Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estudios sobre la relación estructura- función en las enzimas cloroplásticas reguladas por la luz

de Prat Gay, Gonzalo

1990

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

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

This document is part of the Master's and 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:
de Prat Gay, Gonzalo. (1990). Estudios sobre la relación estructura- función en las enzimas cloroplásticas reguladas por la luz. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n2345_dePratGay

Cita tipo Chicago:
de Prat Gay, Gonzalo. "Estudios sobre la relación estructura- función en las enzimas cloroplásticas reguladas por la luz". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n2345_dePratGay

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

TESIS DOCTORAL

ESTUDIOS SOBRE LA RELACION ESTRUCTURA-FUNCION EN LAS ENZIMAS CLOROPLASTICAS REGULADAS POR LA LUZ.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Autor: Gonzalo de Prat Gay

Director: Dr. R.A. Wolosiuk

- 2345 -

ej. 2

"Quien no conoce nada, no ama nada. Quien no puede hacer nada, no comprende nada. Quien nada comprende, nada vale. Pero quien comprende también ama, observa, ve... Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa, más grande es el amor... Quien cree que todas las frutas maduran al mismo tiempo que las frutillas nada sabe acerca de las uvas."

Felipe Teofrasto Bombast de Hohenheim,
Paracelso (1493-1541)

A mis viejos

INTRODUCCION	1
RESULTADOS Y CONCLUSIONES	57
DISCUSION GENERAL	159
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	172
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	187
ABREVIATURAS	197
AGRADECIMIENTOS	200

INTRODUCCION

I- Fototsíntesis. Conceptos generales
II- Componentes involucrados
A- Cloroplastos
B- Composición y estructura de la membrana fotosintética
1- Proteínas integrales
2- Lípidos estructurales
3- Pigmentos fotosintéticos
4- Complejos clorofila-proteínas
III- Funcionamiento del aparato fotosintético
A- Reacciones primarias y transporte de electrones
1- Esquema Z
2- Reacciones primarias
3- Fotosistema II
4- Complejo de citocromos y Plastocianina
5- Fotosistema I
B- Generación de poder asimilatorio:síntesis.de ATP y NADPH
1- Fotofosforilación
2- Quimiosmosis: diferencia de potencial electroquímico o fuerza protonmotriz
3- Mecanismo de síntesis de ATP
4- Reducción de $NADP^+$
C- Fotosíntesis bacteriana
1- Cianobacterias
2- Proclorófitas
3- Bacterias púrpuras
4- Bacterias verdes
IV- Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato ó ciclo de Benson y Calvin
A- Estudios iniciales. Formulación del ciclo
B- Etapas del ciclo. Enzimas participantes
1- Carboxilación
2- Reducción
3- Regeneración
4- Formación de productos
V- Regulación del ciclo de Benson y Calvin
A- Estudios de la regulación enzimática por la luz in vivo y con cloroplastos aislados
B- Sistema LEM
C- Estudios in vitro
1- Características estructurales
2- Características cinéticas
3- Moduladores de la actividad específica
i) Iones
ii) Metabolitos intrínsecos de los cloroplastos
iii) Sistema ferredoxina-tiorredoxina
iv) Relación entre el sistema ferredoxina-tiorredoxina y el sistema LEM
v) Interacción sinérgica entre los moduladores enzimáticos
VI- Estudios sobre las modificaciones hidrofóbicas en las enzimas del ciclo de Benson y Calvin
VII- Objetivos de la presente tesis

I- FOTOSINTESIS: CONCEPTOS GENERALES

La conversión de la energía solar en energía química es llevada a cabo por los organismos fotosintéticos. Este proceso posibilita la vida en la Tierra, a través de la reutilización de la energía y del carbono. Los seres vivos dependen de la captación de compuestos orgánicos (alimentos) del entorno, los que proveen el esqueleto carbonado para la biosíntesis y la energía metabólica que dirige las reacciones bioquímicas en las células. Pero la energía almacenada en los alimentos es disipada irreversiblemente en calor a medida que se efectúa el trabajo biológico. Dichos alimentos formaron parte alguna vez de seres vivos y, eventualmente, toda la materia viva pasa a anhidrido carbónico, agua y amonio (ó nitrógeno libre). Para que los compuestos orgánicos portadores de energía sean regenerados, se requiere el ingreso de energía externa. La fuente cuantitativamente más importante para los seres vivos es el sol, y el proceso que posibilita su utilización es la **fotosintesis**.

Las plantas superiores, algas y cierto tipo de bacterias, son las encargadas de capturar dicha energía y utilizarla para la formación de hidratos de carbono y un producto fundamental para la vida terrestre: el **oxígeno**. De ésta manera, se regula en forma cíclica el contenido de O_2 y CO_2 en la atmósfera a través del proceso fotosintético. La

totalidad del CO_2 es ciclada cada 300 años y la del O_2 cada 10500 años por los organismos fotosintéticos.

De la energía solar que alcanza la atmósfera, parte es reflejada antes de penetrarla; de la que logra entrar, parte no está dentro de la región espectral adecuada y a su vez, la que si lo está, es reflejada en gran parte por océanos y desiertos. Estos factores determinan que la producción de biomasa por la fotosintesis muestre una eficiencia del 0.2% (tomando como 100% al espectro visible) (56).

La ecuación clásica de la fotosintesis de las plantas puede representarse de la siguiente manera:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{LUZ} (CH_2O)n + O_2$$

Es una reacción endergónica ($\Delta G° = 2868$ kJ/mol $C_6H_{12}O_6$). Desde el punto de vista químico, es una reducción de CO_2. Una ecuación general que abarca tanto la fotosintesis bacteriana -en la cual no hay desprendimiento de O_2- como la de las plantas verdes es la propuesta por van Niel (148):

$$CO_2 + 2AH \xrightarrow{LUZ} (CH_2O) + 2A + 2H_2O$$

En esta ecuación se incluyó por primera vez a ambos tipos de fotosintesis en la reducción fotoquímica de CO_2. Surge de la misma que el O_2 es el producto de la fotólisis del agua (55). Estudios posteriores incluyeron en esta reducción al N y S.

$$CO_2 + [H] \xrightarrow{ATP} (CH_2O)_n + H_2O$$

$$NO_3^- + [H] \longrightarrow R\text{-}NH_2 + H_2O$$

$$SO_4^{2-} + [H] \xrightarrow{ATP} R\text{-}SH + H_2O$$

Para que éstas reacciones ocurran son necesarias determinadas estructuras y la existencia de compartimientos en las células capacitadas. Dichas estructuras son variadas según el organismo fotosintético de que se trate. En este sentido, el aislamiento de cloroplastos intactos y la posterior separación de sus componentes -membranas y estroma- permitió determinar que solo en presencia de la luz se producía desprendimiento de O_2, mientras que otras reacciones no requerían iluminación. Las diversas reacciones que ocurren fueron agrupadas en dos grandes categorías: i) las reacciones dependientes de la luz ó **lumínicas**, en las que la energía lumínica es transformada, generando poder reductor y asimila-

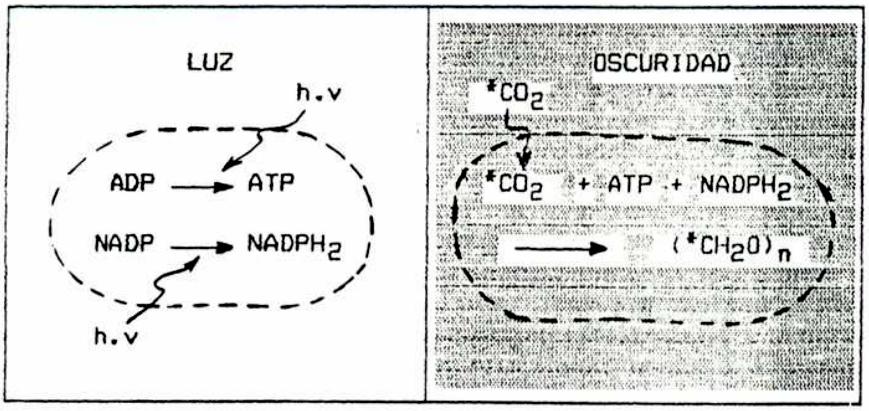


Figura 1. Reacciones oscuras y lumínicas del cloroplasto

torio (ATP) con producción de O_2; y ii) reacciones en la oscuridad u **oscuras**, donde los productos de las reacciones luminicas, son utilizados para la fijación de CO_2. Estas reacciones en las plantas se llevan a cabo dentro del cloroplasto (147).

Los organismos que realizan fotosintesis poseen determinadas estructuras especializadas para tal fin. La luz es captada por un sistema antena o **complejo colector** de energia, compuesto por los pigmentos que la transfieren a un **centro de reacción** (CR). En éste se produce la **transducción** de la energia: la excitación de un pigmento fundamental, la clorofila (ver más adelante) y la posterior separación de cargas. Esto posibilita el transporte de un electrón a través de la cadena fotosintética de transporte de electrones. En el caso de la fotosintesis oxigénica, existen dos sistemas. Cada centro de reacción con su complejo colector, constituyen un **fotosistema** (PS); existiendo dos que funcionan en serie en plantas superiores, algas y cianobacterias. Los fotosistemas I y II constituyen la base del esquema Z en donde las reacciones lumínicas se combinan para la transferencia de electrones del agua al $NADP^+$. El PSII es el responsable de la producción de O_2 (oxidación del agua), mientras que en el PSI se genera el NADPH (reducción del $NADP^+$).

II- COMPONENTES INVOLUCRADOS

Todos los organismos fotosintéticos (oxigénicos ó

anoxigénicos) presentan una membrana especializada que delimita un compartimiento. En cianobacterias, algas y plantas superiores, dicha membrana es el **tilacoide** mientras que en bacterias fotosintéticas lo constituye la membrana celular. Insertos en la estructura de la membrana se encuentran los pigmentos y proteínas que son funcionales en la fotosíntesis.

A- Cloroplastos

En 1837 el botánico alemán von Mohl dio la primera descripción definitiva del **cloroplasto**, como cuerpos coloreados dentro de la célula vegetal. Más tarde, en 1883, Schimper utilizó el nombre de plástidos y observó la capacidad de dichas organelas para dividirse, proponiendo, además, su origen endosimbiótico. En ése mismo año, Meyer describió unos corpúsculos en el interior de dichos plástidos a los que llamó grana. Las principales contribuciones en el estudio de la estructura y función cloroplástica, comenzaron hacia 1940 (20,73).

Los cloroplastos son organelas presentes sólo en plantas y algas. Su composición química es variada, como se indica en la tabla I.

Tabla I. Composición química de cloroplastos de espinaca intactos (55)

Componente	Porcentaje del peso seco del cloroplasto	
Proteínas totales	60	
insolubles en agua		27
solubles en agua		33
Lípidos totales	105	
clorofilas		4.3
carotenoides		0.9
lípidos no pigmentos		14.8
RNA	1.7-3.5	
DNA	?	
Aminoácidos libres	2.5	
Ortofosfatos	0.7	
Iones (K^+,Na^+,Mg^{2+},Ca^{2+},Cl^-)	3.6	
Polisacáridos	0.6	
Hexosaminas	0.2	
Almidón	variable	

Están rodeados por una doble envoltura, las membranas externa e interna, con permeabilidad limitada para sustancias iónicas. Se observó que la membrana externa permite la difusión no específica, por lo que el espacio intermembrana sería accesible a los metabolitos del citoplasma. La interna, en cambio, constituye la barrera funcional entre el interior de la organela y el citoplasma. Es permeable al CO_2 y ciertos ácidos monocarboxílicos, mientras que posee sistemas transportadores para el fosfato, compuestos fosforilados y ácidos dicarboxílicos (61). Delimitados por la membrana interna se encuentran: a) una fracción soluble -operacionalmente así definida- llamada **estroma**, donde se llevan a cabo numerosas reacciones bioquímicas, y b) un sistema de membranas que forman vesículas con estructura de

bolsas ó sacos aplanados: **los tilacoides.** La disposición espacial apilada de los tilacoides constituye las estructuras llamadas grana por Meyer.

Al igual que la mayor parte de las células desprovistas de pared, los cloroplastos son sensibles a la presión osmótica; de modo que para su aislamiento en forma intacta es necesaria la homogeneización del tejido en una solución isotónica. De ésta forma, Garnik en 1938 purificó por primera vez cloroplastos, homogeneizando el tejido en sacarosa 0.5M y separandolos luego por centrifugación diferencial. Este método es la base de los utilizados actualmente y fue fundamental en los avances de estudios estructurales y funcionales de la organela (20).

El sistema de membranas tilacoides separa al cloroplasto en un compartimiento tilacoideo ó **lumen**, comprendido dentro de los sacos o bolsas apilados en las grana ó en las zonas no apiladas. El otro compartimiento es el **estromático** (estroma) que está delimitado por la membrana interna del plástido. Este es un gel proteico cuyo principal componente soluble es la **ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa** (**RuBisCO**) y las enzimas del metabolismo del C, N y S. El estroma contiene, además, almidón -usualmente en forma de gránulos- ribosomas 70S, material lipídico, ácidos nucléicos e iones (ver tabla I).

B- Composición y estructura de la membrana fotosintética

Las membranas tilacoides están compuestas aproximadamente por partes iguales de lípidos y proteínas, organizados en un estado semi-fluído (39). La porción lipídica comprende a los galactolípidos como principal componente estructural, y los pigmentos participantes del proceso fotosintético. Los polipéptidos, asociados a la membrana en forma integral ó periférica, están en gran parte identificados. La mayoría de ellos funcionan, libres ó asociados a pigmentos, en el transporte fotosintético de electrones y síntesis de ATP. En los comienzos se creyó que la membrana estaba estructurada en capas continuas de lípidos y proteínas. Hacia 1960, con la ayuda de la microscopía electrónica, y en especial la técnica de criofracturación de membranas, se fortaleció la idea de que los componentes de la membrana se agrupaban en partículas discretas (20).

1- Proteínas integrales.

Atravesando las membranas tilacoides, se encuentran los fotosistemas I Y II. Estos fotosistemas están constituídos por polipéptidos entre los que se incluyen complejos clorofila-proteína, que se estructuran en los complejos central ó antena (LHC, Ver más adelante). Ambos fotosistemas están conectados por el complejo de citocromo b_{6f} que se encuentra también inserto dentro de la membrana. Por otra parte, el complejo H^+-ATPasa, que participa en la síntesis de ATP, se encuentra separado y constituye otra proteína integral en la membrana. Estos complejos pueden cambiar su

posición relativa dentro de la membrana por la acción de la luz con lo cual originan la posibilidad de una regulación dinámica (2).

2- Lípidos estructurales

Los lípidos más abundantes del cloroplasto, el mono- y el digalactosil diglicérido (relación 2:1), constituyen el grueso de la matriz (bicapa lipídica) de las membranas tilacoides (figura 2). Estos diglicéridos, que representan el 50% de los lípidos de la membrana, son ricos en ácidos grasos no saturados, en particular el ácido linolénico. Su estructura anfipática permite la formación de la bicapa lipídica, en la que, a diferencia de los fosfolípidos, la

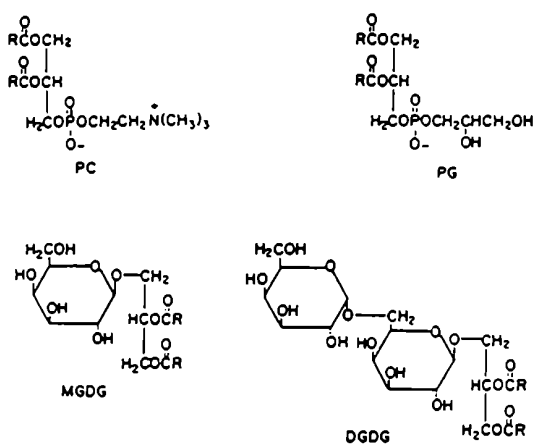


Figura 2. Lípidos polares de la membrana tilacoides. PC, fosfatidil colina, PG, fosfatidil glicerol, MGDG, monogalactosil diglicérido, DGDG, digalactosil diglicérido.

parte polar no está cargada. Esta característica permitiría que las membranas se estructuren en forma apilada, debido a la ausencia de repulsión electrostática (73).

En las membranas tilacoides existen, además, en pequeñas cantidades, sulfoglicolípidos y también fosfolípidos (fosfatidilglicerol).

3- Pigmentos fotosintéticos

CLOROFILA.

Pelletier y Caventou (1817) separaron por primera vez el pigmento verde de las plantas y lo llamaron **clorofila**. Luego, Dutrochet (1837), observó que éste pigmento era necesario para la fotosíntesis. Los estudios de su estructura fueron iniciados por Willstäter y colaboradores en 1928 y continuados por Fischer, quien en 1940, determinó la estructura de la clorofila a (**Chl_a**).

Todos los organismos fotosintéticos poseen clorofila unida a proteínas formando complejos. La molécula de clorofila es un tetrapirrol con estructura de anillo de porfirina cuyo átomo central es el magnesio (figura 3). Unida al anillo, posee una cadena de fitol -cuatro unidades de isopreno- que le confiere carácter hidrofóbico a la molécula.

Las variaciones estructurales en la diferentes clorofilas son pequeñas pero producen cambios muy significativos en las propiedades espectrales. La absorción del pigmento en las regiones del azul y del rojo se debe a los dobles enlaces conjugados del tetrapirrol. La Chl_a posee un máximo de absorción a 663nm en acetona; pero <u>in vivo</u>, éste máximo se presenta a longitudes de onda más largas.

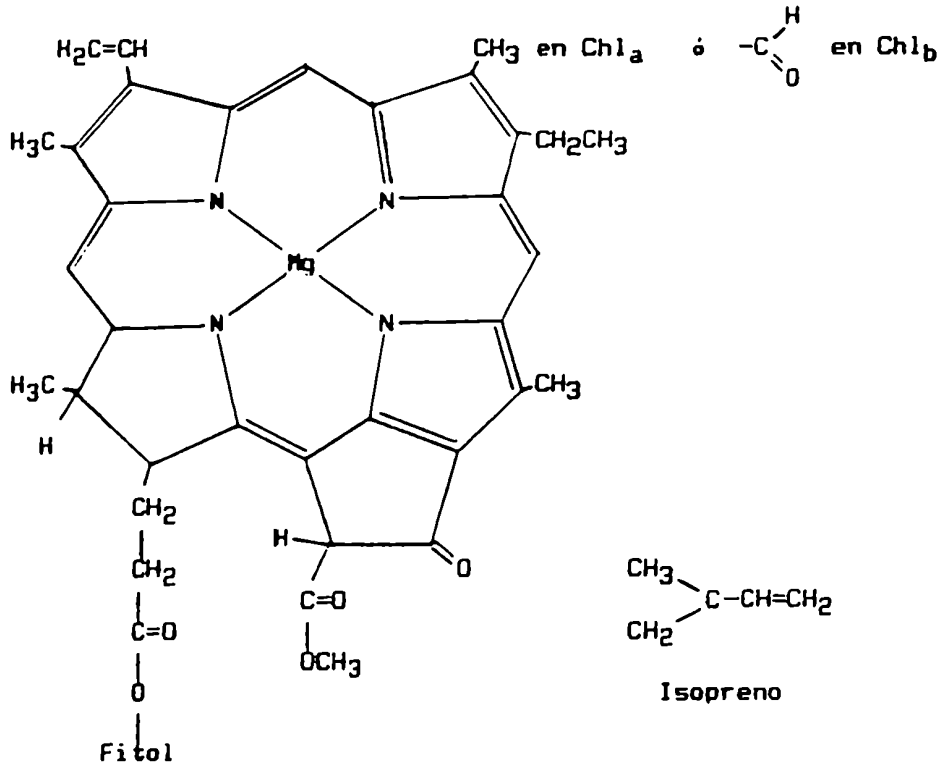


Figura 3. Estructura de la clorofila.

Este fenómeno se debe a la asociación con proteinas y otras clorofilas en la membrana tilacoidea. Evidencias espectroscópicas indican que existen varias formas de Chl_a. La molécula de Chl desprovista de su átomo de Mg2+ central es denominada **feofitina** y participa en la transferencia de electrones. Su máximo de absorción se encuentra desplazado a longitudes de onda más cortas comparado con el de la Chl.

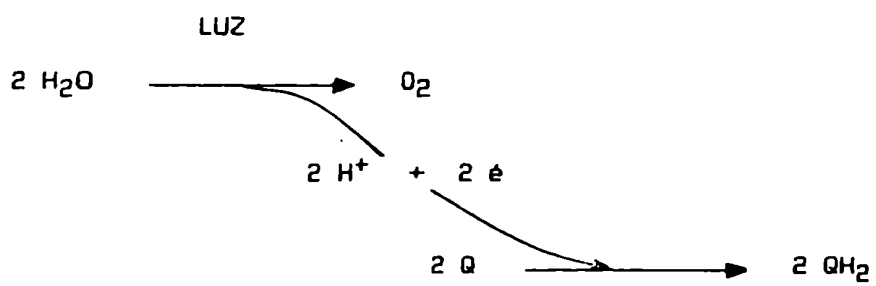
CAROTENOIDES.

Son tetraterpenos cuyo espectro de absorción abarca la zona del amarillo y el rojo. Los principales carotenoides en tejidos fotosintéticos son **β-caroteno**, **luteina**, **violaxantina**

y **neoxantina.** Se encuentran unidos a las membranas fotosintéticas y actúan como pigmentos accesorios, ya que presentan un amplio espectro de absorción que complementa al de la Chl. Poseen una importante función protectora contra la fotooxidación de la clorofila, al neutralizar el oxígeno singulete producido por la luz en presencia de un fotorreceptor (55). Además, transfieren eficientemente la energía de excitación a los pigmentos accesorios y, a través de éstos, a los centros de reacción.

QUINONAS

Dentro de las membranas tilacoides se encuentran un grupo de derivados quinónicos denominados **plastoquinonas.** Estos compuestos pueden sufrir reacciones redox como componentes de la cadena de transporte de electrones. Dichas reacciones involucran, a su vez, toma y liberación de iones H^+, transportándolos a través de la membrana. Como se verá más adelante, este transporte de H^+ será utilizado en la síntesis de ATP (sección B-).



4- Complejos clorofila-proteinas

Diversos métodos físicos y químicos permiten la separación de proteinas asociadas a pigmentos (121). Por electroforesis en geles, se pueden separar numerosos polipéptidos, algunos de los cuales están asociados a Chl. El complejo del centro de reacción (CR) II, está constituido por diez polipéptidos, que, además de poseer entre 40 y 60 moléculas de Chl, contiene a la Chl del centro de reacción: P_{690}. El complejo colector de luz II (Light Harvesting Complex, LHCII), está asociado al PSII y compuesto por 4 a 6 polipéptidos unidos a Chl a, b y carotenoides.

Una vez separado el PSI, sus componentes se estudian también por electroforesis en geles, en procedimientos que implican la utilización de detergentes (121). De esta manera aparecen 13 componentes que contienen complejos Chl-proteina relacionados con el centro de reacción I (CRI) y LHCI. LHCI está constituido por cuatro polipéptidos que poseen entre 40 y 80 clorofilas. El CRI contiene la Chl P_{700} y están presentes, además de 40 a 120 moléculas de Chl por centro. Los péptidos separados por electroforesis en gel, están asociados *in vivo* a complejos de aproximadamente 110 kDa, resultando en consecuencia mayor que el CRII.

III- FUNCIONAMIENTO DEL APARATO FOTOSINTETICO

El transporte fotosintético de electrones comienza con la absorción de fotones por el complejo colector; esta energía absorbida es transferida por los pigmentos accesorios y los complejos colectores a los centros de reacción de PSI y PSII. La excitación por la luz conduce a la oxidación de P_{680} y P_{700} y a la concurrente reducción del aceptor primario, produciéndose una separación de cargas. La determinación de la existencia de dos reacciones luminicas se debe a Emerson, quien observó que la producción de O_2 en algas caia a longitudes de ondas mayores de 680 nm. Esto no ocurria si se irradiaba simultáneamente a 650 y 700 nm, indicando la presencia de dos fotorreacciones actuando en serie (42).

A- Reacciones primarias y transporte de electrones

1- Esquema Z

Los componentes de la cadena de transporte de electrones fueron ordenados por Hill y Bendall en el esquema Z como muestra la figura 4 (68). En este esquema, dos fotosistemas se combinan para reducir al $NADP^+$, utilizando como reductor al agua. Debido a que el proceso está termodinámicamente desfavorecido, su funcionamiento se deba al aporte de energía captada por las dos fotorreacciones. El esquema Z muestra los niveles de energía del flujo electrónico (estado redox).

2- Reacciones primarias.

Los centros fotoquimicos que proporcionan el potencial electroquimico para el funcionamiento de la cadena de

trasnsporte de electrones son las Chl P_{700} y P_{690} (RC I y

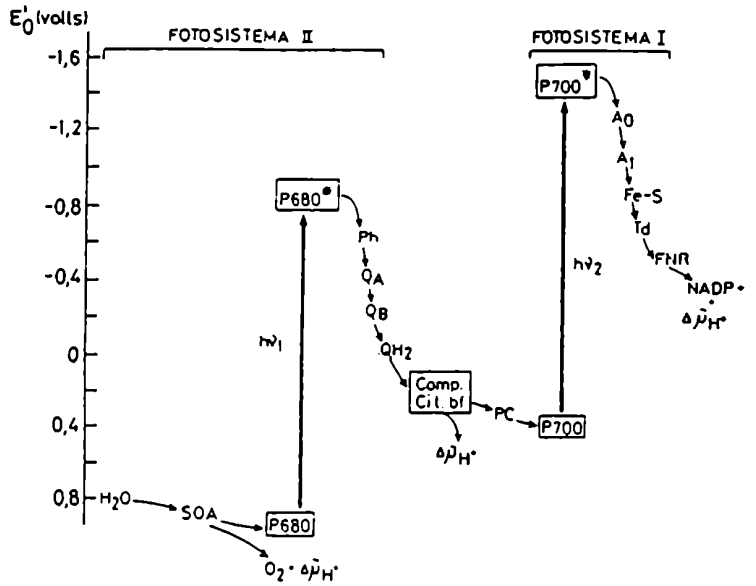


Figura 4. Esquema Z de la fotosintesis. Ph, feofitina, Q_A y Q_B, sitios protéicos de la plastoquinona, QH_2, plastoquinona reducida, PC, plastocianina, A_0 y A_1, aceptores clorofílicos de é, F_d, ferredoxina, FNR, ferredoxina NADP-reductasa, SOA, sistema de oxidación del agua, Fe.S, sulfoferroproteína unida a la membrana.

II). A su vez el sistema de pigmentos (LHC I y II) facilita el acceso de la energia luminosa a los centros de reacción.

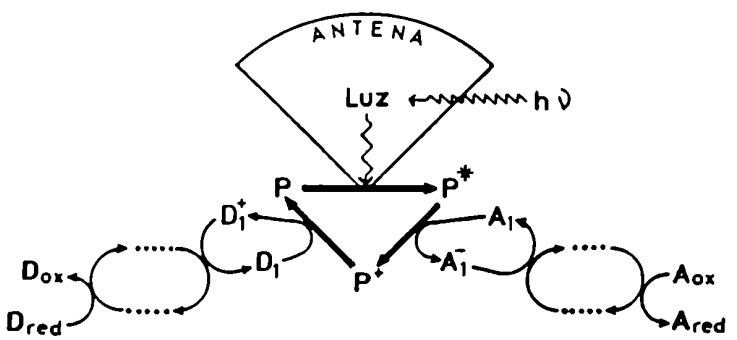


Figura 5. Esquema de la acción de la luz sobre un fotosistema. P, pigmento Chl del centro de reacción (Chl_{CR}), P^*, Chl_{CR} excitado, P^+, Chl_{CR} oxidado, A, aceptor y D, dador de electrones.

La luz excita a P (690 ó 700) y se induce la separación de cargas en dichos centros; posteriormente el electrón faltante es aportado por un dador de electrones D que, en el caso del PSII, toma a su vez uno originado en el agua; en tanto que en el PSI, el electrón faltante es aportado por la plastocianina (ver más adelante). Por otra parte, los aceptores reducidos constituyen los reductores para la PQ (PSII) o el NADP (PSI).

3- Fotosistema II.

El centro de reacción del PSII (CRII), está constituido por una Chl dimérica (P_{690}) que recibe electrones del sistema productor de O_2. Una vez excitado, P_{690} reduce a la feofitina, la que a su vez reduce a la plastoquinona Q_A unida a proteína. Esta última etapa requiere, además la captación de un protón. El catión P_{690}^+ es reducido por un complejo cuyo dador final de electrones es el agua (16).

La dirección del flujo electrónico implica la reducción y oxidación sucesivas de Q_A y Q_B (en ese orden), las dos plastoquinonas que se encuentran unidas a un ion Fe^{2+} de una proteína en la membrana tilacoide. Luego, Q_B es reducida a **plastohidroquinona** (PQH2), mediante la captación de dos protones, pasando a formar parte de las PQ libres en la membrana. El sitio de Q_B en el polipéptido de la membrana, a su vez, recibe una molécula de PQ oxidada del conjunto de PQ libres (16).

