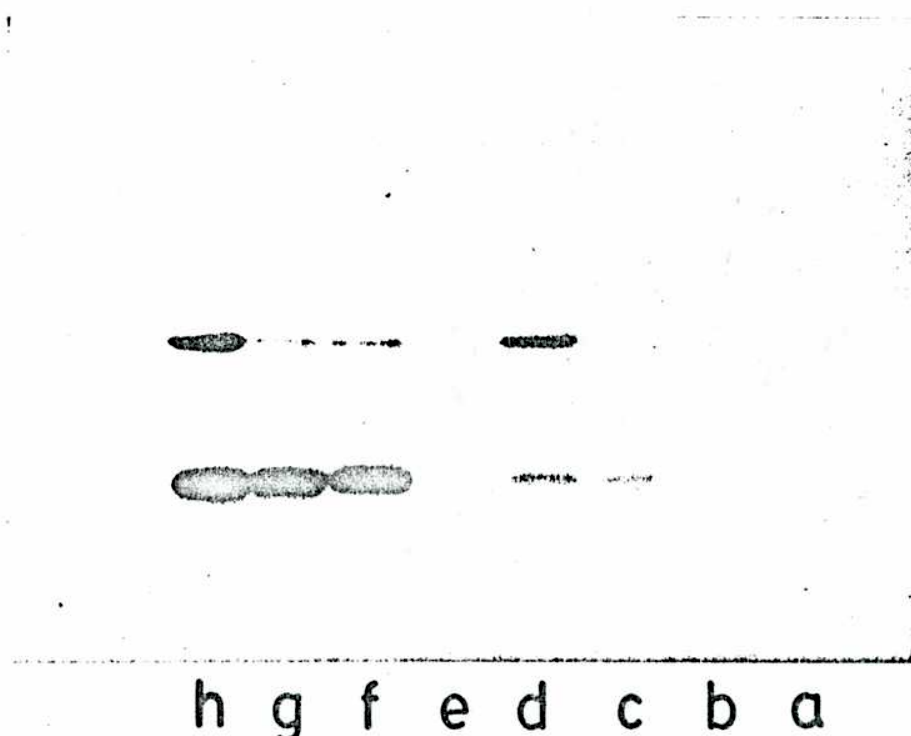
los aniones caotrópicos alteran la estructura del agua, la que a su vez modifica las interacciones de las regiones no polares de la proteína con el solvente (Edelhoch y Osborne, 1976; Nemethy et al., 1981; Collins y Washabaugh, 1985; Washabaugh y Collins, 1986). Así, el efecto de los perturbantes no fisiológicos en la FBPasa de cloroplastos sugiere que la modificación de las interacciones hidrofóbicas (intramoleculares) acompañaría la conversión a una forma catalíticamente más activa. Sobre esta base, en el proceso de activación de la FBPasa de cloroplastos, la interacción con tiorredoxina de cloroplastos causaría un cambio en la estructura terciaria de la enzima.

Utilizando la técnica desarrollada en el capítulo anterior para visualizar cambios conformacionales, mediante la aplicación de electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes sobre fragmentos tripticos de proteínas marcadas, se iniciaron estudios estructurales con la FBPasa sometida previamente a diversos tratamientos. El objetivo principal de estos experimentos fue el de comparar las modificaciones estructurales obtenidas luego de que los tres sistemas de activación caracterizados hasta el momento (tiorredoxina, solventes orgánicos y aniones caotrópicos) estimularan la actividad específica de la FBPasa.

3.1.2.1. EFECTO DE REDUCTORES Y AGENTES DESNATURALIZANTES SOBRE LA EXPOSICION DE GRUPOS -SH EN LA FBPasa

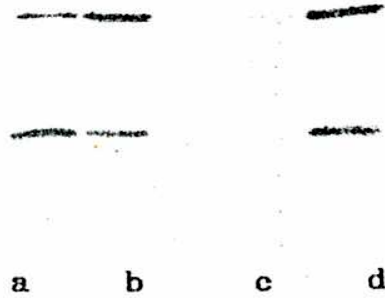
Para determinar si la alteración de la estructura proteica modifica la exposición al solvente de los grupos tioles y disulfuros, se trató primero a la FBPasa con distintos agentes conocidos como desnaturizantes de proteínas (Tanford, 1968), en las siguientes concentraciones: SDS 1%, tiocianato de guanidina [GuSCN] 4 M y urea 6 M, en presencia y en ausencia de DTT 2.5 mM. En una posterior incubación se marcaron los grupos -SH con [1-¹⁴C]-Iodoacetamida y, luego de una digestión triptica, los fragmentos resultantes se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (con SDS). Como se observa en la figura 18, en ausencia de DTT, solo el SDS 1% condujo a la exposición de grupos tioles en un dominio de la enzima que originó el polipéptido de 16.000 Da, mientras que otro fragmento reactivo con la Iodoacetamida (P.M.= 10.000) fue levemente marcado por la incubación en presencia de SDS o urea. Por su parte, el GuSCN no promovió la exposición de dichos tioles. En este experimento, la incorporación de DTT 2.5 mM en la incubación inicial permitió el marcado del fragmento de 10.000 Da en presencia de cualquiera de los tres desnaturizantes. En ausencia de los desnaturizantes, el DTT no facilitó la incorporación de radioactividad. En otro experimento, la FBPasa fue preincubada en presencia de SDS 1% y diversos tioles: 2-mercaptoetanol (5 mM), cysteamina (5 mM) y 2,3-dimercaptosuccínico (2.5 mM). En este caso, y como

Figura 18: ANALISIS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE LA FBPasa TRATADA CON DTT Y AGENTES DESNATURALIZANTES DE PROTEINAS



La FBPasa (52 μg) fue incubada a 23°C en 0.1 ml de una solución de buffer Tris-ClH 0.1 M (pH: 7.9) que contenía: 0.4 mmol de tiocianato de guanidina (calle b); 0.6 mmol de Urea (calle c); 1 mg de SDS (calle d); 0.25 μmol de DTT (calle e); 0.25 μmol de DTT y 0.4 mmol de tiocianato de guanidina (calle f); 0.25 μmol de DTT y 0.6 mmol de Urea (calle g); y, 0.25 μmol de DTT y 1 mg de SDS (calle h). En el control (calle a) se completó el volumen con agua. Luego de 60 minutos, las muestras fueron sometidas sucesivamente a S-carboxiamidometilación, proteólisis con tripsina y separación de los productos por electroforesis en geles desnaturalizantes de Poliacrilamida, como se describe en las secciones 2.3. y 2.15, respectivamente, de materiales y métodos.

Figura 19: ANALISIS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE
POLIACRILAMIDA DE LA FBPasa TRATADA CON SDS Y AGENTES
REDUCTORES



La FBPasa (52 μ g) fue incubada a 23°C en 0.1 ml de una solución de buffer Tris-ClH 0.1 M (pH: 7.9) y SDS 1% conteniendo: 0.25 μ mol de DTT (calle a); 0.25 μ mol de 2,3-dimercaptosuccínico (calle b); 0.5 μ mol de cisteamina (calle c); y 0.5 μ mol de β -mercaptoetanol (calle d). Luego de 60 minutos, las muestras fueron sometidas sucesivamente a S-carboxiamidometilación, proteólisis con tripsina y separación de los productos por electroforesis en en geles desnaturalizantes de Poliacrilamida, como se describe en las secciones 2.3. y 2.15, respectivamente, de materiales y métodos.

se observa en la figura 19, ambos fragmentos (16.000 Da y 10.000 Da) reaccionaron con la Iodoacetamida. Sin embargo, en presencia del 2,3-dimercaptosuccínico se marcó preferencialmente el fragmento de 16.000 Da. Estos resultados indican que la reducción de puentes disulfuro y la exposición de dominios que contienen grupos tioles en la FBPasa, para la S-carboxiamidometilación, se originaron por los cambios conformacionales causados por la acción concertada de un tiol y un agente desnaturizante. Más aun, la reducción de puentes disulfuro, los cuales estarían aparentemente ubicados en el fragmento de 10.000 Da, dependió de otros sustituyentes en el reactivo tiol. Es remarcable que aquellos tioles que promovieron la S-carboxiamidometilación del fragmento de 10.000 Da estimularon la actividad específica de la enzima (ver tabla 3 en la sección 3.1.1.), mientras que los ditioles con cargas negativas fueron inefectivos en ambos aspectos.

3.1.2.2. S-CARBOXIAMIDOMETILACION DEPENDIENTE DE LOS MODULADORES EN LA FBPasa

Si los moduladores que estimulan la actividad específica de la FBPasa provocan tanto cambios conformacionales como la reducción de puentes disulfuro, la aplicación de las técnicas utilizadas en los experimentos anteriores, daría patrones similares, en un gel de poliacrilamida luego de una electroforesis, a los obtenidos por exposición de la enzima a tioles y desnaturizantes.

Luego de una incubación de la FBPasa con DTT 2.5 mM, FBP 4 mM y Cl_2Ca 0.3 mM, la actividad específica fue de

80 μ moles F6P formado.min⁻¹.mg prot⁻¹. Disminuyendo la concentración de FBP y Ca²⁺ en la preincubación a 0.8 mM y 0.05 mM, respectivamente, la enzima permaneció inactiva. La incorporación de propanol 15% o de tricloroacetato de sodio 0.15 M a la solución que contenía bajas concentraciones (no estimulantes) de los moduladores FBP y Ca²⁺, restauró en la FBPasa la anterior actividad específica. Cuando después de estas activaciones, que rindieron formas activas o inactivas de la enzima, la FBPasa fue sucesivamente tratada con Iodoacetamida radioactiva y tripsina, solo aquellas muestras con capacidad catalítica presentaron fragmentos radioactivos en un gel de poliacrilamida luego de una electroforesis bajo condiciones disociantes. Como se observa en la figura 20, la incubación de la FBPasa con DTT 2.5 mM, FBP 4 mM y Cl₂Ca 0.3 mM, y el posterior tratamiento con [1-¹⁴C]-Iodoacetamida, produjo dos bandas marcadas con ¹⁴C (P.M.= 16.000 y 10.000 Da) (calle b). Contrariamente, no hubo incorporación de radioactividad cuando se disminuyó la concentración de FBP y Ca²⁺ a 0.8 mM y 0.05 mM, respectivamente (calle e). Sin embargo, ambos fragmentos fueron S-carboxiamidometilados cuando se incorporó a la anterior solución, 2-propanol 15% o tricloroacetato de sodio 0.15 M antes de efectuar el tratamiento con Iodoacetamida (calles c y d). Las soluciones de FBPasa que no fueron preincubadas con DTT (calle a) o con FBP y Ca²⁺ (calle f) no rindieron polipéptidos radioactivos en los geles. Aunque la radioactividad incorporada en los fragmentos tripticos originados por la incubación de la FBPasa con DTT 2.5 mM y SDS 1% (calle g) fue semicuantitativamente mayor que la presentada por los mismos provenientes de las incubaciones de la FBPasa con sus

Figura 20: ANALISIS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE
POLIACRILAMIDA DE LA FBPasa TRATADA CON DTT, FBP, Ca²⁺,
2-PROPANOL Y TRICLOROACETATO DE SODIO

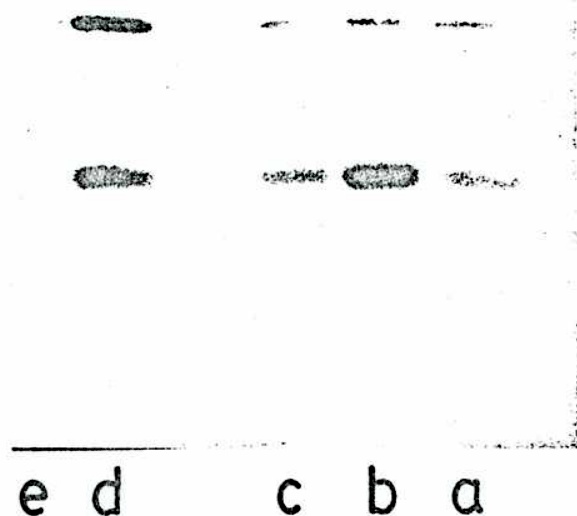


La FBPasa (52 μg) fue incubada a 23°C en 0.1 ml de buffer Tris-ClH 0.1 M (pH: 7.9) conteniendo: 1 μmol de FBP y 0.1 μmol de Cl_2Ca (calle a); 0.4 μmol de FBP, 0.03 μmol de Cl_2Ca y 0.25 μmol de DTT (calle b); 0.08 μmol de FBP, 50 nmol de Cl_2Ca , 0.25 μmol de DTT y 0.015 ml de 2-propanol (calle c); 0.08 μmol de FBP, 50 nmol de Cl_2Ca , 0.25 μmol de DTT y 15 μmoles de tricloroacetato de sodio (calle d); 0.08 μmol de FBP, 50 nmol de Cl_2Ca y 0.25 μmol de DTT (calle e); 0.25 μmol de DTT (calle f); 0.25 μmol de DTT y 1 mg de SDS (calle g); y marcadores de peso molecular (calle m), los que fueron detallados en la sección 2.15. de materiales y métodos. Luego de 15 minutos, las muestras fueron sometidas a los tratamientos señalados en las Figuras 30 y 31, y descriptos en detalle en las secciones 2.3. y 2.15 de materiales y métodos.

moduladores, la posición relativa de las bandas radioactivas fue similar. Es de destacar que el Rf de las bandas descritas permaneció constante tanto para la enzima tratada con sus moduladores como para la incubada con desnaturalizantes. En comparación con los experimentos llevados a cabo con desnaturalizantes de proteínas, estos resultados demuestran que la conversión de la FBPasa a una forma activa requiere un cambio conformacional y la reducción de puentes disulfuro.

Así como el 2-propanol y el tricloroacetato, la tiorredoxina-f aumenta la actividad específica de la enzima disminuyendo el A_{0.5} para la FBP. Es por ello que se analizó si la preincubación de la FBPasa con bajas concentraciones (no estimulantes) de DTT, FBP y Ca²⁺, en presencia de la tiorredoxina-f de cloroplastos conducía a un posterior marcado de la enzima con [1-¹⁴C]-Iodoacetamida. Los resultados de la figura 21 evidencian que, similarmente a lo que ocurre con los perturbantes no fisiológicos, la tiorredoxina-f cooperó con los moduladores en la exposición de los -SH para la posterior reacción con la Iodoacetamida (calle d).

Figura 21: ANALISIS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE LA FBPasa TRATADA CON DTT, FBP, Ca²⁺ Y TRICLOROACETATO DE SODIO, 2-PROPANOL O TIORREDOXINA-F



La FBPasa (52 μg) fue incubada a 23°C en 0.1 ml de buffer Tris-ClH 0.1 M (pH: 7.9), DTT 2.5 mM, FBP 0.8 mM, Cl₂Ca 0.05 mM, conteniendo: ningún agregado (calle a); 15 μmoles de tricloroacetato de sodio (calle b); 0.015 ml de 2-propanol (calle c); 12 μg de tiorredoxina-f de cloroplastos (calle d); y marcadores de peso molecular (calle m), los que fueron indicados en la sección 2.15. de materiales y métodos. Como control, 12 μg de tiorredoxina de cloroplastos fueron incubados en 0.1 ml de buffer Tris-ClH 0.1 M (pH: 7.9) (calle e). Luego de 15 minutos, las muestras fueron sometidas a los tratamientos señalados en las Figuras 30 y 31, y descriptos en detalle en las secciones 2.3. y 2.15 de materiales y métodos.

3.1.2.3. DISCUSION:

La reacción de la [1-¹⁴C]-Iodoacetamida con la FBPasa de cloroplastos, en presencia de SDS 1%, marca un dominio que por digestión triptica produjo un fragmento de 16.000 Da; en este aspecto, la urea y el tiocianato de guanidina fueron mucho menos efectivos. Por otro lado, la S-carboxiamidometilación de los dominios de la enzima que contienen el fragmento triptico de 10.000 Da fue estimulada por el efecto concertado de un tiol, funcional en la estimulación de la actividad enzimática, y cualquiera de los mencionados desnaturizantes de proteínas. De manera que la reducción de puentes disulfuro y la exposición de grupos sulfhidrilos requirió un cambio conformacional de la FBPasa y un reductor apropiado. Bandas similares de proteína aparecieron marcadas con Iodoacetamida radioactiva cuando la FBPasa fue inicialmente incubada, ya sea, con altas concentraciones de moduladores (DTT, FBP, Ca²⁺) o con bajas concentraciones de los mismos en presencia de tiorredoxina-f o perturbantes no fisiológicos. Por analogía con los efectos estructurales de tioles y desnaturizantes de proteínas en la enzima, se infiere que la estimulación de la actividad específica de la FBPasa, por la acción concertada de moduladores y modificadores, provino de cambios conformacionales y de reducción. En estos procesos, tanto la tiorredoxina como los modificadores no fisiológicos disminuyeron la concentración de moduladores para la modificación de la enzima. Experimentos llevados a cabo con un tiol y altas concentraciones de FBP y Ca²⁺ confirmarían este punto de vista: la actividad específica de la enzima

fue alta (Hertig y Wolosiuk, 1983; Corley y Wolosiuk, 1985; sección 3.1.1 de la presente tesis) y ambos dominios proteicos fueron marcados con [1-¹⁴C]-Iodoacetamida (calle b, figura 20). Tanto el aumento de la actividad específica como la exposición de residuos tioles en la FBPasa, en un proceso independiente de la tiorredoxina-f, difieren con los resultados en los cuales la tiorredoxina, en presencia de la Ferredoxina-tiorredoxina reductasa, fue el intermediario apropiado para la reducción del grupo aceptor de H (puente disulfuro) con una proteína transportadora de electrones (Ferredoxina) (Droux et al, 1987). Como corolario de estos estudios, surge que la S-carboxiamidometilación con Iodoacetamida radioactiva no reveló si la forma activa de la FBPasa se originó por incubación con tiorredoxina-f o perturbantes no fisiológicos. Es decir, la incorporación de ¹⁴C a partir de Iodoacetamida, no discrimina si existen diferentes reactividades en las formas de la FBPasa activadas con Tiorredoxina-f o perturbantes no fisiológicos. Sin embargo, otros estudios del laboratorio, indicaron que esta semejanza era aparente: la sensibilidad de la forma activa de la FBPasa al cloruro de dansilo fue dependiente del modulador utilizado en la activación (H. Labate, datos no publicados).

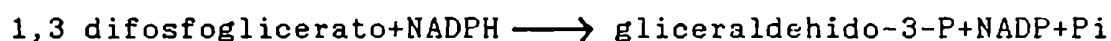
La tiorredoxina de los cloroplastos fue considerada como transportadora de H con capacidad para reducir puentes disulfuro en compuestos de bajo peso molecular y proteínas (Buchanan et al, 1979; Scheibe, 1981; Holmgren, 1985). Sin embargo, y como se plantea en la Introducción de esta Tesis, esta proteína fue funcional en promover la actividad DNA-polimerasa de la proteína del

gen 5 del fago T7 (Tabor et al, 1986) y la de la producción de fagos filamentosos (Model y Russel, 1986; Russel y Model, 1986). Los estudios presentes mostraron que la tiorredoxina-f fue reemplazada en su capacidad para: a) estimular la actividad específica y b) exponer dominios conteniendo sulfuros por modificadores no involucrados en procesos redox, o sea, los solventes orgánicos (Corley y Wolosiuk, 1985) y los aniones caotrópicos (sección 3.1.1. de la presente tesis). Más aun, en experimentos preliminares, se vió que la FBPasa fue activada por DTT, FBP, Ca^{2+} y alta presión (G. Prat Gay, datos no publicados). Por la correlación entre las características conocidas de estos modificadores no fisiológicos (Lea et al, 1971; Edelhoeh y Osborne, 1976; Nemethy et al, 1981; Collins y Washabaugh, 1985; Washabaugh y Collins, 1985; Morild, 1981; Weber y Drickamer, 1983) y los cambios en las constantes cinéticas de la FBPasa, se concluyó en que la tiorredoxina, en una acción concertada con la FBP y el Ca^{2+} , contribuyó a la modificación de las interacciones hidrofóbicas (intramoleculares) de la enzima. La NADP-GAPD, la PRK y la NADP-malato deshidrogenasa fueron también estimuladas por tiorredoxina, cosolventes y aniones caotrópicos (Scheibe y Fickenscher, 1985; Crawford et al, 1986; Wolosiuk et al, 1986 y 1987); por lo tanto, las modificaciones estructurales mediadas por la tiorredoxina aparecen como un mecanismo importante en el control dependiente de la luz de la actividad enzimática en los cloroplastos.