Joliot encontró que los cloroplastos liberaban O_2 luego de ciclos de cuatro flashes de muy corta duración (79). Se

postuló primero y se determino posteriormente, la presencia de un complejo enzimático responsable de la oxidación del agua. Este complejo enzimático, que contiene cuatro átomos de manganeso, cataliza la liberación de una molécula de O_2 luego de cuatro oxidaciones sucesivas (15).

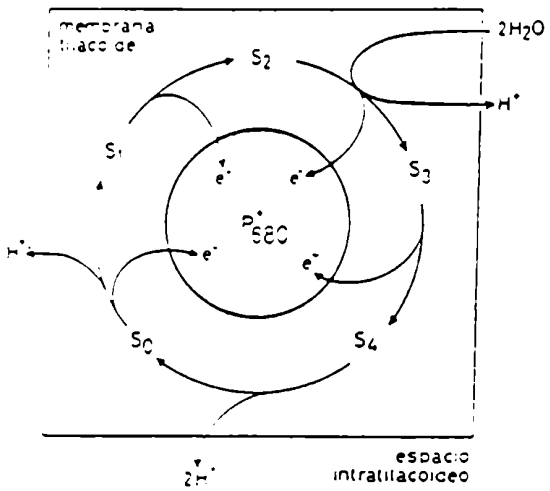
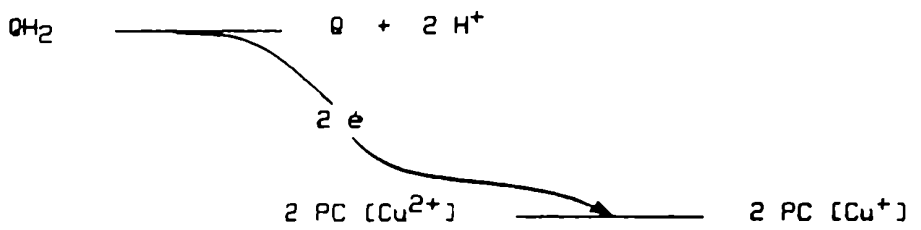


Figura 6. Esquema de la oxidación del agua por el PSII. S_0-S_4, estados redox del sistema de oxidación del agua.

4- Complejo de citocromos y plastocianina.

Entre el conjunto de PQ y el PSI hay un complejo de proteinas integrales: **citocromo-f**, **citocromo-b** (553) y una **sulfoferroproteina** [Fe-S]. Este complejo posee sitios de unión para PQH_2. Los protones liberados en la oxidacion de PQH2, pasan al compartimiento tilacoideo (lumen), produciendose la acidificacion del mismo y en consecuencia se establece un gradiente de concentración de protones (μH^+) a través de la membrana tilacoidea.



El transporte de electrones continúa luego con la reducción de la plastocianina (PC), una proteina que contiene cobre y sirve de dador electrónico para el PSI. La PC se encuentra dentro del espacio tilacoideo.

5- Fotosistema I.

En términos generales, el PSI cataliza la transferencia de electrones de la PC (lumen) a la **ferredoxina** (Fd), que es una sulfoferroproteina que contiene un centro [2Fe-2S] y está localizada en el estroma. Posteriormente, la Fd reduce al $NADP^+$. La separación de cargas en el CRI comprende la transferencia de un electrón del P_{700} (Chl dimérica) a una serie de aceptores secuenciales: A_0, A_1 y X. A_0 es una Chl monomerica especifica y A_1 es vitamina K_1 (85). El aceptor X es un centro [Fe-S] con un potencial redox (Em) extremadamente electronegativo (Em=-705mV). Por el contenido de cisteinas de los polipeptidos, se cree que la estructura de X es [4Fe-4S]. Hay, ademas otros dos centros [4Fe-4S] de potencial redox mayor que X: A (Em=-530mV) y B (Em=-590mV). Recientemente se identificó una proteina de 9 kDa cuyos grupos prosteticos son dos centros [4Fe-4S] y se postuló que

los mismos corresponden a los centros A y B (174). Finalmente éstos centros ceden su electrón a la Fd y ésta a su vez reduce al $NADP^+$ en una reacción catalizada por la ferredoxina-NADP reductasa (FNR) -enzima fuertemente asociada a la membrana-.

B- Generación de poder asimilatorio: producción de ATP y NADPH

Los eventos fotoquímicos conducen a la generación de poder asimilatorio (ATP y NADPH) requerido para la fijación de CO_2. Como consecuencia del transporte de electrones se establece un gradiente protónico y una separación de cargas, posibilitando la síntesis de ATP.

Hasta 1930 se creía que la Chl se encontraba directamente relacionada con la reducción de CO_2 (67). Van Niel, estudiando las bacterias quimiosintéticas, observó que podían reducir CO_2 en la oscuridad y sin Chl (148). Esto indicaba que la luz y la Chl podían disociarse de la reducción de CO_2. En 1939, Hill reportó que los cloroplastos aislados eran capaces de producir O_2 con compuestos oxidantes que no fueran CO_2; este tipo de reacciones se las denominó reacciones de Hill.

$$2Fe^{3+} + H_2O \xrightarrow[\text{(cloroplastos)}]{\text{LUZ}} 2Fe^{2++} + 2H^+ + \tfrac{1}{2} O_2$$

Más tarde, en 1943, Ruben demostró que el O_2 que se desprende proviene del H_2O y postuló la necesidad de ATP y poder reductor. Esto coincidió con los requerimientos del ciclo de Benson y Calvin, desarrollado posteriormente (18).

1- Fotofosforilación

La conversión de ADP y Pi en ATP llevada a cabo dentro del cloroplasto, se denomina fosforilación fotosintética o **fotofosforilación**, para diferenciarla de la fosforilación oxidativa mitocondrial. De esta manera, se genera un compuesto capaz de liberar energía química para ser utilizada en las numerosas reacciones oscuras. Existen distintos tipos de fotofosforilación.

CICLICA

En 1954, Arnon, Allen y Whatley descubrieron la fotofosforilación ciclica (13) En ésta reacción no hay consumo ni producción de O_2 y el proceso es catalizado por la Fd reducida en condiciones aeróbicas ó anaeróbicas. La fotofosforilación ciclica está asociada con el PSI ya que inhibidores del PSII como el DCMU, no impiden la producción de ATP. La inhibición por antimicina A indica que los electrones provenientes de la Fd reingresarían en la cadena de transporte de electrones en algún lugar entre los dos fotosistemas (citocromo b_{563}). Actualmente se asume que la acumulación de NADPH -no oxidado por el ciclo de Benson y Calvin- favorecería la fotofosforilación ciclica. Esto

posibilitaría la formación de ATP sin reducción de $NADP^+$ ni producción de O_2.

NO CICLICA

Esta forma está asociada al transporte de electrones de un dador (H_2O) a un aceptor ($NADP^+$ ó ferricianuro). Puede funcionar alternativamente un reductor de bajo potencial redox como el diclorofenolindofenol (DCIP), bloqueando al mismo tiempo el PSII con DCMU (figura 7).

Se estableció experimentalmente le existencia de dos pares redox en el transporte lineal de electrones, responsables de la sintesis de ATP. Estos dos "sitios" corresponden a la generación de H^+ a partir de: a) la oxida-

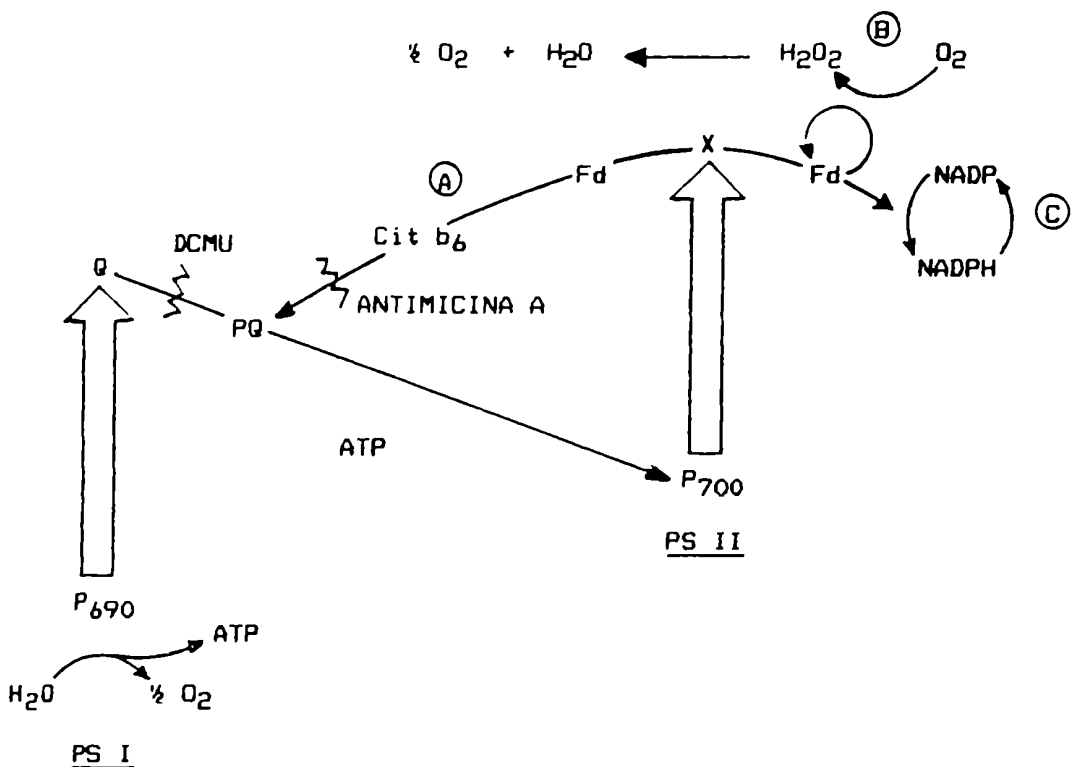


Figura 7. Esquema de fotofosforilación. A, ciclica, B, seudociclica, C, no-ciclica (39).

ción de plastoquinonas de la membrana tilacoides y b) la oxidación del agua por parte del PSII.

SEUDOCICLICA

En 1951, Mehler describió una reacción en la cual el O_2 funcionaba como aceptor de electrones. En ésta reacción hay captación y producción de O_2 simultáneas, que no pueden ser medidas por métodos convencionales. Este transporte de electrones seudociclico es una variante del no-ciclico y se especula acerca de su existencia in vivo. Los electrones son transportados en forma lineal sin reducción de $NADP^+$ pero retornan al O_2, actuando la Fd como intermediario autooxidable (39). Desde el punto de vista fisiológico, este transporte seria importante cuando hay exceso de NADPH que no puede ser reoxidado por el ciclo de Benson y Calvin.

En esta reacción se produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), además de radicales superóxido, tóxicos para el cloroplasto.

$$H_2O + \frac{1}{2} O_2 + Fd_{red} \xrightarrow{h.v} Fd_{ox} + H_2O_2$$

En presencia de catalasa se produce O_2, por lo que no existe intercambio neto de dicho gas.

$$H_2O + O_2 + Fd_{ox} \xrightarrow{h.v} Fd_{red} + H_2O_2 + \frac{1}{2} O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{catalasa} H_2O + \frac{1}{2} O_2$$

2- Quimiosmosis: diferencia de potencial electroquímico ó fuerza protonmotriz.

La excitación de la Chl por la luz, promueve un electrón a un estado de energía superior. Luego, el transporte de dicho electrón, involucra una serie de reacciones consecutivas con las que alternan reacciones que implican la reducción dependiente e independiente de protones, causando una distribución asimétrica de dicho catión. Hind y Jagendorf demostraron que el medio en el que se encuentran los cloroplastos sin envoltura, se alcaliniza al iluminar; volviendo a acidificarse en la oscuridad (69). La hipótesis quimiosmótica de Mitchell explica todos estos hechos, de fundamental importancia en la síntesis de ATP (105). La novedad de la hipótesis de Mitchell no radica en la traslocación de H^+ acoplada a un flujo electrónico, sino en la proposición de que la ATP sintetasa de las membranas mitocondrial y fotosintética también trasloca H^+. Esto permitiría la generación de un gradiente electroquímico ó **fuerza protonmotriz** (**fpm**) que se utiliza para la síntesis de ATP. Este gradiente posee un componente eléctrico $\Delta\Psi$ (debido al desbalance de cargas) y un componente químico $Z\Delta pH$ ($Z=RT/f=$ 60mV). Por lo tanto, la fuerza protonmotriz es la sumatoria de dos componentes:

$$fpm = \Delta\Psi + Z\Delta pH$$

Existen cuatro requerimientos básicos para la hipótesis quimiosmótica:

i) las cadenas de transporte electrónico fotosintético (y respiratoria) deben traslocar H^+;

ii) la ATP sintetasa debe funcionar como una ATPasa reversible traslocadora de H^+;

iii) las membranas transductoras de energía deben tener una baja conductancia protónica efectiva;

iv) las membranas transductoras de energía deben poseer transportadores específicos de metabolitos y la capacidad de mantener la estabilidad osmótica en presencia de un alto potencial de membrana.

En determinados sitios de la cadena de transporte de electrones, los H^+ son liberados dentro del espacio tilacoideo, produciendo una acidificación del mismo y una alcalinización del estroma (figura 8). Luego de la iluminación, la diferencia de pH entre el estroma y el compartimiento tilacoideo es de 3 a 3.5 unidades. En la oscuridad, los pH intratilacoideo y estromático retornan lentamente a su valor inicial. Esta variación del pH es función del transporte de electrones y, en presencia de detergentes que permeabilizan la membrana a los protones, no puede ser detectada.

3- Mecanismo de síntesis de ATP.

Un gradiente protónico generado artificialmente puede llevar a cabo la síntesis de ATP por las membranas tilacoides

en la oscuridad (78). Esto coincidía con la hipótesis quimiosmótica de Mitchell donde la síntesis de ATP está asociada con la disipación del gradiente protónico a través de una ATPasa funcionando en forma reversible. Esta enzima consta de dos factores acoplantes (Racker): el CF_1 (factor de acoplamiento) que se encuentra del lado estromático de la membrana tilacoide y el CF_0 que atraviesa la membrana tilacoide . El CF_1 está compuesto por 5 tipos de subunidades proteicas ($3\alpha:3\beta:\gamma:\delta:\varepsilon$), y puede ser liberado de la membrana, catalizando en este estado sólo la hidrólisis del ATP. El CF_0 se encuentra inserto en la membrana y está formado por tres subunidades polipeptídicas, una de las cuales es un proteolípido. La síntesis del ATP comienza con la unión de

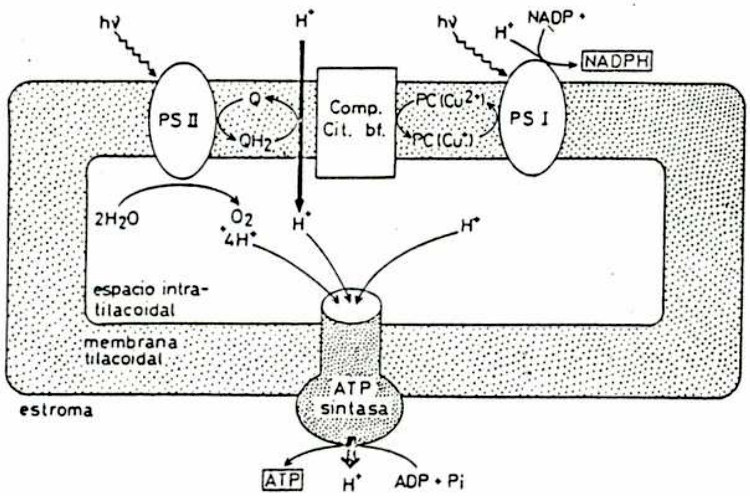


Figura 8. Esquema de transporte de protones y síntesis de ATP. PSII, fotosistema II, PSI, fotosistema I, PC (Cu^{2+}), plastocianina oxidada, Q, plastoquinona, PQH_2, plastoquinona reducida.

fosfato y ADP a CF_1, que actúa a través de las subunidades β en forma catalítica y las α en forma regulatoria. Por otra parte, CF_0 participa en el pasaje de los protones a través de la membrana.

Existe una hipótesis alternativa propuesta por Boyer, en la cual la síntesis de ATP se lleva a cabo en forma espontánea en el sitio activo de CF_1 sin necesidad de energía. Los protones actuarían indirectamente, produciendo un cambio conformacional en CF_1, causando a la vez la liberación del ATP. En esta etapa se disiparía la energía (22).

4- Reducción del $NADP^+$

FERREDOXINA

Hill y colaboradores demostraron que una fracción proteica de extractos acetónicos de hojas, era capaz de reducir la metahemoglobina (67,12). Posteriormente fue descripta como piridín nucleótido reductasa fotosintética por San Pietro y Lang (131). Luego del aislamiento de una proteína de tipo [Fe-S] de bacterias por Mortenson, Arnon y Tagawa descubrieron una proteína que era capaz de catalizar la reducción de $NADP^+$ en cloroplastos iluminados (12). Esta ferredoxina es similar a las bacterianas, tiene un peso molecular de 11000 y su grupo prostético está compuesto por dos átomos de hierro y dos de azufre por molécula. Posee un potencial redox de -430 mV y cataliza la transferencia de un

electrón por vez. Se encuentra débilmente asociada a la membrana en el PSI.

FERREDOXINA-NADP REDUCTASA

Al purificar Fd soluble, se observó que la misma no reducía por sí sola al $NADP^+$. Sin embargo, dicha reacción ocurrió en presencia de membranas tilacoides lavadas, Fd y $NADP^+$ bajo iluminación. Esto indicaba la presencia de un factor asociado a las membranas, capaz de llevar a cabo la reducción del nucleótido. La Fd-NADP reductasa es una flavoproteína fuertemente unida a las membranas cuyo espectro de absorción presenta picos a 275, 385 y 456nm. Su afinidad por el $NADP^+$ es tres órdenes de magnitud mayor que por el NAD^+ y se la considera $NADP^+$-específica bajo las condiciones fisiológicas.

C- Fotosíntesis bacteriana

1- Cianobacterias

Estos organismos realizan fotosíntesis oxigénica con dos reacciones luminosas muy similares a las de las plantas. Su aparato fotoquímico consta de tres complejos macromoleculares: i) el **ficobilisoma**, que sirve de antena ó colector al PSII; ii) un PSII, similar al de los cloroplastos; iii) y un PSI desprovisto de complejo antena (LHCI), también semejante al de plantas. Los genes de los componentes polipeptídicos de PSI, PSII, complejo ATPasa y citocromo b_{6-f} de las cianobacterias, presentan un alto grado

de homología en su estructura primaria con respecto a los correspondientes de los cloroplastos (52).

Los ficobilisomas son complejos proteicos constituidos por **ficobiliproteínas** (apoproteínas con grupos bilina) y proteínas de unión (sin grupo prostético). Los estudios espectroscópicos y de fraccionamiento indican que el ficobilisoma está en íntimo contacto con el PSII, y le transfiere la energía exclusivamente a éste. La generación de poder asimilatorio (síntesis de ATP y NADPH), ocurre del mismo modo que en las plantas.

2- Proclorófitas

Son algas unicelulares procarióticas cuyo único representante es Prochloron. No posee ficobiliproteínas ni carotenos pero sí Chl a y b, formando parte del complejo colector. La membrana fotosintética se encuentra plegada y apilada como en cianobacterias, y al igual que éstas y las plantas, lleva a cabo fotosíntesis oxigénica.

3- Bacterias púrpuras

Existen dos tipos de bacterias púrpuras: las sulfurosas y las no sulfurosas. Entre las primeras se encuentran las del género Rhodospirillaceae, que utilizan alcoholes y ácidos dicarboxílicos como dadores de electrones. Entre las del segundo grupo, las del género Chromatiaceae utilizan sulfuro de hidrógeno (SH_2). El aparato fotosintético se encuentra localizado en invaginaciones de la membrana citoplasmática,

formando vesículas semejantes a los tilacoides. Poseen un solo fotosistema y el complejo colector contiene complejos bacterioclorofila (BChl)-proteinas $B_{800-850}$ y B_{870} que incluyen el centro de reacción: P_{870}. Los electrones circulan en forma ciclica a través de las quinonas para retornar a P_{870}.

La traslocación de protones genera una diferencia de pH de dos unidades, originando el gradiente protonmotriz necesario para la sintesis de ATP. Por otra parte, el NAD^+ seria reducido por la acción conjunta de un transporte invertido de electrones para el cual es necesaria la hidrólisis de ATP.

4- Bacterias verdes

Las bacterias verdes poseen **clorosomas** como estructuras fotosintéticas. Estos son vesículas intimamente relacionadas con la membrana citoplasmática por una membrana basal. Esta membrana aparentemente posee el complejo antena y en la placa basal el complejo BChl-proteina. El centro de reacción es la BChl P_{840}, que al ser excitada reduce a un aceptor primario con un potencial redox muy electronegativo. A diferencia de las bacterias púrpuras, éste aceptor puede ceder sus electrones al NAD via Fd. El déficit electrónico que se produce en el CR seria compensado por una cadena de citocromos que recibiría electrones del SH_2: esto causa el depósito de azufre molecular S^0 (bacterias verdes sulfurosas.

IV- CICLO REDUCTIVO DE LAS PENTOSAS FOSFATO O CICLO DE BENSON Y CALVIN

Los productos de la transformación de la energia luminosa en energia quimica -llevada a cabo por el aparato fotosintético- son el ATP y el NADPH. Estos compuestos son necesarios para la síntesis de otros compuestos capaces de almacenar la energia quimica: los hidratos de carbono. Los productos finales de la fotosintesis son los polisacáridos, tanto estructurales como de reserva. La reducción del CO_2 atmosférico ocurre por medio de una serie de reacciones que se conocen como **Ciclo Reductivo de las pentosas Fosfato** (CRPP) o **Ciclo de Benson y Calvin** por sus descubridores.

A- Estudios iniciales. Formulación del ciclo

Fue elucidado en la década del 50 por Calvin, Benson y colaboradores. Para realizar los estudios se valieron de dos herramientas fundamentales: los marcadores radiactivos y la cromatografia en papel. El ^{14}C fue inicialmente aplicado en este tipo de estudios por Ruben y Kamen (129). En cambio, la cromatografia en papel se utilizaba para la separación de aminoácidos y azucares (100) y los compuestos marcados se revelaban por autorradiografia (45). La disponibilidad de ^{14}C les permitió seguir la incorporación de $^{14}CO_2$ a cultivos del alga **Chlorella**. Luego de iluminar la suspensión del alga,

detenían las reacciones enzimáticas con etanol caliente (80%). Las muestras eran secadas y posteriormente analizadas por cromatografía en dos dimensiones (18). Se observó que el primer compuesto marcado que aparecía era el 3-fosfoglicerato (PGA), un compuesto de tres carbonos (C_3): Esto sugería que ocurría una adición de CO_2 a un compuesto de C_2. Más tarde, con la identificación de la ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) como el aceptor de CO_2, se comprendió que había una adición C_1+C_5 para dar $2C_3$.

El posterior análisis de la distribución del ^{14}C en los distintos intermediarios completó la secuencia de reacciones que comprenden el CRPP (figura 9).

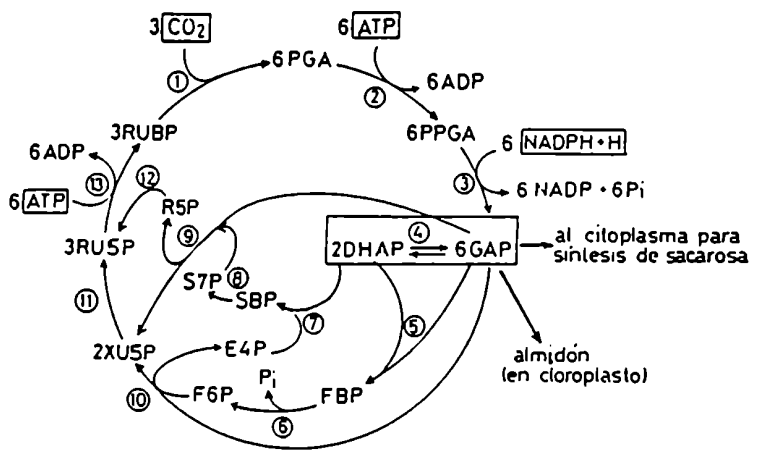


Figura 9. Ciclo Reductivo de las Pentosas-Fosfato (CRPP). 1) RuBisCO, 2) PGA-quinasa, 3) NADP-GAPD, 4) Triosa-P-isomerasa, 5) FBP-aldolasa, 6) FBPasa, 7) SBP-aldolasa, 8) SBPasa, 9) y 10) Transacetolasas, 11) Pentosa-P-epimerasa, 12) Pentosa-P-isomerasa, 13) PRK.

B- Etapas del ciclo. Enzimas participantes

1- Carboxilación

RIBULOSA-1,5-BISFOSFATO CARBOXILASA

El CO_2 se une a la RuBP para dar dos moléculas de PGA. Esta reacción es catalizada por la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO), que es la proteina más abundante del planeta (41). Su presencia en extractos de chlorella fue demostrada en 1954 por Benson (126) y Horecker (154). La reacción comprende la adición simultánea de CO_2, agua y una dismutación (oxidorreducción intamolecular).Su actividad enzimática consta de dos procesos (94): activación y carboxilación.

ACTIVACION

$$\underset{\text{Inactiva}}{E} + CO_2 \xrightarrow{\text{lenta}} \underset{\text{Inactiva}}{E\text{-}CO_2} + Mg^{2+} \xrightarrow{\text{rápida}} \underset{\text{Activa}}{E\text{-}CO_2\text{-}Mg}$$

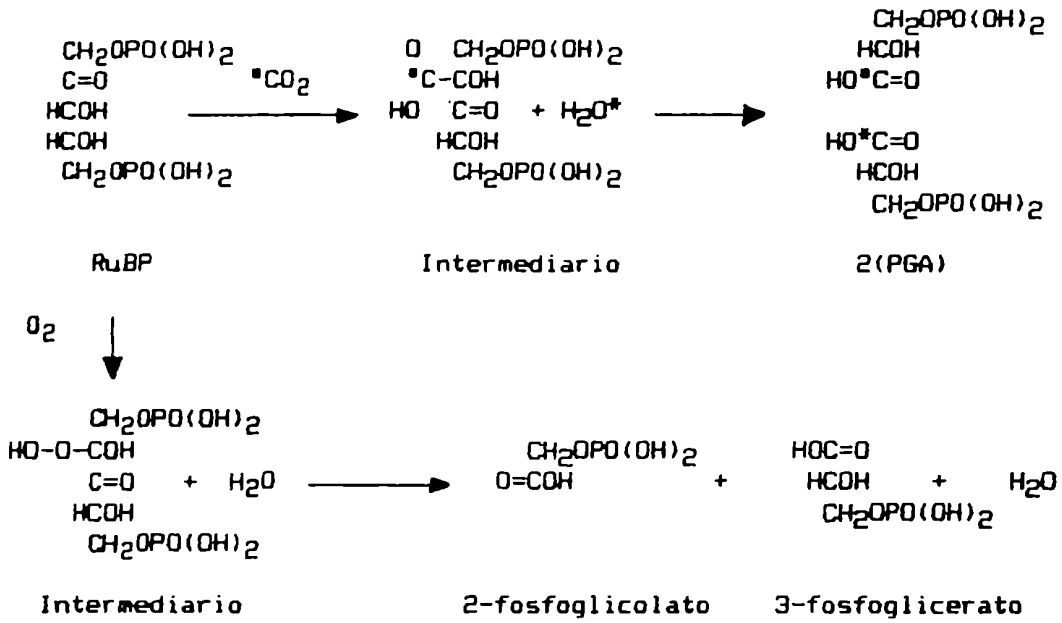
CARBOXILACION

$$E\text{-}CO_2\text{-}Mg + RuBP + {}^{*}CO_2 \longrightarrow E\text{-}CO_2\text{-}Mg + {}^{*}PGA + PGA$$

El O_2 puede competir con el CO_2, lo que permite que esta enzima pueda funcionar también como oxigenasa. La misma produce una molécula de PGA y una de 2-fosfoglicolato (C_2); constituyendo esta reacción en inicio de la fotorrespiración (33). In vitro, cuando la concentración de CO_2 es alta y la de O_2 baja, predominará la actividad carboxilásica.

El pH y la temperatura influyen sobre estas reacciones pero <u>in vivo</u> la actividad de carboxilasa será 4 a 5 veces mayor que la de oxigenasa. (Km O_2= 250 μM; Km CO_2 = 10 μM).

En el siguiente esquema se muestran las etapas de la reacción de carboxilación de la ribulosa 1,5-bisfosfato.