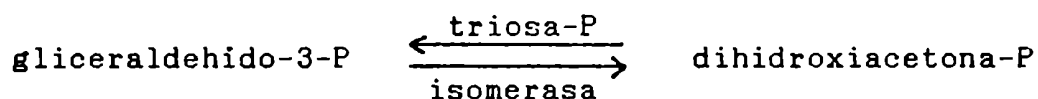
3.2. GLICERALDEHIDO-3-P DESHIDROGENASA DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA

3.2.1. MODULACION DE LA ACTIVIDAD NADP-GLICERALDEHIDO-3-P DESHIDROGENASA POR ANIONES CAOTROPICOS

La NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa cataliza el único paso reductivo en el ciclo de Benson-Calvin de la asimilación fotosintética del CO₂, ya que usa como sustrato poder reductor (NADPH) generado fotoquímicamente. La reacción enzimática es la siguiente:



en un paso posterior:



De esta manera, mediante la regulación de la síntesis de gliceraldehido-3-P, se controla la concentración de triosas-P. Este metabolito y la dihidroxiacetona-P (en equilibrio por la presencia de la triosa-P isomerasa) juegan un rol importante en el metabolismo del cloroplasto por cuanto pueden ser: 1) exportadas al citoplasma para la síntesis de sacarosa, 2) metabolizadas en el cloroplasto para la acumulación de almidón, o bien 3) incorporadas nuevamente al ciclo reductivo de las pentosas-fosfato para la regeneración del aceptor de CO₂, la ribulosa-1,5-bisfosfato (Heber et al, 1979 y 1986; Heldt, 1976).

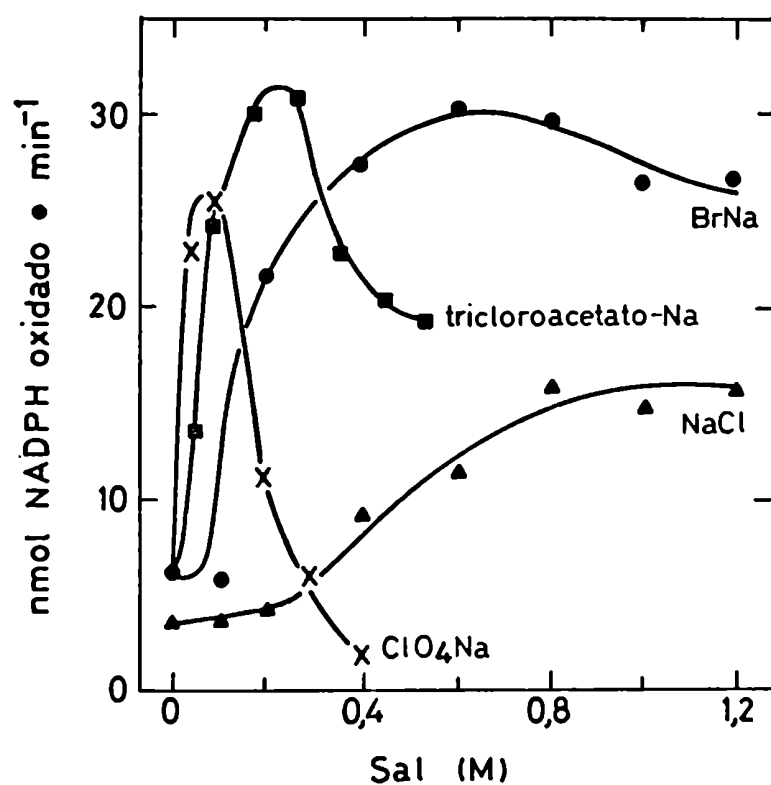
Así como otras enzimas del cloroplasto, la NADP-GAPD resulta activada por la luz "in vivo" (Ortwerth, 1966; Ziegler y Ziegler, 1966; Ziegler et al, 1968). Por otra parte, y tal como se explica en la Introducción, presenta comportamiento histerético (Frieden, 1970 y 1971). Se han establecido "in vitro" varios mecanismos para la activación de esta enzima: a) Efectores: NADPH, ATP, Pi (Wolosiuk y Buchanan, 1976; Wolosiuk et al, 1976) y b) Reductores: Tiorredoxina reducida fotoquímicamente por el sistema Ferredoxina/tiorredoxina, o químicamente con DTT. Aparte de estos efectores fisiológicos, se ha demostrado que la actividad NADP-dependiente de esta enzima puede ser estimulada por micelas de detergentes (Wolosiuk et al, 1987) y también, tal como la Fructosa-1,6-bisfosfatasa, por solventes orgánicos (Wolosiuk et al, 1985). Por lo tanto, la modificación de dominios hidrofóbicos en esta enzima también conduce a formas activas.

Los aniones caotrópicos, al desestabilizar la estructura del agua, permiten que grupos hidrofóbicos se expongan al medio, y con ello facilitan la conversión de una enzima a una forma con diferentes propiedades cinéticas. Por este motivo, se resolvió ensayar los mismos en esta enzima del ciclo de Benson-Calvin. Ya que la actividad específica pudo ser estimulada, el conjunto de todos los resultados obtenidos hasta el momento conduce a la idea de que las modificaciones de las interacciones hidrofóbicas intramoleculares en las enzimas estromáticas conforman un factor fundamental en el proceso de activación de las mismas.

3.2.1.1. ESTIMULACION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA NADP-GLICERALDEHIDO-3-P DESHIDROGENASA POR ANIONES CAOTROPICOS

De acuerdo a lo expuesto en la Introducción, dos etapas constituyen la actividad de la NADP-Gliceraldehido-3-P-deshidrogenasa: a) la modificación y b) la catálisis. Para analizar el efecto de los aniones caotrópicos en la etapa de la modificación se preincubó a la enzima con concentraciones variables de los mismos y luego se ensayó espectrofotométricamente la oxidación de los nucleótidos de piridina reducidos, dependiente de 3-fosfoglicerato y ATP. En este experimento la concentración de cada sal de Na se mantuvo constante durante la fase de catálisis de manera que las diferencias observadas se debieron exclusivamente a sus efectos en la preincubación. En la figura 22 se muestra que a bajas concentraciones de sales la actividad específica fue estimulada en tanto que a altas concentraciones fue inhibida. En experimentos paralelos se observó que por acción de las sales neutras la actividad específica de la NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa aumentó linealmente en los primeros 45 segundos de preincubación y alcanzó el valor máximo (constante) después de los 3 minutos. El uso de diferentes sales de sodio probó que la concentración requerida para la máxima estimulación de la actividad específica dependió de los aniones. En este aspecto, el ordenamiento de los aniones de acuerdo a su efectividad molar (ascendente), conforma la serie liotrópica de Hofmeister: ClO_4^- (0.08 M) < Cl_3CO_2^- (0.24 M) < Br^- (0.6 M) < Cl^- (1.0 M).

Figura 22: ACTIVACION DE LA NADP-GAPD MEDIADA POR ANIONES
CAOTROPICOS



La enzima (5 μg de proteína) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo 10 μmoles de buffer Tris-ClH (pH: 7.9) y, según se indica, las correspondientes sales de sodio. Luego de 5 minutos, la enzima fue ensayada para la actividad asociada al NADP, como se describe en la sección 2.6. de materiales y métodos. La concentración de cada una de las sales de sodio se mantuvo en 20 mM durante la fase catalítica.

Con el fin de establecer si el efecto de la sal constituía un carácter particular de la gliceraldehído-3-P deshidrogenasa fotosintética de cloroplastos se compararon las actividades NADP- y NAD- dependientes de esta enzima con preparaciones enzimáticas de dos sistemas diferentes: a) cianobacterias (*Anabaena* sp 7119) y b) tejido de mamíferos (músculo de conejo). En este y los siguientes experimentos se utilizó BrNa como modelo de sal neutra por dos motivos: 1) es la sal con la que se obtiene la máxima actividad específica de la enzima. 2) no presenta efectos secundarios en soluciones acuosas. Como se ve en la tabla 7, el BrNa estimuló solamente la actividad NADP-dependiente de la enzima de cloroplastos. En ninguno de los tres sistemas fue modificada la actividad NAD-dependiente así como tampoco lo fue la actividad NADP-dependiente de las enzimas de músculo de conejo y cianobacterias. En ensayos paralelos se observaron resultados similares cuando el BrNa fue reemplazado por tricloroacetato de sodio.

Si el cambio conformacional mediado por los aniones caotrópicos fuera similar al producido por el efecto de los moduladores fisiológicos (potenciales) en la activación de la NADP-gliceraldehído-3-P deshidrogenasa, la enzima debería retornar a su actividad basal al remover el perturbante del medio. De otra manera, el efecto de la sal sería el de un cambio irreversible (desnaturalización). Con el fin de dilucidar esta alternativa se trató a la Gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa según el siguiente esquema: 1) preincubación de la enzima con BrNa 0.5 M a 23°C

Tabla 7: ESPECIFICIDAD DEL EFECTO DEL BrNa EN LA GAPD

FUENTE DE ENZIMA	NMOL NADPH OXID. POR MIN		NMOL NADH OXID. POR MIN	
	CONTROL	BrNa	CONTROL	BrNa
Cloroplastos de espinaca	8	25	23	25
Músculo de Conejo	0	0	60	48
<u>Anabaena</u> sp 7119	12	7	20	12

La respectiva enzima (cloroplastos de espinaca, 5 μ g; músculo de conejo (Sigma Chemical, Co.), 1.5 μ g; Anabaena sp 7119; 12 μ g) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de buffer Tris-ClH 0.1 M (pH: 7.9) conteniendo, según se indica, 0.5 M de BrNa. Luego de 5 minutos, la mezcla fue inyectada en la solución para ensayar la correspondiente actividad GAPD, según se describe en la sección 2.6. de materiales y métodos.

Tabla 8: REVERSIBILIDAD DEL EFECTO DEL BrNa EN LA NADP-GAPD DE CLOROPLASTOS

ETAPA	TRATAMIENTO	ACTIVIDAD NADP-GAPD $\mu\text{mol NADPH oxid. min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$
1°	Ninguno	8
2°	Preincubación con BrNa	25
3°	Diálisis	6
4°	Preincubación del dializado con BrNa	22

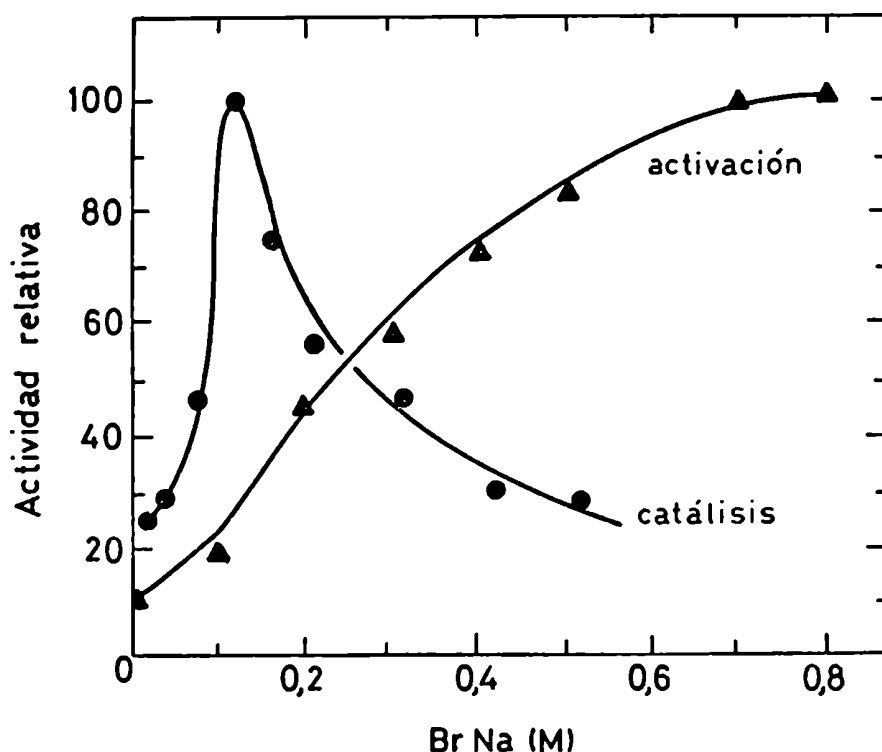
1° etapa: la enzima (5 μg) fue preincubada durante 10 minutos a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo en μmoles : buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 5. 2° etapa: la enzima (10 μg) fue preincubada durante 10 minutos a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo en μmoles : buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 5 y BrNa, 50. 3° etapa: efectuada la misma preincubación que en la 2° etapa, se dializó la muestra contra buffer Tris-ClH 30 mM durante 10 horas. 4° etapa: la fracción proveniente de la etapa 3° (4 μg de enzima) fue nuevamente preincubada durante 10 minutos a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo en μmoles : buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 5 y BrNa, 50. En todos los casos, luego de las preincubaciones, se ensayó la actividad enzimática como se describe en la sección 2.6. de materiales y métodos.

2) remoción de la sal del medio y 3) nueva preincubación de la enzima con el anión caotrópico. Cuando el BrNa se removió ya sea por diálisis, como se muestra en la tabla 8, o por filtración por gel (en experimentos no mostrados), la actividad NADP-dependiente de la gliceraldehido-3-P deshidrogenasa retornó a su valor basal volviendo a aumentar por una nueva incubación con la sal. Por otro lado, la actividad NAD-dependiente no cambió durante estos tratamientos.

3.2.1.2. EFECTO DE LOS ANIONES CAOTROPICOS EN LA FASE CATALITICA DE LA NADP-GLICERALDEHIDO-3-P DESHIDROGENASA

Dado que los aniones caotrópicos estimularon la actividad específica de la enzima (durante la fase de modificación), se decidió estudiar su influencia en el proceso de catálisis. En estos experimentos, para obviar algún efecto de las sales sobre la enzima auxiliar (3-fosfoglicerato fosfoquinasa), se ensayó la reducción del NADP en presencia de gliceraldehido-3-P y arseniato. La velocidad de catálisis resultó estimulada por bajas concentraciones de BrNa (5 veces a 0.12 M) e inhibida a concentraciones supraóptimas, tal como se observa en la figura 23. Así como en los efectos de los aniones caotrópicos (figura 6) y los cosolventes (Corley y Wolosiuk, 1985) sobre la Fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos, la concentración de anión caotrópico que aumentó la actividad específica de la deshidrogenasa fue mayor que la que estimuló la catálisis. Aunque las condiciones "in vitro" para la activación de la enzima

Figura 23: EFECTO DEL BrNa EN LA NADP-GAPD DE CLOROPLASTOS



Activación: la enzima (5 μg) fue incubada a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo 10 μmoles de buffer Tris-ClH (pH: 7.9) y BrNa, como se indica. Luego de 5 minutos, una alícuota de la mezcla fue inyectada en la solución para el ensayo de la dirección oxidativa descrita en la sección 2.6. de materiales y métodos. La concentración del BrNa durante la catálisis se mantuvo en 20 mM.

Actividad control: 20 nmol NADP reducido.min⁻¹

Catálisis: la activación de la GAPD de cloroplastos (1 μg) se realizó durante 5 minutos a 23°C en 0.1 ml de una solución conteniendo (en μmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10 y BrNa, 50. Luego de la preincubación, una alícuota de la mezcla fue inyectada en la solución de ensayo, para la dirección oxidativa, conteniendo, como se indica, concentraciones variables de BrNa.

Actividad control: 25 nmol NADP reducido.min⁻¹

difieren de las requeridas para la catálisis, estos resultados no establecen si hay distintos dominios enzimáticos involucrados. De todas maneras y optimizando el sistema, la actividad de la NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa pudo ser estimulada 25 veces seleccionando las concentraciones de BrNa a utilizar en las fases de activación (0.5 M) y catálisis (0.1 M).

3.2.1.3. ACTIVACION CONCERTADA DE LA NADP-GLICERALDEHIDO-3-P DESHIDROGENASA

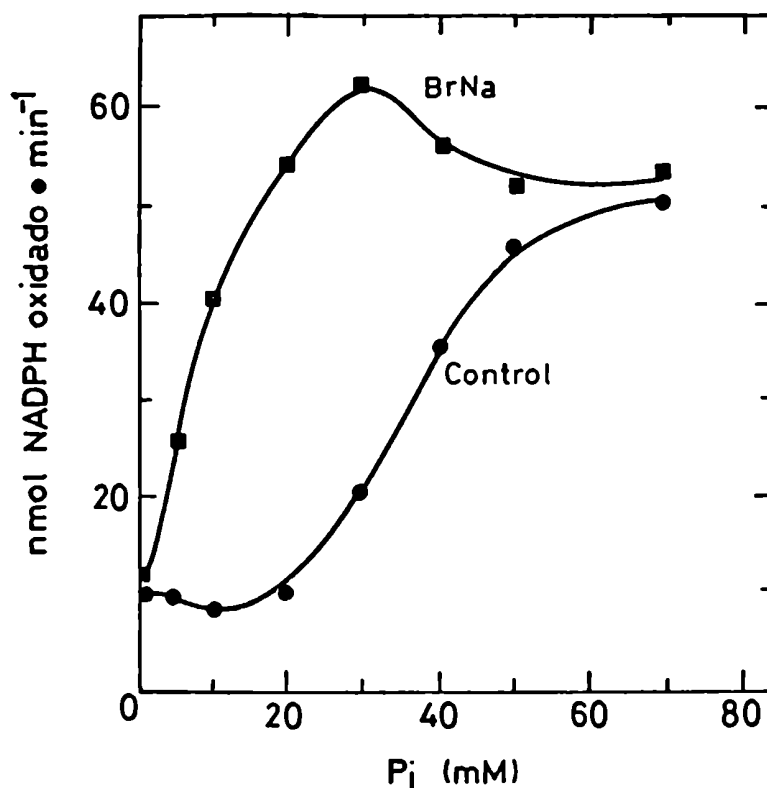
Tal como se describe en la Introducción, la NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa puede ser activada "in vitro" por altas concentraciones de ya sea metabolitos propios del cloroplasto (ATP, NADPH, Pi) (Wolosiuk y Buchanan, 1976; Wolosiuk, 1986; Pupillo y Giuliani-Piccari, 1975), tiorredoxina reducida (Wolosiuk et al, 1986; Wolosiuk y Buchanan, 1978) o solventes orgánicos (Wolosiuk et al, 1985 y 1986). Las concentraciones de estos moduladores, para la máxima estimulación pudieron ser disminuidas cuando otro modulador se incorporó en la preincubación (histéresis concertada) (Frieden, 1970): en experimentos descritos previamente concentraciones no activantes per-se, ya sea de metabolitos, tiorredoxina reducida o solventes orgánicos, disminuyeron el $A_{0.5}$ para Pi, ATP y NADPH (Wolosiuk et al, 1986; Wolosiuk y Buchanan, 1976). Sobre esta base, si los aniones caotrópicos actúan como moduladores secundarios, deberían disminuir el $A_{0.5}$ para los moduladores primarios. Con el fin de probar lo antedicho se midieron los efectos de bajas concentraciones (no activantes) del BrNa en la

estimulación de la actividad específica de la enzima mediada por Pi. Como se muestra en la figura 24, aun cuando una concentración de BrNa 0.1 M fue no estimuladora, el A.o.s para el Pi se redujo de 38 mM a 7 mM. En experimentos paralelos se vió que concentraciones similares de BrNa también disminuyeron el A.o.s tanto para el ATP como para el NADPH. De esta manera, los aniones caotrópicos semejan a los metabolitos del cloroplasto, a la tiorredoxina reducida y a los cosolventes, en ser funcionales para la activación concertada de la NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa.