2- Reducción

El PGA producto de la carboxilación es fosforilado a DPGA por la fosfogliceratoquinasa (115). La reducción del DPGA a G3P es llevada a cabo por la **NADP-gliceraldehido 3-P deshidrogenasa** (NADP-GAPD) que funciona en dirección inversa a su contraparte glicolítica (NAD dependiente)

Esta reacción es la única en el CRPP que utiliza el poder reductor (NADPH) generado por la cadena fotosintética

de transporte de electrones. En esta etapa se consume la mayor parte de la energía proveniente de las reacciones fotoquímicas: ATP y NADPH (17). La enzima presenta un peso molecular de 600000 en plantas superiores y está constituida por dos tipos de subunidades de peso molecular 43000 y 37000.

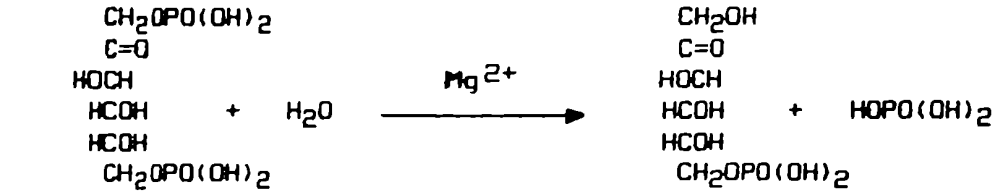
Una enzima presente también en la glucolisis, la **triosa fosfato isomerasa**, cataliza la conversión de G3P a DHAP. Las triosas fosfato son compuestos clave en la formación y distribución de hidratos de carbono en las hojas. Participan en la síntesis de almidón intracloroplástico, son traslocadas al citosol para la síntesis de sacarosa y son necesarias en la regeneración de RuBP como se explica en la sección siguiente.

3- Regeneración

Para que la incorporación de CO_2 pueda continuar debe ser regenerado su sustrato aceptor. El primer paso es la condensación aldólica de G3P y DHAP catalizada por la **FBP aldolasa** (25). El equilibrio de esta reacción está desplazado hacia la formación de FBP. La serie de reacciones que continúan, involucran compuestos de 3 a 7 carbonos, en donde las reacciones claves son catalizadas por tres enzimas regulatorias:

FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA

Esta enzima cataliza la hidrólisis de FBP a fructosa 6-fosfato (F6P) y P_i libre.

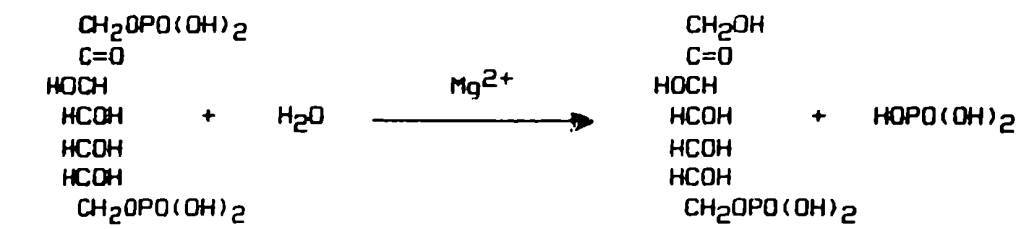


Fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) → Fructosa 6-fosfato (F6P)

La enzima es un homotetrámero de peso molecular 170000 y su estructura primaria es diferente de la citosólica. La activación de la misma resulta de una disminución del pH óptimo y un aumento en la afinidad por el FBP y Mg^{2+}.

SEDOHEPTULOSA-1,7-BISFOSFATASA

Es la segunda reacción del CRPP donde se libera fosfato dando, además sedoheptulosa 7-fosfato. La enzima de espinaca es altamente específica para SBP y requiere un metal bivalente.

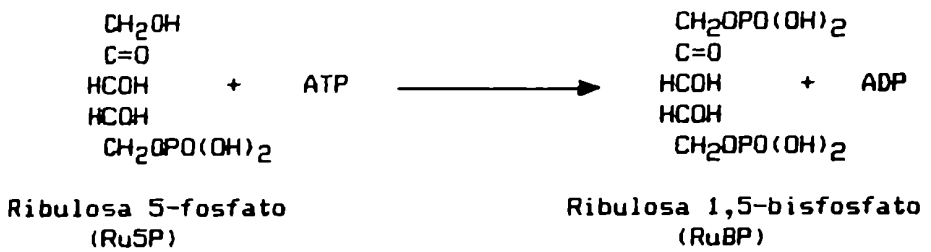


Sedoheptulosa 1,7-bisfosfato (SBP) → Sedoheptulosa 7-fosfato (S7P)

FOSFORRIBULOQUINASA

A través de una condensación aldólica, una isomerización y una epimerización de los intermediarios provenientes de las etapas anteriores, se llega a la Ru5P que es el sustrato de la fosforribuloquinasa (PRK) (127). Esta reacción, al igual

que la catalizada por la RuBisCO, es exclusiva de los organismos autotróficos. Por otra parte, constituye la última reacción de la fase regenerativa del CRPP donde se obtiene RBP, el sustrato de la etapa de carboxilación.



La reacción requiere ATP y constituye un sitio de regulación metabólica. La PRK tiene un peso molecular de 240000 y está regulada por las concentraciones de ATP, ADP, y AMP.

4- Formación de productos

Por cada tres moléculas de CO_2 que entran al ciclo se sintetiza una triosa fosfato. Estas a su vez pueden: a) traslocarse al citosol para sintetizar sacarosa; b) ser metabolizadas dentro del cloroplasto para dar origen al almidón; c) reingresar en la etapa regenerativa formando parte de intermediarios en forma autocatalitica. De esta manera, el aumento en el ingreso de las triosas fosfato en el ciclo produce un aumento de aceptor de CO_2.

La mayoria de los procesos en los seres vivos dependen directa o indirectamente de compuestos derivados de la asimilación fotosintética del C. Debe existir, entonces, un

proceso químico básico autosuficiente que pueda producir y aumentar su sustrato. El único mecanismo que poseen las plantas para convertir los productos de la fotosintesis en sustrato adicional, es el CRPP.

V- REGULACION DEL CICLO

La asimilación fotosintética de CO_2 es un proceso altamente controlado cuya regulación puede darse a tres niveles:

i) catalítico (modulación de las actividades enzimáticas)

ii) acción de masas (influencia de las concentraciones de metabolitos)

iii) transporte (intercambio de metabolitos entre el cloroplasto y su entorno celular)(39).

Debido al objetivo de la presente tesis se desarrollará, en las secciones subsiguientes, la modulación de las actividades enzimáticas, con énfasis en los mecanismos mediados por la luz.

A- Estudios de la regulación enzimática por la luz en hojas intactas y con cloroplastos aislados

Como se vio anteriormente, las reacciones "oscuras" (asimilación de CO_2) se diferencian de las "luminicas" por ser independientes de la luz (11). Esto fue cuestionado

cuando se observó que la actividad de ciertas enzimas del alga Chlorella dependía de la transición oscuridad-luz (118). Los estudios con cloroplastos aislados presentan mayor facilidad de manejo con respecto a las algas ya que su ruptura por shock osmotico es inmediata. De esta manera, las actividades enzimáticas fueron determinadas con precision. Estos estudios requerian i) el aislamiento, ii) la iluminación y iii) la ruptura de los cloroplastos; finalmente se efectuaba el análisis de las actividades enzimáticas correspondientes. De esta forma se encontró que la iluminación de dichas organelas estimulaba la actividad especifica de las enzimas regulatorias del CRPP: FBPasa, SBPasa, NADP-GAPD, PRK (1,30,46). Posteriormente, este efecto fue observado con otras enzimas pertenecientes a los metabolismos del C, N y S (84,133). Experimentos posteriores mostraron que la activación por la luz era compartida por varias enzimas cloroplásticas pertenecientes a otros caminos metabólicos (172):

- del carbono (PEP-carboxilasa, piruvato-Pi diquinasa, NADP-malato deshidrogenasa, glicerato quinasa)
- del azufre (adenilil-sulfato quinasa)
- del nitrógeno (nitrato reductasa, nitrito reductasa, glutamino sintetasa)
- de los alcaloides derivados de la quinolizidina (lisina decarboxilasa, 17-oxoasparteina sintetasa).

Estos mecanismos ocurren tanto en organismos que efectuan fotosintesis oxigénica -cianobacterias, algas y plantas- como en aquellos que realizan fotosintesis anoxigénica -bacterias fotosintéticas- (28).

Tres hechos condujeron a postular que el efecto de la luz sobre las enzimas era indirecto. En primer lugar, la estimulación de las enzimas presentaba una espectro de accion similar al de la fotosintesis, indicando a la Chl como fotorreceptor (4). En segundo lugar, la estimulacion no era afectada por bloqueantes de la sintesis proteica, eliminando la posibilidad de un aumento originado en la sintesis de novo de la respectiva enzima. Finalmente, se observo que las enzimas no poseian ningun cromoforo susceptible de excitacion por la luz.

B- Sistema LEM

Anderson y colaboradores determinaron que inhibidores de los fotosistemas I y II bloqueaban la accion de la luz sobre las enzimas. Sin embargo, los efectos tanto de un desacoplante de la fosforilación (FCCP) como de un antagonista de la Fd (DSPD), dependian de la enzima analizada (5). El primer inhibidor actuaba sobre la NADP-GAPD, mientras que el segundo, lo hacia sobre la FBPasa y SBPasa. Esta serie de experimentos condujo a los autores a postular la existencia de dos sistemas mediadores del efecto luminico, LEM (Light Effect Mediator), cuyos componentes serian proteinas unidas a la membrana tilacoide, del lado

proteinas unidas a la membrana tilacoide, del lado estromático (4.5.8) (figura 10). LEM I actuaria sobre glucosa 6-P deshidrogenasa (G6PD), NADP-GAPD, PRK y malato deshidrogenasa (MDH); LEM II lo haria preferentemente sobre FBPasa y SBPasa.

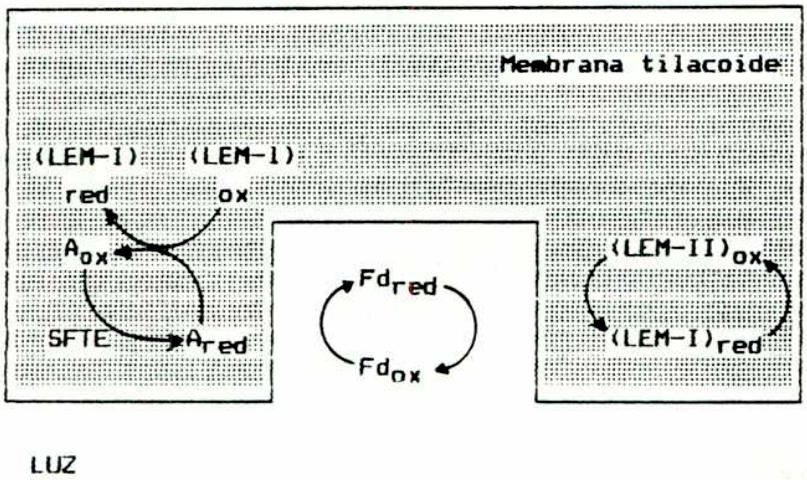


Figura 10. Sistema LEM. Fd, ferredoxina, SFTE, sistema fotosintético de transporte de é, A, aceptor (172).

C- Estudios in vitro

La ausencia de sintesis de novo de dichas enzimas durante la estimulación por la luz, indica que se trata de un proceso de activación enzimática. De la misma manera, al no poseer estas proteinas cromoforos dentro de su estructura y correlacionar el proceso con la fotosintesis, implica que el sistema fotosintético de transporte de electrones actúa como mediador del efecto activador de la luz. Surge, entonces, la

pregunta de cuáles son los cambios que la luz opera en el cloroplasto para que las enzimas, modifiquen su actividad.

La iluminacion de los cloroplastos trae como consecuencia la variación de la concentración de iones y metabolitos en el estroma, siendo de particular importancia la disminucion de la concentracion de H^+ (aumento de pH) y el aumento en la concentración de Mg^{2+} (50,60,62,86,155). Se produce también una modificación del estado de redox de las proteinas (140). Para determinar los efectos de la luz sobre las enzimas, se estudia in vitro la acción de aquellos componentes cuya concentracion varia en la transición oscuridad-luz

1- Caracteristicas estructurales

Las caracteristicas estructurales de las enzimas regulatorias pueden resumirse en la tabla II.

Tabla II. Estructura cuaternaria de las enzimas del CRPP.

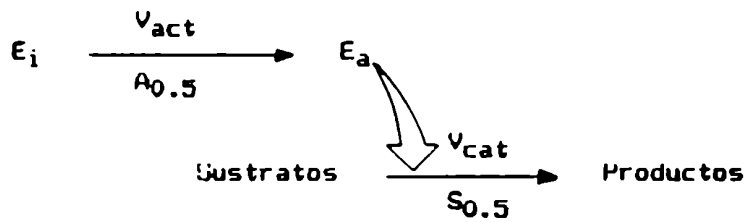
	Subunidades	
Enzima	Número	Peso molecular
Fructosa-1,6-bisfosfatasa	4	46000
Fosforribuloquinasa	2	44000
Gliceraldehido-3P	2 (B)	37000
deshidrogenasa	2 (B)	43000
Ribulosa-1,5-bisfosfato	8	56000
carboxilasa	8	14000

Los agentes perturbantes de la estructura proteica, como el SDS, provocan la disociación de las enzimas con perdida total de sus actividades. Tratamientos menos drásticos con perturbantes o bajas concentraciones de metabolitos, generan nuevas formas oligomericas con caracteristicas cinéticas diferentes. Por ejemplo, a pH 8.8-9.0, se disocia la forma tetramerica de la FBPasa dando un dimero que retiene el 20% de la actividad (53,90).

En la NADP-GAPD, tanto de plantas superiores como de algas verdes, el proceso de disociación está ligado a su regulación ya que modifica la actividad NADP-dependiente, permaneciendo inalterada la ligada al NAD. En presencia de bajas concentraciones de ATP, NADPH ó Pi, la forma nativa (peso molecular 600000) pasa a una forma de menor peso molecular (160000), aumentando 10 veces la actividad NADP-dependiente (44,125,151). Alternativamente, en el alga Scenedesmus obliquus, la disociacion de la NADP-GAPD (560000) causada por DTT y NADPH da como resultado un tetrámero con actividad NADP-GAPD y un dimero con actividad PRK (112).

2- Caracteristicas cinéticas

Las enzimas regulatorias del CRPP poseen velocidades de activación y desactivacion lentas comparadas con la velocidad de catálisis. Este fenomeno fue descripto por Frieden con el nombre de **histiéresis enzimática** (49) y se puede esquematizar de la siguiente manera:



De esta manera, la enzima pasa de una forma inactiva a una activa, y esta última es la que actúa en la catálisis. Dado que $V_{act} << V_{cat}$, resulta posible estudiar ambos procesos por separado. Para ello, se incuba a la enzima con metabolitos en condiciones que no permiten la catálisis; analizando luego su capacidad para transformar los sustratos. Sobre esta base experimental, se define como **moduladores** a aquellos compuestos que modifican la primera etapa ó fase de modificación. Los metabolitos que actúan en la segunda etapa ó fase catalítica, son los **sustratos** ó **cofactores**. Asimismo, podemos definir dos constantes cinéticas:

$A_{0.5}$: la concentracion de modulador que aumenta la actividad especifica a la mitad de su valor máximo;

$S_{0.5}$: la concentración de sustrato ó cofactor por la cual la actividad enzimatica alcanza la mitad de la velocidad maxima (64,65).

3- Moduladores de la actividad especifica

i) Iones

La luz produce un cambio en la composicion de iones del estroma: la concentración de H^+ disminuye y la de Mg^{2+}

aumenta. Estos iones modulan in vitro la actividad de RuBisCO, FBPasa, SBPasa y PRK. En particular, la FBPasa presenta una variacion en el pH óptimo de activación con respecto a la catálisis (138).

Por otra parte, la luz estimula la entrada de Ca2+ a través de la membrana interna del cloroplasto, aumentando la unión de dicho cation a las membranas tilacoides (87). Sin embargo, el Ca^{2+} posee un comportamiento dual in vitro: actúa como modulador positivo en la activacion de FBPasa y SBPasa, mientras que inhibe la fase catalítica de ambas enzimas (64,65,87,169). No se ha establecido aun con certeza el rol del Ca^{2+} sobre las actividades enzimáticas en los cloroplastos (128).

ii) Metabolitos intrinsecos de los cloroplastos

Las enzimas son activadas por sus respectivos sustratos: NADP, NADPH, Pi, 1,3-DPGA, G3P (NADP-GAPD); FBP (FBPasa); SBP (SBPasa); CO_2 (RuBisCO). En ésta modulación, la acción producida por un compuesto dado (**modulador primario**) es potenciada por concentraciones subestimulantes de un segundo metabolito (**modulador secundario**). Este efecto, conocido como **histiéresis concertada**, adquiere importancia en la regulacion enzimática ya que permite la disminucion del $A_{0.5}$ para determinados moduladores, acercándolos al rango de las concentraciones in vivo (168).

iii) Sistema ferredoxina-tiorredoxina

La purificación de las enzimas del CRPP permitió establecer la existencia de factores solubles proteicos que participaban en la estimulación de la actividad enzimática por la luz (137,161). En presencia de membranas tilacoides, tres proteinas solubles -ferredoxina (Fd), **ferredoxina tiorredoxina reductasa (FTR)** y **tiorredoxina (Th)**- causan la estimulación de la actividad espacifica de varias enzimas cloroplásticas (24,26,28,74,84,101,104,139,145,146,158,161-163,165). Este sistema se lo conoce como **sistema ferredoxina-tiorredixina (Fd-Th)** y está presente en plantas C_3 y C_4, cianobacterias y algas (26,28,161,167,175). Un aspecto clave de este sistema es la presencia de un compuesto capaz de reducir a la Fd. Alternativamente, un reductor no fisiológico, el DTT, estimula la actividad de las enzimas, requiriendo sólo la presencia de Th (138,27). La participación de un proceso redox y la ausencia de grupos prostéticos, involucran a las uniones disulfuro como los grupos modificados por el sistema Fd-Th en el proceso de activación por la luz (132,134). En relación a **éste** fenómeno se encontró que compuestos con capacidad de modificar grupos -SH inhibían el proceso de activacion enzimática. Resulta evidente, luego, que los grupos -S-S- participan en los procesos redox acoplados a la cadena fotosintética de transporte de electrones (7). Recientemente se ha demostrado en la NADP-MDH que el sitio de regulacion por la luz via Th sería un puente disulfuro ubicado en la region N-terminal de

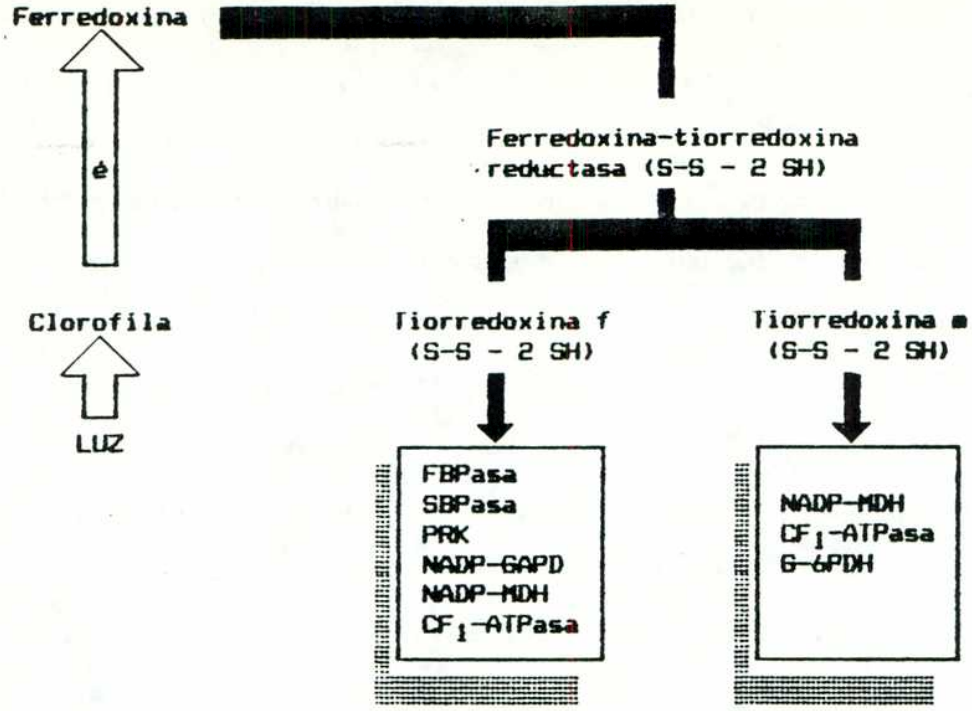


Figura 11. Esquema del sistema Ferredoxina-Tiorredoxina. Enzimas moduladas.

Según éste modelo, la Fd es reducida por la luz por medio de la cadena fotosintética de transporte de electrones. La Fd reducida, reduce a la Th en una reacción catalizada por la FTR. A su vez, la Th reducida interacciona con la enzima correspondiente, estimulando su actividad específica.

TIORREDOXINAS.

La Th fue estudiada inicialmente como participante en la reducción de ribonucleótidos a deoxirribonucleótidos y en la de sulfóxido a sulfato en levaduras (71,72). Esta proteína de bajo peso molecular (12000-15000) se encuentra en todos los seres vivos y posee un sitio activo altamente conservado: **cys-gly-pro-cys-**. En las plantas superiores, las tiorredoxinas están presentes tanto en los cloroplastos como

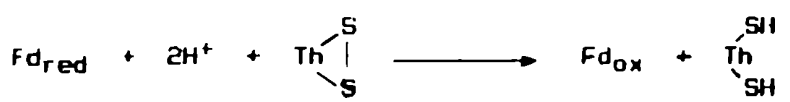
cys-gly-pro-cys-. En las plantas superiores, las tiorredoxinas están presentes tanto en los cloroplastos como en el citoplasma de las células de las hojas. Al no tener una actividad enzimática inrínseca, se hace necesaria la determinación a través de una reacción auxiliar. El ensayo utilizado en los sistemas fotosintéticos se basa en su capacidad de activar una determinada enzima. De esta manera, se estableció la presencia de dos Th en los cloroplastos:

- la Th-f, que activa preferentemente a la FBPasa, SBPasa, PRK, NADP-GAPD y la H^+-ATPasa;
- la Th-m, con mayor capacidad estimulatora sobre la NADP-MDH (35,76,167).

La estructura primaria de ambas es diferente, presentando la forma -m un 44% de homología con la de Escherichia coli. La Th-f muestra importantes diferencias estructurales con las anteriores (80,97). Se han encontrado otras proteínas definidas como Th en trigo (149). Asimismo una del tipo -f, cuyo peso molecular es de 28000, fue detectada en Scenedesmus obliquus (88).

FERREDOXINA-TIORREDOXINA REDUCTASA

Posee un peso molecular de 38000 y cataliza la reducción de la Th por Fd



Se estableció que es una sulfoferroproteína con un puente disulfuro que participa en la reducción de la Th. Forma un complejo por uniones electrostáticas con la Fd (70). Su presencia se ha determinado en una bacteria anaerobica estricta -Clostridium pasteurianum- en la cual contiene un grupo flavina que interviene en el proceso de reducción. (58). Dada su importancia en la regulación enzimática y la escasa información acerca de sus caracteristicas, distribucion y mecanismo de acción, son actualmente objeto de estudio.

iv) Relación entre los sistemas LEM y Fd-Th

Hasta ahora se vio que hay dos sistemas descriptos responsables de la estimulación de las enzimas del CRPP por la luz: LEM y Fd-Th. La diferencia entre ambos sistemas reside en la naturaleza de los factores que participan en la transferencia del poder reductor desde el PSI hasta la enzima. El sistema Fd-Th requiere el agregado de Fd y Th exógenas para conseguir la activación. El análisis reciente de los factores estromáticos del sistema LEM, mostró la presencia de un complejo compuesto por Fd, FTR y Th (47). Luego, durante el proceso de activación por la luz, la Fd y la Th no se hallarían libres en el estroma, sino que se encontrarían formando un complejo. La asociación entre las proteinas y de éstas con las membranas, sugiere que la diferencia entre ambos sistemas residiría en la forma de preparación de los mismos.

v) Interacción sinérgica entre los moduladores enzimáticos

En el estroma, los sistemas de activación mencionados (iones , metabolitos, sistema Fd-Th) actúan en forma simultanea. Como consecuencia, las constantes cineticas se verán afectadas por un segundo componente. Este comportamiento histerético se observo en el caso de la NADP-GAPD: el $A_{0.5}$ para los moduladores -ATP, NADPH y P_i- es disminuido por bajas concentraciones tanto de Th reducida como de otros metabolitos (168). Por otra parte, para la FBPasa, se han estudiado numerosos metabolitos que actuan sobre los dos procesos que componen la actividad de la enzima: activación y catálisis (66,138,142). El análisis de la actividad enzimática mediante un ensayo en dos etapas, facilita la detección de compuestos con efectos opuestos. Por ejemplo: la fructosa 2,6-bisfosfato y el Ca^{2+} estimulan la activación e inhiben la catálisis de la FBPasa. Se observa, ademas, que la Th disminuye el $A_{0.5}$ para FBP, sin modificar ni el $A_{0.5}$ para el Ca^{2+} ni el $S_{0.5}$ para FBP ó Mg^{2+} (tabla III). Si bien el análisis de la tabla indica que existen numerosos mecanismos por los cuales la FBPasa puede ser estimulada <u>in vitro</u>, su posible efecto <u>in vivo</u>, requiere mayor estudio. En particular, la presencia de la F2,6BP no fue establecida en el estroma de los cloroplastos, en tanto que las poliaminas son incorporadas lentamente desde el citoplasma hacia el cloroplasto por efecto de la luz (82). Estos datos fisiológicos hacen dudar sobre su participación <u>in vivo</u>.

Tabla III. Efecto de los modificadores sobre las reacciones que componen la actividad de la FBPasa.

	Efecto	
Modificador	Modulación	Catalisis
tiorredoxina	activador	ninguno
fructosa 1,6-bisfosfato	activador	sustrato
sedoheptulosa 1,7-bisfosfato	activador	sustrato
glucosa 1,6-bisfosfato	activador	ninguno
fructosa 2,6-bisfosfato	activador	inhibidor
Ca^{2+}	activador	inhibidor
Mn^{2+}	activador	cofactor
Mg^{2+}	activador	cofactor
espermidina	inhibidor	ninguno
espermina	inhibidor	ninguno

VI- ESTUDIOS SOBRE MODIFICACIONES HIDROFOBICAS EN LAS ENZIMAS DEL CRPP

La modificación enzimática por la luz resulta de un cambio en la estructura de las enzimas. La activación de la NADP-GAPD proviene de la conversion de la enzima a una forma de menor peso molecular (125). Alternativamente, el peso molecular de la FBPasa permanece invariable luego de su activación por metabolitos o el sistema Fd-Th (65)

Las caracteristicas del microentorno de una enzima son determinantes de la actividad de la misma. La microheterogeneidad en la superficie de las proteinas se debe a la superposición ó interaccion entre grupos o dominios

polares y no polares. Esto genera un ambiente adecuado para la unión de los efectores y/o sustratos.

En el laboratorio del Instituto de Investigaciones Bioquimicas se realizaron estudios tendientes a determinar la influencia de las modificaciones hidrofóbicas de las enzimas del CRPP sobre la actividad de las mismas. Se observó que las constantes de activación para los efectores ($A_{0.5}$) de la FBPasa son disminuidas por la presencia de solventes orgánicos. La efectividad de dichos solventes correlaciona con el coeficiente de partición octanol/agua, que es una medida de la hidrofobicidad del solvente (34). Posteriormente se determinó el mismo efecto activador de los cosolventes sobre otras enzimas cloroplásticas: NADP-GAPD, PRK y NADP-MDH (35,166). Por otra parte, la NADP-GAPD presenta una activacion pronunciada por el detergente CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio). Esta activación se obtiene a concentraciones inferiores a la concentración micelar critica (cmc) del detergente y no requiere la presencia de un reductor (DTT) (171).

Uno de los factores que determinan la conformación de las proteinas globulares en solucion es su grado de hidratacion (agua unida). Ello estabiliza una conformacion dada por la interaccion del agua con los grupos polares (40,130). Por otro lado, los grupos no polares interaccionan entre si, ocultándose de la solucion; su contribucion a la estabilidad conformacional resulta de su tendencia a alejarse

de la superficie y alojarse en el interior de la proteina (repulsión por el agua) (110).

Con el proposito de analizar las interacciones hidrofóbicas intramoleculares por modificación del agua unida a la proteina, se estudió el efecto de aniones caotrópicos sobre la actividad de algunas enzimas del CRPP. Estos aniones alteran la estructura del agua por tener gran tamaño y en consecuencia baja densidad de carga (59,150). A concentraciones bajas estos iones interaccionan con las proteinas por uniones electrostáticas no-especificas, ésto estabiliza dichas macromoléculas ya que se eliminan las fuerzas electrostáticas repulsivas dentro de la proteina. Este fenómeno ocurre a fuerzas iónicas debajo de 0.2 y es independiente de la naturaleza del ión. A concentraciones mayores estas sales si presentan efectos ion-especificos: unos estabilizan la estructura proteica (**cosmotrópicos:** SO_4^{2-} F^-) y otros la desestabilizan (**caotrópicos:** SCN^-, ClO_4^-) (36,152).

Se vio que las enzimas FBPasa y NADP-GAPD son estimuladas por dichos agentes, teniendo lugar una disminución de los $A_{0.5}$ para los moduladores (141,142,171). Los aniones caotrópicos pueden ser ordenados de acuerdo a su efectividad molar para la activación de eatas enzimas. Dicho ordenamiento coincide con la serie liotrópica ó serie de Hofmeister (36,142)

$$SCN^- < Cl_3COO^- < ClO_4^- < I^- < Br < Cl^- < SO_4^{2-}$$

Tanto los cosolventes como los aniones caotrópicos inhiben los procesos catalíticos mostrando que si bien reemplazan a la Th en la activación, su efecto difiere en la conversión del complejo E-sustrato a E-producto. Ello sugiere un distinto tipo de interacciónes intervinientes en los procesos de activación y catálisis.

VII- OBJETIVOS DE LA PRESENTE TESIS

Del conjunto de resultados expuestos, surgen como objetivos principales de esta tesis los siguietntes:

A- Análisis cinéticos

- Estudiar los cambios conformacionales que producen la Th, los cosolventes y los aniones caotrópicos durante la activación de la FBPasa. Con este proposito, se busca modificar quimicamente la enzima y analizarla desde el punto de vista cinético y estructural. Estos estudios permiten realizar un análisis comparativo de los diferentes mecanismos de activación.
- Analizar la acción de otro agente perturbante de la estructura proteica, de caracteristicas fisicas: **la presión**. Estos estudios no efectuados anteriormente con enzimas cloroplásticas permitirían conocer el efecto de un modulador

físico sobre las dos etapas: activación y catálisis. Por este motivo, se extienden estos estudios a otras enzimas regulatorias.

B- Análisis estructurales

Si bien las enzimas del CRPP se definen como solubles por la forma en que son purificadas, ello no implica que en el estroma se encuentren en tal estado. Se sabe que cambios en la composición del medio para lisar los cloroplastos, altera la fracción de enzimas que precipitan junto a las membranas tilacoides (112). En el presente trabajo se analizan las posibilidades de interacción de la FBPasa con estructuras supramoleculares, determinando la naturaleza de dichas interacciones y la acción de los efectores sobre las mismas. Por este motivo se estudia la unión de esta enzima (modelo de enzima activada por el sistema luz-Fd-Th) a las membranas tilacoides y las micelas de detergentes no iónicos.

RESULTADOS

Y

CONCLUSIONES

I- Modificaciones quimicas en la FBPasa

A- Efecto del reactivo K de Woodward

1- Análisis cinético

2- Proteccion de la inhibicion

3- Análisis estructurales. Espectrofotometria diferencial

B- Efecto del dietilpirocarbonato

1- Análisis cinético

2- Protección de la inhibición

3- Análisis estructurales. Espectrofotometria diferencial

4- Desplazamiento nucleofilico de la unión DEPC-enzima

C- Conclusiones

II- Estudios a alta presión hidrostática (APH)

A- Fructosa-1,6-bisfosfatasa

B- Gliceraldehido-3P-deshidrogenasa

C- Fosforribuloquinasa y ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa

D- Conclusiones

III- Interacción de la FBPasa con micelas de Triton X-114 y membranas tilacoides.

A- Marcación con ^{125}I

B- Interacción con micelas de Triton X-114

1- Estudios con ^{125}I-FBPasa inactiva (dímero)

i) Incorporación a las micelas y desplazamiento por seroalbúmina bovina

ii) Efecto de tioles

iii) Efecto de cationes

iv) Modificaciones quimicas

2- Estudios con ^{125}I-FBPasa activa (tetrámero)

i) Interacción: requerimientos

ii) Efecto del pH

iii) Efecto del Mg^{2+}

3- Conclusiones

C- Interacción con membranas tilacoides

1- Estudios con ^{125}I-FBPasa inactiva (dímero)

i) Análisis de la interacción

ii) Temperatura y pH

iii) Efecto de cationes

iv) Modificaciones quimicas

2- Estudios con 125I-FBPasa activa (tetrámero)

i) Interacción: requerimientos

ii) Efecto de reductores y pH

3- Conclusiones

IV- Disminución de la actividad específica de la FBPasa en presencia de membranas tilacoides.

A- Inhibición de la activación

1- Efecto sobre la modulacion y la catálisis de la FBPasa

2- Cinética de la inactivación.

B- Efecto sobre las constantes cinéticas de la activación ($A_{0.5}$)

1- $A_{0.5}$ para FBP

2- $A_{0.5}$ para Ca^{2+}

3- DTT y Th

C- Reversión del efecto inhibitorio

D- Inhibición de la activación de la FBPasa por vidrio poroso

E- Conclusiones

I- MODIFICACIONES QUIMICAS EN LA FBPasa

La incubación de la forma nativa (inactiva) de la FBPasa con un tiol, un azucar fosfato y un catión bivalente, genera la forma activa de la enzima. La tiorredoxina del cloroplasto, los solventes orgánicos y los aniones caotrópicos contribuyen a la estimulación de la actividad especifica disminuyendo el A_{05} (constante cinética de activación) para azucares bisfosfatos. Contrariamente, la fase catalitica no es modificada por la tiorredoxina y es inhibida por los solventes orgánicos y los aniones caotrópicos (34,64,65,142). Experimentos efectuados previamente en el laboratorio, demostraron que el patrón de elución en columnas de filtración por geles de la FBPasa activada -en presencia de DTT, FBP, Ca^{2+} y alternativamente Th, 2-propanol ó tricloroacetato- no varia con respecto a la enzima nativa (34,65,142). Esto indica que no ocurren cambios en el peso molecular de la enzima (disociación) durante dicha activación. Al no ser modificada la estructura cuaternaria de la FBPasa por dichos tratamientos, la reactividad de las cadenas laterales de aminoácidos a reactivos especificos de grupo constituye una metodologia sensible para detectar modificaciones en la conformacion de la proteina. La existencia de una reactividad diferente a los modificadores quimicos indicaria la posibilidad de distintas conformaciónes dependientes de la forma de activación utilizada. Con este propósito se anailizaron reactivos especificos de grupos

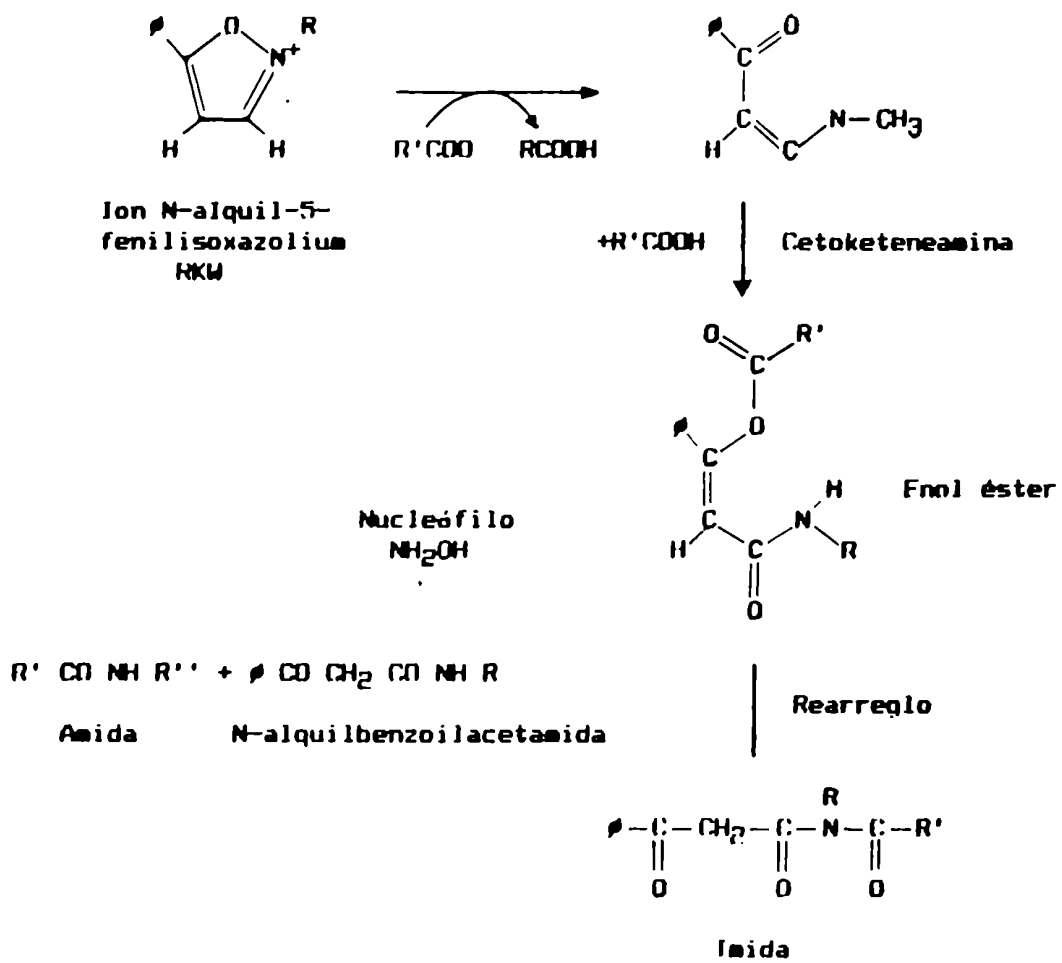
carboxilo -Reactivo K de Woodward (RKW)- y de grupos histidilo -dietilpirocarbonato (DEPC)- para el análisis estructural y cinético de las diferentes vias de activación de la FBPasa (19,109,157).

La reactividad de estos grupos (carboxilo e histidilo) no fue analizados anteriormente en esta enzima. La atención se dirigió principalmente a los grupos -SH puesto que surgen de la reducción de uniones -S-S- durante la activación por la luz. (9,27,122).

La actividad de la FBPasa, por ser una enzima histerética, puede determinarse por ensayo en dos etapas ó, alternativamente en una sola etapa (ver procedimientos experimentales). El ensayo en dos etapas se efectúa preincubando la enzima con los moduladores y posteriormente determinando la actividad catalítica a bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+}. El ensayo en una etapa, en cambio, se lleva a cabo directamente en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg^{2+}.

A- Efecto del reactivo K de Woodward (RKW) sobre la FBPasa.

El reactivo K de Woodward (N-Etil-5-fenilisoxazolium-3'-sulfonato) es una sal de isoxazolium que puede reaccionar con grupos carboxilo a temperatura ambiente y en soluciones acuosas (173). En esas condiciones el RKW forma un enol éster por reacción con un grupo carboxilo, produciéndose una serie de reacciones indicadas en el siguente esquema:



En base a estas reacciones químicas bien establecidas, surge la posibilidad de utilizar el RKW para el estudio de la modificación de grupos carboxilo en la FBPasa. La unión RKW-proteina produce variaciones en el espectro de absorción que permiten seguir dicha reacción espectrofotométricamente (19).

1- Análisis cinético.

La determinación cinética del orden de inactivación por un inhibidor irreversible, se basa en el método descripto por Levy (117) donde

$$E + I \xrightarrow{k} E\text{-}I$$

Este método no asume la formación de un complejo disociable entre enzima e inhibidor, debiendo tomarse consideraciones adicionales según (118)

$$E + I \underset{}{\overset{K_i}{\rightleftharpoons}} E.I \xrightarrow{k_3} E\text{-}I$$

$$k_{ap} = k_3 \cdot [E.I] = \frac{k_3}{K_i/[I] + 1}$$

Esta ecuación representa una hipérbola, donde k_{ap} es la constante de inactivación aparente, K_i es la constante de disociación para el inhibidor y k_3 es la constante de inactivación irreversible. En el gráfico $1/k_{ap}$ vs. $1/[I]$ k_3 es la ordenada al origen y K_i constituye la pendiente de la recta (93,103).

La incubación de la FBPasa nativa con RKW disminuye la capacidad de la enzima para hidrolizar la fructosa 1,6-bisfosfato, medida a altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} (ensayo en una etapa) (figura 12a). Dicha disminución de la actividad sigue una cinética de seudoprimer orden ya que la concentración del inhibidor está en exceso con respecto a la enzima. Esto ocurre durante los primeros 100 segundos, luego de los cuales la inactivación se detiene debido a la hidrólisis rápida del reactivo al pH del ensayo (116).

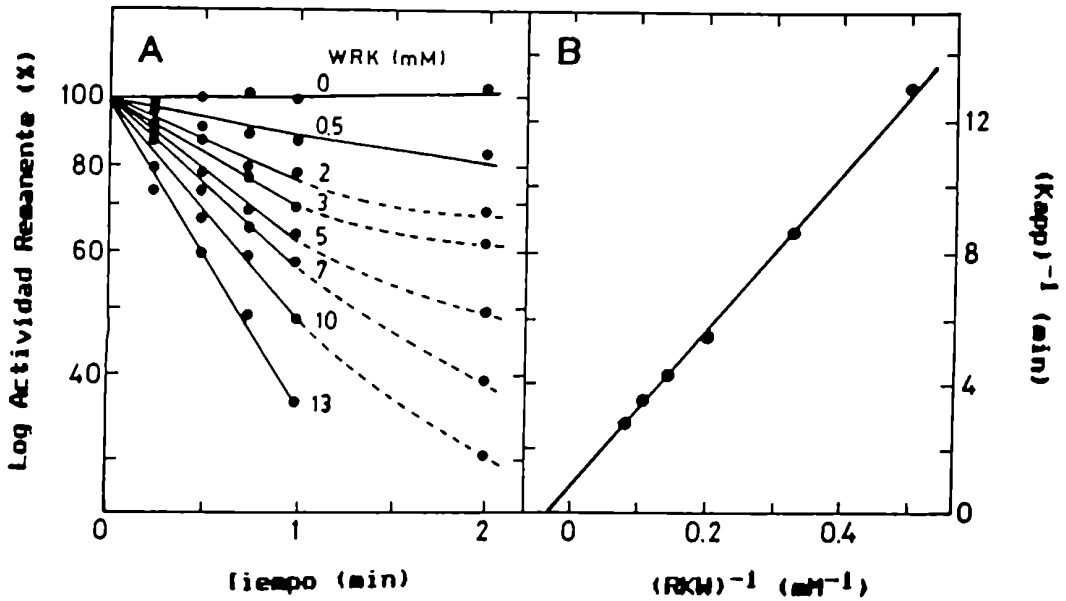


Figura 12. Inactivación de la FBPasa por el RKW. La enzima (10µg) fue tratada con RKW a 23° C en 0.25 ml de 0.1 M MOPS-NaOH pH 7.8. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 0.025 ml y se midió la actividad remanente a altas concentraciones de Mg^{2+} y FBP (ver procedimientos experimentales). Actividad control: 10.0 µmol Pi.min^{-1}.mg prot^{-1}

La constante de inactivación aparente (k_{ap}) estimada de las pendientes de la figura 12a, muestra una dependencia hiperbólica de la concentración de RKW (figura 12b). Este resultado es indicativo de un proceso de unión reversible entre el inhibidor y la enzima, previo a la inactivación irreversible (29,93)

$$\text{(FBPasa)} + \text{RKW} \xrightarrow{K_i} \text{(FBPasa).RKW} \xrightarrow{k_3} \text{FBPasa-RKW}$$

donde FBPasa se refiere a la forma nativa de la enzima, K_i es la constante de disociacion del complejo enzima-reactivo y k_3 es la constante de velocidad de la inactivación irreversible.

Los valores de K_I y de k_3 son 30 mM y 1.6×10^{-2} seg^{-1}, tomados respectivamente de la pendiente y la ordenada al origen del gráfico de $1/k_{ap}$ vs. 1/[I] (figura 12b). Resultados similares se obtienen cuando la actividad remanente de la FBPasa -luego del tratamiento con RKW- se mide activando la enzima con los moduladores y midiendo luego la actividad catalítica (ensayo en dos etapas). Estos resultados se muestran en la figura 13, indicando que el RKW reacciona con la forma nativa de la enzima, lo que impide su

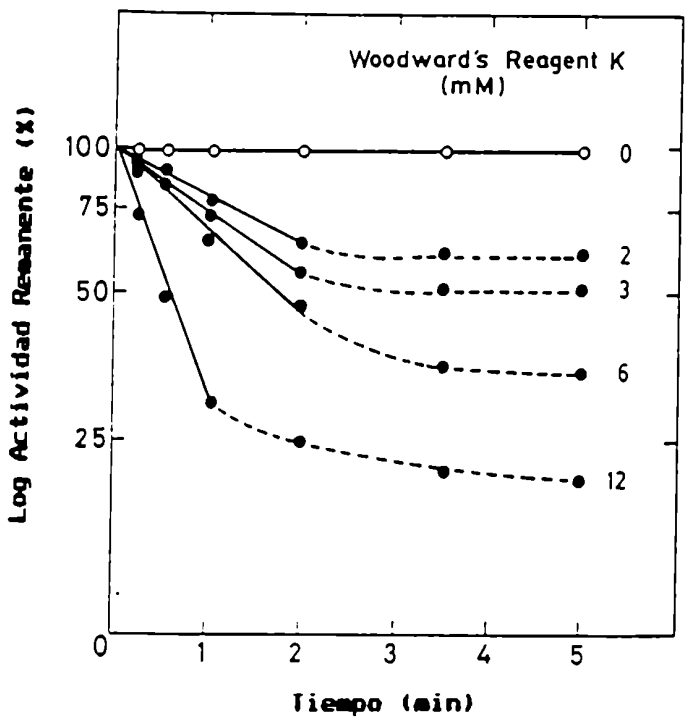


Figura 13. Inactivación de la FBPasa por RKW. Se procede del mismo modo que la figura 12 y la actividad remanente se mide en dos etapas como se indica en procedimientos experimentales. Actividad control: 10.0 µmol Pi.min^{-1}.mg $prot^{-1}$

posterior activación y en consecuencia su capacidad catalítica.

2- Protección de la inhibición por activación de la enzima

Para determinar el efecto de la protección por moduladores a la inactivación mediada por modificación química (RKW), se procede según el siguiente esquema:

Control

30 min	tiempo variable	20 min	2 min
buffer	reactivo	activación	catálisis

Activada

30 min	tiempo variable	20 min	2 min
incubación con moduladores	reactivo	activación	catálisis

Si la enzima es activada incubando con DTT, FBP y Ca^{2+} y alternativamente tiorredoxina, tricloroacetato ó 2-propanol,

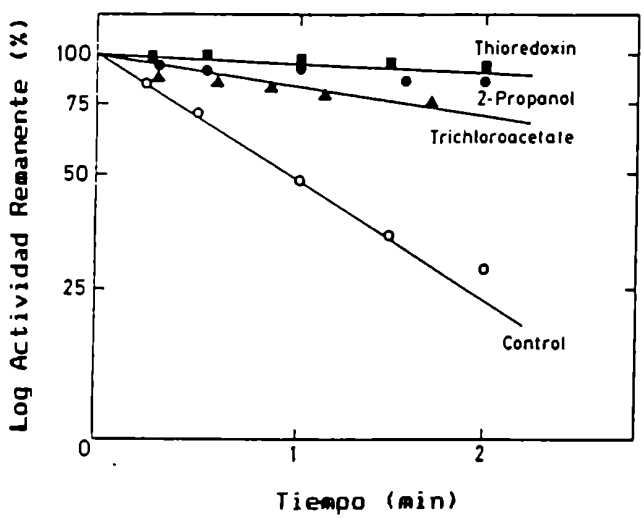


Figura 14. Efecto de la activación de la FBPasa sobre la inactivación por RKW. La enzima (10µg) se incuba a 23° C por 30 min en 0.22 ml de MOPS-NaOH pH 7.8 solamente (control) ó conteniendo las mezclas de activación de Th, 2-propanol ó tricloroacetato. Luego se trata con RKW (6 mM) y, a los tiempos indicados, se toman alícuotas de 0.025 ml y se ensaya la actividad remanente en dos etapas con la respectiva mezcla de activación como se indica en proc. exp.. Actividad control: 8.0 µmol $Pi.min^{-1}.mg\ prot^{-1}$

se obtiene una protección a la inactivación por el RKW (figura 14). Luego de incubar 2 minutos con el reactivo específico de carboxilos, la actividad específica de las formas activas decae un 20%, mientras que la inactivación de la forma nativa es de 80%

Estos resultados indican que las formas, generadas por activación vía tiorredoxina, cosolventes o aniones caotrópicos, muestran una respuesta similar al RKW, la cual difiere de la observada con la forma nativa.

3- Análisis estructurales. Espectrofotometría UV

La modificación de los grupos carboxilo en las proteínas puede ser determinada espectrofotométricamente por un aumento de la absorbancia a 278 y 343 nm, correspondiendo el pico de 278 nm a la forma enol-éster (19,120). El espectro de absorción de la FBPasa nativa tratada con RKW muestra dos picos positivos a 278 y 343 nm cuya relación de absorbancias (A_{278nm}: A_{343nm}) es 2.1 (figura 15). Por otra parte, si se trata a la FBPasa activada con el RKW, la relación de absorbancias es mayor de 4. Esta relación da una estimación del grado de modificación química pero no puede ser utilizada para determinaciones cuantitativas de unión del reactivo, debido a la formación lenta del derivado imido, el cual es producto del rearreglo del enol-éster en medio básico y muestra un máximo de absorción a 242 nm (19). Sin embargo, en

base a estudios con otras proteínas, se puede inferir que variaciones considerables de estos valores, indican que el

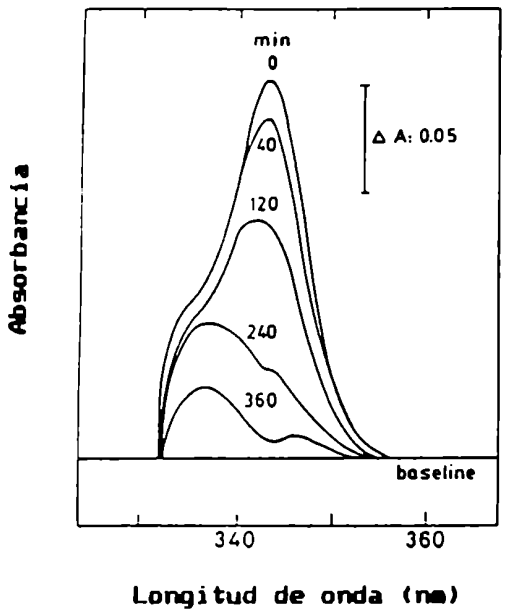


Figura 15. Efecto del RKW sobre el espectro de absorción de la FBPasa. La enzima (150 µg) se incubó a 23°C por 30 min en 0.2 ml de Hepes-NaOH pH 8.1 (nativa) ó en el mismo buffer conteniendo la mezcla de activación por tricloroacetato (activada). Luego se agregó 1µg de RKW, se incubó 10 min, se filtró por Bio-Gel P_4 (1 x40 cm) y se determinó el espectro de absorción según proc. exp.

grado de modificación por el RKW de la forma nativa de la FBPasa es mayor que el de la forma activada.

Los compuestos nucleofílicos -por ejemplo hidroxilamina (NH_2OH), éster etílico de la glicina, metoxamina- tienen la capacidad de desplazar el RKW unido a las proteínas, eliminando las diferencias espectrales (19,120,43). Para confirmar la presencia de grupos carboxilo reactivos en la FBPasa, la enzima nativa es tratada primero con 6.3mM RKW hasta completar la reaccion, para luego ser tratada con el éster etílico de la glicina (0.4M). Como se muestra en la

figura 16, el aumento de absorbancia debido a la modificación por RKW disminuye lentamente luego del agregado del nucleófilo. Pasadas las 3 horas, la absorbancia a 343nm es la

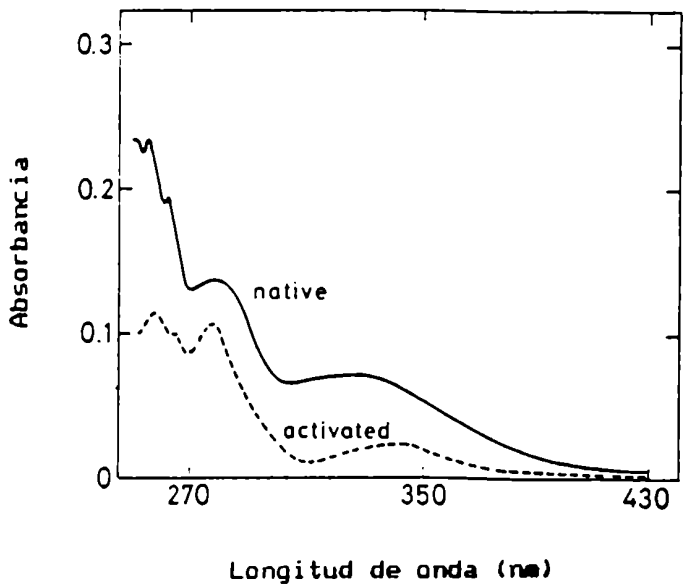


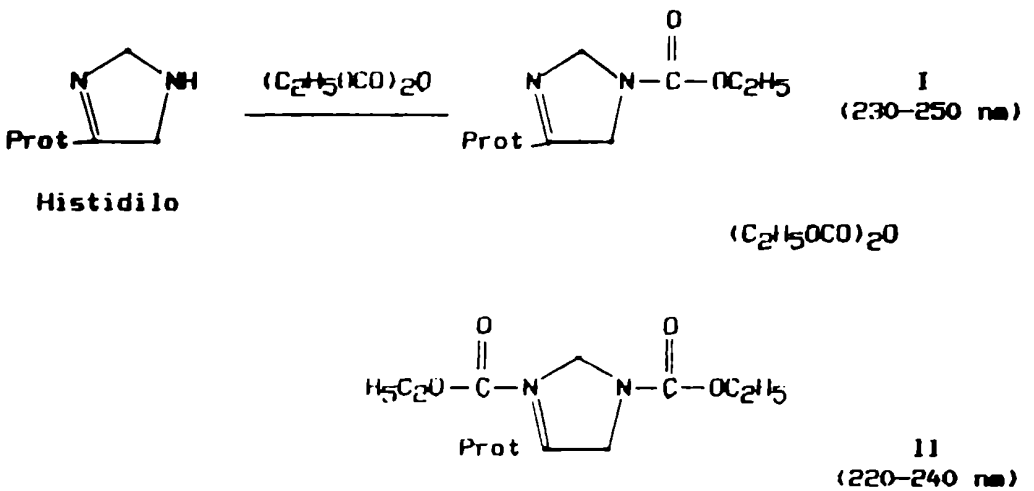
Figura 16. Espectro diferencial de absorción de la FBPasa tratada con RKW, luego del agregado del etil éster de la glicina. Se agregaron 0.8 ml de solución en las diferentes posiciones. En "muestra", 100µg de enzima, 100µmol de Mops-NaOH pH 7.8 y 5µmol de RKW en una celda y el mismo buffer como único agregado en la otra. En "referencia", la enzima en una celda y el RKW en la otra, ambos en Mops-NaOH. Los espectros fueron registrados a los tiempos indicados luego del agregado de 0.2 ml de 0.2M etil éster de glicina. (ver detalles en proc. exp.).

mitad del valor máximo inicial. Finalmente las absorbancias en la región de 340 nm se aproximan a la línea de base según lo esperado para el desplazamiento nucleofililico (38).

No obstante, se determinó que el desplazamiento del RKW por el éster etílico de la glicina no permite recuperar la actividad catalítica de la FBPasa. Por este motivo, la reversión del espectro no está acompañada de la recuperación de la actividad. Esta ausencia de reversión puede deberse a:

(i) que los grupos -COOH modificados -involucrados en la actividad- sufran un rearreglo a la forma imido que no puede ser desplazada por tratamiento con el nucleófilo (ver fórmulas), o bien (ii) que el desplazamiento nucleofílico dé lugar a un cambio conformacional en la enzima. En relación a esta modificación en la estructura terciaria, es de destacar que altas concentraciones del éster etílico de la glicina (1M) impiden la activación de la enzima.

B- Efecto del dietilpirocarbonato (DEPC) sobre la FBPasa.



El dietilpirocarbonato (DEPC) reacciona principalmente con residuos de histidilo de las proteinas dando derivados N-carbetoxilados (ó N-etoxiformilados), segun se muestra en la ecuación y su hidrólisis ocurre segun:

$$(C_2H_5OCO)_2O + H_2O \xrightarrow{\text{pH neutro}} 2\ CO_2 + 2\ C_2H_5OH$$

DEPC Etanol

Esta reacción puede ser seguida espectrofotométricamente pues genera un cromoforo que presenta un maximo de absorbancia en

la región de 230 a 250 nm. El número de residuos modificados puede ser determinado utilizando el coeficiente de extinción molar $\epsilon_{240\ nm}$ = 3200 $M^{-1}.\ cm^{-1}$ (157). El DEPC puede también reaccionar con residuos de tirosilo, dando derivados O-carbetoxilados, que producen una disminución de la absorbancia con un mínimo en la región de 275 a 280 nm ($\epsilon_{278\ nm}$ = 1310 $M^{-1}.cm^{-1}$). Al igual que el RKW, la unión DEPC-histidilo ó DEPC-tirosilo puede ser desplazada por un nucleófilo como NH_2OH (esquema).