3.2.1.4. EFECTO DE LOS ANIONES CAOTROPICOS EN LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA GLICERALDEHIDO-3-P DESHIDROGENASA

Luego de la incubación de la Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa (560.000 Da) con ciertos modificadores, el peso molecular de la misma pasa a ser 160.000, en tanto que el tratamiento con desnaturalizantes proteicos genera dos subunidades diferentes de 43.000 y 37.000 Da (Iadarola et al, 1986; Nicholson et al, 1987). Dado que moduladores, funcionales en la disociación de la enzima, también estimulan la actividad NADP-dependiente (Nicholson et al, 1987; Wara-Aswapati et al, 1980), se examinó el efecto de los aniones caotrópicos en el peso molecular de la gliceraldehido-3-P deshidrogenasa. Para ello, la enzima fue incubada durante 5 minutos en presencia de BrNa 0.5 M y luego cromatografiada en una columna de Superose 12, eluyendo con una solución que contenía BrNa 0.5 M. Como se observa en la figura 25, a una concentración óptima para

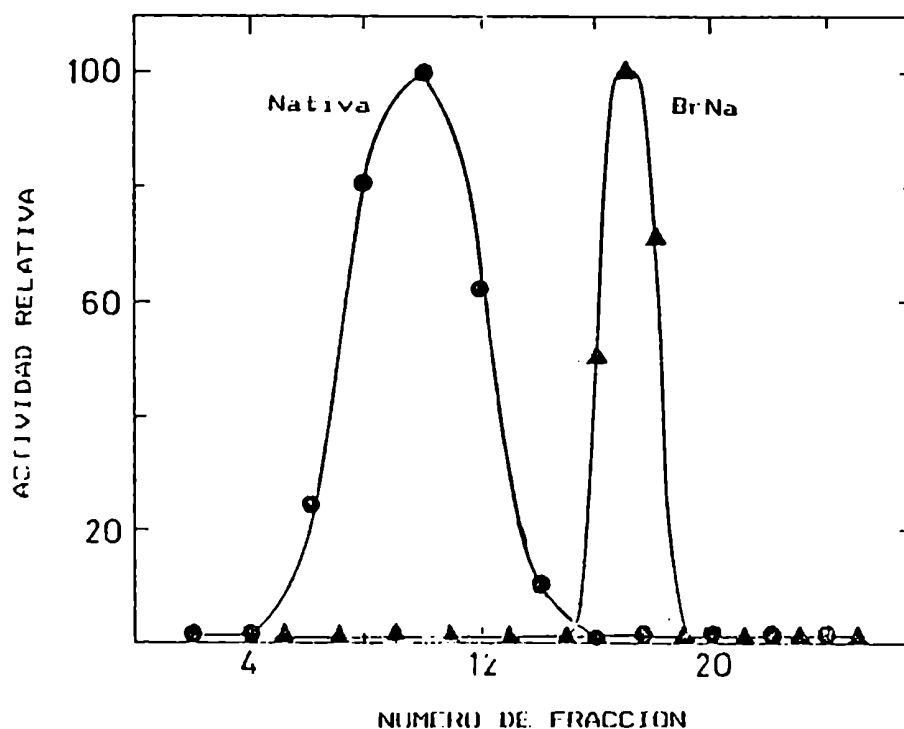
Figura 24: EFECTO DEL BrNa EN LA ACTIVACION DE LA NADP-GAPD
DE CLOROPLASTOS MEDIADA POR Pi



La enzima (30 μg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución de buffer Tris-ClH 0.1 M (pH: 7.9), conteniendo concentraciones variables de ortofosfato de potasio y, según se indica, 12 μmoles de BrNa. Luego de 5 minutos de preincubación, 0.02 ml de la mezcla enzimática fueron utilizados para determinar actividad NADP-GAPD, como se describe en la sección 2.6. de materiales y métodos, en presencia de Pi 2 mM y BrNa 2.4 mM.

estimular la actividad NADP-dependiente, el BrNa disminuyó el peso molecular de la enzima a 160.000; por otro lado, la estructura cuaternaria de la enzima se mantuvo cuando se omitió el BrNa tanto en el medio de preincubación como en la elución cromatográfica. En otros experimentos el tricloroacetato (0.2 M), también indujo la disociación de la enzima. Estos resultados demuestran que, en forma similar a otros modificadores que estimulan la actividad NADP-dependiente de la enzima, los aniones caotrópicos indujeron cambios en el estado de agregación de la Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa de los cloroplastos.

Figura 25: CROMATOGRAFIA EN SUPEROSE 12 DE LA NADP-GAPD
ACTIVADA POR BrNa



Nativa: 0.25 ml de una solución de GAPD (2.5 mg prot./ml) se sembraron en una columna de Superose 12 (1 x 30 cm) y se eluyeron con buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9), EDTA 10 mM y β -met 0.01 %.

Activada: la enzima (500 μ g) fue preincubada a 23°C en 0.25 ml de una solución conteniendo buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9), EDTA 10 mM, β -met 0.01 % y BrNa 0.5 M. A los 10 minutos de preincubación, la mezcla fue sembrada en la columna de Superose 12 (1 x 30 cm) equilibrada en la misma solución. La elución se efectuó con dicho buffer.

En ambos casos, el volumen de las fracciones de la columna fue de 0.4 ml, y la actividad NADP-GAPD de las mismas se determinó como se describe en la sección 2.6. de materiales y métodos.

3.2.1.5. DISCUSION

La estimulación de la actividad específica de la NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa por los aniones caotrópicos correlaciona con la serie liotrópica (Hofmeister), en forma similar a ciertas propiedades de varios compuestos, tanto de bajo como de alto peso molecular (Collins y Washabaugh, 1985; Von Hippel y Wong, 1964). La diversidad de procesos indica que los efectos son causados por modificaciones de las características del solvente. Los aniones caotrópicos cambian la estructura del agua alrededor de la proteína a consecuencia de lo cual la proteína modifica sus interacciones intramoleculares. De este modo, se facilita la exposición de dominios apolares al solvente (Hatefi y Hanstein, 1969; Collins y Washabaugh, 1985; Von Hippel y Wong, 1964). La hipótesis de que los cambios en las interacciones hidrofóbicas de la proteína participan en la activación de la NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa, es congruente con la estimulación de enzimas cloroplásticas mediada por solventes orgánicos (Wolosiuk et al, 1986; Lea et al, 1971).

Los resultados presentados en este capítulo muestran que los aniones caotrópicos aumentan la actividad NADP-dependiente mientras que la actividad NAD-dependiente no es modificada. Así, la estimulación inducida por sales neutras es específica para la actividad que tiene lugar en el ciclo reductivo de las pentosas-fosfato para la asimilación fotosintética del CO₂. Estas modificaciones mediadas por bajas concentraciones de aniones caotrópicos, no implican desnaturalización proteica con la generación de

una forma de enzima con propiedades cinéticas especiales, ya que las formas inactiva y activa aparecen por exclusión e inclusión, respectivamente, del perturbante. Por otra parte, el efecto de las sales neutras en el proceso catalítico no es similar al de la activación enzimática. Así, la divergencia entre la concentración de BrNa requerida para la estimulación de la actividad específica con la necesaria para aumentar la reducción del NADP, es congruente con el hecho de que la actividad de la Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa de cloroplastos está constituida por dos reacciones (activación y catálisis) (Wolosiuk et al, 1986; Wolosiuk y Buchanan, 1976).

Los estudios sobre los efectos de compuestos no fisiológicos en las enzimas regulatorias del cloroplasto revelan, en la fase de activación, una analogía entre los modificadores (cosolventes, aniones caotrópicos) y la proteína del cloroplasto que media la regulación de las enzimas por la luz (tiorredoxina); por el contrario, en la catálisis los perturbantes son inhibitorios mientras que la tiorredoxina no es funcional. Tanto los perturbantes como la tiorredoxina actúan como moduladores primarios y secundarios de la NADP-Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa (Wolosiuk et al, 1986; Wolosiuk y Buchanan, 1978), mientras que en la Fructosa-1,6-bisfosfatasa estos modificadores solo actúan como secundarios disminuyendo el $A_{0.5}$ para los primarios (FBP y Ca^{2+}) (Wolosiuk, 1986; sección 3.1.1. de la presente tesis; Hertig y Wolosiuk, 1983; Corley y Wolosiuk, 1985). La NADP-Malato deshidrogenasa difiere de estas enzimas en que la tiorredoxina-m constituye un requerimiento para la estimulación de la actividad específica; sin embargo, tanto

los cosolventes como los caotrópicos disminuyen la concentración de tiorredoxina necesaria para la estimulación (Crawford et al, 1986; Wolosiuk, datos no publicados). Sobre la base de a) la semejanza entre perturbantes y tiorredoxina en los efectos cinéticos y b) la influencia de los perturbantes en la posición relativa de los grupos apolares en las proteínas, pareciera que la modificación de las interacciones hidrofóbicas en las enzimas regulatorias del cloroplasto constituye un requerimiento importante en la activación mediada por la luz.

3.2.2. CARACTERIZACION EN LAS MEMBRANAS DE LOS CLOROPLASTOS DE UN MECANISMO DESACTIVADOR DE LA GLICERALDEHIDO-3-P DESHIDROGENASA NADP-DEPENDIENTE

Como se ha visto en los anteriores capítulos, existen varios mecanismos de activación para las enzimas del cloroplasto, incluida la NADP-Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa. Sin embargo, la importancia de los mecanismos de regulación enzimática reside en la presencia conjunta de los componentes que potencian la actividad y los que la controlan negativamente. Un requerimiento adicional es la separación de ambos, espacial o temporal, para evitar un ciclo fútil. A pesar de estas consideraciones, los procesos de desactivación de las enzimas activadas por la luz han sido poco estudiados. Estudios "in vitro" mostraron que las enzimas del cloroplasto pueden ser desactivadas por: a) oxidantes solubles (Schürmann y Wolosiuk, 1978; Wolosiuk y Buchanan, 1977 y 1978 "bis"; Nishizawa et al, 1979), b) tiorredoxina oxidada (Leegod y Walker, 1980) y c) componentes presentes en las membranas de los cloroplastos (Wolosiuk et al, 1977). Para la NADP-GAPD no había sido reportado ningún mecanismo de desactivación, sin embargo, en el curso de los estudios sobre la modulación de la actividad específica de esta enzima proveniente de los cloroplastos de espinaca, se encontró que, en membranas de cloroplastos, existe un factor capaz de desactivar su forma regulatoria.

3.2.2.1. PRESENCIA EN LAS MEMBRANAS DE CLOROPLASTOS DE UN INHIBIDOR DE LA FORMA REGULATORIA DE LA NADP-GLICERALDEHIDO-3-P DESHIDROGENASA

Se preincubó la enzima en presencia de Pi, el cual es un modulador positivo de la misma, y de membranas de cloroplasto, purificadas como se describe en la sección 2.7. de Materiales y Métodos. Como se observa en la tabla 9, la presencia de las membranas en la preincubación, disminuyó la actividad de la enzima activada por Pi; esta propiedad no cambió aun después de 12 horas de diálisis contra buffer Tris-ClH 30 mM (pH: 7.9), ni tampoco por repetidos lavados con dicho buffer.

Con el objetivo de estudiar la naturaleza de la inhibición, se ensayó la actividad de la enzima preincubándola con membranas en presencia de un quelante de metales bivalentes (EGTA) o agentes reductores de puentes disulfuro (DTT y β -MET). Como se ve en la tabla 10, el agregado de EGTA revirtió el efecto inhibitorio, lo que indicaría la probable participación de un catión bivalente en dicho efecto. Por otro lado, el β -MET no modificó el efecto de desactivación enzimática, en tanto que, la presencia de DTT tuvo un efecto directo en la estimulación de la actividad enzimática.

Posteriormente, se realizó un experimento en el cual se trataron previamente las membranas con calor y tioles (tabla 11). Se ve que cuando se preincubó a la enzima con una fracción de membranas pretratadas con DTT 5 mM, dicha fracción conservó su capacidad de inhibir. Sin embargo, el efecto inhibitor resulta anulado cuando las

Tabla 9: PRESENCIA EN LAS MEMBRANAS DE LOS CLOROPLASTOS DE UN MECANISMO DESACTIVADOR DE LA NADP-GAPD

AGREGADO EN LA PREINCUBACION	ACTIVIDAD NADP-GAPD (nmoles de NADPH oxid.min ⁻¹)
Ninguno	8
Pi	30
Pi + membranas(0.15 mg Chl/ml)	16
Pi + membranas(0.75 mg Chl/ml)	16

La enzima (ca. 10 µg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución de buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9) y, según se indica, fosfato de potasio 0.1 M y membranas cloroplásticas (extraídas según la técnica descrita en la sección 2.7. de materiales y métodos). A los 10 minutos, las muestras fueron inyectadas en mezcla de reacción para determinar actividad NADP-GAPD, como se detalla en la sección 2.6. de materiales y métodos.

**Tabla 10: EFEECTO DE TIOLES Y QUELANTES SOBRE LA
DESACTIVACION DE LA NADP-GAPD MEDIADA POR MEMBRANAS DE
CLOROPLASTOS**

AGREGADO EN LA PREINCUBACION	ACTIVIDAD NADP-GAPD (nmoles de NADPH oxid.min⁻¹)
Pi	30
Pi + membranas	16
Pi + membranas + EGTA 1 mM	29
Pi + membranas + DTT 5 mM	37
Pi + membranas + β -met 10 mM	20

La enzima (ca. 10 μ g) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución de buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9), fosfato de potasio 0.1 M y, según se indica, membranas cloroplásticas (0.15 mg Chl/ml), EGTA 1 mM, DTT 5 mM y β -met 10 mM. A los 10 minutos, las muestras fueron inyectadas en mezcla de reacción para determinar actividad NADP-GAPD, como se detalla en la sección 2.6. de materiales y métodos.

Tabla 11: EFECTO DE TIOLES Y CALOR SOBRE LAS MEMBRANAS
CONTENIENDO EL FACTOR DESACTIVADOR DE LA NADP-GAPD

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD NADP-GAPD (nmoles de NADPH oxid.min ⁻¹)
DTT 5 mM	21
100°C, 3 min	17
100°C, 3 min + DTT 5 mM	32
100°C, 3 min + β -met 10 mM	17

Una suspensión de membranas cloroplásticas (0.75 mg Chl/ml) fue tratada, según se indica, con DTT 5 mM o a 100°C durante 3 minutos, en presencia y en ausencia de DTT 5 mM o β -met 10 mM. Luego, 0.02 ml de esta suspensión fueron incubados con la enzima (ca. 10 μ g) a 23°C en 0.1 ml de una solución de buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9) y fosfato de potasio 0.1 M. A los 10 minutos, las muestras fueron inyectadas en mezcla de reacción para determinar actividad NADP-GAPD, como se detalla en la sección 2.6. de materiales y métodos.

membranas fueron calentadas a 100°C, en presencia de DTT 5 mM, durante 3 minutos. La concentración final de DTT en la preincubación, 1 mM, no alteró a la actividad de la enzima. En cambio, la inhibición no fue diferente al control, cuando la enzima fue preincubada con membranas previamente calentadas a 100°C por 3 minutos, en ausencia de DTT o en presencia de β -MET. Teniendo en cuenta que el potencial redox del DTT es menor que el del β -MET, surge la posibilidad de que la membrana, al ser calentada, exponga ciertos grupos disulfuro a la reducción por DTT, lo cual torna al factor inefectivo en la desactivación de la NADP-GAPD.

Con el objeto de analizar si existían grupos sulfhidrilos involucrados en la acción inhibitoria de las membranas, se trataron las mismas con reactivos cuya acción reside primariamente sobre el par redox R-SH/R-S-S-R. El tratamiento se efectuó: i) incubando las membranas durante 30 minutos a 23°C, con el reactivo correspondiente a una concentración de 1 mM y ii) dializando cada muestra durante 12 horas contra buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9). Luego se preincubó la Gliceraldehido-3-P-deshidrogenasa con Pi y cada una de las membranas tratadas y, finalmente, se midió la actividad enzimática. Los resultados en la tabla 12 muestran que el pretratamiento con Diamida o Bisulfito de Sodio revirtió parcialmente la inhibición. No se visualizó reversión en el caso del pretratamiento con p-cloromercurifenilsulfónico (PCMPS). Es conocido que el PCMPS tiene la capacidad de reaccionar con los R-SH generando R-S-Hg-X, en tanto el anión SO_3H^- reacciona con los grupos -S-S- dando origen a -S-SO₃⁻; por otra parte, si bien la diamida tiende

Tabla 12: EFECTO DE REACTIVOS A GRUPOS SULFIDRILLOS SOBRE LAS MEMBRANAS CONTENIENDO EL FACTOR DESACTIVADOR DE LA NADP-GAPD

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD RELATIVA
Ninguno	43.2
PCMPS	51.3
Diamida	62.1
NaHSO ₃	73

Una suspensión de membranas cloroplásticas (0.75 mg Chl/ml) fue tratada, según se indica, con p-cloromercuri-fenilsulfónico (PCMPS) 1 mM, o diamida 1 mM, o bisulfito de sodio 1 mM, a 23°C durante 30 minutos. Luego de una diálisis de 12 horas contra buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9), una alícuota de 0.02 ml del respectivo dializado fue preincubada con la enzima (ca. 10 µg) a 23°C, en 0.1 ml de una solución de buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9) y fosfato de potasio 0.1 M. A los 10 minutos, la suspensión fue inyectada en la mezcla de reacción para determinar la actividad NADP-GAPD, como se detalla en la sección 2.6. de materiales y métodos. Actividad control: 37 nmoles NADPH oxidado.min⁻¹

a reaccionar con los grupos -SH, también tiene la capacidad de producir entrecruzamiento en las membranas (Hosey et al, 1984). Dado que la reversión de la inhibición se produjo mediante los tratamientos que aparentemente modificaron los -S-S- (SO_3H^- , calor en presencia de DTT), surge la posibilidad de que un puente disulfuro sea requerido para el control negativo de la GAPD.

3.2.2.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ACETONA SOBRE EL INHIBIDOR

Se intentó extraer de las membranas el factor inhibidor. Para ello a fracciones de membranas de cloroplastos se les agregó acetona al 50% (V/V) ó al 100% (V/V), la suspensión se centrifugó y tanto el precipitado, resuspendido en buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9), como la fracción sobrenadante, se dializaron contra el buffer mencionado; finalmente, se ensayó el efecto de estas fracciones sobre la actividad NADP-Gliceraldehido-3-P-deshidrogenasa. En la tabla 13 se observa que el factor se encontraba en el precipitado y en la fracción sobrenadante cuando la membrana fue tratada con acetona al 50% y al 100%, respectivamente.

Tabla 13: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ACETONA SOBRE LAS MEMBRANAS CONTENIENDO EL FACTOR DESACTIVADOR DE LA NADP-GAPD

TRATAMIENTO	FRACCION	ACTIVIDAD RELATIVA
Acetona 50 %	sobrenadante	100
	precipitado	23
Acetona 100 %	sobrenadante	57
	precipitado	118

Una suspensión de membranas cloroplásticas (0.75 mg Chl/ml) fue tratada con un volumen igual de, según se indica, acetona 50 % ó 100 %, agitando fuertemente y centrifugando 5 minutos a 10.000 g. Luego de resuspender los precipitados en buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9), todas las fracciones fueron dializadas 12 horas contra dicho buffer. Finalmente, 0.02 ml de cada fracción fueron preincubados con la enzima (ca. 10 µg) a 23°C en 0.1 ml de una solución de buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9) y fosfato de potasio 0.1 M. A los 10 minutos, las muestras fueron inyectadas en la mezcla de reacción para determinar la actividad NADP-GAPD, como se detalla en la sección 2.6. de materiales y métodos.

Actividad control: 41 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹

3.2.2.3. EFECTO DE LA LUZ SOBRE LA INHIBICION DE LA NADP-GAPD MEDIADA POR MEMBRANAS DE CLOROPLASTOS

Estudios previos sobre la activación enzimática, mediada por la luz, indicaron la participación del par redox -SH/-S-S- en dicha regulación; este mecanismo implicaría la reducción de los puentes disulfuro en la luz y la oxidación de los grupos sulfhidrilo en la oscuridad. Por ello, se examinó el efecto de la luz sobre la inhibición producida por las membranas de los cloroplastos sobre la gliceraldehído-3-P deshidrogenasa.

Para realizar el ensayo, se preincubó a la enzima con las membranas, tanto en luz como en oscuridad. La preincubación se realizó en vasos de Warburg, en una mezcla conteniendo: Tris-ClH 100 mM (pH: 7.9), Pi 100 mM, Ascorbato 20 mM, Diclorofenolindofenol (DPIP) 25 mM y membranas (0.15 mg Chl/ml). Durante el tiempo en que duró la preincubación (10 minutos) circuló N₂ sobre la solución, para evitar la presencia de O₂ (que pudiera formar radicales libres perniciosos para la actividad de la enzima o de la membrana). Los reductores exógenos (ascorbato, DPIP) se agregaron como dadores de la cadena fotosintética de transporte de electrones. Así, se realizó el ensayo en presencia y en ausencia de luz, midiendo la reacción enzimática en la oscuridad. Como se observa en la tabla 15, la luz fue capaz de revertir el efecto inhibitorio de las membranas sobre la NADP-Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa. Para constatar que los resultados se debieran únicamente a modificaciones producidas por la membrana, y no por el Ascorbato o el DPIP, se realizaron los experimentos control

en la oscuridad que se detallan en la tabla 14. Allí se ve que el Ascorbato altera levemente el efecto de la inhibición por las membranas, pero que ninguno de los reactivos modifica sustancialmente la acción del factor sobre la enzima.