1- Análisis cinético.

La forma activa de la FBPasa se obtiene incubando la forma nativa con los moduladores en buffer Tris-HCl. Sin embargo, en los ensayos con DEPC se utiliza el buffer MOPS-NaOH en reemplazo del Tris, ya que este último reacciona con el DEPC. Esta modificación experimental condujo al análisis de los efectos que la misma poseería sobre la activación enzimática. En la tabla IV se observa que la activación en presencia de buffers aniónicos es menor que la obtenida en presencia del Tris. Las causas de este fenómeno experimental no fueron analizadas.

Tabla IV. Activación de FBPasa en diferentes buffers aniónicos

Buffer	Actividad (%)
Tris-HCl pH 7.9	100
Mops-NaOH pH 7.8	45
Tricina-NaOH pH 8.4	33
HEPES-NaOH pH 7.9	40

Con el fin de determinar la sensibilidad de la FBPasa a reactivos especificos para grupos histidilo, la forma nativa de la enzima se incuba en buffer MOPS-NaOH pH 7.8 con DEPC y luego se transfiere a una solución que contiene DTT, FBP, Ca^{2+} y TCA en Tris-HCL a pH 7.9, para su activación y posterior ensayo de la actividad. La inactivación de la enzima por el DEPC a pH 7.8 y 23°C depende del tiempo y de la concentración del modificador quimico (figura 17a). Durante los primeros 2 minutos de incubación, la reacción de la FBPasa nativa con DEPC sigue una cinética de seudoprimer orden; en tiempos más prolongados se produce una desviación de la linealidad debido a la inestabilidad del reactivo a pH 7.8. En cambio, la actividad permanece inalterada si se omite el DEPC.

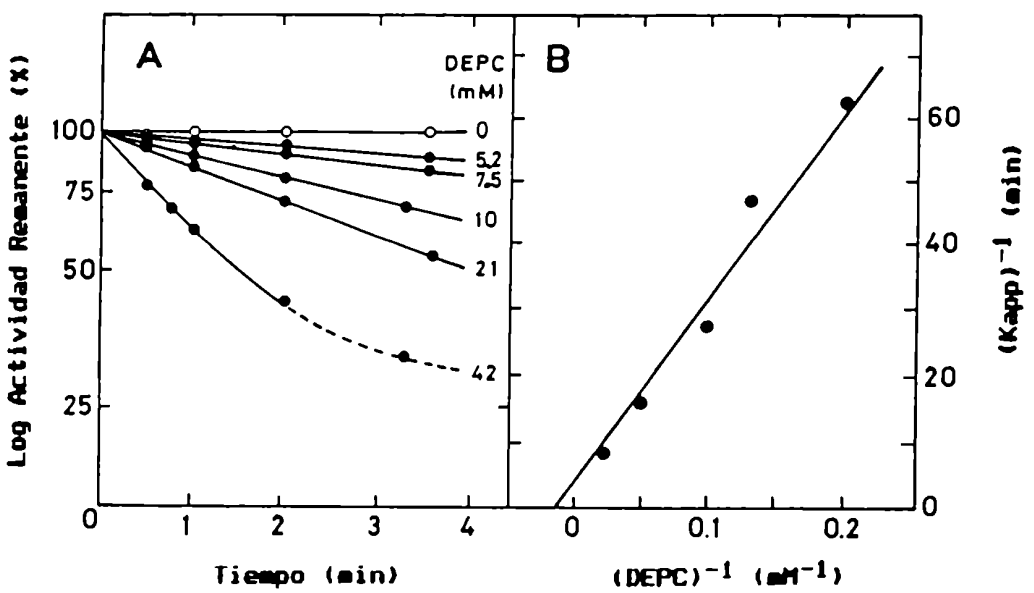


Figura 17. Inactivación de la FBPasa por DEPC. La enzima (10µg) se incubó con el DEPC en 0.25 ml a 23° con Mops-NaOH pH 7.8. A los tiempos indicados, se tomaron alicuotas de 0.025 ml y se ensayó la actividad en dos etapas como se detalla en proc. exp.. Actividad control: 10.0 µmol Pi.min^{-1}.mg prot^{-1}

Efectuando los mismos análisis y consideraciones que en el caso del RKW el gráfico de inversas $1/k_{ap}$ vs. 1/[DEPC] es lineal y se obtiene una ordenada al origen finita (figura 17b). Aparentemente una molécula de FBPasa reacciona reversiblemente con una de DEPC, dando un complejo con una K_i de 50 mM^{-1}. La constante de velocidad (k_3) para la formación del complejo inactivo (irreversible) es de 4.2×10^{-3} seg^{-1} (29,93,103).

2- Protección de la inhibición por activación de la enzima.

Si la inactivación de la FBPasa es consecuencia de la reacción del DEPC con grupos esenciales para la conversión a su forma activa, sería probable que al incubar la enzima con los moduladores hubiera una protección o retardo de la inactivación. Para el análisis de ésta posibilidad se procede secuencialmente de la siguiente manera (ver sección I-A-2): i) se activa la FBPasa en buffer MOPS-NaOH pH 7.8, con DTT, FBP, Ca y alternativamente Th-f, tricloroacetato ó 2-propanol; ii) se la trata con DEPC; iii) se la incuba en una solución de activación similar a la de i) pero en buffer Tris-Hcl pH7.9; y, finalmente iv) se ensaya su actividad a bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+}. En la figura 18 se muestra que la actividad de la FBPasa -activada por TCA ó Th- decae un 50% por la acción del DEPC en 6 minutos; mientras que tanto para la enzima nativa como para la activada por 2-propanol, la misma inactivación se logra en 2 minutos. Esta diferencia en la inactivación mediada por el DEPC sugiere que

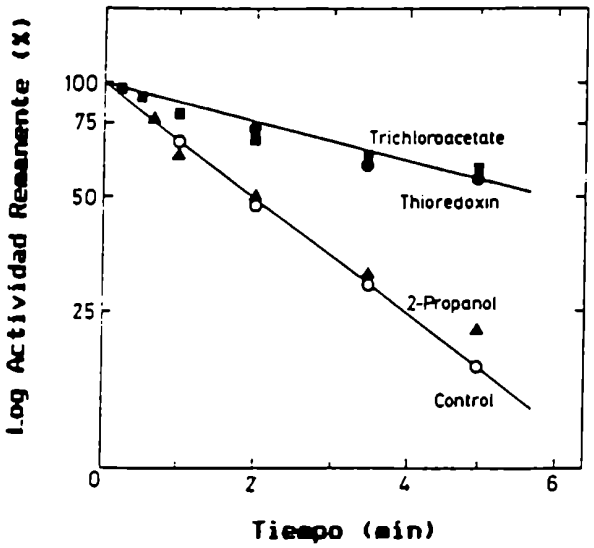


Figura 18. Efecto de la activación de la FBPasa sobre la inactivación por DEPC. La enzima (10µg) se incuba a 23° por 30 min en 0.22 ml de MOPS-NaOH pH 7.8 solamente (control) ó conteniendo las mezclas de activación de Th, 2-propanol ó tricloroacetato. Luego se trata con DEPC y, a los tiempos indicados, se toman alícuotas de 0.025 ml y se ensaya la actividad remanente en dos etapas con la respectiva mezcla de activación como se indica en proc. exp.. Actividad control: 10.0 µmol Pi.min^{-1}.mg prot^{-1}

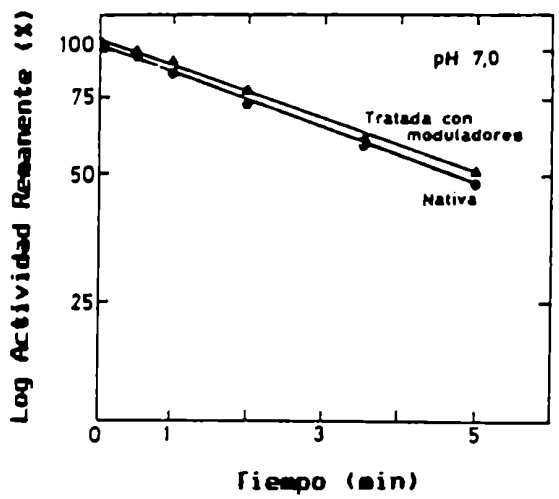


Figura 19. Efecto del tratamiento con DT, FBP, Ca^{2+} y tricloroacetato a pH 7.0 sobre la inactivación de la FBPasa por DEPC. La enzima (10µg) nativa ó tratada con moduladores fue incubada a 23° C con Mops-NaOH pH 7.0, y su actividad remanente se determinó según proc.exp.. Actividad control: 7.0 µmol Pi.min^{-1}.mg prot^{-1}

las distintas formas activas de la FBPasa pueden poseer diferentes conformaciones.

En otros experimentos se vio que la FBPasa es inactivada por el DEPC a pH 7.0 con un $t_{0.5}$ de 5 min; la incubación con los moduladores y tricloroacetato no consiguen proteger contra la inactivación (figura 19). Debido a que a pH7.0, los moduladores son incapaces de estimular a la enzima, solamente los cambios mediados por la tiorredoxina ó tricloroacetato que la activan a pH7.9 previenen la inactivación por DEPC.

3- Análisis estructurales. Espectrofotometría diferencial al UV.

La N-carbetoxilación de residuos de histidina en las proteínas, produce un aumento de absorbancia en el rango de 240 a 245 nm mientras que la O-carbetoxilación de grupos tirosilo disminuye la absorbancia en la región de 280 a 290 nm (157). En experimentos control se determinó mediante el análisis espectrofotométrico que ni Th, ni TCA, ni el 2-propanol, afectan la N-carbetoxilación de histidina libre.

El espectro diferencial en el UV de la FBPasa nativa tratada con DEPC a pH 7.8, muestra diferencias positivas de absorbancia correspondientes a region de 240 a 245 nm, mientras que entre 282 y 285 nm las diferencias fueron negativas (figura 20). Si se utiliza el coeficiente de extinción molar del derivado N-carbetoxilado de histidilo (ϵ_{242nm}= 3200 $M^{-1}.cm^{-1}$) y O-carbetoxilado de tirosilo (ϵ_{275nm}= 1310 $M^{-1}.cm^{-1}$), se pueden calcular 7 moles de

histidina y 16 moles de tirosina modificados por el DEPC, por mol de FBPasa nativa a pH 7.8.

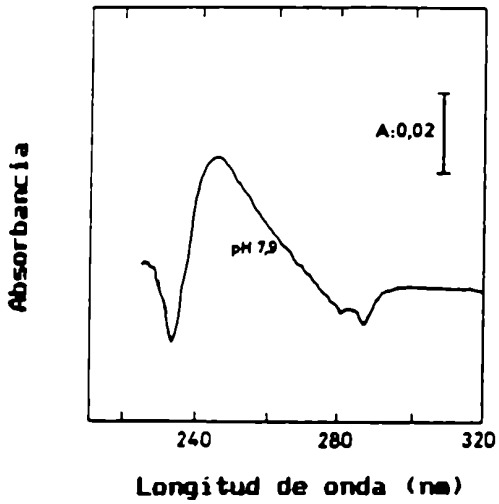


Figura 20. Espectro diferencial al UV de la FBPasa a pH 7.8 tratada con DEPC. En 1 ml se incuba la enzima (100µg) a 23° en Mops-NaOH pH 7.8 y 7µmoles de DEPC. Posteriormente se registran los espectros diferenciales a los tiempos indicados, como se detalla en proc. exp.

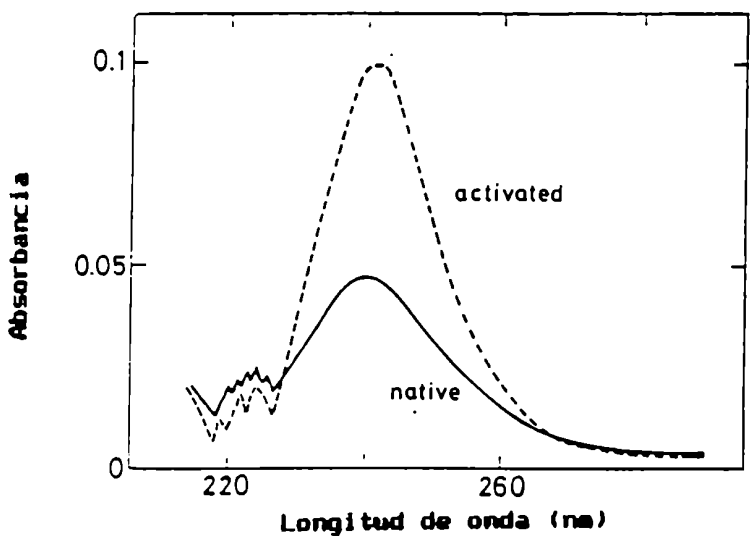


Figura 21. Espectros diferenciales de la FBPasa nativa y activada tratadas con DEPC. Se incubaron en 0.8 ml la enzima (100µg) a 23°C por 30 min en Mops-NaOH pH 7.8 solamente (nativa, linea llena) ó en presencia de la mezcla de activación por tricloroacetato (activada, linea punteada). Posteriormente se trataron con DEPC (7µmoles) y se registraron los espectros diferenciales según proc. exp..

Cuando se activa a la enzima con TCA previo a la modificación con DEPC, se determinan 11 histidinas y 18 tirosinas por mol de FBPasa. Si bien éstos valores podrian ser mayores debido a la contribución negativa de las tirosinas O-carbetoxiladas sobre el espectro de las histidinas N-carbetoxiladas y viceversa, establecen claramente diferencias de las formas nativa y activada de la FBPasa en la reactividad de éstos residuos (figura 21).

Paralelamente, al realizar los espectros diferenciales a pH 7.0, se observa que la FBPasa nativa presenta modificaciones en la absorbancia a 242 nm solamente.

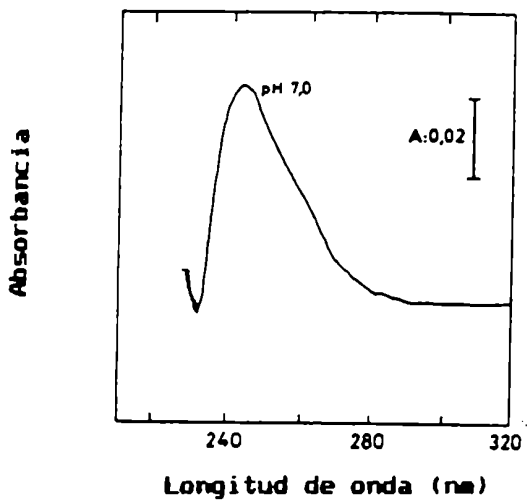


Figura 22. Espectro diferencial de la FBPasa tratada con DEPC a pH 7.0. Se trata a la enzima en Mops-NaOH pH 7.0 y se procede como en la figura 20.

Utilizando el ϵ_{242nm}, se calcula que a pH 7.0, reaccionan 5 moles de histidina por mol de enzima y no se observan cambios en las tirosinas (280 nm) (figura 22).

Con el propósito de correlacionar las modificaciones estructurales con la pérdida de actividad de la FBPasa, se analiza la reacción del DEPC con ambos residuos, siguiendo los cambios de absorbancia a 242 y 280 nm en función del tiempo. Simultáneamente, se toman alícuotas para ensayar la actividad de FBPasa remanente. Como se muestra en la figura 23, en presencia de DEPC, la N-carbetoxilación de histidinas es el proceso más rápido ($t_{0.5}$= 0.4 min); la inactivación ocurre más lentamente ($t_{0.5}$= 1.0 min), siendo el último proceso en completarse la O-carbetoxilación de tirosinas ($t_{0.5}$= 5.0 min).

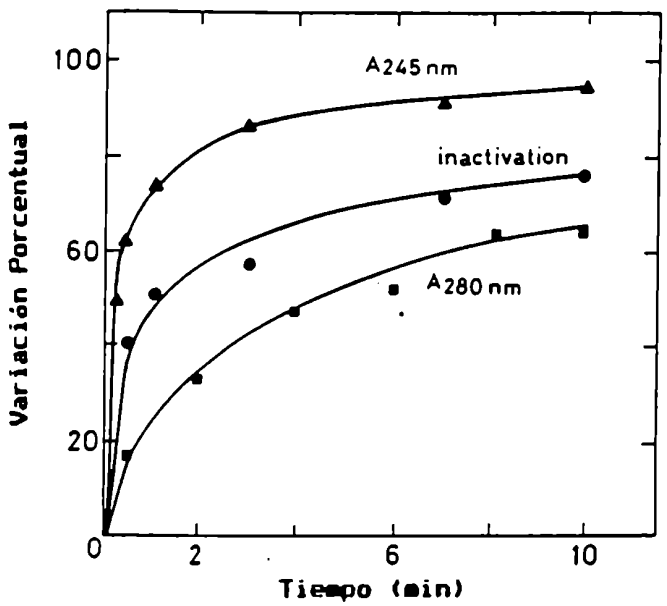


Figura 23. Efecto del DEPC en función del tiempo sobre la modificación de residuos de la FBPasa. Se incubó la enzima (100µg) a 23°C en Mops-NaOH pH 7.8 en las celdas muestra y referencia del espectrofotómetro de doble haz. Luego se trató la "muestra" con DEPC (11mM) y se registraron las absorbancias a 245 y 280 nm a los tiempos indicados. La actividad remanente se ensayó en dos etapas. Actividad control: 10.0 µmol Pi.min^{-1}.mg prot^{-1}

4- Desplazamiento nucleofílico de la unión DEPC-enzima.

Los derivados N- y O-carbetoxilados, producto de la reacción del DEPC con residuos histidilo y tirosilo respectivamente, pueden ser desplazados por nucleófilos como NH_2OH (157). Asimismo, es conocido que el DEPC puede reaccionar con grupos -SH, pero esta unión no puede ser desplazada por nucleófilos (92).

En experimentos no mostrados, se oservó que a ambos pH -7.0 y 7.8-, el espectro diferencial de la FBPasa tratada con DEPC es anulado, revirtiendo a la linea basal luego de agregar NH_2OH 0.5 M. Para analizar si la reversión espectral muestra una recuperación de la capacidad catalítica de la FBPasa, se la trata con DEPC y luego con NH_2OH. Posteriormente, se toman alícuotas para determinar la actividad remanente en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg^{2+}. Los datos que se muestran en la figura 24 indican

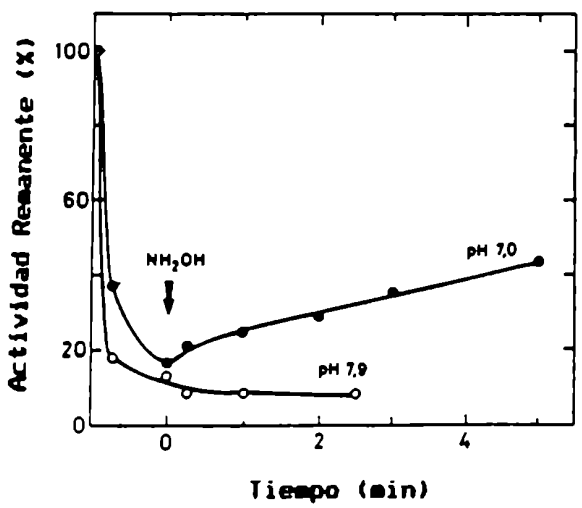


Figura 24. Efecto de la hidroxilamina sobre la actividad de la FBPasa tratada con DEPC. La enzima se incubó con 2mM DEPC en Mops-NaOH al pH indicado, según se describe en proc. exp.. Luego de 10 min se agregaron 0.02 ml de 0.8M NH_2OH-1.2M imidazol (pH final 7.0) y se analizó la actividad enzimática remanente en dos etapas. Actividad control: 10.0 µmol Pi.min^{-1}.mg $prot^{-1}$

que la reversión del espectro no es reflejo de la recuperación de la actividad a pH 7.8. Por el contrario, en experimentos similares efectuados a pH 7.0, la enzima recupera parcialmente su actividad (40%).

C- Conclusiones.

La actividad especifica de la FBPasa es estimulada por DTT, FBP, Ca^{2+} y alternativamente Th, cosolventes, aniones caotrópicos y, como se verá más adelante, alta presión. Luego, perturbantes de la estructura proteica -no involucrados en reacciones redox- ejercen sobre la FBPasa una activación similar a una proteína, tiorredoxina, cuya función primaria estaba exclusivamente ligada a la reducción de -S-S- a -SH (71). De esto surgen dos preguntas: i) es la conformación de la FBPasa activada diferente a la nativa? ii) poseen las diferentes formas activas similares conformaciones?. Para contestar la primer pregunta, se analizó el efecto de reactivos especificos de grupo, previo y posterior a la activación de la FBPasa. Con respecto a la segunda pregunta, se comparó la accion de modificadores químicos sobre las formas activas generadas por incubación con moduladores fisiológicos (Th-F) y no fisiológicos (cosolventes y aniones caotrópicos).

Luego de la reacción con RKW y DEPC, se produce la inactivación de la FBPasa y la capacidad catalítica no puede ser recuperada. La incubación de la enzima con moduladores ó el ensayo a altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} muestran que

la enzima no es funcional. Los estudios espectrofotométricos indican que la inactivación de la enzima nativa por el RKW, se debe a la modificación química de los grupos carboxilo. Por otra parte, a pesar de que las variaciones espectrales debidas al DEPC indican modificaciones tanto en histidinas como en tirosinas, la N-carbetoxilación de las primeras precede la inactivación, mientras que la O-carbetoxilación de las segundas es un proceso posterior. Consecuentemente, los grupos histidilos son esenciales para la activación enzimática de la FBPasa, mientras que la modificación de los grupos tirosilos producen cambios espectrales durante la etapa de activación sin ser directamente responsables de la inactivación por DEPC. El requerimiento de histidinas en la actividad enzimática fue inferido de datos de secuencias de aminoácidos que muestran dos residuos de histidina conservados en varias FBPasas conocidas (98).

La inactivación por RKW y DEPC puede ser protegida por incubación con Th-F o tricloroacetato, indicando que una exposición diferente de los residuos es la responsable de la pérdida lenta de la actividad. Por otra parte al preincubar la enzima con 2-propanol, no se produce la inactivación mediada por RKW, en tanto que el DEPC mantiene su efectividad de inactivación. Por lo tanto, la reactividad de la forma activa de la FBPasa al DEPC depende de la vía de activación utilizada mientras que para RKW es indistinto. Estos resultados indican que en la FBPasa activada, los moduladores protegen a los grupos carboxilo esenciales a) para la

activación enzimática ó b) para la catálisis. Por otra parte los moduladores condicionan la exposición de grupos histidilo esenciales. Sobre esta base se concluye que: i) la conformación de la enzima activada es diferente de la nativa y ii) las diferentes formas activas poseen distintas conformaciones.

A pH 7.0, donde el proceso de activación no ocurre, los moduladores no previenen la inactivación por DEPC. A este pH reaccionan solamente los grupos histidilo pues no se observan modificaciones en la región del espectro que corresponde a las tirosinas las tirosinas. Se observa, además que la inactivación de la enzima nativa es más pronunciada a pH 7.8 que a pH 7.0. Al mismo tiempo a pH 7.8 no hay reversión del efecto del DEPC por NH_2OH mientras que ocurre una recuperación parcial a pH 7.0. Estos resultados indican una fuerte dependencia del pH en el cambio conformacional de la FBPasa, y en consecuencia en la activación.

En relación con este análisis, se encontró en el laboratorio que la reacción de FBPasa con iodoacetamida es independiente de los moduladores utilizados (143). Esto se determinó tratando a la enzima -nativa ó activada por las diferentes vías- con ^{14}C-iodoacetamida, realizando luego una digestión triptica de la FBPasa y analizando finalmente los fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida. Se observó, entonces, que la enzima nativa no incorpora ^{14}C, mientras que la forma activada si lo hace. Los digeridos tripticos de la FBPasa activada presentaban el mismo patrón

electroforético. En estudios preliminares se observó que los moduladores condicionan la respuesta al cloruro de dansilo (Hugo Labate, resultados no publicados). Es decir que se obtienen actividades específicas similares en presencia de Th-F ó perturbantes no-fisiológicos. Por otra parte, si bien la reactividad de la enzima al RKW e iodoacetamida es independiente del modulador utilizado, no lo es frente al DEPC y cloruro de dansilo.

II- ALTA PRESION.

Los cosolventes y aniones caotrópicos modifican la composición de la solución, alterando en consecuencia la hidratación de las proteínas; ello determina cambios en las interacciones intramoleculares (no-covalentes). De esta manera, el aumento de la actividad de las enzimas regulatorias del CRPP sería producido por la modificación de la cantidad de agua unida a la proteína. La **alta presión hidrostática** (APH) constituye otra aproximación para alterar el estado de hidratación de las proteínas (108,153). Los efectos de la presión sobre las proteínas se pueden presentar como cambios en la estructura terciaria y cuaternaria implicando modificaciones en la exposición de los grupos reactivos, o bien como cambios en el equilibrio de reacciones proteína-ligando. El común denominador de estos efectos es la alteración que produce la APH, sobre las interacciones intra e intermoleculares que confieren estabilidad a las macromoléculas. Estudios realizados sobre reacciones bioquímicas modelo sugieren que las interacciones iónicas y las hidrofóbicas son las principales modificadas por la presión; por el contrario, los puentes de hidrógeno son escasamente afectados por este perturbante (77). Estos resultados pueden resumirse en la tabla que se presenta a continuación

Cambios de volumen (ΔV) asociados con ejemplos representativos de reacciones bioquímicas relevantes (77).

Reacción	ΔV ($cm^3.mol^{-1}$)
Protonación/formación de par iónico	+10
Uniones hidrógeno	-1
Hidratación hidrofóbica	-10
Hidratación de grupos polares	-5
Asociación protéica (microtúbulos)	+90
Desnaturalización protéica (mioglobina)	-98

EFECTO DE LA PRESION SOBRE LAS PROTEINAS

- ALTERACION DE LA ESTRUCTURA
  - TERCIARIA: Cambio conformacional
    - General: toda la macromolécula
    - Local: dominios
  - CUATERNARIA: Asociación-disociación
- TIPO DE EFECTO
  - Reversible
  - Parcialmente reversible
  - Irreversible
- DETERMINACIONES
  - ESTRUCTURALES
    - Polarización de fluorescencia intrinseca.
    - Corrimientos espectrales
    - Cambios de rendimiento cuántico
    - Variaciones en el tiempo de vida media
  - CINETICAS
    - Estimulación
    - Inhibición

En el cuadro se resumen los efectos de la APH sobre las proteínas descriptos hasta el presente y los métodos de estudio empleados (77,153, esta tesis), indicando el tipo de efecto y el nivel al que actúa dicho perturbante físico.

Se determinó, en otros estudios, que la APH induce cambios en la estabilidad estructural de las enzimas oligoméricas, lo que eventualmente llevaría a una disociación y a la concurrente modificación de la actividad de las mismas (77,83,135).

El efecto de APH no fue estudiado hasta ahora en las enzimas cloroplásticas, por lo que se busca comparar las modificaciones -mediadas por éste perturbante físico- sobre las constantes cinéticas afectadas por perturbantes químicos (cosolventes y aniones caotrópicos). Por lo tanto, se propone analizar los efectos de APH sobre enzimas del CRPP, reguladas por el sistema Fd-Th: FBPasa, NADP-GAPD y PRK, cuyas actividades son estimuladas en presencia de solventes orgánicos ó aniones caotrópicos (ver introducción, sección VI). En forma paralela en estos estudios, se ensaya el efecto de la presión sobre la RuBisCO. La actividad de esta enzima no es modulada por la Th (75) y se desconoce el efecto de los perturbantes químicos (solventes orgánicos y aniones caotrópicos) sobre la activación de esta enzima. De esta manera, el análisis de la RuBisCO resulta relevante como control en estos experimentos por: i) no estar regulada por el sistema Fd-Th, ii) encontrarse en el estroma del cloroplasto y iii) pertenecer al CRPP.

Los estudios realizados anteriormente sobre la acción de APH en la actividad de enzimas fueron efectuados teniendo en cuenta una sola etapa como componente de la actividad enzimática; siendo ésto válido solo en el caso de enzimas que no son regulatorias (o histeréticas). Para estudiar los efectos cinéticos de APH sobre las enzimas cloroplásticas, se analizan separadamente las dos etapas de la reacción de las enzimas histeréticas: activación y catálisis. Es de destacar que así se estudiaron, previamente, los efectos de otro perturbante físico, la temperatura, donde los gráficos de Arrhenius fueron curvados para la activación y lineales para la catálisis (34,159).

A- Fructosa-1,6-bisfosfatasa.

Al incubar la FBPasa en presencia de DTT, FBP y Ca^{2+} e incrementar la presión hidrostática, se observa la actividad de la enzima aumenta hasta llegar a un máximo a 70-100 bar. A presiones mayores -supraóptimas- su actividad comienza a

Tabla V. Requerimientos de la activación por presión

Moduladores (a 80 bar)	Actividad (%)
DTT, FBP,Ca^{2+}	100
DTT, FBP	11
DTT, Ca^{2+}	5
FBP, Ca^{2+}	8

Actividad control:5.0 µmol Pi.min^{-1}.mg $prot^{-1}$.

disminuir (figura 25). En experimentos control se observó que la activación mediada por APH es estrictamente dependiente de DTT, FBP y Ca^{2+}, como se indica en la tabla V

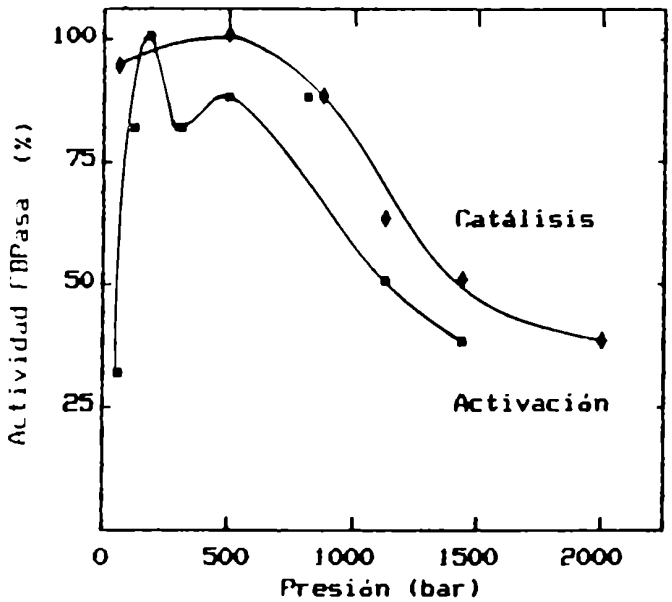


Figura 25. Efecto de la presión sobre la activación y catálisis de la FBPasa. Activación: la enzima (20µg) fue incubada a 23°C en 0.2 ml de una solución que contenía (en µmoles): Tris-HCl pH 7.9, 10; DTT, 1.0; FBP, 0.24; $CaCl_2$, 0.01. Luego de 10 min, la presión se liberó y la actividad se ensayó en dos etapas como se indica en proc. exp. Catálisis: 20µg de enzima se incubaron en 0.1 ml de mezcla de activación 2-propanol por 10 min. A continuación, se inyectaron 0.9 ml de mezcla de catálisis y se introdujo en la bomba de presión. Luego de 5 min, se liberó la presión y se determinó inmediatamente el P_i liberado según proc. exp.. Actividad control: 5.0 µmol $Pi.min^{-1}.mg\ prot^{-1}$

Resulta importante el estudio de la reversibilidad del efecto de APH debido a que los efectos descriptos sobre las enzimas oligoméricas, son de tipo reversible: a altas presiones las enzimas se disocian con pérdida de su actividad catalítica pero al retornar a la presión atmosférica la recupera. Para analizar este efecto, se incrementa la

actividad especifica de la FBPasa aplicando alta presión y retornando inmediatamente a la presión atmosférica. Se determina la actividad de la enzima tomando alicuotas a diferentes tiempos. A tiempo cero (retorno a la presión atmosférica) se obtiene un valor de 4.6 µmol Pi. min^{-1}.mg $prot^{-1}$ que aumenta 2 veces si la incubación se extiende por 60 min; la enzima control, que no fue expuesta a APH, aumenta 6 veces en el mismo período debido a la activación lenta en presencia de DTT, FBP y Ca^{2+}; no obstante, la actividad especifica es menor (figura 26).

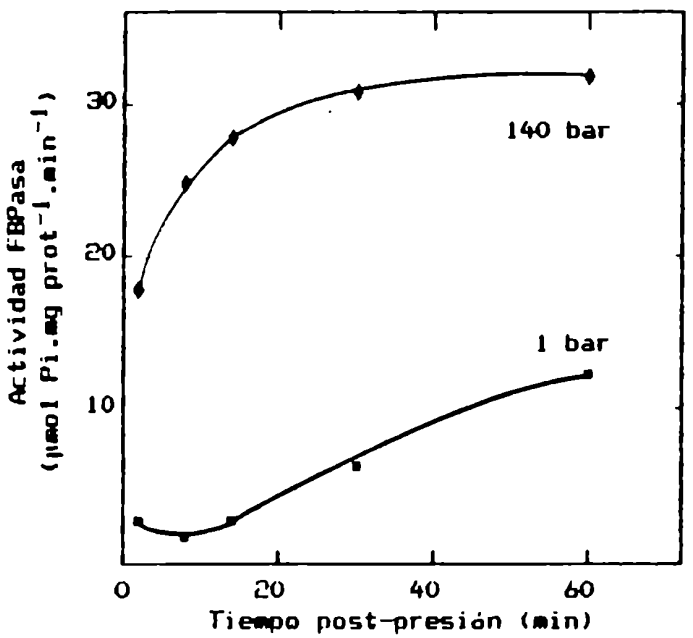


Figura 26. Activación irreversible de la FBPasa mediada por alta presión. Se procedió de la misma manera que la figura 25, pero se incubó a 140 bar y se tomaron alicuotas a los tiempos indicados luego de liberar la presión. La actividad se determinó luego con la mezcla de catálisis del ensayo en dos etapas (ver proc. exp.). En la curva control (1 bar) no se aplicó presión y se determinó la actividad de la misma manera.

Se observa que la enzima no sólo no retorna a su valor basal de actividad, sino que ésta sigue aumentando. Estos datos indican que la presion no modifica el equilibrio entre las formas activa e inactiva de la FBPasa; aparentemente aumenta la velocidad con la que se produce la conversión.

El análisis del efecto de APH sobre la catálisis muestra que presiones menores a 700 bar estimulan este proceso levemente, mientras que a valores mayores, el efecto es claramente inhibitorio (figura 25).

En los estudios realizados con Th, cosolventes y aniones caotrópicos sobre la FBPasa, el efecto estimulatorio tiene su origen en una disminución del $A_{0.5}$ para FBP, permaneciendo sin modificaciones el $A_{0.5}$ para el Ca^{2+} (34,65,142). Con el

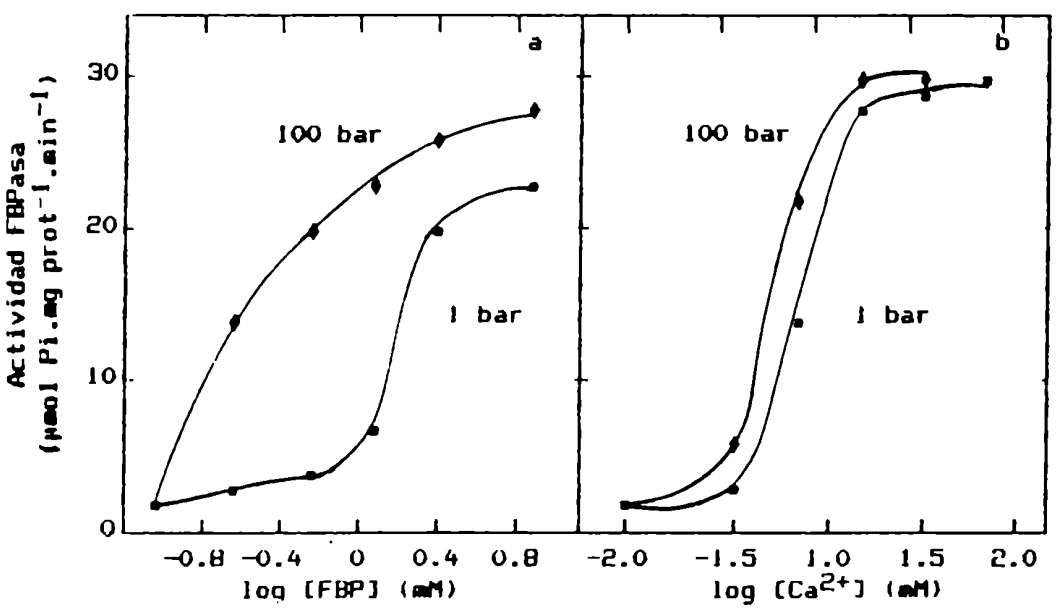


Figura 27. Efecto de la presión sobre la activación de la FBPasa mediada por FBP y Ca^{2+}. La FBPasa (20µg) fue incubada como se indica en la figura 25 (activación), a las concentraciones de Ca^{2+} y FBP indicadas. Para los controles (1 bar) se procede de la misma manera pero sin aplicar la presión.

objeto de determinar el $A_{0.5}$ de un modulador, se incuba a la enzima con concentraciones crecientes de dicho compuesto, manteniendo constante las concentraciones de los otros moduladores. Luego, se determina la actividad catalítica en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+}.

En la figura 27, se observa una disminución del $A_{0.5}$ para FBP de 1.5 mM a 0.3 mM al incrementar la presión de 1 a 100 bar. Por otra parte, variaciones similares de presión no producen modificación del $A_{0.5}$ para Ca^{2+}.

B- Gliceraldehido-3P-deshidrogenasa.

La NADP-GAPD es una enzima multimérica de peso molecular

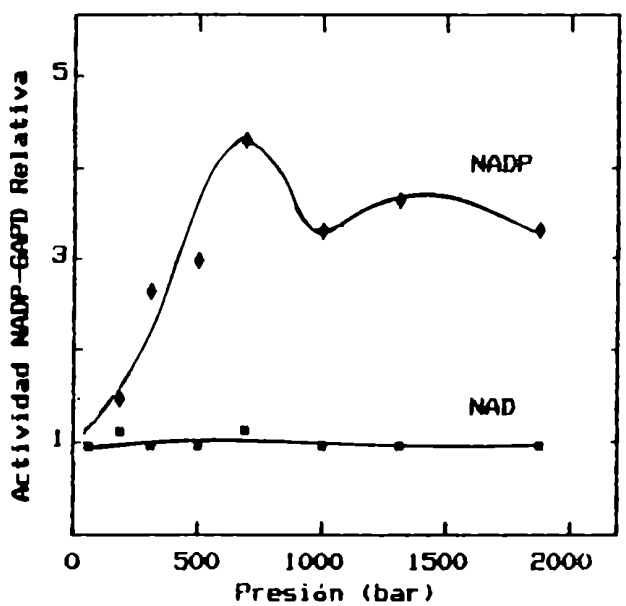


Figura 28. Efecto de la presión sobre la activación de la GAPD (reducción de piridin nucleótido). La NAD(P)-GAPD (40µg) se incubó a las presiones indicadas en 0.2 ml de 0.1M Iris-HCl pH 7.9. Luego de 5 min, se tomó una alicuota y se inyectó en la solución para el ensayo de actividad -reducción de NAD(P)- descripto en proc. exp..

600000, que interviene en la fase reductiva del CRPP. En la reducción del gliceraldehido 3-P actúan tanto el NADP como el NAD ; la reacción en la que participa el NADP constituye la actividad funcional en el cloroplasto y está regulada por la luz (160).

Al someter a esta enzima a presiones mayores que 700 bar, la actividad NADP-dependiente en el sentido de la reducción (oxidación de piridín nucleótido) aumenta 4 veces,en tanto que la actividad ligada al NAD, permanece inalterada (figura 28).

En el sentido opuesto -reducción de piridín nucleótido- se observa un resultado similar: la actividad dependiente del NADP es incrementada por la presión mientras que la ligada al NAD no se modifica (figura 29). Resulta importante destacar

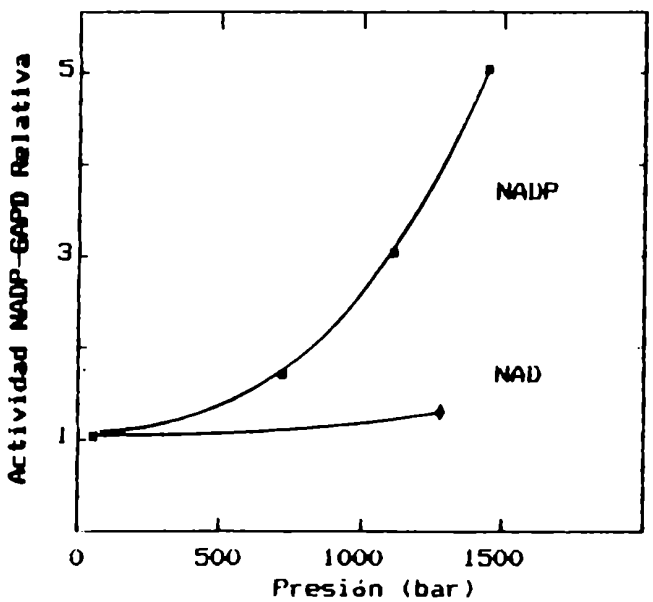


Figura 29. Efecto de la presión sobre la activación de la GAPD (oxidación de piridín nucleótido). Se incubo la enzima como en la figura 28 y la actividad -oxidación de NAD(P)- se determinó segun proc. exp..

que la activación por APH, al igual que por metabolitos, cosolventes y aniones caotropicos, no requiere la presencia de un reductor (DTT) (171).

Para estudiar la reversibilidad del efecto, se procede igual que con la FBPasa. Primero se somete la enzima a alta presión y luego se libera la presión; se analiza, luego, la actividad de la enzima a distintos tiempos. Esta se mantiene sin modificaciones en los primeros minutos, pero a diferencia

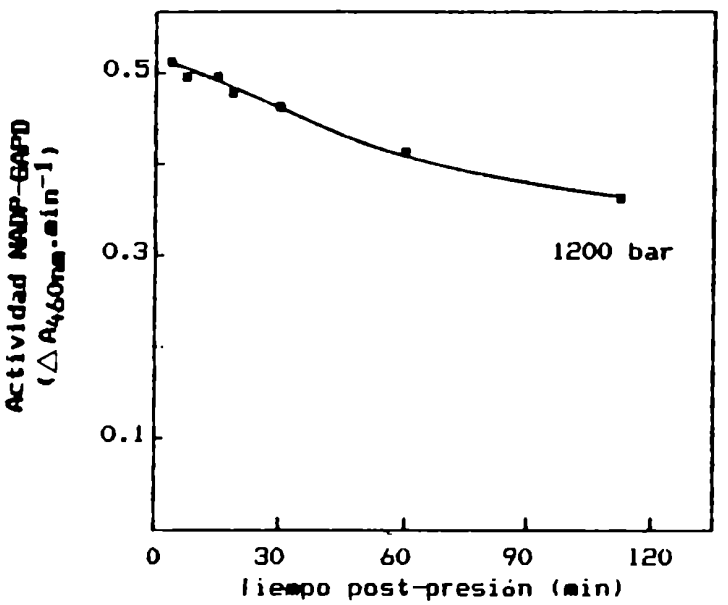


Figura 30. Actividad NADP de la GAPD luego de la activación por presión. Se incubó la enzima como se indica en la figura 28; al liberar la presión, se tomaron alicuotas a los tiempos indicados para determinar la actividad GAPD.

con la FBPasa decae un 30% luego de 2 horas de incubación a presión atmosférica (figura 30).

En la activacion de esta enzima in vitro participan varios moduladores; el $A_{0.5}$ para un metabolito (primario) es modificado por: i) un segundo metabolito, ii) Th reducida ó iii) un cambio en la composición del medio por incorporación

de un solvente orgánico o un anión caotrópico (168,171). Este fenómeno se conoce con el nombre de histiéresis concertada; afecta la actividad NADP- y no se observa para la actividad NAD-dependiente.

Estudios previos determinaron que la NADP-GAPD es estimulada por metabolitos presentes en los cloroplastos (ATP, NADPH, Pi, 1,3 diPG) y Th, cosolventes ó aniones caotrópicos (160,166,168). Con el fin de analizar el efecto de la APH sobre el mecanismo de activación concertada, se incuba a la enzima con los moduladores y se incrementa la presión, determinándose luego la actividad catalítica a presión atmosférica. Como se observa en la figura 31, cuando

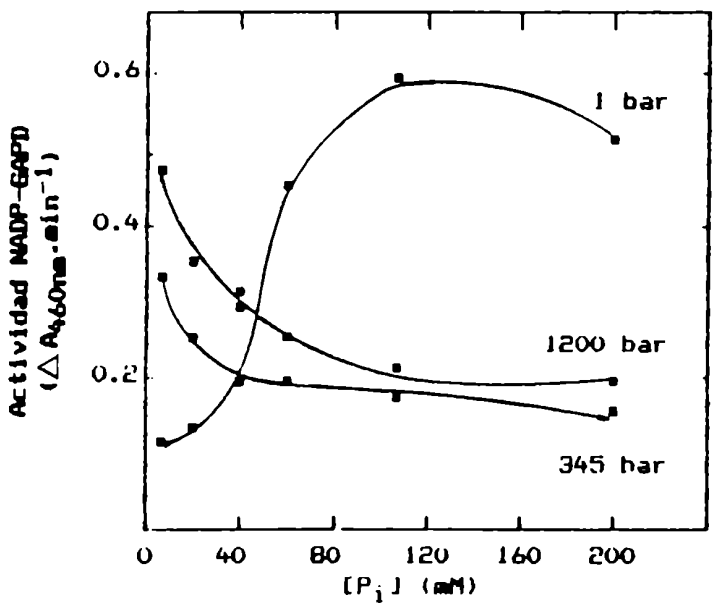


Figura 31. Inactivacion concertada de la NADP-GAPD mediada por la presión y el P_i. La enzima (40µg) se incubó bajo presión como se indica en la figura 28, en presencia de las concentraciones de P_i indicadas. Luego de 5 min se determinó la actividad.

la GAPD es incubada con 0.1M Pi -a presión atmosférica-, la actividad NADP- dependiente aumenta 6 veces. Sin embargo, al incubar la enzima por 5 minutos a 350 ó 1200 bar, la actividad especifica decae a valores basales a medida que aumenta la concentración de Pi. Se obtienen resultados similares cuando se analiza el efecto concertado de APH y otro modulador de la enzima, el ATP (figura 32).

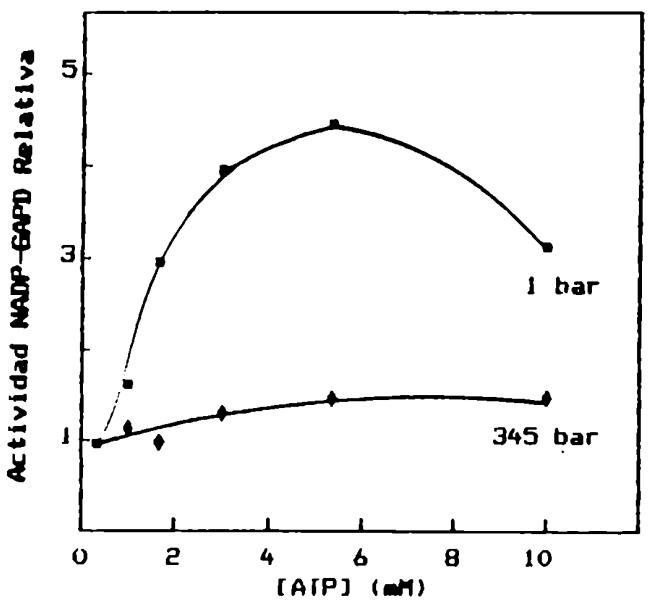


Figura 32. Inactivación concertada de la NADP-GAPD mediada por la presión y el ATP. Se procede de la misma manera que la figura 31 en presencia de las concentraciones de ATP indicadas.

Estos resultados difieren respecto de los obtenidos con moduladores fisiológicos -Th- ó químicos -cosolventes y aniones caotrópicos-. Los mismos, en presencia de metabolitos, activan en forma concertada a la NADP-GAPD.

El estudio del efecto de APH sobre la fase catalítica no puede ser llevado a cabo en el sentido de la oxidacion del NADPH, debido a que en este proceso participa una enzima

auxiliar -fosfoglicerato quinasa- necesaria para la generación del sustrato (1,3-diPGA). Este aspecto complica el análisis por cuanto la acción de APH se ejerce simultáneamente sobre las dos enzimas. Este inconveniente se evita analizando dicho efecto en el sentido de la reducción del NADP, donde no se utiliza enzima auxiliar. En la figura 33 se compara el efecto de APH sobre la activación y la

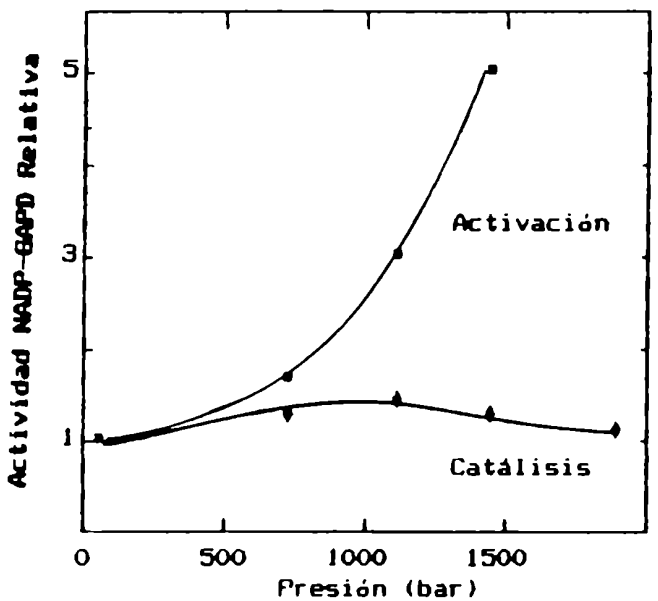


Figura 33. Efecto de la presión sobre la catálisis de la GAPD en el sentido oxidativo (reducción de NADP). Comparación con el efecto sobre la activacion. La enzima (40µg) se incubó con la mezcla de catálisis-oxidación (arseniato y NADP), como se detalla en proc. exp.

catálisis de la NADP-GAPD medidas en el sentido oxidativo (reducción del NAD).

C- Fosforribuloquinasa y ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa

PRK y RuBisCO son dos enzimas caracteristicas de organismos autotroficos y difieren en sus mecanismos de regulación (106,162). La actividad especifica de PRK de

cloroplastos de plantas superiores es estimulada por moduladores fisiológicos (sistema Fd-Th) y no fisiológicos (cosolventes) (162,166). Por el contrario, RuBisCO es estimulada por metabolitos -CO_2 y Mg^{2+}- y no es modificada por la Th (75).

La actividad específica de PRK aumenta progresivamente al incrementar la presión hasta 1400 bar. Aún a 2000 bar -la

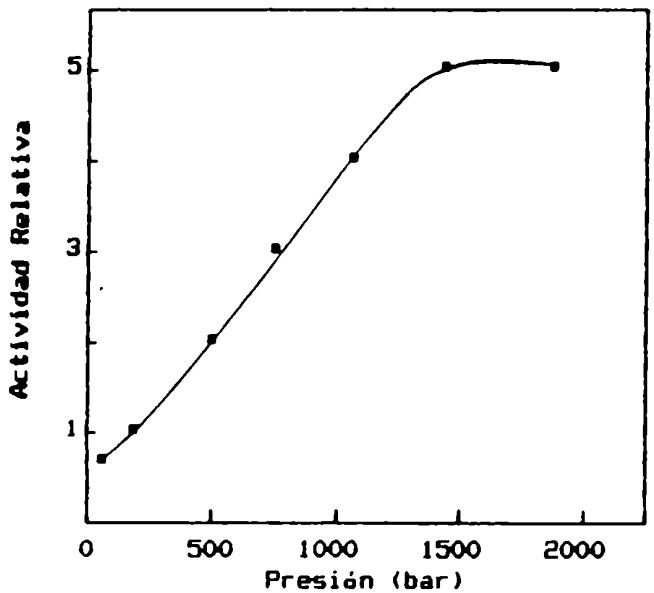


Figura 34. Efecto de la presión sobre la activación de la fosforribuloquinasa. Se incubaron 40µg de la enzima en 0.2 ml de 0.1M Tris-HCl pH 7.9 y 2 mM DTT. Luego de 5 min a las presiones indicadas, se tomaron alícuotas para la determinación de la actividad PRK (ver proc. exp.).

máxima presión que se puede obtener con el aparato-, la enzima mantiene una alta actividad específica (figura 34). Sin embargo, del mismo modo que con la NADP-GAPD, la interpretación del efecto de APH sobre la fase catalítica de ésta enzima se hace extremadamente complicada, ya que tanto para la generación del sustrato (Ru-5P) como para la

estimación del producto (ADP), resulta necesaria la presencia de enzimas auxiliares.

Cuando se analiza el efecto de APH sobre RuBisCO, se observa una disminución del 50% al aplicarse una presión de 50 bar a la solución (figura 35). El incremento en las concentraciones de HCO_3^- y Mg^{2+} (activadores de la enzima) hasta 10 y 20 mM respectivamente, no evitan la inactivación mediada por APH.

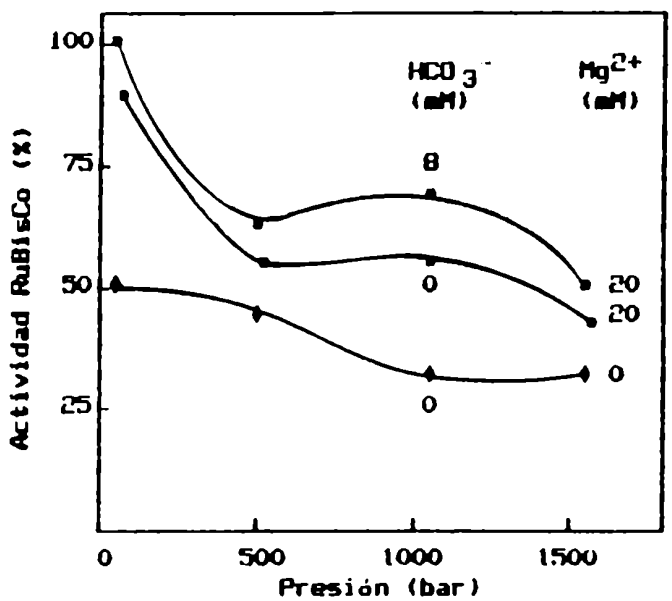


Figura 35. Efecto de la presión sobre la activación de la RuBisCO. La enzima (280µg) se incubó en 0.2 ml de buffer Bicina-KOH pH 8.0, en presencia de 2 mM DTT y las concentraciones de Mg^{2+} y HCO_3^- de la figura. Luego de 10 min a las presiones indicadas, se determinó la actividad segun proc. exp..

El efecto de los aniones caotrópicos y los solventes orgánicos sobre la RuBisCO no habia sido determinado previamente. Al no estar afectada esta enzima por Th y ser inhibida por APH, se deseó saber el efecto de estos perturbantes quimicos que activan otras enzimas regulatorias del CRPP. Esta accion se ensayo en presencia de los efectores

requeridos para su activación: Mg^{2+} y CO_2 (HCO_3^-). En la figura 36 se observa el efecto de un anión caotropico (tricloroacetato) y el de un anion cosmotrópico (sulfato) en la fase de activacion (152). El primero posee un marcado efecto inhibitorio, mientras que el segundo es menos pronunciado.

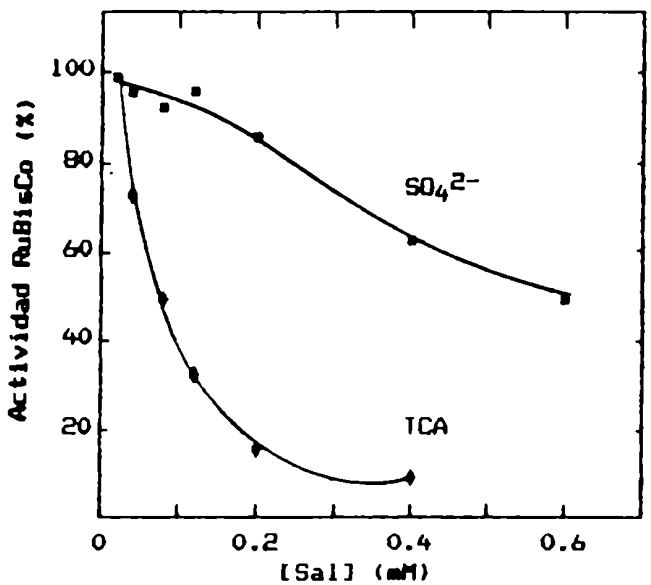


Figura 36. Efecto de aniones sobre la activacion de la RuBisCO. La enzima (280µg) se incubó en 0.2 ml de Bicina-NaOH pH 8.0 en presencia de $NaCO_3H$ (10mM), $MgCl_2$ (20mM), DTT (2.5mM) y las concentraciones de sales indicadas. Luego de 20 min se determinó la actividad de RuBisCO como se explica en proc. exp..