Tabla 14: CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO DEL EFECTO DE LA LUZ
SOBRE EL FACTOR DESACTIVADOR DE LA NADP-GAPD

AGREGADO EN LA PREINCUBACION	ACTIVIDAD RELATIVA
Ninguno	100
Membranas	36
Membranas + ascorbato	46
Membranas + DPIP	36
Membranas + ascorbato + DPIP	46

La enzima (ca. 10 μg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución de buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9) y fosfato de potasio 0.1 M y, según se indica, membranas cloroplásticas (0.15 mg Chl/ml), Ascorbato 20 mM, y Diclorofenolindofenol (DPIP) 25 mM. A los 10 minutos, las muestras fueron inyectadas en mezcla de reacción para determinar actividad NADP-GAPD, como se detalla en la sección 2.6. de materiales y métodos.

Actividad control: 56 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹

Tabla 15: EFECTO DE LA LUZ EN LA DESACTIVACION DE LA NADP-GAPD MEDIADA POR MEMBRANAS DE CLOROPLASTOS

AGREGADO EN LA PREINCUBACION	ACTIVIDAD RELATIVA
Control	100
Membranas (oscuridad)	53
Membranas + luz	106

La enzima (ca. 10 μg) fue preincubada a 23°C en 0.1 ml de una solución de buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9) y fosfato de potasio 0.1 M (en presencia de Ascorbato 20 mM y Diclorofenolindofenol 25 mM) y, según se indica, membranas cloroplásticas (0.15 mg Chl/ml). En el tratamiento indicado, los vasos de Warburg fueron iluminados desde una distancia de 12 cm con una lámpara incandescente de 150 watts, separada de los vasos por un baño de agua (10 cm) mantenido a 23°C. A los 10 minutos, las muestras fueron inyectadas en la mezcla de reacción para determinar la actividad NADP-GAPD, como se detalla en la sección 2.6. de materiales y métodos.

Actividad control: 32 nmoles de NADPH oxidado.min⁻¹

3.2.2.4. DISCUSION

Los resultados arriba indicados constituyen la primera evidencia sobre la existencia, en membranas de cloroplastos, de un mecanismo desactivador de la NADP-Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa.

Estos datos preliminares sugieren que los grupos sulfhidrilos y los puentes disulfuro serían funcionales en el mecanismo de desactivación. Este factor (o factores), posiblemente proteico(s), pudo ser removido de la fracción de membranas mediante tratamiento con acetona. Por otra parte, el proceso descrito de desactivación de la enzima es congruente con lo que sería dable esperar "in vivo", dado que se anula al producirse la transición oscuridad/luz. De todas maneras, los resultados son aun preliminares y serán necesarios, por lo tanto, futuros estudios de regulación así como de purificación, para caracterizar en forma más precisa al mecanismo indicado.

3.3. FBPasa DE LA CIANOBACTERIA Anabaena sp 7119

3.3.1. ACTIVACION DE LA FBPasa DE Anabaena sp 7119 POR LA LUZ.

En cloroplastos de algas y plantas superiores se ha podido observar que varias enzimas, entre las cuales se encuentra la FBPasa, resultan activadas por la luz. El efecto de la luz no se produce sobre las enzimas directamente sino a través de los productos reducidos de la cadena de transporte electrónico fotosintético. Los mecanismos que participarían fueron discutidos en la Introducción (sección 1.5.1.).

En los estudios sobre la regulación de las enzimas por la luz, el cloroplasto es una organela de fácil manejo debido a que se puede romper rápidamente mediante un shock hipotónico, con la consecuente liberación de enzimas al medio. Utilizando esta técnica se han realizado los ensayos enzimáticos "in vivo" reportados hasta el momento. En contraposición, las cianobacterias presentan la resistencia de su pared celular y por lo tanto, ofrecen dificultad para efectuar determinaciones enzimáticas rápidas "in vivo", de manera que los resultados publicados en el tema son escasos.

Con el propósito de analizar si la FBPasa de Anabaena sp.7119 era activada por la luz, se preparó una suspensión de cianobacterias, como se indica en Materiales y Métodos (sección 2.8.4.) y se la iluminó. A distintos tiempos se tomaron alicuotas que fueron sometidas a: a) sonicación en presencia o en ausencia de Tritón X-100, o b) tratamiento con tolueno. La suspensión resultante fue

inyectada en la mezcla de reacción para determinar la hidrólisis de FBP. La figura 26 muestra que la enzima aumentó su actividad específica con el tiempo de iluminación. El agregado de Tritón X-100 no causó diferencias significativas respecto del tratamiento sin detergente. Por otra parte, el procedimiento de permeabilización con tolueno no resultó efectivo debido, probablemente, al poco tiempo que las células estuvieron expuestas al solvente.

Por lo tanto, si bien los métodos de permeabilización de cianobacterias mostraron diferencias en la activación enzimática, la FBPasa de *Anabaena* sp 7119 incrementó significativamente su actividad luego de la transición oscuridad/luz.

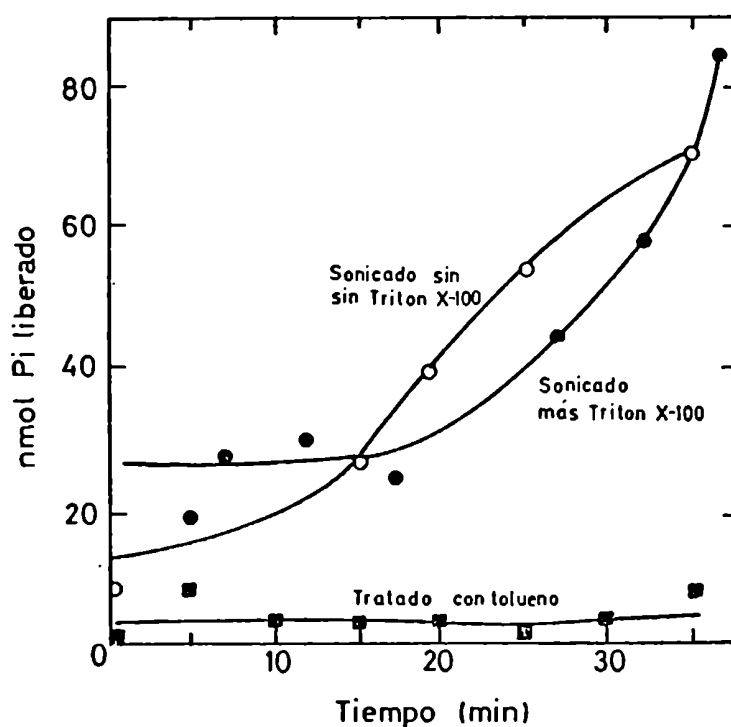
3.3.2. ENSAYOS DE PURIFICACION

Dada la presencia en cianobacterias de una FBPasa cuya actividad pudo ser estimulada por luz, se encararon los ensayos de su purificación con el objetivo de efectuar posteriores estudios comparativos. La purificación parcial de la enzima se efectuó mediante los siguientes pasos:

- 1) Precipitación ácida.
- 2) Fraccionamiento con Sulfato de Amonio.
- 3) Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

Una de las dificultades encontradas a lo largo de los ensayos de purificación fue que la actividad enzimática

Figura 26: EFECTO DE LA LUZ EN LA ACTIVIDAD DE LA FBPasa DE Anabaena sp



La iluminación de las cianobacterias se realizó como se indica en la sección 2.8.4. Posteriormente, se extrajeron alícuotas que fueron sometidas a:

Tratamiento con tolueno: se agregó 0.2 ml de tolueno a la suspensión bacteriana, se agitó 2 segundos, se centrifugó, y el precipitado se resuspendió en 0.4 ml de buffer Tris-ClH 50 mM (pH: 7.9); 0.1 ml de esta resuspensión se inyectaron en 0.9 ml de la mezcla para medir la actividad FBPasa.

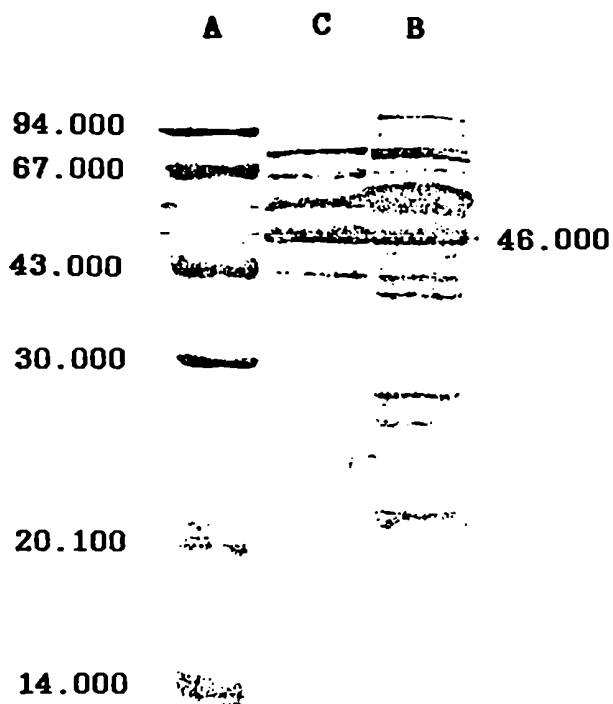
Sonicación: la alícuota, en presencia o en ausencia de Tritón X-100 0.02%, se sonicó durante 50 segundos a 60 watts, utilizando el microtip en un Braunsonic-1510; 0.1 ml de la suspensión se inyectaron en 0.9 ml de la mezcla para el ensayo de la FBPasa.

La mezcla para medir la actividad FBPasa contenía (en μ moles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 50; Cl_2Mg , 5; FBP, 1.5; y EGTA, 0.1. Luego de 5 minutos de reacción se agregó el reactivo de Chen, como se indica en la sección 2.10. de materiales y métodos.

copurificaba con parte de los pigmentos característicos de las cianobacterias: las ficobiliproteínas. Estos pigmentos son fáciles de detectar, aun a bajas concentraciones, dado que fluorescen cuando son irradiados con luz ultravioleta. La serie de ensayos en la que no se logró una separación efectiva de la enzima y los pigmentos contaminantes fueron cromatografías en columnas de: i) intercambio iónico (DEAE-Celulosa), a diversos pH y en presencia o en ausencia de detergentes como eluyentes; ii) afinidad (Blue y Red-agarosa); iii) hidrofobicidad (Octil y Fenil-agarosa); iv) adsorción (Hidroxiapatita y Fosfocelulosa); y v) adsorción tiofílica (2-mercaptoetanol agarosa). Finalmente, la utilización de una resina de intercambio aniónico, QAE-Sephadex, permitió separar a la actividad enzimática de las ficobiliproteínas. Como se observa en la Figura 3 (sección 2.9.3.), las fracciones fluorescentes fueron eluidas con el buffer de lavado de la columna, en tanto que la FBPasa se halló en las fracciones correspondientes al gradiente salino, en la posición aproximada de 130 mM de ClNa. Luego de este paso, la enzima no era homogénea ya que el número de bandas que aparecieron en un gel de Poliacrilamida después de una electroforesis bajo condiciones disociantes (con SDS) fue de 15-20. Sin embargo, y tal como se observa en la Figura 27, la mayoritaria tuvo un peso molecular aproximado de 46.000, similar al del monómero de la FBPasa de los cloroplastos de espinaca.

Se juntaron las fracciones con actividad FBPasa, se concentraron mediante ultrafiltración (1/10 del

Figura 27: ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS
DE LA FBPasa DE Anabaena sp



Las condiciones experimentales se detallan en la sección 2.15. Canal a: marcadores de peso molecular (detallados en la sección 2.15.); canal b: muestra proveniente de la cromatografía en columna de QAE-Sephadex; canal c: muestra proveniente de la cromatografía en columna de Mono-Q.

volumen original) y se dializaron como se indica en la sección 2.9.3. de materiales y métodos. Esta fracción se denominó preparación de QAE.

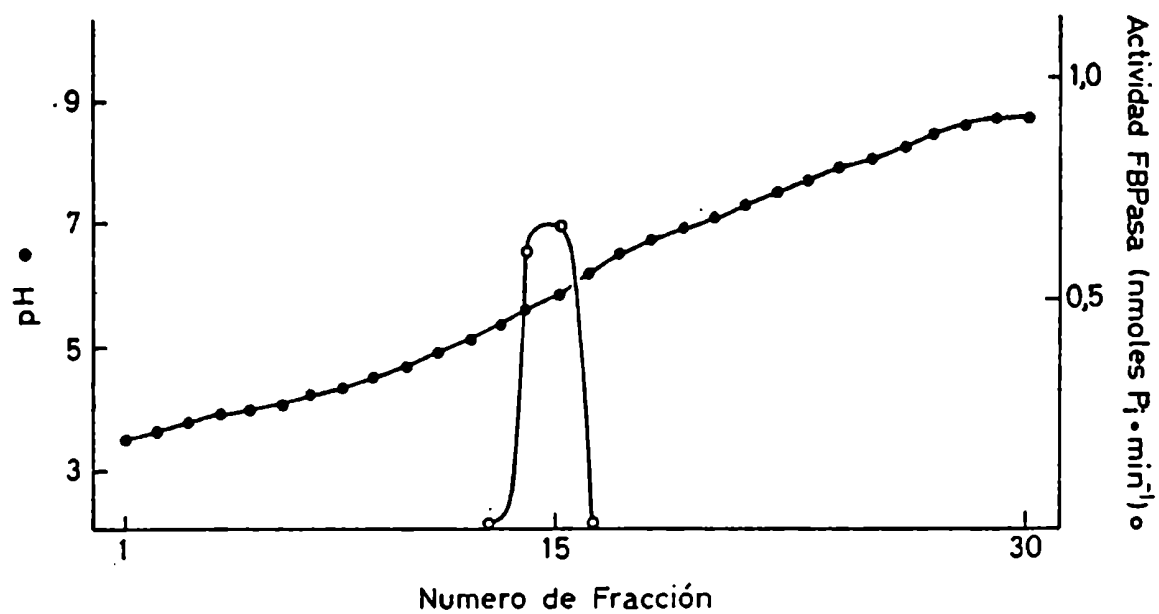
La preparación de QAE fue sembrada, finalmente, en una columna de Mono Q (intercambiadora aniónica) equilibrada en buffer Trietanolamina-acético a pH: 7.4 para efectuar una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). En la figura 3 de materiales y métodos (sección 2.9.4.) se puede observar que la actividad FBPasa coincide con uno de los picos mayoritarios de proteína.

Luego de esta etapa de purificación, la fracción conteniendo la actividad FBPasa se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (con SDS) (Figura 27). La tinción del gel con Azul Brillante de Coomassie reveló la presencia de una banda mayoritaria con un peso molecular aparente de 46.000 y otras 6 minoritarias. Aunque el grado de contaminación es bajo, la purificación, en términos de actividad específica, no fue efectiva (60 veces) debido a la inestabilidad de la forma activa durante el proceso de la purificación.

3.3.3. PUNTO ISOELECTRICO

Utilizando la técnica de Isoelectroenfocado, descrita en la sección 2.16. de materiales y métodos, se determinó el punto isoeléctrico (pI) de la FBPasa de Anabaena sp 7119. El análisis de la actividad enzimática reveló la presencia de dos fracciones en la zona correspondiente a los pH 5.6 y 5.9 (figura 28). Por otra

Figura 28: ISOELECTROENFOQUE EN PLACA DE SEPHADEX G-200 DE
LA FBPasa DE Anabaena sp



Las condiciones experimentales se detallan en la sección 2.16.

parte, también han sido reportados dos pI para esta enzima en otra cianobacteria, Synechococcus leopoliensis, si bien los valores fueron más bajos, 4.5 y 4.7 (Gerbling et al, 1984). En nuestros estudios, este análisis fue la única evidencia sobre la existencia dos formas enzimáticas.

3.3.4. REGULACION DE LA FBPasa DE Anabaena sp 7119

En un ensayo preliminar que se detalla en la Tabla 16, se observa que la FBPasa de Anabaena sp 7119 requiere la presencia de un catión bivalente, como el Mg^{2+} , y de un tiol para poder llevar a cabo la hidrólisis de la FBP. La Figura 29 muestra que la cinética de este proceso no fue lineal por cuanto presentó una fase de retardo de 3 minutos, luego de la cual la velocidad alcanzó un valor constante que se mantuvo por espacio de 15 minutos. Experimentos con filamentos toluenizados y el ensayo de activación por luz (ver Figura 26) mostraron que la actividad enzimática presenta un comportamiento similar. En comparación con otros estudios, estos resultados sugieren que la enzima de cianobacterias presenta comportamiento histerético (Frieden, 1970 y 1971).

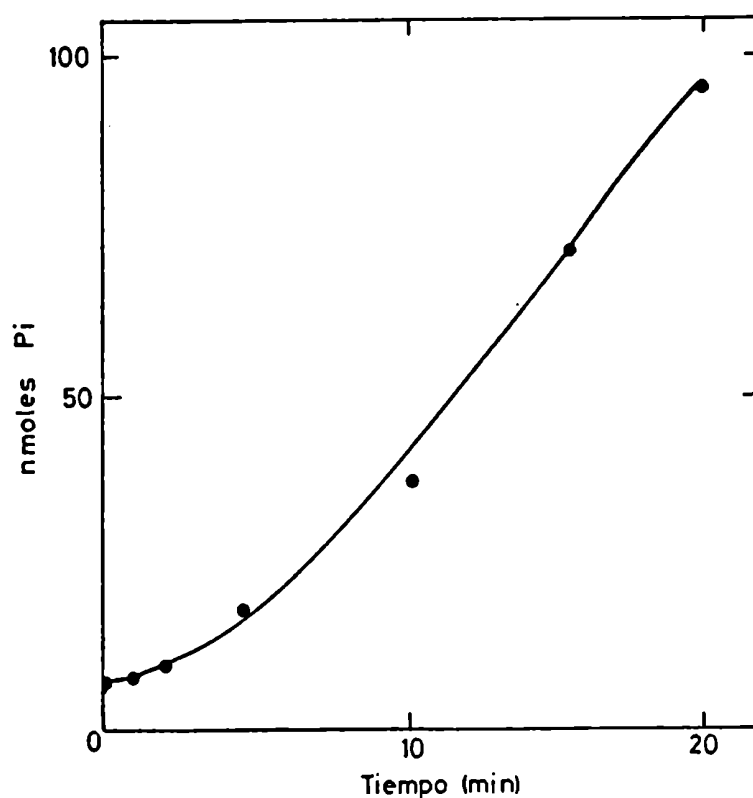
El $S_{0.5}$ para la FBP, determinado con una concentración de Mg^{2+} de 10 mM fue de 0.6 mM (Figura 30). Este valor es 10 veces superior al establecido para la FBPasa de cloroplastos de espinaca (Hertig, tesis doctoral).