Aunque no se muestra, si se agrega 2-propanol en concentraciones crecientes a la mezcla de activación, se observa que éste no ejerce efecto sobre RuBisCO a bajas concentraciones del cosolvente (hasta 10%), y precipita la enzima a concentraciones mayores.

D- Conclusiones

La APH estimula la actividad específica de las enzimas regulatorias del CBC para la asimilación fotosintética de CO_2. Este efecto de APH (estimulación o inhibición) es ejercido sobre la etapa de activación. Cuando se analiza la fase catalítica se observa un efecto inhibitorio en el caso de la FBPasa y no se observa de efecto en el caso de la NADP-GAPD (reducción del NADP, figura 33).

Los datos aquí presentados indican que el aumento de la actividad por APH no está restringido a enzimas monoméricas (119). Un hecho significativo distingue los cambios aquí observados de otras enzimas reportadas: las modificaciones reversibles de la estructura cuaternaria de las proteínas por APH no pueden ser las responsables de la activación de las enzimas, ya que la actividad específica no revierte a valores iniciales luego de la liberación de la presión. Estos resultados contrastan con la enzima enolasa, la cual sufre una disociación reversible (117). Por otra parte difieren también de estudios reportados que afirman que la presion ejerce un efecto inhibitorio sobre las enzimas multiméricas por causa de disociacion (83).

La accion de la presion está relacionada con la cinética de una reacción mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{d \ln k}{d p} = \frac{-\Delta V^{\#}}{RT}$$

donde k es la constante de velocidad a la presión p y $\Delta V^{\#}$ es el volumen de activación, que representa la diferencia entre el volumen del estado de transición y el estado inicial. Teniendo en cuenta el principio de Braun-Le Chatelier, una variación positiva del volumen de activación lleva a una disminución en la velocidad de la reacción. De manera que el aumento que hemos observado en la actividad correlaciona con una disminución del $\Delta V^{\#}$.

Datos disponibles indican que la hidratación hidrofóbica constituye la reacción con el $\Delta V^{\#}$ más negativo, mientras que un $\Delta V^{\#}$ altamente positivo es caracteristico de formación de pares ionicos (77,108,153). Por otra parte, de los datos acumulados en el laboratorio, resulta evidente que las interacciones involucradas en la conversión de las enzimas cloroplásticas de un estado a otro con diferentes propiedades cinéticas, difieren de las del proceso de catálisis.

En particular, la acción de APH sobre el proceso de activación de la FBPasa es semejante a la de Th, cosolventes y aniones caotropicos. Aparentemente en dicho proceso, los moduladores no fisiológicos -actuando en conjunto con DIT, FBP y Ca^{2+}- disminuyen la esfera de hidratación (modificación del agua unida) alrededor de los grupos expuestos en la forma activa de la FBPasa.

Durante la formacion del complejo activo FBPasa-FBP en el proceso de activacion, uno o más grupos polares en la superficie de la enzima pueden aumentar su exposicion al

agua, conduciendo a una reducción del $\Delta V^{\#}$. En este caso, los moduladores no fisiológicos disminuyen la hidratación de estos grupos; por lo tanto, la magnitud del $\Delta V^{\#}$ sería menor, con la concurrente disminución de la velocidad de la reacción (54,96).

Al igual que los moduladores químicos -aniones caotrópicos, cosolventes- el efecto cinético de APH sobre la FBPasa se origina en una disminución del $A_{0.5}$ para FBP, requiriendo la presencia de un reductor (DTT) y Ca^{2+}. Existe luego una similitud en la acción de los moduladores no-fisiológicos sobre la FBPasa.

A diferencia de esta enzima, la NADP-GAPD presenta frente a APH un comportamiento distinto al observado con la Th y los moduladores no-fisiológicos (perturbantes químicos). Además existe otra diferencia importante y es que no requiere ningun modulador para su activación por APH -constituyendo la APH un **modulador primario**-. Este efecto es específico -en ambos sentidos, oxidación y reducción- para el sustrato funcional en el CRPP: NADP(H); en cambio, la actividad asociada a NAD(H), permanece invariable en presencia de los cosolventes, aniones caotrópicos ó APH, cuando éstos actúan como moduladores primarios. Sin embargo la aparente similitud de APH con los moduladores no-fisiológicos no se cumple al analizar su efecto sobre la GAPD en presencia de un segundo modulador. La diferencia fundamental reside en que la APH no aumenta la actividad reduciendo el $A_{0.5}$ para los moduladores

de esta enzima (ATP, Pi) sino que inhibe el efecto estimulatorio de estos metabolitos (figuras 31 y 32).

Por otra parte, la PRK requiere solo DTT para su activación por APH al igual que la activación por Th y cosolventes. Su actividad permanece elevada aun al aplicar las presiones más altas

En contraste con lo observado para las enzimas reguladas por el sistema Fd-Th, la RuBisCO es inactivada rápidamente por APH. Del mismo modo, su actividad es disminuida por cosolventes y aniones caotrópicos aún en presencia de sus moduladores, HCO_3^- y Mg^{2+}.

De lo visto hasta ahora se concluye que:

- la estimulación de la actividad especifica por perturbantes físicos (presión, temperatura) y quimicos (cosolventes y aniones caotrópicos) está limitado a enzimas reguladas por el sistema Fd-Th
- existen diferencias en las tres enzimas del sistema Fd-Th en cuanto a su requerimiento de reductor (DTT): la FBPasa requiere DTT y FBP y Ca^{2+}, la PRK sólo reductor y la NADP-GAPD ni reductor ni moduladores secundarios
- la NADP-GAPD constituiria un caso particular,ya que su respuesta a la APH difiere de los otros perturbantes no-fisiológicos; la presencia de un segundo modulador (ATP, Pi) produce una inhibicion concertada.

III- INTERACCION DE LA FBPasa CON MICELAS DE TRITON X-114 y MEMBRANAS TILACUIDES.

A- MARCACION DE FBPasa Y RuBisCO CON ^{125}I.

Existen varias alternativas experimentales para determinar la interacción proteina-ligando. Estas consisten en medir la concentración del componente libre (no-unido) ó unido bajo condiciones de equilibrio. A su vez, los métodos pueden ser directos ó indirectos: a) en los indirectos se mide la concentración de proteina ó ligando luego de separar la forma libre de la unida por algún procedimiento, ej. centrifugación ó diálisis; b) en los directos la separación no es necesaria ya que el complejo (o la forma libre) posee alguna propiedad medible, ej. variaciones en los espectros de absorción ó emisión.

En el siguiente análisis de la interacción entre una proteina (enzima) y una estructura supramolecular es necesaria la existencia de una sonda en dicha proteina. Con tal fin, se marcan las proteinas en estudio con ^{125}I utilizando el reactivo Iodogen, segun se describe en procedimientos experimentales (48). Este tratamiento conduce a una ^{125}I-enzima inactiva. Experimentos efectuados en el laboratorio indican que la enzima se encuentra en gran parte como monomero y que el tratamiento con Iodogen -y no la incorporacion de I- es el responsable de la pérdida de actividad (Rodriguez Suárez,R., no publicado).

La incubación de la enzima en presencia de FBP y Ca^{2+}, previo al tratamiento con lodogen, permite la obtención de una enzima que mantiene un 40% de su actividad original (tabla VI). Para analizar su estado de asociación, se siembra la enzima marcada en una columna de filtración por geles Ultrogel AcA 54-, que excluye pesos moleculares mayores a 70000. Se determino, entonces, la aparicion de un único pico radiactivo que eluye en el volumen de exclusión de la columna (V_0). Dado que el peso molecular de la forma nativa es de 170000, ésto indicaria que la enzima se encuentra como tetrámero.

Tabla VI. Marcación de FBPasa con ^{125}I. Formas obtenidas

Forma	Incubación	Estado	Abreviación
Monómero	ninguna	inactiva	^{125}I-FBPasa$_1$
Tetrámero	FBP + Ca^{2+}	activa	^{125}I-FBPasa$_4$

Al marcar la RuBisCO con ^{125}I utilizando el mismo procedimiento que la FBPasa, se obtiene una ^{125}I-enzima inactiva. En las siguientes secciones se presentan los experimentos llevados a cabo con la ^{125}I-FBPasa$_1$ (inactiva) y la ^{125}I-FBPasa$_4$ (activa) por separado, tanto en la interacción con micelas de triton X-114 como con membranas tilacoides. Esto se debe a que el monómero carece de actividad y por lo tanto no puede ser comparado a lo que ocurre in vivo con la enzima activa.

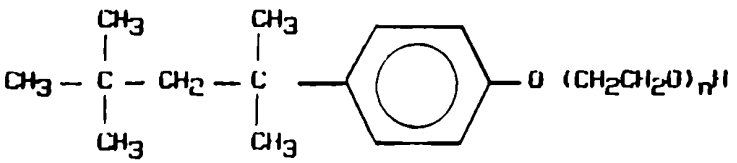
B- INTERACCION CON MICELAS DE TRITON X-114.

La activacion de la FBPasa está mediada -como se explicó anteriormente- por modificación de las interacciones hidrofóbicas intramoleculares. La exposición de nuevos grupos ó dominios a la solución en el proceso de activación, posibilita la modificación de las interacciones intermoleculares. Esto sugiere que las interacciones de la enzima activa con otras estructuras moleculares (membranas, complejos proteicos) seria diferente de la enzima nativa. Sin embargo, el análisis de la interacción con las membranas resulta complejo y no da idea de los mecanismos involucrados. Por este motivo, se hace necesario la utilización de estructuras supramoleculares cuyas caracteristicas fisico-quimicas esten bien definidas. Esto permite cuantificar dicha interacción y los efectores que influyen sobre la misma. Las micelas de los detergentes no-ionicos constituyen una herramienta adecuada para estudiar la interacción hidrofobica (63,144).

A bajas concentraciones en soluciones acuosas, los detergentes se encuentran dispersos principalmente como monomeros. A medida que se incrementa su concentracion, los monomeros se ensamblan en agregados de 60 a 150 unidades. Estas estructuras se denominan **micelas** y la concentracion a partir de la que se forman se la llama **concentración micelar critica** (**cmc**): constituyendo ésta una caracteristica del

detergente. La formación de micelas es la resultante por una parte de la repulsión hidrofobica entre las cadenas hidrocarbonadas y el entorno acuoso y, por otra parte la orientación de las cabezas polares hacia el solvente acuoso (32).

Los detergentes no-ionicos de la serie Triton X poseen cabezas de polioxietileno y forman pequeñas micelas en agua a 0°C.



Polioxietilen p-t-octil fenol (Triton X)

Cuando aumenta la temperatura, aumenta el tamaño de las micelas y se forman agregados insolubles que precipitan y pueden ser separados mediante centrifugación. De esta manera se obtiene una rápida separación de las micelas del resto de la solución. La temperatura a la cual se produce la precipitación se la denomina **punto nube (Cloud Point, CP)**, siendo de 64°C para el Triton X-100 y 20°C para el X-114. La baja temperatura para la separacion de fases del X-114 permite utilizarlo en condiciones que resultan compatibles con las macromoleculas biologicas. Estos detergentes, además, carecen de reactividad quimica y, al no poseer cargas, sus micelas no son afectadas por el pH. (21,124).

Para la determinación de la enzima unida a las micelas se hace necesario marcar la enzima respectiva con ^{125}I como se indica en la seccion III-A. Ello permite analizar la capacidad de union de la ^{125}I-FBPasa y la ^{125}I-RuBisCO a las micelas del detergente Triton X-114. De esta manera se puede comparar la capacidad de interacción hidrofóbica de dos enzimas que presentan diferentes mecanismos de regulación.

1- Estudios con ^{125}I-FBPasa$_I$ (inactiva).

i) Incoporación a las micelas y desplazamiento por seroalbúmina bovina.

Cuando la ^{125}I-FBPasa$_I$ es incubada a pH 7.9, en presencia de DTT, FBP, Ca^{2+} y Th y concentraciones crecientes de Triton X-114, la incorporación de ^{125}I al precipitado aumenta hasta llegar a un máximo (5% de concentración del detergente). El máximo de incorporacion de ^{125}I representa un 8% de la radiactividad total. Si se continúa aumentando la concentración de Triton X-114, no ocurre un aumento en la incorporación de FBPasa (figura 37). Sobre esta base, se analiza el efecto de diferentes tratamientos sobre la maxima incorporación. Para obtener una respuesta sensible, se elige la concentracion del 4% de Triton X-114 en los experimentos subsiguientes.

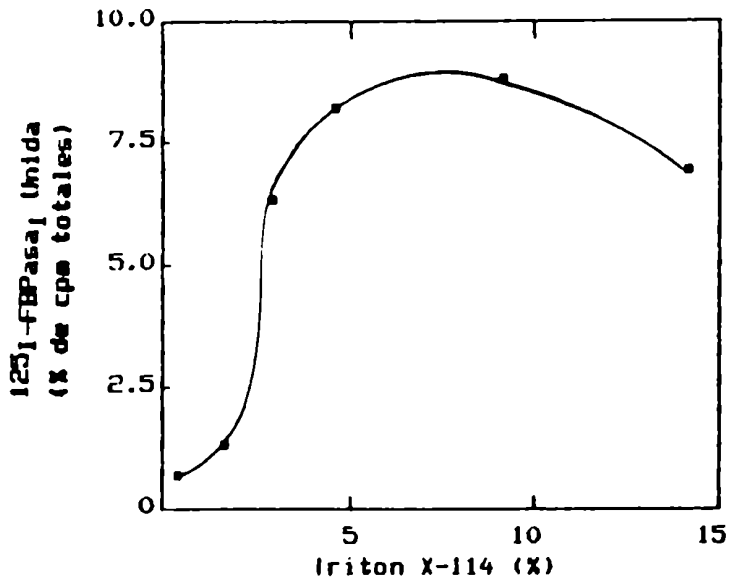


Figura 37. Incorporación de ^{125}I-FBPasa$_1$ a las micelas de Triton X-114. La enzima (5µg) se incubó en 0.2 ml de Tris-HCl pH 7.9 con la mezcla de activación Th por 30 min a 23°C como se explica en proc. exp.. Luego se agregaron 20µl de Tritón X-114 y se incubó a 0° C por 30 min. A continuación fue transferida a un tubo conteniendo 0.7 ml de 0.25 M sacarosa, se incubó a 30°C por 10 min, se centrifugo y se determino el ^{125}I en las micelas (ver proc. exp.).

Con el fin de estudiar las características de la interacción de la FBPasa con las micelas, se utiliza la seroalbumina bovina (BSA) para determinar si existe desplazamiento o competencia por las micelas. La BSA es una proteina globular ampliamente conocida, que presenta características hidrofóbicas. Para ésto, se incuba la ^{125}I FBPasa$_1$ en presencia de cantidades crecientes de BSA y luego se efectua la separacion de fases, determinando la aparicion de radiactividad en el precipitado de micelas de Triton X 114. En la figura 38 se muestra que la union de ^{125}I-FBPasa$_1$ a las micelas puede ser desplazada por BSA en presencia de

DTT; en ausencia de DTT la enzima presenta una incorporación baja que no es modificada por la presencia de BSA.

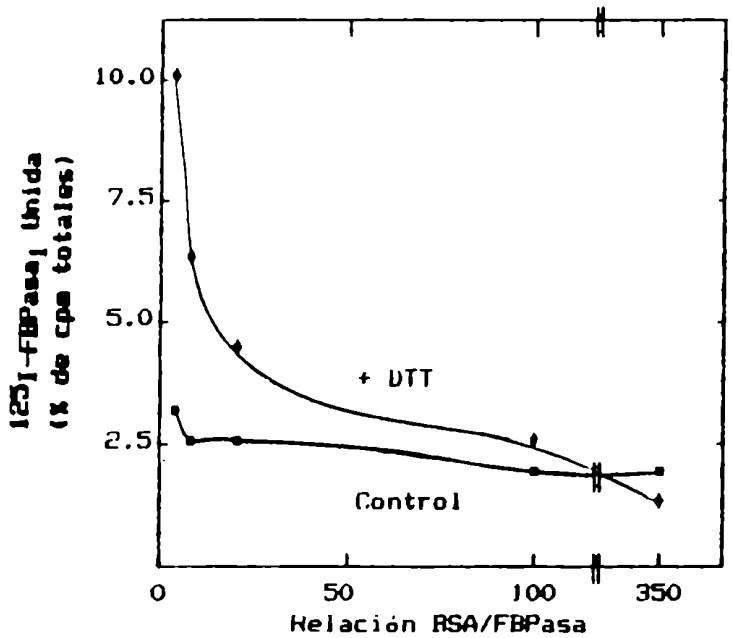


Figura 38. Desplazamiento de la unión de ^{125}I-FBPasa a las micelas de Triton X-114 por BSA. Se incubaron 5µg de la enzima en 0.2 ml de Tris-HCl pH 7.9 por 30 min a 23°C en presencia ó en ausencia de DTT y cantidades crecientes de BSA. Luego se agregó el Triton X-114 y se procedió como indica la leyenda de la figura 37.

ii) Efecto de tioles.

En estudios previos en el laboratorio, se determinó que los tioles modifican las constantes cinéticas correspondientes al proceso de activación (34,64,141). Este efecto depende de los sustituyentes presentes en la estructura del tiol. Por este motivo, se analiza el efecto de varios mono- y ditioles sobre la incorporación de ^{125}I-FBPasa a las micelas de Triton X-114. Se incuba la ^{125}I-enzima en presencia de los diferentes tioles y luego se

determina su incorporación a las micelas. En la figura 39 se observa que los tioles estimulan la incorporación de la enzima a dichas estructuras. Del mismo modo que en los estudios cinéticos, los ditioles son más efectivos que los monotioles para estimular la unión a las micelas. En general, la efectividad de los ditioles es aproximadamente el doble que la de los monotioles. Una concentración de 2mM de DTT produce la máxima incorporación de la ^{125}I-FBPasa$_1$, en tanto que el 2 DET produce la mínima estimulación.

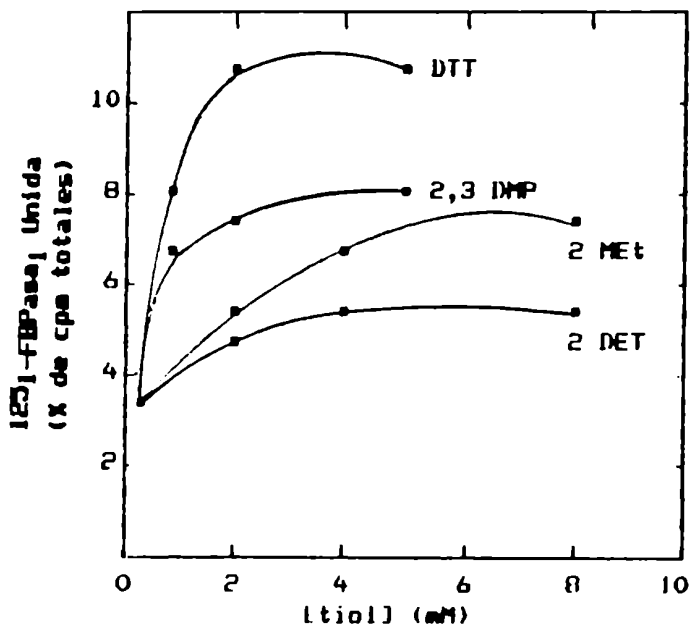


Figura 39. Efecto de tioles sobre la incorporación de ^{125}I-FBPasa$_1$ a micelas de Triton X-114. Se procedió como en la figura 37, incubando la enzima en presencia del buffer y el tiol correspondiente. Luego de 30 min, se agregó el Triton X-114, se separaron las fases y se contó la radiactividad en el precipitado de micelas. DTT, ditiotreitol; 2,3 DMP, 2,3-dimercapto propanol; 2-ME, 2-mercapto etanol; 2 DET, 2-dietilamino etanotiol.

De la misma manera y como comparación, se analiza la incorporación a las micelas de otra enzima, ^{125}I-RuBisCO, no regulada por el sistema Fd-Th. En la figura 40, se muestra la interacción de ^{125}I-RuBisCO con micelas de Triton X-114 en respuesta a concentraciones crecientes de DTT.

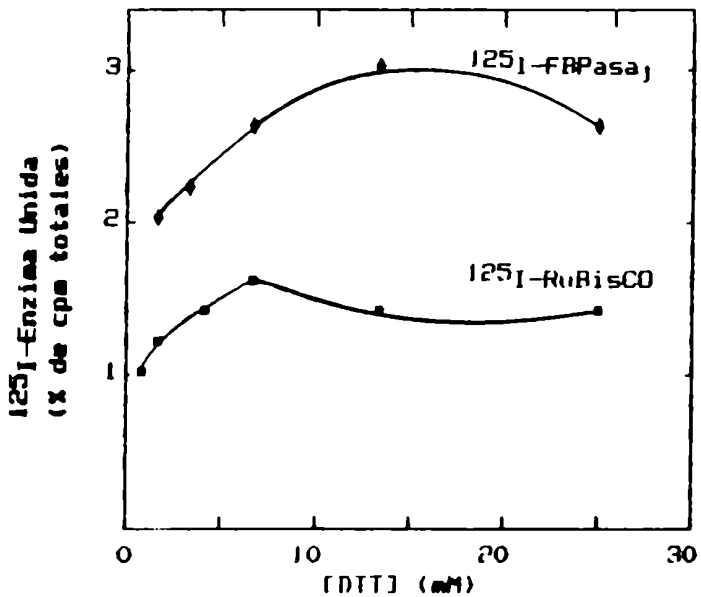


Figura 40. Efecto del DTT en la incorporación de ^{125}I-RuBisCO e ^{125}I-FBPasa$_1$ a micelas de Triton X-114. Se incubaron 5µg de ^{125}I-FBPasa$_1$ y 40µg de ^{125}I-RuBisCO en presencia de concentraciones crecientes de DTT de la misma manera que en la figura 39.

La incorporación relativa de esta enzima a las micelas es estimulada en un 50% en similares condiciones, mientras que la ^{125}I-FBPasa$_1$ alcanza un 200% de estimulación a concentraciones similares del ditiol (10 mM).

iii) Efecto de cationes.

Con el fin de determinar la influencia de cationes monovalentes sobre las propiedades de la ^{125}I-FBPasa$_1$ de interaccionar con las micelas, se preincuba la enzima con los iones K^+ y Na^+. Se eligieron estos cationes debido a su importancia fisiológica en la celula vegetal; en particular el cloroplasto permite la entrada de K^+, permitiendo variaciones de su concentración en el estroma (Barber). Por otra parte se utilizan para modificar la composición iónica ya que son inertes.

Al analizar el efecto de dichos cationes sobre la incorporación de la ^{125}I-FBPasa$_1$ a las micelas, se observa que a pH 7.9 el K^+ estimula 5 veces la incorporación basal

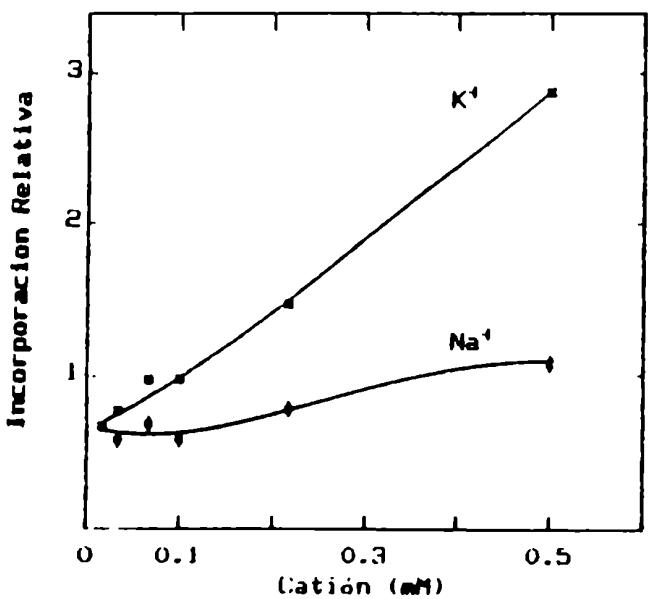


Figura 41. Efecto de K^+ y Na^+ sobre la incorporación de ^{125}I-FBPasa$_1$ a micelas de Triton X-114. Se incubo la enzima con las concentraciones de cationes indicadas, en Tris-HCl pH 7.9; luego de 30 min a 23° C se procedio a separar las fases y determinar la radiactividad como se indica en proc. exp..

(en % de cuentas totales) y el Na^+ tiene solo un leve efecto estimulatorio (figura 41). Las concentraciones de sal utilizadas en estas curvas, llegan a 0.5 M (NaCl o KCL). Esto implicaría que el efecto estimulatorio puede deberse a un aumento de la interacción hidrofóbica por dichas sales. Se sabe que al aumentar la concentración de sales, y por lo tanto la fuerza iónica del medio, las interacciones hidrofóbicas de las proteinas son potenciadas. Por otra parte el K^+ y Na^+ no poseen efecto sobre la activación de la FBPasa en las condiciones utilizadas en las preincubaciones.

El ión magnesio (Mg^{2+}) está presente en los cloroplastos y es fundamental para la actividad de varias enzimas, siendo el cofactor en la catálisis de la FBPasa. Además, su concentración varía durante las transiciones oscuridad-luz, por lo que resulta deseable el estudio de su efecto sobre la interacción de la enzima con estructuras supramoleculares. Al preincubar la ^{125}I-FBPasa$_1$ nativa en presencia de concentraciones crecientes de Mg^{2+} no se observan cambios en la incorporación a la fase rica en detergente. Sin embargo, al analizar la enzima reducida por DTT, el Mg^{2+} presenta un efecto estimulatorio sobre dicha interacción (figura 42).

Las concentraciones de Mg^{2+} necesarias para lograr un efecto similar al de los cationes monovalentes son inferiores, siendo del orden de 8-12 mM. Esto sugiere un efecto específico del Mg^{2+} sobre la proteina, debido a las bajas concentraciones del catión bivalente utilizadas.

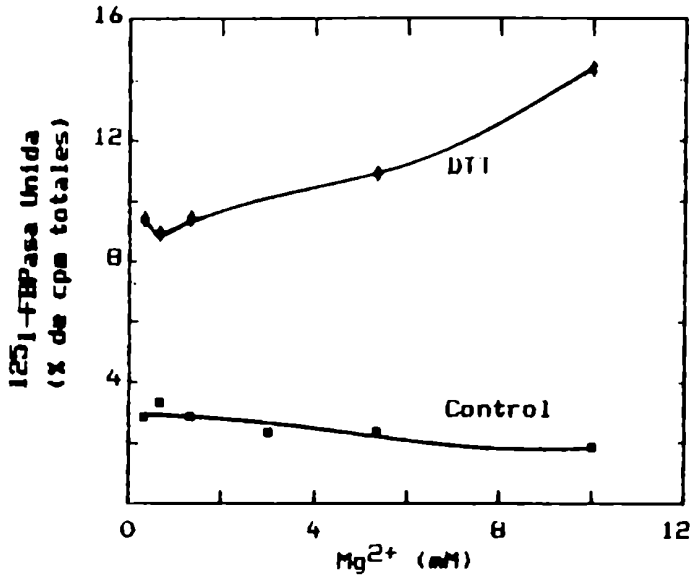


Figura 42. Efecto del Mg^{2+} en la incorporación de ^{125}I-FBPasa$_1$ a las micelas de Tritón X-114. Se incubó a la enzima con las concentraciones indicadas de $MgCl_2$ y 2mM DTT (control, sin DTT). Se procedió como en fig. 37.

iv) Modificaciones químicas.

En la activación la FBPasa cambia su conformacion y expone nuevos grupos a la solución, segun indica la reactividad diferencial al DEPC y al RKW de las formas nativa y activada. Estos reactivos especificos reaccionan con grupos cargados (COO^- y $=HN-^+$) en la enzima nativa produciendo una inactivación irreversible de la misma (sección 1). Esta variación de exposición de grupos cargados implica asimismo un cambio en la superficie de la enzima. Existe, pues, la posibilidad de que al bloquear dichas cargas se generen formas de la proteina modificadas quimicamente en las que su superficie seria mas hidrofóbica. Para ensayar esta hipótesis, se preincuba la ^{125}I-enzima marcada con el

reactivo específico RKW o DEPC a pH 7.9; se agrega el Triton X-114 y se determina la cantidad de enzima unida a las micelas. Al tratar a la ^{125}I-FBPasa con concentraciones crecientes de RKW y luego con Triton X-114 para efectuar la separación de fases, la incorporación de la enzima a la fase rica en detergente aumenta 5 veces con respecto al valor basal, alcanzando el 30% de las cuentas totales. Como control indicativo de la diferencia entre enzimas se llevó a cabo un experimento con ^{125}I-RuBisCO (figura 43).