Por otra parte, el $S_{0.5}$ para el Mg^{2+} fue 5.6 mM (Figura 31), cuando el ensayo se efectuó en presencia de FBP 2 mM. Este valor fue i) similar al hallado utilizando filamentos permeabilizados con tolueno y ii) ligeramente

Tabla 16: REQUERIMIENTOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDADFBPasa DE Anabaena sp

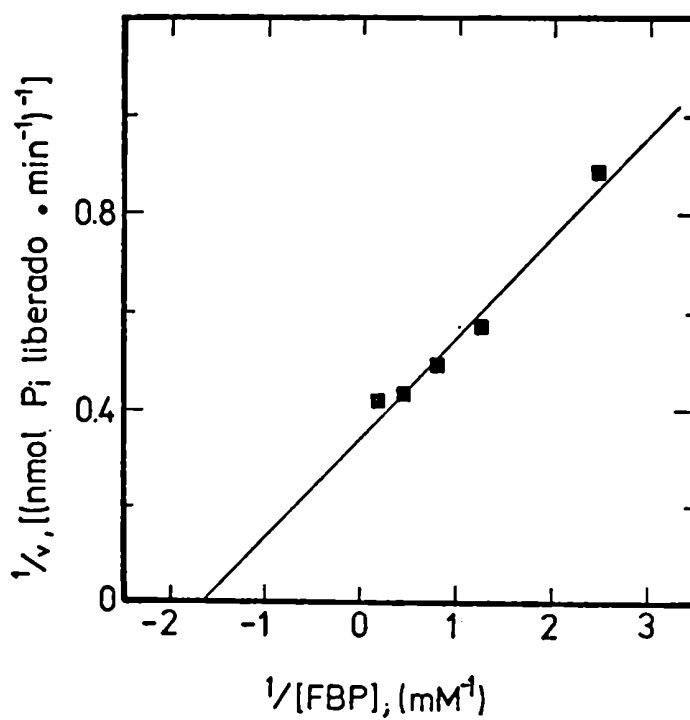
CONDICIONES DEL ENSAYO	ACTIVIDAD RELATIVA
Completo	100
menos Mg ²⁺	7
menos EGTA	107
menos DTT	40

La preparación de DEAE fue incubada como se detalla en la sección 2.10. de materiales y métodos. Según se indica, uno de los componentes de la mezcla de reacción fue omitido.
 Actividad control: 0.04 nmol Pi liberado.min⁻¹.(mg prot)⁻¹

Figura 29: CURVA DE TIEMPO DE LA FBPasa DE Anabaena sp

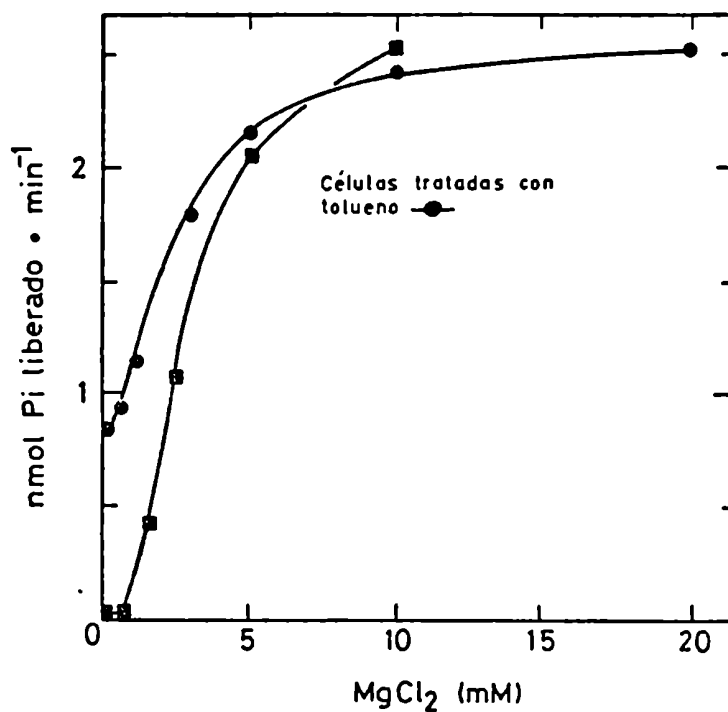
Se incubaron 30 μ l de preparación de DEAE (2 mg prot/ml) en la mezcla de reacción para determinar la actividad FBPasa, descrita en la sección 2.10. de materiales y métodos. La reacción se detuvo a los tiempos indicados, y se estimó el Pi liberado por el método de Chen (Chen et al, 1956).

Figura 30: GRAFICO DE LINEWEAVER-BURK DE LA FBPasa DE Anabaena sp PARA LA FBP



La preparación de DEAE se incubó en la mezcla de reacción para determinar la actividad FBPasa, descrita en la sección 2.10. de materiales y métodos, variando la concentración de FBP.

Figura 31: EFECTO DEL Mg^{2+} EN LA ACTIVIDAD FBPasa DE Anabaena sp



Los filamentos de *Anabaena* fueron tratados como se indica en la sección 2.8.3. de materiales y métodos. Luego, 50 μl de la suspensión se inyectaron en la mezcla de reacción, conteniendo concentraciones variables de Cl_2Mg . La actividad enzimática se determinó como se detalla en la sección 2.10. de materiales y métodos.

30 μl de la preparación de DEAE (2 mg prot/ml) se incubaron en las mismas condiciones que los filamentos toluenizados para determinar la actividad enzimática.

superior al de la contraparte de cloroplastos de espinaca.

Como se ve en la Tabla 17, el Mn^{2+} reemplazó al Mg^{2+} como cofactor. El So.s, ensayado en presencia de FBP 3 mM (Figura 32), fue de 0.1 mM, valor similar al hallado para la enzima de las plantas (Hertig, tesis doctoral). Sin embargo, la FBPasa de los cloroplastos fue 5-10 veces más activa en presencia de Mg^{2+} que de Mn^{2+} (Hertig y Wolosiuk, 1983) mientras que la velocidad máxima alcanzada por la enzima de cianobacterias con ambos cofactores fue similar.

3.3.4.1. EFECTO DE LOS AZUCARES-BISFOSFATO

Entre los compuestos ensayados, FBP y SBP fueron hidrolizadas en tanto que otros azúcares-bisfosfato y metabolitos fosforilados no actuaron como sustratos (Tabla 18). Por lo tanto, los efectos observados no corresponden a una fosfatasa inespecífica sino a una enzima que fue funcional en la hidrólisis de los azúcares-bisfosfato que forman parte del ciclo de Benson-Calvin. Si bien la FBPasa de *Anabaena* sp 7119 mostró similitud con la previamente purificada de *Synechococcus leopoliensis* en cuanto hidrolizan FBP y SBP con ligeras diferencias (Gerbling et al, 1984), ambas enzimas de cianobacterias difieren de la correspondiente a los cloroplastos de espinaca en que, para esta última, la actividad ensayada con SBP es 10 veces menor que la medida en presencia de FBP (Hertig y Wolosiuk, 1983).

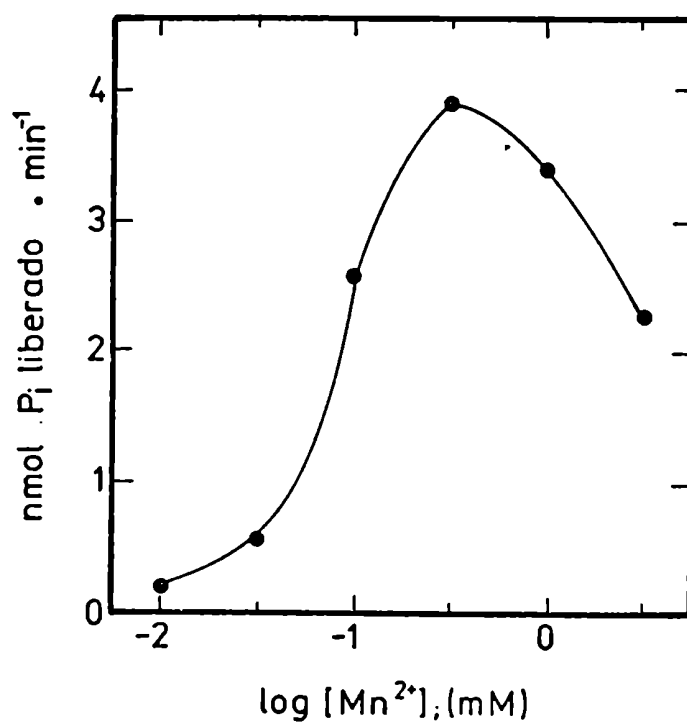
Tabla 17: EFECTO DE LOS CATIONES BIVALENTES EN LA ACTIVIDAD
FBPasa DE Anabaena sp

ADICIONES DURANTE EL ENSAYO	ACTIVIDAD RELATIVA
Mg ²⁺ (10 mM)	100
+ Ca ²⁺ (1 mM)	39
+ Cu ²⁺ (50 μM)	115
+ Zn ²⁺ (1 mM)	95
Ca ²⁺ (1 mM)	37
Cu ²⁺ (50 μM)	28
Zn ²⁺ (1 mM)	0
Mn ²⁺ (0.1 mM)	117

Los cationes bivalentes indicados fueron agregados a la mezcla de reacción para determinar la actividad enzimática, según se describe en la sección 2.10. de materiales y métodos. En este ensayo se omitió el EGTA.

Actividad control: 0.4 nmol Pi liberado.min⁻¹.(mg prot.)⁻¹

Figura 32: EFECTO DEL Mn^{2+} EN LA ACTIVIDAD FBPasa DE
Anabaena sp



Se incubaron 50 μ l de preparación de DEAE (2 mg prot/ml) en la mezcla de reacción para determinar la actividad FBPasa descrita en la sección 2.10. de materiales y métodos, omitiendo el agregado de Mg^{2+} y añadiendo Mn^{2+} , como se indica.

Tabla 18: ENSAYO DE LA FBPasa DE Anabaena sp SOBRE
DIFERENTES COMPUESTOS FOSFORILADOS

COMPUESTO FOSFORILADO	ACTIVIDAD RELATIVA
FBP	100
SBP	61
GluBP	8
RuBP	0
F6P	0
R5P	0
PGA	0
ATP	0
GTP	0

La actividad FBPasa fue ensayada, de acuerdo a lo detallado en la sección 2.10. de materiales y métodos, utilizando una preparación de DEAE, en presencia de Cl_2Mg 5 mM, EGTA 0.1 mM y de cada uno de los compuestos fosforilados que se indican, en una concentración de 2 mM.

Actividad control: $0.6 \text{ nmol Pi liberado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg prot.})^{-1}$

3.3.4.2. EFECTO DE LOS CATIONES BIVALENTES

La FBPasa de *Anabaena* sp 7119 requirió de la presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} para llevar a cabo la hidrólisis de la FBP. Otros cationes bivalentes, Ca^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} fueron inefectivos en reemplazar al Mg^{2+} o al Mn^{2+} como cofactores en la hidrólisis de la FBP (Tabla 17). Por otra parte, a las concentraciones indicadas, el Ca^{2+} inhibe la acción del Mg^{2+} en la actividad enzimática.

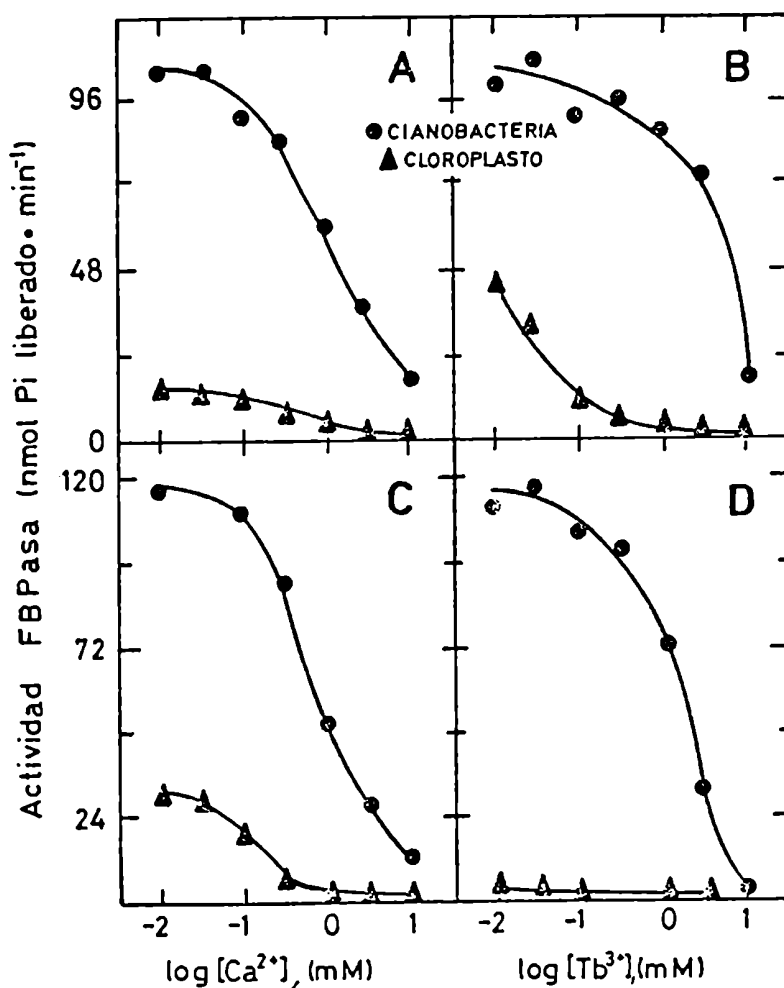
3.3.4.2.1. COMPARACION DE LOS EFECTOS DE LOS CATIONES BIVALENTES Y TRIVALENTES ENTRE LA ENZIMA PROVENIENTE DE *Anabaena* sp 7119 Y LA DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA.

Las FBPasas de cloroplastos de espinaca y cianobacterias compartieron ciertas características tales como activación por luz, activación por reducción y pH óptimo. Dado que los cationes juegan un rol importante en la actividad de la FBPasa de cianobacterias, se compararon las actividades de ambas enzimas en presencia de cationes bivalentes y trivalentes. En estos ensayos, el empleo de un metal trivalente, el Tb^{3+} , se debe a que el Ca^{2+} posee un radio iónico similar al de los lantánidos y por ello, a pesar de la diferencia en la carga, el Tb^{3+} constituye una herramienta para el análisis de la interacción del Ca^{2+} con las proteínas (Martin y Richardson, 1979). Como se observa en la Figura 33, la respuesta de ambas enzimas a los cationes bi- y trivalentes difiere significativamente. La FBPasa de cloroplastos fue mucho más sensible al Ca^{2+} o al

Tb^{3+} , ya sea en presencia de Mg^{2+} o de Mn^{2+} en calidad de cofactor. Se ve en la Figura 33 que $10 \mu M$ de Tb^{3+} fue suficiente para anular la actividad de la enzima de espinaca, en tanto que para obtener un 50% de inhibición, la FBPasa de *Anabaena* sp 7119 requirió una concentración 200 veces mayor. Por otra parte, la enzima proveniente de cloroplastos presentó, en catálisis, un $I_{0.5}$ para Ca^{2+} 10 veces menor (0.1 mM) al de su contrapartida en cianobacterias (1mM). En ambas enzimas, el $I_{0.5}$ dependía de la concentración de Mg^{2+} ; en un ensayo que no se muestra, el $I_{0.5}$ de la enzima de *Anabaena* fue de 0.45 mM a 4 mM de Mg^{2+} , en tanto que el de la FBPasa de cloroplastos fue de 0.04 mM a 5 mM de Mg^{2+} . Contrariamente a lo que ocurre en la catálisis, la actividad específica de la FBPasa de cloroplastos es estimulada por incubaciones con Ca^{2+} (Hertig y Wolosiuk, 1980 y 1983; secciones 3.1.1. y 3.1.2. de la presente tesis). Este efecto activador no se verificó en la enzima de cianobacterias.

La diferencia en la respuesta de ambas enzimas a los cationes bi- y trivalentes sugiere distintos modos de regulación.

Figura 33: EFECTO DE Ca^{2+} Y Tb^{3+} EN LAS FBPasas DE *Anabaena* sp Y DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA

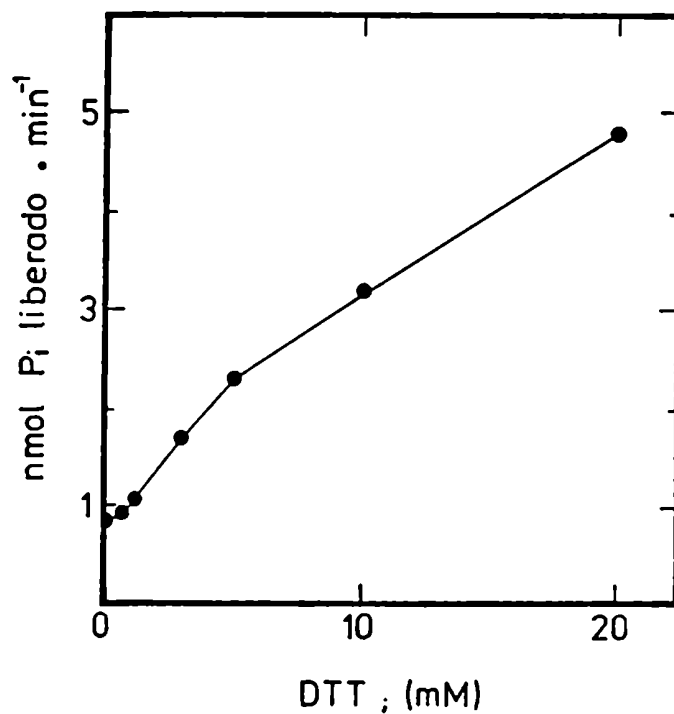


En 1 ml de mezcla de reacción, conteniendo en μmoles : Tris-ClH (pH: 7.9), 100; FBP, 1.9; DTT, 5; Cl_2Mg , 10 (en A y B) ó Cl_2Mn , 1 (en C y D) y concentraciones crecientes, según se indica, de Cl_3Tb o Cl_2Ca , se incubaron 10 μg de FBPasa de cloroplastos, durante 2 minutos, o 20 μl de una preparación de DEAE de *Anabaena* (3.6 mg prot./ml), durante 10 minutos. La reacción se detuvo por agregado de reactivo de Chen (Chen et al).

3.3.4.3. EFEECTO DE TIOLES

Tanto la FBPasa como otras enzimas provenientes de cloroplastos de espinaca (Gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa, Malato deshidrogenasa, Fosforribuloquinasa) son activadas por DTT. La Figura 34 muestra que la actividad de la FBPasa de Anabaena sp 7119 aumentó 5 veces por la incorporación de DTT al medio de reacción. Por otra parte, otros ditiolos no modificaron la capacidad hidrolítica de la enzima (tabla 19). Cuando se comparó la efectividad de los monotioles con respecto a los ditiolos, se observó que la estimulación producida por los monotioles era mucho menor que la obtenida con DTT. Es de destacar que, a diferencia de su efecto activador sobre la enzima de cloroplastos (Corley y Wolosiuk, 1985; tabla 3 de la sección 3.1.1. de la presente tesis), el dietilaminoetanotiol fue totalmente inefectivo en estimular la actividad de la enzima de cianobacterias. Estos resultados sugieren que la activación de las enzimas del ciclo de Benson-Calvin por tioles no está determinada solamente por los grupos sulfhidrilos, sino también por los sustituyentes presentes en la molécula. La respuesta de la actividad FBPasa a dichos sustituyentes dependió del origen de la enzima, indicando que la regulación de las mismas sería diferente.

Figura 34: EFECTO DE DTT EN LA ACTIVIDAD FBPasa DE
Anabaena sp



En presencia de DTT, según se indica, se incubaron 20 μ l de una preparación de DEAE (2 mg prot./ml) en la mezcla de reacción para determinar la actividad FBPasa descrita en la sección 2.10. de materiales y métodos.

Tabla 19: EFFECTIVIDAD DE LOS MONO- Y DITIOLES EN LA ESTIMULACION DE LA ACTIVIDAD FBPasa DE Anabaena sp

TIOL	ACTIVIDAD RELATIVA
Ditiotreitol	100
1-tioglicerol	26
2-mercaptoetanol	18
Glutación reducido	12
L-cisteína	3
2-dietilaminoetanotiol	0
2,3-dimercaptosuccinato	2
ninguno	0

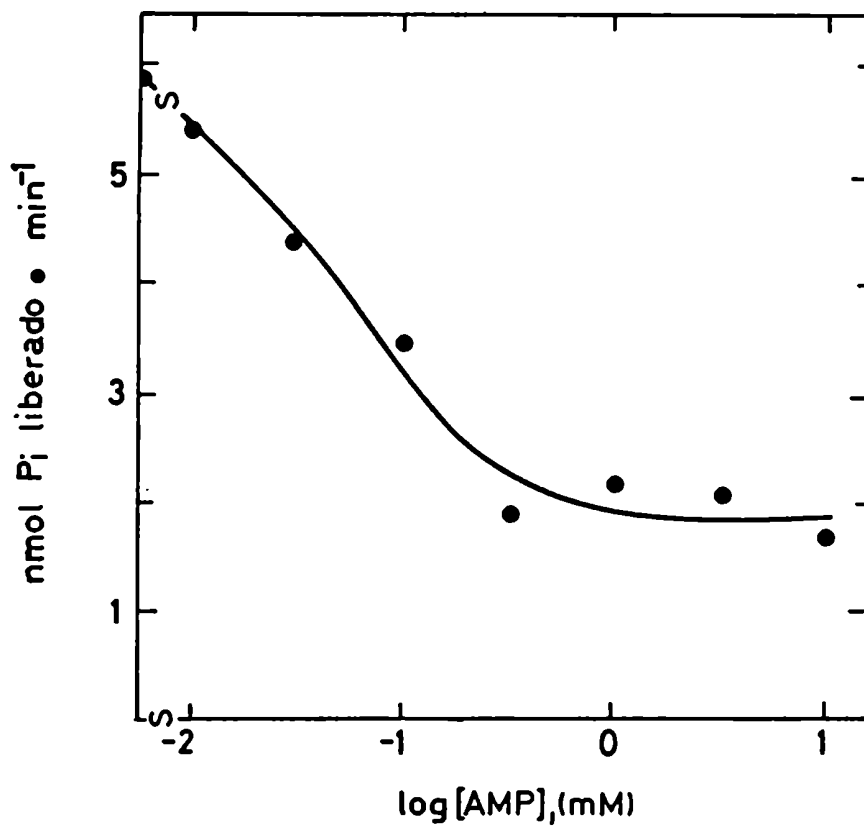
La actividad FBPasa se ensayó en la mezcla de reacción descrita en la sección 2.10. de materiales y métodos, en presencia de un monotiol (10 mM) o de un ditiol (5 mM).
 Actividad control: 0.4 nmol Pi liberado.min⁻¹.(mg prot.)⁻¹

3.3.4.4. EFECTO DEL AMP

La inhibición por AMP constituye una de las características de las FBPasas obtenidas de los sistemas heterotróficos (Pontremoli y Horecker, 1971), en tanto que la FBPasa de los cloroplastos no es sensible a dicho metabolito (Buchanan et al, 1971). Sin embargo, como se ve en la Figura 35, la enzima de Anabaena sp 7119 resultó inhibida ($I_{0.5}$ 0.18 mM). En este aspecto, nuestros resultados difieren cuantitativamente de los obtenidos con la FBPasa de Synechococcus leopoliensis ($I_{0.5}$ = 10-15 mM) (Gerbling et al, 1984).

Aunque la sensibilidad de la FBPasa al AMP sea variable entre las cianobacterias, su existencia marca otra diferencia importante en su regulación respecto de la enzima proveniente de los cloroplastos de plantas superiores.

Figura 35: EFEECTO DEL AMP EN LA ACTIVIDAD FBPasa DE
Anabaena sp



La preparación de DEAE fue incubada en presencia de las concentraciones indicadas de AMP y la actividad FBPasa se determinó como se describe en la sección 2.10. de materiales y métodos.

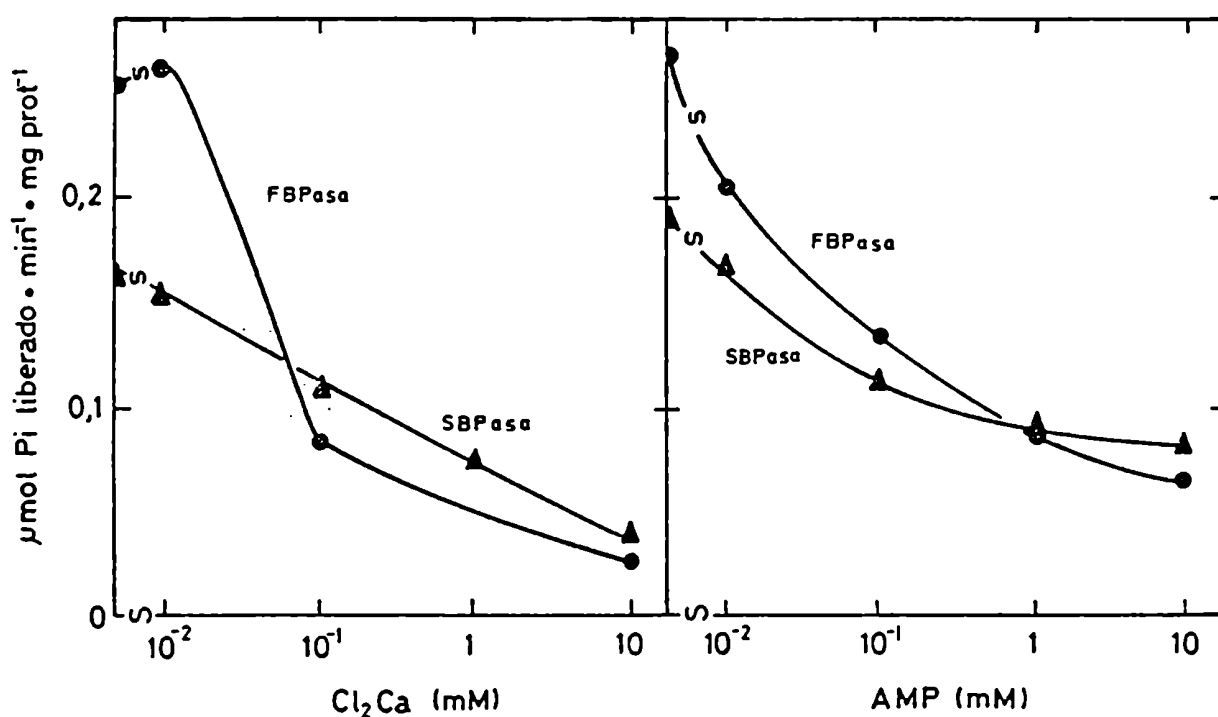
3.3.4.5. ACTIVIDAD SBPasa ASOCIADA A LA FRACCION DE FBPasa DE Anabaena sp 7119

Dado que la SBP siguió a la FBP en importancia como sustrato (Tabla 18), se compararon los efectos de AMP y Ca^{2+} sobre las respectivas hidrólisis.

Los resultados en la Figura 36 muestran que la inhibición por AMP fue similar para ambas actividades. En cambio, la sensibilidad de la actividad SBPasa al Ca^{2+} fue menor respecto a la actividad FBPasa; el $\text{I}_{0.5}$ para la SBPasa fue 1 mM en tanto que para la FBPasa fue 0.1 mM.

Estos datos sugieren que dos conformaciones de la misma proteína, expondrían distintos sitios de unión al Ca^{2+} . Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de una copurificación de dos proteínas, ya que en una cromatografía en BioGel $\text{A}_{0.5}$ m de un extracto de Anabaena sp 7119 se observó que, si bien ambas actividades se superponían, los picos no eran totalmente coincidentes (Crawford et al 1983).

Figura 36: ACTIVIDAD SBPasa ASOCIADA A LA FBPasa DE
Anabaena sp



Se incubaron 5 μl de una preparación de DEAE (3.6 mg prot./ml) en presencia de FBP 2.5 mM o SBP 2.5 mM para determinar la actividad FBPasa o la actividad SBPasa, respectivamente. La estimación del Pi liberado se efectuó como se describe en la sección 2.10. de materiales y métodos.

3.3.4.6. EFEECTO DEL pH

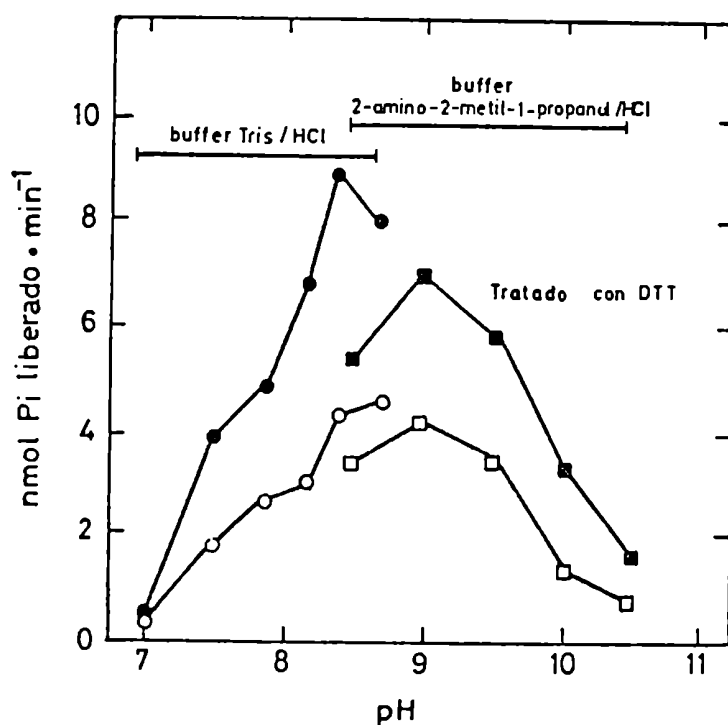
Tal como se describió en la Introducción, uno de los cambios que se producen durante la transición oscuridad/luz es la alcalinización del estroma de los cloroplastos. Se ha demostrado que el pH óptimo de las enzimas del ciclo de Benson-Calvin, provenientes de cloroplastos es 8-8.5. Dado que el pH óptimo de las FBPasas no fotosintéticas es cercano a la neutralidad, esta diferencia podría ser indicativa de la función fisiológica. En la Figura 37 se observa que la máxima actividad se logró a pH: 8.4, en tanto que, a pH: 7, la hidrólisis de FBP fue casi nula. Por lo tanto, la enzima presentó un pH óptimo similar al de su contraparte de cloroplastos.

3.3.4.7. EFEECTO DE LA TEMPERATURA

Para determinar la estabilidad de las preparaciones enzimáticas de *Anabaena* sp 7119, se realizaron ensayos a diferentes temperaturas. La enzima fue preincubada en presencia y en ausencia de sus efectores a 23°C, 40°C y 50°C. Como se observa en la Tabla 20, el aumento de la temperatura provocó un aumento de la actividad enzimática, cuando el DTT estuvo presente y se omitió el catión Mg^{2+} . A de 50°C la enzima se inactivó indefectiblemente.

Esta activación por calor, que no fue observada en la FBPasa de cloroplastos, induce a pensar que el aumento de la temperatura provocaría una modificación estructural, en

Figura 37: EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD FBPasa DE
Anabaena sp



Se incubaron 10 μ l de una preparación de DEAE (3 mg prot./ml) en presencia o en ausencia de DTT 5mM, en la mezcla de reacción para determinar la actividad FBPasa detallada en la sección 2.10. de materiales y métodos. El pH de la incubación fue determinado por buffer Tris-ClH (50 mM) o por buffer 2-amino-2-metil-1-propanol (50 mM).

Tabla 20: EFECTO DE LA TEMPERATURA, DTT, FBP Y Mg²⁺ EN LA PREINCUBACION DE LA FBPasa DE Anabaena sp

CONDICIONES	NMOL Pi LIBERADO/MIN	
	PREINCUBACION A	
	23°C	40°C
Completo	2.6	3.3
Menos:		
DTT	1.8	1.7
FBP	4.0	5.4
Mg ²⁺	6.1	22.8
DTT y FBP	3.0	2.9
DTT y Mg ²⁺	3.3	3.6
FBP y Mg ²⁺	6.9	22.8

Se preincubaron 20 µl de una preparación de DEAE (3 mg prot./ml), a las temperaturas indicadas, en 0.1 ml de una solución que contenía (en µmoles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; Cl₂Mg, 1; FBP, 0.3 y DTT, 0.5. Luego de 3 minutos, se inyectó cada muestra en 0.9 ml de mezcla de reacción para determinar actividad FBPasa, como se indica en la sección 2.10. de materiales y métodos.

la cual ciertos moduladores (DTT y FBP) participarían en forma positiva, en tanto que el Mg^{2+} lo haría en forma negativa.

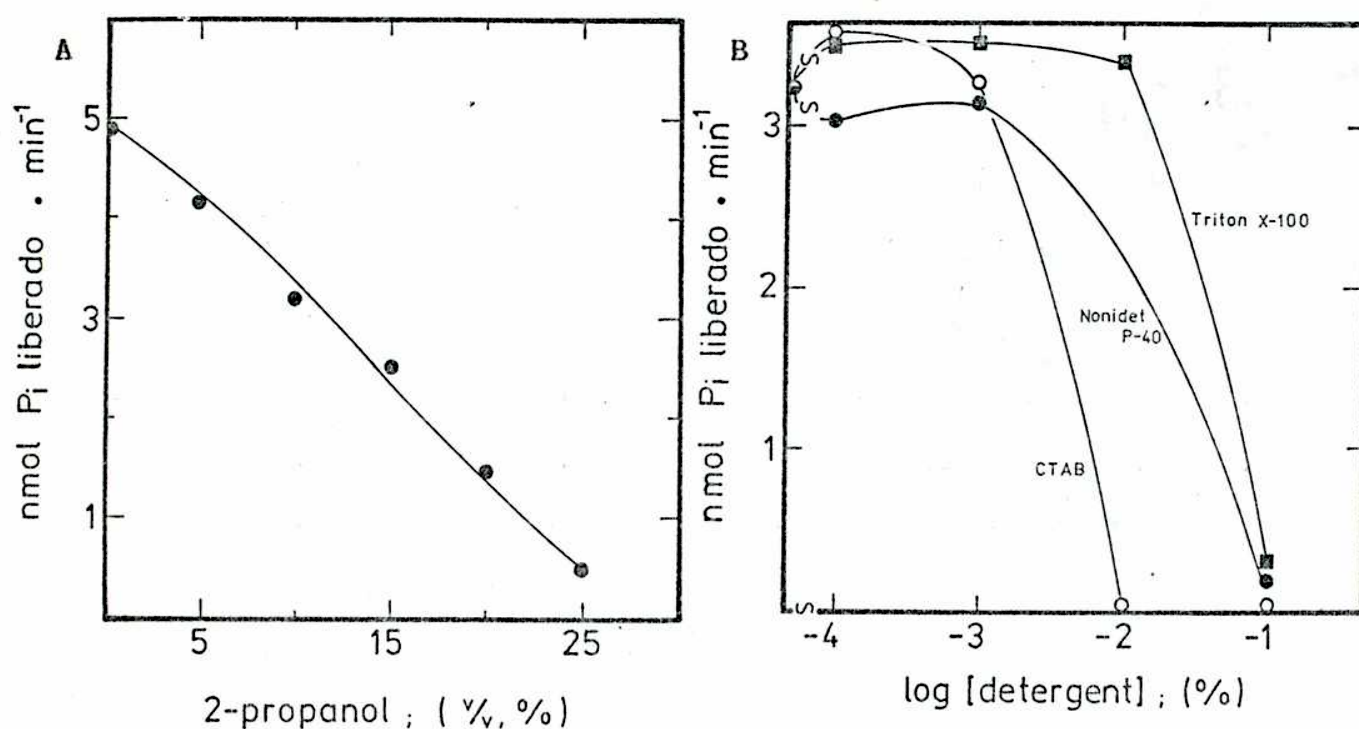
3.3.4.8. EFEECTO DE SOLVENTES Y DETERGENTES

Dado que la FBPasa de Anabaena fue activada por luz y que los fenómenos relacionados con la excitación lumínica ocurrirían en la interfase tilacoide/estroma, es probable que algunas enzimas interactúen con componentes de las membranas. Existen evidencias sobre el aumento de la actividad específica cuando las enzimas se encuentran en un ambiente relativamente hidrofóbico. En particular, se ha demostrado que la FBPasa y la NADP-Gliceraldehido-3-P-deshidrogenasa de cloroplastos de espinaca son activadas por solventes orgánicos (Corley y Wolosiuk, 1985; Wolosiuk et al, 1987). Por otra parte, como se describió en las secciones 3.1.1. y 3.2.1., también se ha logrado la activación de la FBPasa y la NADP-Gliceraldehido-3-P-deshidrogenasa agregando aniones caotrópicos al medio, los cuales, al perturbar la estructura del agua, favorecieron la exposición de dominios hidrofóbicos por parte de la proteína.

Contrariamente a lo observado con las enzimas de los cloroplastos, el isopropanol no estimuló la actividad de la FBPasa de Anabaena sp 7119, así como tampoco lo hicieron los detergentes. Se observa en la Figura 38 que el solvente orgánico provocó una drástica inhibición al igual que los siguientes detergentes ensayados: CTAB (catiónico), Tritón X-100 (aniónico), o Nonidet P-40 (no iónico).

Por lo tanto, los compuestos que modifican las interacciones hidrofóbicas en las proteínas no activan a la FBPasa de Anabaena sp 7119; en este aspecto su efecto fue opuesto al encontrado en las respectivas enzimas de los cloroplastos, lo cual sugiere que las diferencias cinéticas tienen su origen en distintas estructuras.

Figura 38: EFECTO DE ISOPROPANOL Y DETERGENTES EN LA FBPasa
DE Anabaena sp



A: se preincubaron 20 μ l de una preparación de DEAE (3 mg prot./ml) en una solución conteniendo (en μ moles): buffer Tris-ClH (pH: 7.9), 10; Cl_2Ca , 0.02; DTT, 0.5; FBP, 0.1 e isopropanol destilado, según se indica. Luego de 10 minutos, la solución fue inyectada en la mezcla de reacción para determinar la actividad FBPasa, como se detalla en la sección 2.10. de materiales y métodos.

B: Se incubaron 20 μ l de una preparación de DEAE (3 mg prot./ml) en la mezcla de reacción para determinar la actividad FBPasa, como se detalla en la sección 2.10. de materiales y métodos, en presencia de los detergentes CTAB, Nonidet P-40 o Tritón X-100, según se indica.

3.3.5. DISCUSION:

Desde el punto de vista biológico, las cianobacterias constituyen un sistema de estudio sumamente interesante dado que conforman el mayor grupo (entre los procariotas fotolitotrofos) que presenta fotosíntesis oxigénica. Este tipo de fotosíntesis es el que llevan a cabo todos los vegetales eucarióticos permitiendo, dada la liberación de oxígeno, la existencia de toda la vida sobre la tierra. Considerando la lejanía evolutiva entre las cianobacterias y las plantas, es remarcable que un grupo tan primitivo como el de estas bacterias presente mayor similitud fisiológica, respecto del tipo de fotosíntesis, con organismos eucariotas que con otros procariotas fotosintéticos. Dada la facilidad de manejo que ofrecen las cianobacterias, en cuanto al cultivo en laboratorio bajo condiciones controladas, se pensó que los resultados obtenidos a partir de estos organismos podrían ser más reproducibles que los de los vegetales que se adquieren en los mercados locales (cuyas variedades suelen ser diferentes según su lugar de origen y época del año). Por otra parte, se creía que si el tipo de fotosíntesis que se expresaba era similar al de las plantas, la regulación de las enzimas del ciclo de la asimilación del CO₂ así como las técnicas de purificación de las mismas deberían ser muy parecidas. Sin embargo, a lo largo del desarrollo del trabajo se observó que la enzima en estudio, la Fructosa-1,6-bisfosfatasa, exhibía características que la diferenciaban, en varios aspectos, de la proveniente de los cloroplastos de espinaca.

Respecto de las técnicas de purificación, no son extrapolables a cianobacterias las utilizadas para obtener en forma homogénea a la FBPasa de los cloroplastos. En un principio, la presencia de ficobiliproteínas, pigmentos característicos de las cianobacterias, constituyó una dificultad que logró salvarse con la implementación de la resina QAE-Sephadex. Luego, las cromatografías utilizando columnas Mono Q rindieron una preparación que por electroforesis en geles de poliacrilamida, bajo condiciones disociantes, reveló la presencia de más de una banda. Por el peso molecular aparente de la banda mayoritaria se dedujo que tenía un tamaño similar al del monómero de la FBPasa de cloroplastos (46.000 Da). Como dato ilustrativo al respecto, es de destacar que Latzko et al (1984) hallaron que la masa molecular de las formas nativas, A y B, de la FBPasa de Synechococcus leopoliensis es de 67-70 kDa y 65-70 kDa, respectivamente.

Los experimentos descriptos indican que la FBPasa de Anabaena sp 7119, al igual que su contrapartida de los cloroplastos, aumenta su actividad específica en presencia de luz. Los experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Buchanan (Yee et al, 1981) mostraron la activación de la enzima de los cloroplastos por el sistema de Ferredoxina/Tiorredoxina extraído de cianobacterias. Además, el DTT reemplaza en el proceso de activación a la Ferredoxina y a la Ferredoxina-tiorredoxina reductasa de las cianobacterias. La similitud entre estos experimentos con los efectuados con cloroplastos sugiere que el sistema Ferredoxina/Tiorredoxina sea funcional en la activación de la FBPasa "in vivo".

Los estudios cinéticos evidencian que la enzima presenta comportamiento histerético; durante los ensayos de activación por la luz "in vivo" y los de activación por DTT, tanto en filamentos toluenizados como en la muestra purificada, las curvas de actividad enzimática vs. tiempo mostraron una fase de retardo. Aunque experimentalmente no pudieron ser separadas, como en el caso de la FBPasa de los cloroplastos, el hecho de que la FBP y el DTT actúen como activadores también conduce a concluir que existiría una fase de modificación previa a otra de catálisis.

El aumento del pH del estroma del cloroplasto durante la transición oscuridad/luz, es congruente con que el pH óptimo de esta FBPasa esté en el rango 7.9 - 8.7, en tanto que el pH óptimo de la FBPasa que actúa en el camino gluconeogénico en organismos eucariotas es cercano a la neutralidad (7 - 7.5). De todas maneras, y como se ha visto en los ensayos presentados, no se puede discriminar si la FBPasa de las cianobacterias participa solamente en el ciclo de la asimilación del CO₂ o si, también, forma parte de la vía de la gluconeogénesis. En los vegetales eucarióticos existe una separación entre ambas enzimas; la presencia de membranas cloroplásticas limita el compartimiento en el cual la enzima está restringida: una en el estroma del cloroplasto y otra en el citoplasma. En los procariotas, tal compartimentalización es inexistente. Por eso, es razonable pensar que en este tipo de organismos habría una sola enzima cumpliendo la misma función en dos vías diferentes. De ser así, se explicaría la inhibición observada por AMP en la enzima de cianobacterias (al igual que en la enzima gluconeogénica de organismos eucarióticos), en

contraposición a la insensibilidad de la enzima de los cloroplastos a ese metabolito.

Respecto de la regulación enzimática, además de la inhibición mencionada, los resultados actuales muestran diferencias importantes entre las enzimas cloroplástica y procariótica. Aunque la actividad específica de ambas enzimas es estimulada por DTT, la respuesta de las mismas a otros tioles es diferente: el dietilaminoetanotiol es inefectivo en estimular a la enzima de cianobacterias en tanto que activa fuertemente a la de los cloroplastos (Corley y Wolosiuk, 1985; tabla 3 de la sección 3.1.1. de la presente tesis), lo cual sugiere que la modulación enzimática por tioles no estaría solamente determinada por el potencial redox del grupo sulfhidrilo, sino por los sustituyentes del reactivo y los dominios de la enzima con los cuales interacciona el tiol. La hidrólisis de FBP requiere al Mg^{2+} o al Mn^{2+} como cofactores. A diferencia de lo observado en la FBPasa de cloroplastos de espinaca, el Ca^{2+} no estimula la actividad específica pero sí inhibe la catálisis; sin embargo, la FBPasa de cianobacterias fue menos sensible a este catión que la enzima de plantas, como se evidencia en la diferencia entre los respectivos I_{0.5}. Por otra parte, los estudios comparativos de sensibilidad a los cationes bi- y trivalentes demuestran que estas dos enzimas, aunque involucradas en el mismo ciclo fisiológico, tienen distinta afinidad a los mencionados cationes. Indicando la existencia de diferencias estructurales entre ambas enzimas, surgen las divergentes respuestas obtenidas en las incubaciones con solventes orgánicos y detergentes. A lo largo del desarrollo del trabajo, no se han podido lograr

con la FBPasa de cianobacterias las activaciones por modificación de dominios hidrofóbicos que se observan con la enzima de los cloroplastos. Estos resultados indican que los dominios cuya modificación da origen a las conformaciones activas, deben ser sumamente diferentes. En apoyo de esta suposición, se encuentra la estimulación de la actividad específica de la FBPasa de Anabaena sp 7119 por un perturbante físico: la temperatura. Esta activación, no detectada con la enzima de los cloroplastos, se produciría por modificaciones estructurales en las cuales la presencia de DTT es indispensable; en tanto, el catión Mg^{2+} impediría la estructuración de la conformación activa.

Finalmente, y como otro indicador de diferencias estructurales, anticuerpos policlonales contra la FBPasa de cloroplastos de espinaca no presentaron reacción cruzada con la enzima de cianobacterias, ya sea mediante las técnicas de Outcherlony (Inmunodifusión) o de Inmunolectroforesis.

Sobre la base de estos datos surge que las FBPasas de cloroplastos y de cianobacterias, si bien participan en un mismo ciclo (Benson-Calvin), son diferentes estructuralmente y están sujetas a distintas formas de regulación. Como ya se destacara, en las plantas superiores, el cloroplasto y el citoplasma constituyen dos compartimentos que contienen a dos FBPasas diferentes: una involucrada en fotosíntesis y la otra en gluconeogénesis. En cambio, en procariotas la misma enzima llevaría a cabo los dos procesos en el único compartimento existente, el citoplasma. Los datos comparativos en la secuencia de aminoácidos de las enzimas provenientes de hígado de cerdo (gluconeogénica) y de cloroplastos (fotosintética)

mostraron un 44% de homología más un 17% de reemplazos conservativos (Marcus y Harrsch, 1986). Ello sugiere que se puede haber mantenido el sitio catalítico mientras que modificaciones en la estructura primaria habrían alterado los sitios reguladores de la actividad enzimática. Entonces, sería posible conjeturar que por la falta de compartimentalización en cianobacterias la FBPasa ha evolucionado hacia una regulación que parcialmente semeja tanto a la fotosintética como a la gluconeogénica.

4. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El trabajo desarrollado para la presente Tesis de Doctorado abarca estudios de regulación de las enzimas que participan en el Ciclo de la asimilación fotosintética del CO₂ (Benson-Calvin), provenientes de cloroplastos de espinaca y de la cianobacteria Anabaena sp 7119. Estos estudios intentan profundizar en el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales la luz ejerce su efecto regulatorio. Como resultado de la iluminación, varias enzimas involucradas en la asimilación del CO₂ resultan activadas, en tanto que otras, participantes en las vías de degradación de hexosas y almidón, son desactivadas; el retorno a la oscuridad, revierte esta situación. El efecto de la luz, que causa activación enzimática, estaría mediado por:

- a) reducción
- b) iones
- c) efectores
- d) modificación de interacciones hidrofóbicas

Obviamente, los mecanismos descritos suelen operar por sí o en forma conjunta en lo que se denominan efectos concertados.

Las enzimas reguladas por la luz presentan comportamiento histerético, o sea que la velocidad de transformación de las mismas a un estado activo es menor que la de catálisis. De esta manera, el sistema del ciclo de Benson-Calvin, está protegido de cambios drásticos y es inducido por la regulación simultánea de cada uno de sus pasos.

En los estudios efectuados con la FBPasa y la NADP-GAPD de cloroplastos de espinaca se observa que ambas enzimas son activadas por aniones caotrópicos, disponiéndose las eficiencias molares de las sales utilizadas según la serie liotrópica (Hofmeister). Mientras que los aniones caotrópicos constituyen solamente moduladores secundarios de la FBPasa, disminuyendo las constantes cinéticas de los moduladores primarios, en el caso de la NADP-GAPD actúan como moduladores primarios y secundarios. Es destacable que en la GAPD solo puede ser estimulada la actividad dependiente del NADP (participante en el ciclo de Benson-Calvin) y no es alterada la relacionada al NAD. Por otra parte, dichos aniones son activadores de la fase de modificación e inhibidores de la fase catalítica, correspondiente a la FBPasa. En cambio, aunque las concentraciones óptimas difieren, ambas fases de la NADP-GAPD son estimuladas.

Los iones caotrópicos perturban la estructura del H₂O con lo cual favorecen la exposición de dominios hidrofóbicos de las proteínas. En este aspecto, se han ensayado métodos químicos y físicos que provocan una perturbación similar, y con ello estimulan la actividad enzimática: cosolventes (Corley y Wolosiuk, 1985) o alta presión (Prat Gay, datos no publicados).

Para la FBPasa, el cambio conformacional, mediado por los aniones caotrópicos, modifica la posición relativa de los grupos tirosina y triptofano, reduce puentes disulfuros y expone grupos -SH. Por su parte, la acción de los aniones caotrópicos sobre la NADP-GAPD altera la estructura cuaternaria causando la disociación. La

activación de la FBPasa y la GAPD por aniones caotrópicos no implica una desnaturalización (entendida como proceso irreversible) que conduce a una forma más activa, por cuanto, removiendo por diálisis los perturbantes, las enzimas retornan al estado nativo, siendo susceptibles de activarse nuevamente por preincubación con el mismo sistema.

La existencia en nuestro laboratorio de la FBPasa de los cloroplastos de espinaca, purificada a homogeneidad, permite profundizar en el análisis estructural del proceso de activación. Para ello, se titulan los grupos tioles con Iodoacetamida radioactiva luego que la FBPasa es sometida a diversas condiciones. La forma nativa de la FBPasa no presenta ningún grupo tiol reactivo a la Iodoacetamida. Cuando la enzima es desnaturalizada por tratamiento con SDS, un fragmento triptico (P.M.=16.000) es S-carboxiamidometilado; el agregado de un reductor, con el agente desnaturalizante, provoca la aparición de otro fragmento, cuya masa molecular es de 10.000 Da, marcado radioactivamente. La preincubación de la FBPasa con los tres sistemas de activación: solventes orgánicos, aniones caotrópicos (perturbantes no fisiológicos) y tiorredoxina (modulador natural), da origen a dos fragmentos S-carboxiamidometilados cuyos pesos moleculares son 16.000 y 10.000. Por lo tanto, dado que la tiorredoxina causa en la FBPasa (y en otras enzimas) efectos cinéticos similares a los que producen compuestos no involucrados en reacciones redox (solventes orgánicos y aniones caotrópicos), es probable que esta proteína contribuya también a la modificación de las interacciones hidrofóbicas (intramoleculares) de la FBPasa (y las otras enzimas). Este

aspecto implica un mecanismo fundamental en la activación lumínica de las enzimas cloroplásticas mediada por el sistema Ferredoxina-tiorredoxina.

Respecto de los mecanismos de desactivación enzimática, los cuales se discuten en la Introducción, se presentan en esta tesis evidencias preliminares sobre la existencia de un factor en las membranas de cloroplastos de espinaca capaz de desactivar la forma regulatoria de la NADP-GAPD. El mecanismo de acción de este factor, de naturaleza proteica, sería congruente con la situación "in vivo", por cuanto su efecto se anula en la transición oscuridad/luz.

Por otra parte, con el objeto de comparar el sistema de regulación enzimática de los cloroplastos con el proveniente de un organismo fotosintético procariota, se realizan ensayos de purificación y caracterización de la FBPasa de cianobacterias. Cuando se efectúan ensayos comparativos, una serie de características resultan similares entre las enzimas de cianobacterias y las de cloroplastos. La actividad específica de esta enzima es estimulada "in vivo" por la luz, y los datos obtenidos proveen evidencias indicadoras de que habría un mecanismo de reducción involucrado en dicho proceso. Además, el pH óptimo es similar al que presentan la mayor parte de las enzimas del estroma del cloroplasto activadas por la luz, y también sería una enzima histerética.

Sin embargo, estudios comparativos con la enzima de los cloroplastos muestran que la FBPasa de Anabaena sp 7119 posee características estructurales bastante diferentes:

a) Las técnicas de purificación no son extrapolables, si bien la enzima disociada produce, por electroforesis en geles de poliacrilamida, una banda mayoritaria de 46.000 Da, semejante a la hallada para la enzima de cloroplastos.

b) La actividad enzimática es mucho menos sensible al tratamiento con cationes bivalentes y trivalentes, tanto en el proceso de activación como en el de inhibición.

c) No presenta activación por modificación de las interacciones hidrofóbicas mediante detergentes y solventes orgánicos.

d) Anticuerpos policlonales contra la FBPasa de cloroplastos no exhiben reacción cruzada con preparaciones enzimáticas de la enzima de Anabaena sp.

e) El AMP, metabolito regulador de la vía gluconeogénica del citoplasma, es efectivo en la inhibición de la enzima de cianobacterias tal como lo hace con aquellas FBPasas heterotróficas. Ello sugiere que la enzima de Anabaena sp 7119 participa en las vías auto- y heterotróficas. Esto sería factible ya que, a diferencia de los eucariotas autotróficos, que presentan una FBPasa en los cloroplastos y otra en el citoplasma, en las cianobacterias hay un solo compartimento.

Todos estos datos indican que aunque ambas FBPasas participan en el ciclo de Benson-Calvin, sus características estructurales y cinéticas son diferentes.



BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, M. B.; ARNON, D. I.; CAPINDALE, J. B.; WHATLEY, F. R. y DURHAM, L. J. (1955) *J. Am. Chem. Soc.* 77, 4149-4155
- ANDERSON, L. E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 235, 237-244.
- ANDERSON, L. E. (1974) *Proc. 3rd Int. Cong. Photosynthesis*, pág. 1393-1405, Elsevier, Scientific Publishing Co., Amsterdam.
- ANDERSON, L. E. (1979) *Encycl. Plant Physiol.* 6, 271-281.
- ANDERSON, L. E. y AVRON, M. (1976) *Plant Physiol.* 57, 209-213.
- ANDERSON, L. E.; HANSEN, M. J. y ANDERSON, J. B. (1979) *Plant Physiol. Suppl.* 63(5), 2.
- ANDERSON, L. E.; NEIRLICH, S. C. y CHAMPIGNY, M. L. (1978) *Plant Physiol.* 61, 601-605.
- ANDREO, C. S. y VALLEJOS, R. H. (1984) *Fotosíntesis*, serie de Biología, monografía N°30, Secretaria Gral. de la O.E.A.
- ARAGNOL, D.; PRADEL, J. y CECHINI, J. P. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 829, 275-281.
- ARAKAWA, T. y GODDETTE, D. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 240, 21-32.
- ARNON, D. I. (1949) *Plant Physiol.* 24, 1-15.
- ARNON, D. I. (1955) *Science* 122, 9.
- ARNON, D. I. (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 39-42.
- ARNON, D. I.; ALLEN, M. y WHATLEY, F. (1954) *Nature* 164, 394-396.
- ARNON, D. I.; Mc SWAIN, B. D.; TSUJIMOTO, H. Y. y WADA, K. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 357, 231-245.
- ASAHI, T.; BANDURSKI, R. S. y WILSON, L. J. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1830-1835.
- ASHTON, A. R. y ANDERSON, L. E. (1979) *Plant Physiol. Suppl.* 63(5), 24.
- BAHR, J. T. y JENSEN, R. G. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 185, 39-48.
- BAIER, D.; LATZKO, E. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 396, 141-148.
- BASSHAM, J. A. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 2877-2882.

- BASSHAM, J. A. (1979) *Encycl. Plant Physiol.* 6, 9-30.
- BASSHAM, J. A.; BENSON, A. A.; KAY, L. D.; HARRIS, L. D.; HARRIS, A. Z.; WILSON, A. T. y CALVIN, M. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 1760.
- BASSHAM, J. A. y JENSEN, R. G. (1967) en *Harvesting the Sun* (San Pietro et al, eds.), pág. 111-130, New York: Academic.
- BASSHAM, J. A. y KIRK, M. (1968) en *Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis* (Shibata et al, eds.), pág. 365-378, State College, Pa: Univ. Park Press.
- BASSHAM, J. A. y KRAUSSE, G. H. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 189, 207-221.
- BEN-BASSAT, D. y ANDERSON, L. E. (1979) *Plant Physiol. Suppl.* 63(5), 8.
- BENSON, A. A. (1951) *J. Amer. Chem. Soc.* 73, 2971-2975.
- BENSON, A. A.; BASSHAM, J. A.; CALVIN, M.; GOODALE, T. C.; HASS, V. A. y STEPKA, W. (1950) *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 1710.
- BLACK, S.; HARTE, E. M.; HUDSON, B. y WARTOFSKY, L. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2910-2916.
- BLANKENSHIP, R. E. y PRINCE, R. C. (1985) *Trends Biochem. Sci.* 10, 382-383.
- BOEHM, J. (1883) *Bot. Zeitg.* 41, 33.
- BRADFORD, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BREAZEALE, V. D.; BUCHANAN, B. B. y WOLOSUIK, R. A. (1978) *Z. Naturforsch., Teil C* 33, 521-528.
- BROOKS, K. y CRIDDLE, R. S. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 117, 650-653.
- BUCHANAN, B. B. (1980) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 341-374.
- BUCHANAN, B. B. y SCHURMANN, P. (1972) *FEBS Lett.* 23, 157-159.
- BUCHANAN, B. B. y SCHURMANN, P. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 4956-4964.
- BUCHANAN, B. B. y SCHURMANN, P. (1973) "bis" *Curr. Top. Cell. Reg.* 7, 1-20.
- BUCHANAN, B. B.; SCHURMANN, P. y KARLBERER, P. P. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5952-5959.
- BUCHANAN, B. B.; SCHURMANN, P. y WOLOSUIK, R. A. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 970-978.
- BUCHANAN, B. B. y SIREVAG, R. (1976) *Arch. Microbiol.* 109, 15-19.

- BUCHANAN, B. B. y WOLOSUIK, R. A. (1976) *Nature* 264, 669-670.
- BUCHANAN, B. B.; WOLOSUIK, R. A. y SCHURMANN, P. (1979) *Trends Biochem. Sci.* 4, 93-96.
- CADET, F.; MEUNIER, J. C. y FERTE, N. (1987) *Eur. J. Biochem.* 162, 393-398.
- CALVIN, M. y MASSINI, P. (1952) *Experientia* 8, 445.
- CHARLES, S. A. y HALLIWELL, B. (1980) *Biochem. J.* 189, 373-376.
- CHARLES, S. A. y HALLIWELL, B. (1980) "bis" *Biochem. J.* 188, 775-779.
- CHEHEBAR, C. y WOLOSUIK, R. A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 613, 429-438.
- CHEN, P. S.; TORIBARA, T. Y. y WARNER, H. (1956) *Anal. Chem.* 28, 1756-1758.
- CHU, D. K. y BASSHAM, J. A. (1974) *Plant Physiol.* 54, 556-559.
- CHU, D. K. y BASSHAM, J. A. (1975) *Plant Physiol.* 55, 720-726.
- CLEMENT-METRAL, J. D. (1979) *FEBS Lett.* 101, 116-120.
- COCKBURN, W.; BALDRY, C. W. y WALKER, D. A. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 143, 614-624.
- COLLINS, K. D. y WASHABAUGH, M. W. (1985) *Quat. Rev. Biophys.* 18, 323-422.
- CORLEY, E. y WOLOSUIK, R. A. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 3978-3983.
- CORLEY, E.; WOLOSUIK, R. A. y HERTIG, C. M. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 707-714.
- CRAWFORD, N. A.; SUTTON, C. W.; YEE, B. C.; CARLSON, D. C. y BUCHANAN, B. B. (1983) en *Workshop on Light-Dark Modulation of Plant Enzymes*. Universität Bayreuth, Wallenfels, August 7-9, 1983 (pág. 38-42).
- CRAWFORD, N. A.; YEE, B. C.; HUTCHENSON, S. W.; WOLOSUIK, R. A. y BUCHANAN, B. B. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 244, 1-15.
- CSEKE, C. y BUCHANAN, B. B. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 853, 43-63.
- DE LA TORRE, A.; LARA, C.; WOLOSUIK, R. A. y BUCHANAN, B. B. (1979) *FEBS Lett.* 107, 141-145.
- DOUCE, R.; HOLTZ, R. B. y BENSON, A. A. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 7215-7222.

- DROUX, M.; CRAWFORD, N. A. y BUCHANAN, B. B. (1987) *Compt. Rend. Acad. Sci.* 305, 335-342.
- EDELHOCH, H. y OSBORNE, J. C. (1976) *Adv. Protein Chem.* 30, 183-250.
- EL-BADRY, A. M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 333, 366-377.
- FINK, R. M. y FINK, K. (1948) *Science* 107, 253.
- FLUHR, R.; KUHLEMEIER, C.; NAGY, F. y CHUA, N. H. (1985) *Science* 232, 1106-1112.
- FORD, D. M.; JABLONSKI, P. P.; MOHAMED, A. H. y ANDERSON, L. A. (1987) *Plant Physiol.* 83, 628-632.
- FRIEDEN, C. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 5788-5799.
- FRIEDEN, C. (1971) *Annu. Rev. Biochem.* 40, 653-696.
- FRIDOVICH, I. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 592-598.
- GERBLING, K. P.; STEUP, M. y LATZKO, E. (1984) *Arch. Microbiol.* 137, 109-114.
- GHOSH, H. P. y PREISS, J. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 4491-4504.
- GIBBS, M. (1971) en *Structure and Function of Chloroplasts* (Gibbs, M. ed.), págs. 169-214, Springer-Verlag, Berlin.
- GIBBS, M. y CYNKIN, M. A. (1958) *Nature* 182, 1241.
- GLAZER, A. N. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 768, 29-51.
- GOTTSCHALK, M. E.; CHATERJEE, T.; EDELSTEIN, I. y MARCUS, F. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 8016-8020.
- GREANEY, G. S. y ROMERO, G. N. (1979) *Biochemistry* 18, 5322-5332.
- GRIFFITH, C. J.; REA, P. A.; BLUMWALD, E. y POOLE, R. J. (1986) *Plant Physiol.* 81, 120-125.
- GRODEN, D. y BECK, E. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 546, 426-435.
- HALL, D. O. (1979) *Nature* 278, 114-117.
- HALL, D. O. y RAO, K. K. (1987) en *Photosynthesis* (Edward Arnold, ed.), Baltimore.
- HALLIWELL, B. (1978) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 33, 1-54.
- HANSTEIN, W. G.; DAVIS, K. A. y HATEFI, Y. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 147, 534-544.
- HATCH, A. y JENSEN, R. G. (1979) *Plant Physiol. Suppl.* 63(5), 64.

- HATCH, M. D. y SLACK, C. R. (1970) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21, 141-162.
- HATEFI, Y. y HANSTEIN, W. G. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 62, 1129-1136.
- HEBER, U.; NEIMANIS, S.; DIETZ, K. J. y VIJL, J. (1986) en *Progress in Photosynthesis Research* (Biggens, J., ed.), vol. 3, pág. 293-299. M. Nijhoff Publish., Dordrecht.
- HEBER, U. W. y SANTARIUS, K. A. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 109, 390-408.
- HEBER, U. W. y WALKER, D. A. (1979) *Trends in Bioch. Sci.* 4, 252-256.
- HELDT, H. W. (1976) en *The Intact Chloroplast* (Barber, J., ed.), pág. 215-234. Elsevier, Amsterdam.
- HELDT, H. W.; CHON, C. J.; MARONDE, D.; HEROLD, A.; STANKOVICH, Z. S.; WALKER, D. A.; KRAMINER, A.; KIRK, M. R. y HEBER, U. (1977) *Plant Physiol.* 59, 1146-1155.
- HELDT, H. W. y RAPLEY, L. (1970) *FEBS Lett.* 10, 143-148.
- HELDT, H. W.; WERDAN, K.; MILOVANCEV, M. y GELLER, G. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 314, 224-241.
- HELMER, F.; KIEHS, K. y HANSCH, C. (1968) *Biochemistry* 7, 2858-2863.
- HERSKOVITS, T. T.; SAN GEORGE, R. C. y ERHUNMWUNSEE, L. J. (1981) *Biochemistry* 20, 2580-2587.
- HERSKOVITS, T. T. y SORENSEN, S. M. (1968) *Biochemistry* 7, 2523-2532.
- HERSKOVITS, T. T. y SORENSEN, S. M. (1968) "bis" *Biochemistry* 7, 2533-2542.
- HERTIG, C. M. (1985) en *Regulación de Enzimas del Ciclo de Asimilación Fotosintética de CO₂*, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Univers. de Buenos Aires, Tesis doctoral.
- HERTIG, C. M. y WOLOSIUK, R. A. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 325-333-
- HERTIG, C. M. y WOLOSIUK, R. A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 984-989.
- HILL, R. y BENDALL, F. (1960) *Nature* 186, 136-137.
- HOLMGREN, A. (1981) *Trends Biochem. Sci.* 6, 26-29.
- HOLMGREN, A. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 237-271.
- HOLMGREN, A.; REICHARD, P. y THELANDER, L. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 830-836.

- HOLMGREN, A.; SODERBERG, B. O.; EKLUND, H. y BRANDEN, C. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2305-2309.
- HOLTZER, A.; WANG, T. Y. y NOELKEN, M. E. (1960) Biochim. Biophys. Acta 42, 453-461.
- HOOBER, J. K. (1984) en Chloroplasts (P. Siekevitz, ed.), Plenum Press, New York.
- HOSEY, M. M.; PLUT, D. A. y TAO, M. (1978) Biochim. Biophys. Acta 506, 211-220.
- HUG, D. H.; O'DONNELL, P. S. y HUNTER, J. K. (1980) Photochem. Photobiol. 32, 841-844.
- HURWITZ, J.; WEISSBACH, A.; HORECKER, B. L. y SMYRNIOTIS, P. Z. (1956) J. Biol. Chem. 218, 769-783.
- IADAROLA, P.; BONFERONI, C.; FERRI, G.; STOPPINI, M. y ZAPPONI, M. C. (1986) J. of Chromatog. 359, 423-432.
- INGENHOUSZ, J. (1779) Experiments upon Vegetables (Elmsly y Payne, eds.), Londres.
- INGENHOUSZ, J. (1796) Essay on the Food of Plants and the Renovation of Soils, apéndice capitulo 15 (General Report from Board of Agriculture), Londres.
- JACQUOT, J. P.; VIDAL, J. y GADAL, P. (1976) FEBS Lett. 71, 223-227.
- JACQUOT, J. P.; VIDAL, J.; GADAL, P. y SCHURMANN, P. (1978) FEBS Lett. 96, 243-246.
- JAGENDORF, A. y URIBE, E. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55, 170-177.
- JOHNSON, H. S. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 703-709.
- JOHNSON, H. S. y HATCH, M. D. (1970) Biochem. J. 119, 273-280.
- KACHRU, R. B. y ANDERSON, L. E. (1975) Plant Physiol. 55, 199-202.
- KAISER, W. M. y BASSHAM, J. A. (1979) Plant Physiol. 63, 105-108.
- KAISER, W. M. y BASSHAM, J. A. (1979) "bis" Plant Physiol. 63, 109-113.
- KANAZAWA, T.; KANAZAWA, K.; KIRK, M. R. y BASSHAM, J. A. (1970) Plant Cell Physiol. 11, 149-160.
- KARLBERER, P. P.; BUCHANAN, B. B. y ARNON, D. I. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57, 1542-1549.
- KELLY, G. J. y LATZKO, E. (1982) Prog. Bot. 44, 103-131.

- KELLY, G. J.; LATZKO, E. y GIBBS, M. (1976) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 27, 181-205.
- KELLY, G. J.; ZIMMERMANN, G. y LATZKO, E. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 193-199.
- KREIMER, G.; MELKONIAN, M.; HOLTUM, J. A. M. y LATZKO, E. (1988) *Plant Physiol.* 86, 423-428.
- LAEMMLI, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- LATZKO, E. y FISCHER, K. H. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89, 300-306.
- LATZKO, E. y KELLY, G. J. (1982) *Progress in Botany* 44, 103-131.
- LAURENT, T. C.; MOORE, E. C. y REICHARD, P. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 3436-3444.
- LAVERGNE, D. y BISMUTH, E. (1973) *Plant Sci. Lett.* 1, 229-236.
- LAYNE, E. (1957) en *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., ed.), vol. III, pág. 447-454. Academic Press, New York.
- LAZARO, J. J.; CHUECA, A.; LOPEZ-GORGE, J. y MAYOR, F. (1975) *Plant Sci. Lett.* 5, 49-55.
- LEA, A.; HANSCH, C. y ELKINS, D. (1971) *Chem. Rev.* 71, 525-616.
- LEEGOOD, R. C. y WALKER, D. A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 593, 362-370.
- LENDZIAN, K. J. (1978) *Planta* 143, 291-296.
- LENDZIAN, K. J. y ZIEGLER, H. (1970) *Planta* 94, 27-36.
- LORIMER, G. H.; BADGER, M. R. y ANDREWS, T. J. (1976) *Biochemistry* 15, 529-536.
- LOSADA, M.; HERVAS, M. y ORTEGA, J. M. (1987) en *Inorganic Nitrogen Metabolism* (Ulrich et al, eds.), pág. 3-15, Springer Verlag, Berlin.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. y RANDALL, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MARCUS, F.; GONTERO, B.; HARRSCH, P. W. y RITTENHOUSE, J. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 374-381.
- MARCUS, F. y HARRSCH, P. W. (1987) en *Progress in Photosynthesis Research* (J. Biggens, ed.), vol. III, pág. 471-474, Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- MARTIN, A. J. P. y SYNGE, R. L. M. (1952) *Le Prix Nobel en 1952*, Norstedt, Estocolmo.

- MARTIN, R. B. y RICHARDSON, F. (1979) *Quat. Rev. Biophys.* 12, 181-209.
- MASSEY, V. (1953) *Biochem. J.* 53, 67-71.
- MASTERS, C. J. (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 11, 105-143.
- McGOWAN, R. E. y GIBBS, M. (1974) *Plant Physiol.* 54, 312-319.
- MITCHELL, P. (1961) *Nature* 191, 144-148.
- MODEL, P. y RUSSEL, M. (1986) en "Thioredoxin and Glutaredoxin Systems, Structure and Function" (Holmgren, A.; Brändén, C. I.; Jornvall, H. y Sjöberg, B. M., ed.), pág. 323-329, Raven Press, New York.
- MONTAGNOLI, G. (1977) *Photochem. Photobiol.* 26, 679-683.
- MORILD, E. (1981) *Adv. Prot. Chem.* 34, 93-166.
- MULLER, B. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 205, 102-109.
- MULLER, B.; ZIEGLER, I. y ZIEGLER, H. (1969) *Eur. J. Biochem.* 9, 101-106.
- NEMETHY, G. (1986) *Methods Enzymol.* 127, 183-196.
- NEMETHY, G.; PEER, W. J. y SCHERAGA, H. A. (1981) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 10, 459-497.
- NICHOLSON, S.; EASTERBY, J. S. y POWLS, R. (1987) *Eur. J. Biochem.* 162, 423-431.
- NISHIZAWA, A. N.; WOLOSUIK, R. A. y BUCHANAN, B. B. (1979) *Planta* 145, 7-12.
- NORRIS, L.; NORRIS, R. E. y CALVIN, M. (1955) *J. Exp. Bot.* 6, 64-74.
- OKITA, T. W.; GREENBERG, E.; KUHN, D. N. y PREISS, J. (1979) *Plant Physiol.* 64, 189-192-
- ORTWERTH, B. J. y KOEPPPE, O. J. (1966) *Plant Physiol.* 41, 1213-1217.
- PACOLD, I. y ANDERSON, L. E. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51, 139-143.
- PAULSEN, J. M. y LANE, M. D. (1966) *Biochemistry* 5, 2350-2357.
- PELROY, R. A.; LEVINE, G. A. y BASSHAM, J. A. (1976) *J. Bacteriol.* 128, 633-643.
- PHARMACIA FINE CHEMICALS (1982) Isoelectric focusing. Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suecia.

- PLA, A. y LOPEZ-GORGE, J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 636, 112-118.
- PONTREMOLI, S. y HORECKER, B. L. (1971) en "The enzymes" (P. D. Boyer, ed.), vol. IV, pág. 612. Academic Press, New York.
- PORTIS, A. R. Jr. y HELDT, H. W. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449, 434-446.
- PRADEL, J.; SOULIE, J. M.; BUC, J.; MEUNIER, J. C. y RICARD, J. (1981) *Eur. J. Biochem.* 113, 507-511.
- PREISS, J.; BIGGS, M. L. y GREENBERG, E. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 2292-2294.
- PREISS, J.; GHOSH, H. P. y WITTKAP, J. (1967) en *Biochemistry of Chloroplast* (Goodwin, T. W., ed.), 2, 131-153, Academic Press, New York.
- PREISS, J. y KOSUGE, T. (1970) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21, 433-466.
- PUPILLO, P. y FAGGIANI, R. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 194, 581-592.
- PUPILLO, P. y GIULIANI-PICCARI, G. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 154, 324-331.
- PUPILLO, P. y GIULIANI-PICCARI, G. (1975) *Eur. J. Biochem.* 51, 475-482.
- QUAYLE, J. R.; FULLER, R. C.; BENSON, A. A. y CALVIN, M. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 3610.
- RACKER, E. (1955) *Nature* 175, 249-251.
- RACKER, E. (1957) *Arch. Biochem. Biophys.* 69, 300-310.
- RACKER, E. y SCHROEDER, E. A. R. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 326-344.
- RUBEN, S. y KAMEN, M. (1941) *Physiol. Rev.* 59, 49.
- RUSSEL, M. y MODEL, P. (1986) en "Thioredoxin and Glutaredoxin Systems, Structure and Function" (Holmgren, A.; Bränden, C. I.; Jornvall, H. y Sjöberg, B. M., ed.), pág. 331-337, Raven Press, New York.
- SACHS, J. (1863) *Jahrb. Wiss. Bot.* 3, 184.
- SCHEIBE, R. (1981) *FEBS Lett.* 133, 301-304.
- SCHEIBE, R. y BECK, E. (1979) *Plant Physiol.* 64, 744-748.
- SCHEIBE, R. y FICKENSCHER, K. (1985) *FEBS Lett.* 180, 317-320.
- SCHMIDT, A. (1979) *Plant Physiol. Suppl.* 63(5), 11.
- SCHMIDT, A. y CHRISTEN, U. (1978) *Planta* 140, 234-244.

- SCHULMAN, M. D. y GIBBS, M. (1968) *Plant Physiol.* **43**, 1805-1812.
- SCHURMANN, P.; ROUX, J. y SALVI, L. (1985) *Physiol. Veg.* **23**, 813-818.
- SCHURMANN, P.; TSUGITA, A.; MAEDA, K.; DALZOPPO, D. y VILBOIS, F. (1986) en "Thioredoxin and Glutaredoxin Systems, Structure and Function" (Holmgren, A.; Bränden, C. I.; Jornvall, H. y Sjöberg, B. M., ed.), pág. 31-38, Raven Press, New York.
- SCHURMANN, P. y WOLOSUIK, R. A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **522**, 130-138.
- SCHURMANN, P.; WOLOSUIK, R. A.; BREAZEALE, V. D. y BUCHANAN, B. B. (1976) *Nature* **263**, 257-258.
- SIEGEL, M. J. y LANE, M. D. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 5486-5498.
- SLACK, C. R. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**, 483-488.
- SRIVASTAVA, D. K. y ANDERSON, L. E. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **724**, 359-369.
- STEIGER, E.; ZIEGLER, I. y ZIEGLER, H. (1971) *Planta* **96**, 109-118.
- STOPPANI, A. O. M.; FULLER, R. C. y CALVIN, M. (1955) *J. of Bacteriol.* **69**, 491-501.
- SUGIYAMA, T.; NAKAYAMA, N. y AKAZAWA, T. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 737-745.
- TABOR, S.; HUBER, H. E. y RICHARDSON, C. C. (1986) en "Thioredoxin and Glutaredoxin Systems, Structure and Function" (Holmgren, A.; Bränden, C. I.; Jornvall, H. y Sjöberg, E. M., ed.), pág. 285-300, Raven Press, New York.
- TANFORD, C. (1968) *Adv. Prot. Chem.* **23**, 121-282.
- UFFEN, R. L. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 3298-3302.
- VON HIPPEL, P. H. y WONG, K. Y. (1964) *Science* **145**, 577-580.
- WAGNER, W.; FOLLMANN, H. y SCHMIDT, A. (1978) *Z. Naturforsch. Teil C* **33**, 517-520.
- WALKER, D. A. (1973) *New Phytol.* **72**, 209-235.
- WALKER, D. A. (1976) *Currents Topics in Cellular Regulation* (Ed. Horecker, B. L.) **11**, pág. 203-241. Academic Press, New York.
- WALKER, D. A. y CROFTS, A. R. (1970) *Ann. Rev. Biochem.* **39**, 389-428.

- WARA-ASWAPATI, O.; KEMBLE, R. J. y BRADBEER, J. W. (1980) *Plant Physiol.* 66, 34-39.
- WASHABAUGH, M. W. y COLLINS, K. D. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 12477-12485.
- WEBER, G. y DRICKAMER, H. G. (1983) *Quat. Rev. Biophys.* 16, 89-112.
- WEISSBACH, A.; HORECKER, B. L. y HURWITZ, J. (1956) *J. Biol. Chem.* 218, 795-810.
- WEISSBACH, A.; SMYRNIOTIS, P. Z. y HORECKER, B. L. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 3611.
- WERDAN, K. y HELDT, H. W. (1972) *Proc. Int. Cong. Photosynthesis Res. 2nd, 1971*, 2, 1337-1344.
- WERDAN, K.; HELDT, H. W. y MILOVANCEV, M. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 396, 276-292.
- WILDNER, G. F. y CRIDDLE, R. S. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 952-960.
- WILLARD, J. M.; DAVIS, J. J. y WOOD, H. G. (1969) *Biochemistry* 8, 3137-3144.
- WOLOSIUK, R. A. (1986) en "Thioredoxin and Glutaredoxin Systems, Structure and Function" (Holmgren, A.; Bränden, C. I.; Jornvall, H. y Sjöberg, B. M., ed.), pág. 253-266, Raven Press, New York.
- WOLOSIUK, R. A. y BUCHANAN, B. B. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 6456-6461.
- WOLOSIUK, R. A. y BUCHANAN, B. B. (1977) *Nature* 266, 565-567.
- WOLOSIUK, R. A. y BUCHANAN, B. B. (1978) *Plant Physiol.* 61, 669-671.
- WOLOSIUK, R. A. y BUCHANAN, B. B. (1978) "bis" *Arch. Biochem. Biophys.* 189, 97-101.
- WOLOSIUK, R. A.; BUCHANAN, B. B. y CRAWFORD, N. A. (1977) *FEBS Lett.* 81, 253-258.
- WOLOSIUK, R. A.; CORLEY, E.; CRAWFORD, N. A. y BUCHANAN, B. B. (1985) *FEBS Lett.* 189, 212-216.
- WOLOSIUK, R. A.; CRAWFORD, N. A.; YEE, B. C. y BUCHANAN, B. B. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1627-1632.
- WOLOSIUK, R. A. y HERTIG, C. M. (1983) en "Thiorredoxins, structure and functions." (Gadal, P., ed.), pág. 167-173. Editions CNRS, Paris.
- WOLOSIUK, R. A.; HERTIG, C. M. y BUSCONI, L. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 245, 1-8.

- WOLOSIUK, R. A.; PERELMUTER, M. E. y CHEHEBAR, C. (1980) FEBS Lett. 109, 289-293.
- WOLOSIUK, R. A. y SCHURMANN, P. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 189, 97-101.
- WOLOSIUK, R. A.; SCHURMANN, P.; BREAZEALE, V. D. y BUCHANAN, B. B. (1976) Fed. Proc. 35, 1732.
- WOLOSIUK, R. A.; SCHURMANN, P. y BUCHANAN, B. B. (1980) Methods in Enzymology 69, 382-391.
- WOLOSIUK, R. A.; STEIN, M. y BUSCONI, L. (1987) en Progress in Photosynthesis Research (J. Biggens, ed.), vol. III, pág. 459-462, Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- WOODROW, I. E. y WALKER, D. A. (1980) Biochem. J. 191, 845-849.
- YEE, A.; DE LA TORRE, A.; CRAWFORD, N. A.; LARA, C.; CARLSON, D. E. y BUCHANAN, B. B. (1981) Arch. Microbiol. 130, 14-18.
- YONUSCHOT, G. R.; ORTWERTH, B. J. y KOEPPE, O. J. (1970) J. Biol. Chem. 245, 4193-4198.
- ZIEGLER, H. y ZIEGLER, I. (1965) Planta 65, 369-380.
- ZIEGLER, H. y ZIEGLER, I. (1966) Planta Berlin 69, 111-123.
- ZIEGLER, H. y ZIEGLER, I. (1967) Planta 72, 162-169.
- ZIEGLER, H.; ZIEGLER, I. y SCHMIDT-CLAUSEN, H. J. (1965) Planta 67, 344-356.
- ZIEGLER, H.; ZIEGLER, I. y SCHMIDT-CLAUSEN, H. J. (1968) Planta 81, 181-192.
- ZIEGLER, H.; ZIEGLER, I.; SCHMIDT-CLAUSEN, H.J.; MULLER, B. y DORR, I. (1969) en "Progress in Photosynthesis Research" (Metzner, H., ed.) 3, 1636-1645. Tübingen, Laupp.
- ZIMMERMANN, G.; KELLY, G. J. y LATZKO, E. (1976) Eur. J. Biochem. 70, 361-367.

Quilley

Ricardo Wolosuk