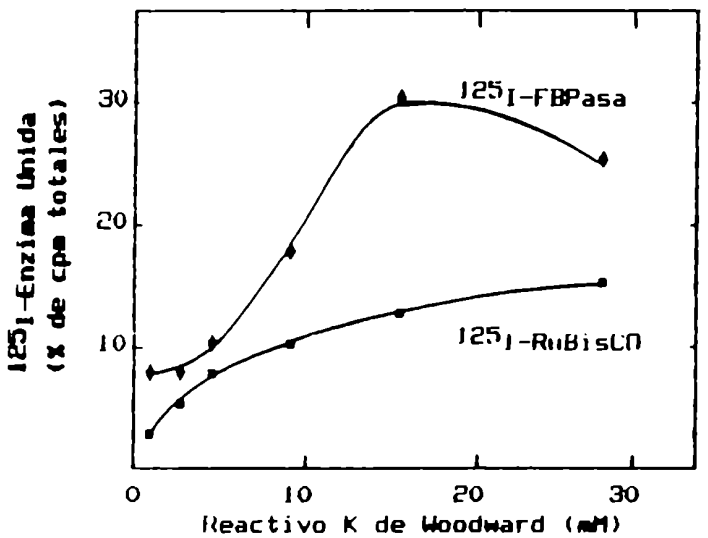


Figura 43. Efecto del RKW sobre la incorporacion de ^{125}I-RuBisCO y ^{125}I-FBPasa a micelas de Triton X-114. Se incubaron las ^{125}I-enzimas en 0.2 ml de Tris-HCl pH 7.9 50mM a 23°C por 30min. Luego se trato por 10min con las concentraciones de RKW indicadas, llevando el volumen a 0.22 ml y se procedio como en la figura 37.

La misma presenta valores bajos de incorporacion basal y aumenta 10 veces al incrementarse la concentración de RKW,

llegando a obtenerse el 13% de las cuentas totales en el precipitado micelar.

Por otra parte, un experimento similar al anterior se efectua utilizando DEPC como reactivo especifico de grupo. La ^{125}I-FBPasa aumenta 6 veces su incorporacion a la fase rica en detergente al ser preincubada con el DEPC. De una incorporación basal del 4 o 5%, la enzima marcada llega a un 28% de las cuentas totales en la fase rica en detergente (figura 44). En cambio, si se preincuba a la ^{125}I-RuBisCO con concentraciones crecientes de DEPC, su posterior incorporación a las micelas no se ve modificada, manteniéndose en el valor basal del 3% del total de las cuentas agregadas.

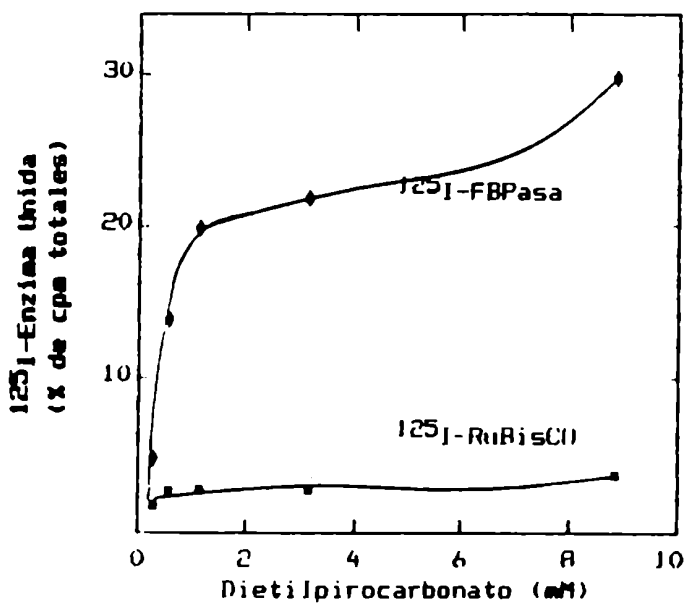
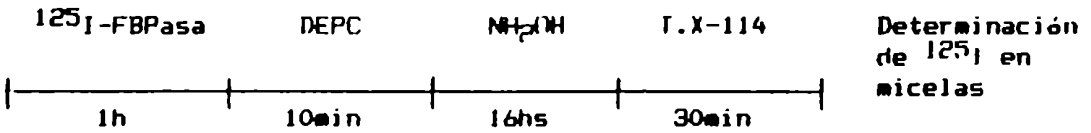


Figura 44. Efecto del DEPC sobre la incorporación de ^{125}I RuBisCO y ^{125}I-FBPasa a micelas de Triton X-114. Se trataron las enzimas -con las concentraciones de DEPC indicadas- como se indica en la leyenda de la figura 43.

Para confirmar que el aumento de unión a las micelas se debe a la modificación química de la ^{125}I-FBPasa por el DEPC, se realiza un desplazamiento del reactivo en la proteína etoxiformilada, utilizando como nucleófilo la hidroxilamina (NH_2OH, secc. I-B-4) (38). El esquema experimental es el siguiente:



Como se observa en la tabla VII, el desplazamiento del DEPC de la ^{125}I-FBPasa revierte a valores basales la incorporación de la enzima nativa a las micelas de Triton X 114. Sin embargo, la enzima que fue tratada con DTT previo a su modificación química no recupera los valores basales de incorporación por el mismo tratamiento. Existe la posibilidad

Tabla VII. Desplazamiento de la unión DEPC ^{125}I-FBPasa por hidroxilamina

	cpm % en micelas	
	+DTT	-DTT
buffer	10	6
DEPC	26	26
DEPC; NH_2OH	27	9

La ^{125}I-FBPasa$_1$ (5 µg) se incubó, en 0.2 ml de 25 mM Mops-NaOH pH 6.8 con el agregado de 5 mM DTT, por 1 h a 23°C. Luego se agregaron 0.01 ml de DEPC (3 mM final) y se incubó 10 min a la misma temperatura. Posteriormente se agregó 0.2 ml conteniendo 100 mM Tris-HCl pH 7.9 (detiene la reacción) y 0.4 M NH_2OH y se incubó por 16 hs. Finalmente se agregó Triton X-114 y se determinó la incorporación a las micelas según proc. exp..

de que el DEPC reaccione con grupos -SH expuestos por la enzima; como se describió en el capitulo de modificaciones qupimicas, esta unión no puede ser desplazada por nucleofilos (92).

Dado que el tratamiento con DEPC se efectúa a pH 7.0, estarian implicados residuos de histidina y no asi los de tirosina.

2- Estudios con ^{125}I-FBPasa$_4$ (activa).

i) Interacción: requerimientos.

Si se incuba la FBPasa con FBP y Ca^{2+} previo a la marcación con ^{125}I, se obtiene una ^{125}I-enzima que conserva parte de su actividad y su estructura tetramérica. El hecho de poder marcar la enzima conservando su actividad catalítica constituye un hecho relevante ya que los cambios observados in vitro pueden ser relacionados a lo que ocurre in vivo; esto es, un fenomeno bioquimico podria ser relacionado con un posible rol fisiológico. De esta manera, el análisis de la interacción in vitro de una proteina -marcada con una sonda radiactiva- con diversos soportes, permite obtener información sobre interacciones dentro del cloroplasto.

Para analizar la incorporacion de la enzima a las micelas de Triton X-114, se trata paralelamente a la ^{125}I FBPasa$_4$ nativa o preincubada con los moduladores de la activación -DTT, FBP, Ca^{2+} y Th-, con concentraciones crecientes del detergente no-iónico. Posteriormente se

efectúa la separación de fases por aumento de la temperatura y se determina la radiactividad en las micelas. En la figura 45 se observa que la respuesta es más pronunciada en el caso de la enzima activada con respecto a la no tratada, alcanzando un 6% y 2% de incorporación respectivamente.

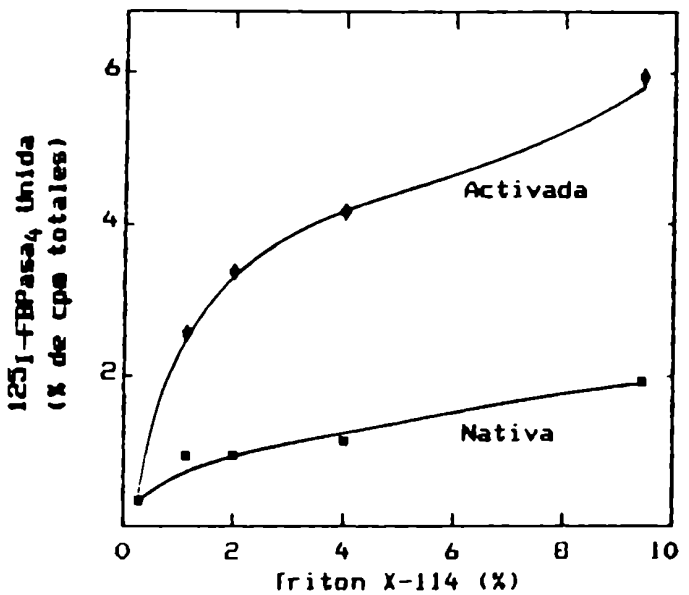


Figura 45. Incorporación de ^{125}I-FBPasa$_4$ a micelas de Triton X-114. La enzima (5µg) se trató con Tris-HCl pH 7.9 solamente (nativa) ó con la mezcla de activación Th, y se procedió como se detalla en la figura 37.

En la tabla VIII se muestran los requerimientos de la interacción. La estimulación de la incorporación de la enzima a las micelas está determinada por el tiol, en tanto que los restantes compuestos si bien son fundamentales para la activación, no lo son para la interacción. El efecto del DTT se debería a una reducción ya que la ausencia de estimulación por el eritritol -un análogo del DTT-, descarta un efecto estérico.

Tabla VIII. Requerimientos para la interacción de ^{125}I-FBPasa$_4$ con micelas de Triton X-114

Tratamiento	cpm (%)
Nativa (dimero)	1.6
DTT	5.0
Eritritol	1.5
FBP	2.4
Ca^{2+}	2.1
Th	1.8
DTT, Th	5.0
FBP, Ca^{2+}	2.8
Completo	4.6
Completo,-DTT	1.9

Se incubaron 5 µg de la ^{125}I-FBPasa$_4$ en 0.2 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7.9 por 30 min a 23°C con los moduladores en las siguientes concentraciones: 5 mM DTT, 0.1 mM FBP, 50 µM $CaCl_2$ y 10 µg Th. Se llamó completo cuando se incubó con todos los moduladores. Luego se agregó Triton X-114 y se efectuó la separación de fases y determinación de la radiactividad en las micelas como se indica en proc. exp.

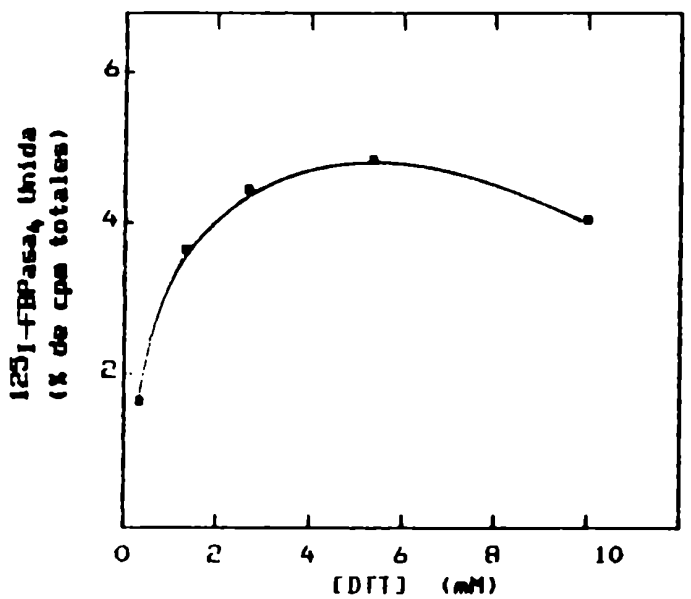


Figura 46. Incorporación de ^{125}I-FBPasa$_4$ a micelas de Triton X-114. La enzima (5µg) se incubo por 30 min en presencia de las concentraciones indicadas de DTT, en buffer Tris-HCl pH 7.9 (ver figura 37).

La figura 46 muestra que el efecto estimulatorio del DTT sobre la interacción de la enzima nativa con las micelas del detergente, resulta similar a la ^{125}I-FBPasa inactiva -monómero- (figura 2).

ii) *Efecto del pH*

Otro aspecto relevante a analizar es el efecto del pH, dada su importancia <u>in vivo</u> debida a los cambios ocurridos durante la transición oscuridad-luz en el cloroplasto. Cuando se preincuba a la ^{125}I-FBPasa activa (tetrámero) -nativa ó activada vía Th- en Tris-HCl a diferentes pH, se puede observar que disminuye la incorporación de la forma nativa a las micelas de Triton X-114 a medida que aumenta el pH; con-

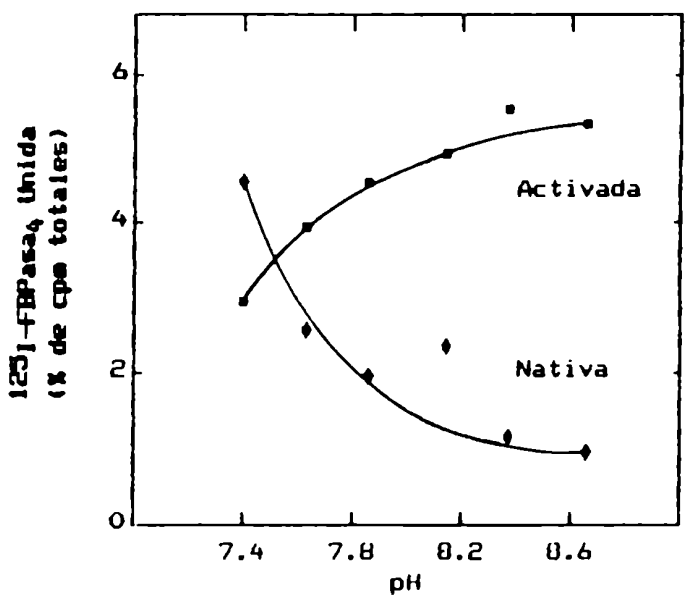


Figura 47. Efecto del pH en la incorporacion de ^{125}I-FBPasa$_4$ a las micelas de Triton X-114. Se trataron 5µg de la enzima en 0.2 ml de Tris-HCl a diferentes pH a 23°C por 30 min. Se llamó enzima nativa o activada segun la leyenda de la figura 45.

trariamente, la enzima activada aumenta su incorporación (figura 47).

iii) Efecto de Mg^{2+}

Al estudiar el efecto del Mg^{2+} se encuentra que, a diferencia de la ^{125}I-FBPasa$_1$ (inactiva) donde no se observa variación alguna, la enzima tetramérica aumenta su incorporación a las micelas al incrementarse la concentración de Mg^{2+} (figura 48).

3- Conclusiones.

Las micelas de Triton X-114 constituyen una alternativa versátil para el análisis de las interacciones hidrofóbicas de la FBPasa. Los cambios observados se deben a modificacio-

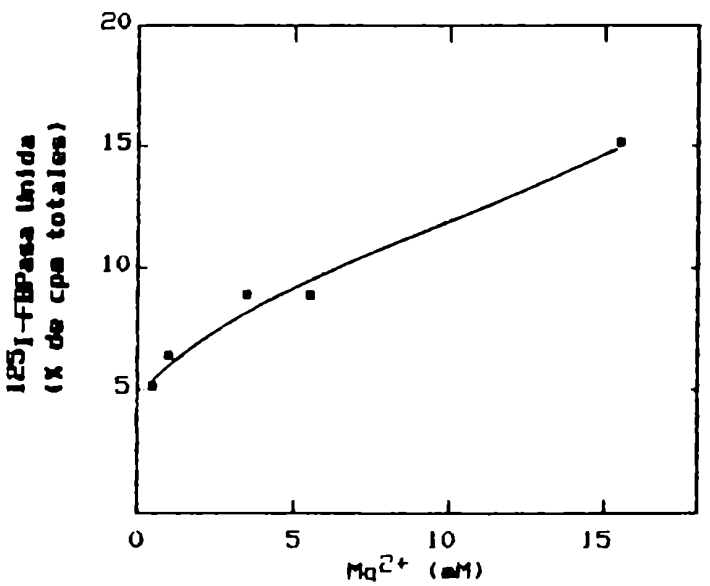


Figura 48. Efecto del Mg^{2+} en la incorporacion de ^{125}I-FBPasa$_4$ a micelas de Triton X-114. Se procedio del mismo modo que la figura 42 (sin el agregado de DTT).

nes en la superficie de la proteína ya que tanto el pH como los diferentes iones no alteran la estructura de las micelas. Esta falta de reactividad química del detergente es compartida también por los reactivos modificadores de grupo.

La FBPasa -tanto la ^{125}I-enzima inactiva (monómero) como la activa (tetrámero)- se une a las micelas dependiendo de la concentración del detergente. No obstante, existe una diferencia cuantitativa que implica una diferente exposición de los grupos ó dominios que interaccionan con la micela. Esta exposición diferencial es producida por los moduladores que participan en la activación. Cuando la ^{125}I-FBPasa$_4$ es activada en presencia de DTT, FBP, Ca^{2+} y Th, su incorporación a las micelas es notablemente mayor que la enzima nativa (no tratada) (figura 45). Esto indica que al ser activada la enzima, la misma sufre modificaciones en las regiones expuestas al solvente y le permiten, a su vez, interaccionar con estructuras de tipo hidrofóbico en mayor medida que la forma nativa.

Del análisis del efecto de los tioles sobre la incorporación de la enzima a las micelas se desprende que su efectividad para estimular dicho proceso depende de la enzima en estudio y de la estructura química de los reductores ensayados. En particular, se vio que los ditioles son más efectivos que los monotioles. Observaciones similares fueron hechas en el estudio del efecto de los tioles en la estimulación de la actividad enzimática (34,64,141).

La ausencia de reaccion y/o interacción entre los tioles y la micela indica que la acción de los mercaptanos ocurre sobre la estructura de la proteina. Cuando se analizan las formas inactivas, se observa que la capacidad de respuesta al DTT es mayor para la ^{125}I-FBPasa que para la ^{125}I-RuBisCO; esto podria deberse a distinto grado de reactividad de los -SH con el tiol o bien, una diferente exposición de los -SH. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que estas diferencias puedan deberse a efectos del proceso de marcación con ^{125}I sobre ambas enzimas, ya que se trata de formas inactivas.

Del mismo modo,el DTT estimula la incorporación de la ^{125}I-FBPasa$_4$ (activa) a las micelas y este efecto se debe a los grupos tiol, ya que el eritritol (los grupos -SH en la molécula están reemplazados por -OH) no estimula dicha interacción.

Experimentos realizados en el laboratorio muestran que la FBPasa nativa no incorpora ^{14}C-iodoacetamida luego de ser incubada en presencia de DTT. Para que la enzima sea carboxiamidometilada, resulta necesaria la presencia de un desnaturalizante proteico además del reductor (143). La imposibilidad de marcación con ^{14}C-iodoacetamida no implica necesariamente ausencia de reducción; esto podria deberse a la inaccesibilidad del reactivo a los grupos -SH ocultos de la proteina. Los experimentos con micelas sugieren que el DTT produce un cambio en la enzima nativa, ya que no modifica la estructura de la micela. Dicho cambio seria una reducción y

conduciría a una forma de la enzima con mayor exposición al solvente de los grupos o dominios no polares, los que se hallan en el interior de la forma nativa. De manera que los cambios en el estado de redox de ésta enzima modificarían sus propiedades de inteacción hidrofóbica intermolecular, o sea, la capacidad de asociarse con otras estructuras de tipo hidrofóbico.

El efecto estimulatorio sobre la incorporación a micelas por parte de los cationes monovalentes, en particular el K^+, se debe a una potenciación de la interacción hidrofóbica causada por un aumento en la concentacion de sal; dicho incremento no estaría relacionado a un rol específico del ion K^+. Como vimos anteriormente, el aumento del pH favorece la interacción de la ^{125}I-FBPasa$_4$ (activa) activada con las micelas, mientras que causa una disminución en la interacción de la enzima nativa (no tratada) con dichas estructuras. Al mismo tiempo, el Mg^{2+} produce una leve disminución de la incorporación de la ^{125}I-FBPasa$_1$ (inactiva) no tratada y un aumento cuando ésta es reducida por el DTT. De estos resultados se desprende que cambios asociados a la transición luz-oscuridad en el cloroplasto (estado redox, aumento de [Mg^{2+}] y de pH) conducen in vitro a formas mas hidrofóbicas de la FBPasa. Si bien el Mg^{2+} y pH aumentan la capacidad de la FBPasa de interaccionar con estructuras supramoleculares, no se excluye la posibilidad de que exista una accion secuencial ó concertada entre la reducción y los iones H^+ y/o Mg^{2+}.

Las modificaciones quimicas introducen una alteración en la estructura de un grupo ó residuo de la proteina produciendo cambios en su superficie. En los experimentos aquí presentados, las modificaciones selectivas de grupos conducen a una estimulación de la incorporación a las micelas. La modificación por el RKW tiene efecto sobre ambas enzimas, ^{125}I-FBPasa e ^{125}I-RuBisCO; èsto es de esperar ya que al pH en que se trabaja la mayoria de los grupos se encontrarán como carboxilatos (COO^-). La reacción del RKW con los grupos COO^- no es especifica en cuanto a la enzima y/o grupo de la misma y genera formas no cargadas (ver esquema de la reacción). Alternativamente, el DEPC estimula la unión de la ^{125}I-FBPasa mientras que no modifica el valor basal de ^{125}I-RuBisCO. Al pH en que se trabaja, 7.9, se estarían modificando histidinas y tirosinas, segun se determinó en la sección I-B. Por otra parte , se plantea una diferencia importante en el comportamiento de las distintas formas de la FBPasa. La reversión por NH_2OH sólo es posible en el caso de la ^{125}I-FBPasa (monomero) no tratada; la forma tratada con DTT no recupera los valores de incorporación basal. Esto podria deberse a que la conformacion de la forma reducida dificulta la reacción de desplazamiento nucleofílico. Por otra parte, existe la posibilidad de que el DEPC reaccione con un grupo -SH de la proteina y ésta union no puede ser revertida por el nucleófilo.

C- INTERACCION CON MEMBRANAS TILACOIDES.

Las micelas de Triton X-114 posibilitan la caracterización de la diferenrte exposición de dominios hidrofóbicos en la FBPasa. Entre los posibles componentes biológicos -presentes en el cloroplasto- con los que podría interactuar la enzima, se encuentran las membranas tilacoides. La estructura de las mismas es compleja, lo cual conduce a diversos tipos de interacción. Por este motivo las micelas constituyen un modelo de aproximación al estudio del mecanismo de interacción de las enzimas cloroplásticas con estructuras supramoleculares mas complejas; en particular las membranas fotosintéticas.

Surge como objetivo de esta tesis el estudio de la interacción de la FBPasa con las membranas tilacoides. Con el propósito analizar y poder cuantificar esta interacción, se utiliza la enzima marcada con ^{125}I segun se indica en los procedimientos experimentales. Las caracteristicas estructurales de la FBPasa difieren según el procedimiento de marcación (sección III-A). Se ensayan separadamente la ^{125}I-FBPasa$_1$ (inactiva) y la ^{125}I-FBPasa$_4$ (activa), siendo esta última la mas relevante por cuanto permite aproximar los resultados con ella obtenidos a lo que ocurre dentro del cloroplasto.

1- Estudios con ^{125}I-FBPasa$_1$ inactiva (monómero).

i) Análisis de la interacción.

Una primera aproximación experimental al estudio de esta interacción fue mediante la utilización de columnas de filtración por geles para la separación de la enzima libre de la unida. El fundamento del experimento es que, de existir una interacción con las membranas, parte de la enzima eluirá con las mismas en una columna cuyo límite de exclusión de peso molecular sea superior al de la enzima nativa. Para ésto, se incuba la ^{125}I-FBPasa a pH 7.9 en presencia de membranas tilacoides de espinaca purificadas. Se siembra en una columna de Biogel $A_{0.5m}$ y luego de eluida se analiza la radiactividad de las fracciones. El perfil de elución muestra

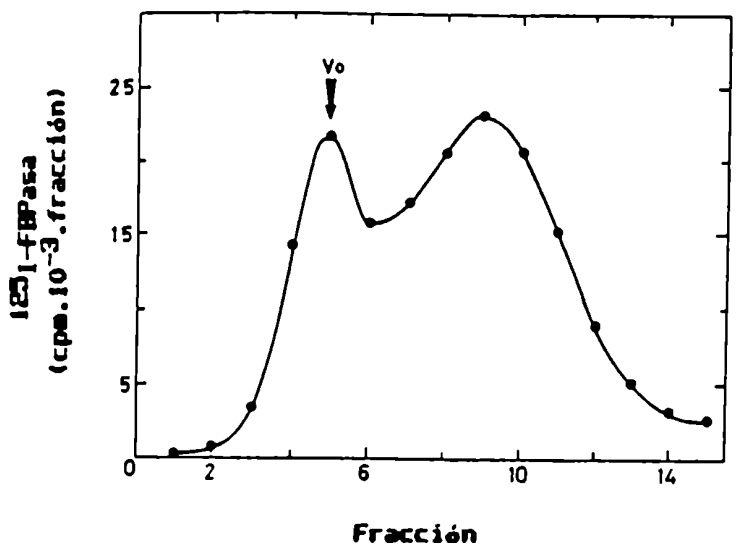


Figura 49. Interaccion de ^{125}I-FBPasa$_I$ con membranas tilacoides. Columna de Biogel $A_{0.5}$. La enzima (10µg) se incubó en 0.3 ml de Iris-HCl pH 7.9 a 30°C y por 2 horas en presencia de membranas tilacoides (1mg de Chl). Se sembraron luego los 0.3 ml en una columna de Biogel $A_{0.5}$ (1 X 30cm) equilibrada en el mismo bufffer. Posteriormente se contó el ^{125}I en las fracciones.

dos picos conteniendo ^{125}I: uno que eluye en el volumen de exclusión (Vo) junto con las membranas tilacoides, y el otro en el volumen de inclusión, correspondiente a la ^{125}I-FBPasa libre (figura 49). Este resultado indica la existencia de una interacción entre la enzima y las membranas. Sin embargo, este procedimiento no resulta conveniente para la cuantificación de dicha interacción.

Otro procedimiento para analizar este fenómeno es separando la radiactividad incorporada a las membranas tilacoides de la ^{125}I-enzima libre, mediante centrifugación. Al incubar a ^{125}I-FBPasa en presencia de cantidades crecientes de membranas tilacoides, se observa que la incorporación aumenta con la [Chl] hasta alcanzar un máximo

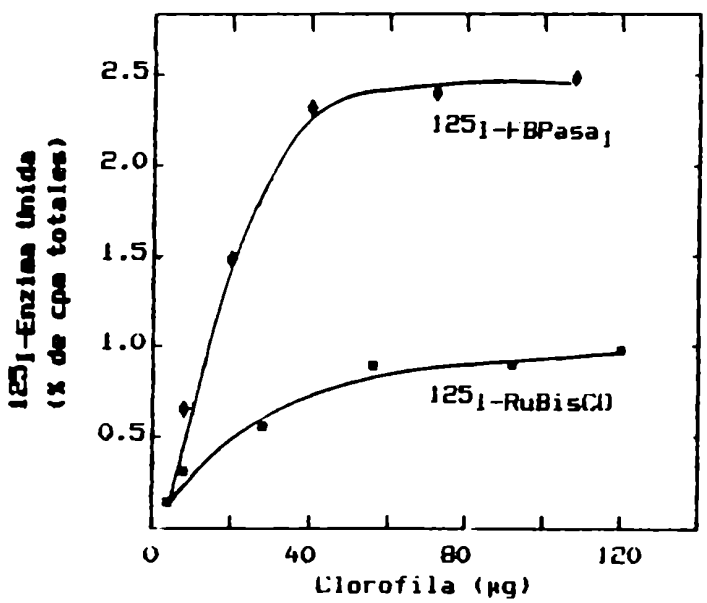


Figura 50. Incorporación de ^{125}I-FBPasa$_I$ e ^{125}I-RuBisCO a membranas tilacoides. FBPasa (5µg) y RuBisCO (40µg) se incubaron en 0.2 ml de Iris-HCl pH 7.9 a 23°C por 30min, con las cantidades de membranas tilacoides indicadas (en µg de Chl). Posteriormente se centrifugó y lavó el precipitado de membranas para luego contar el ^{125}I como se detalla en proc. exp.

(2,7%) en presencia de 40 µg de Chl (figura 50). Como control, se analiza la RuBisCO que se encuentra en el estroma pero no es modulada por el sistema Fd-Th; en las mismas condiciones ^{125}I-RuBisCO alcanza una incorporación del 1%.

ii) Temperatura y pH

Sobre la base experimental anterior, se analizan otros parámetros en la unión de ambas enzimas -FBPasa y RuBisCO- a las membranas: la temperatura y el pH. Estos parámetros resultan importantes tanto desde el punto de vista fisicoquímico de la interacción como del fisiológico -actividad enzimática-. En la figura 51a se observa que la temperatura estimula la unión de la FBPasa y la RuBisCO, si bien la respuesta de FBPasa es claramente superior.

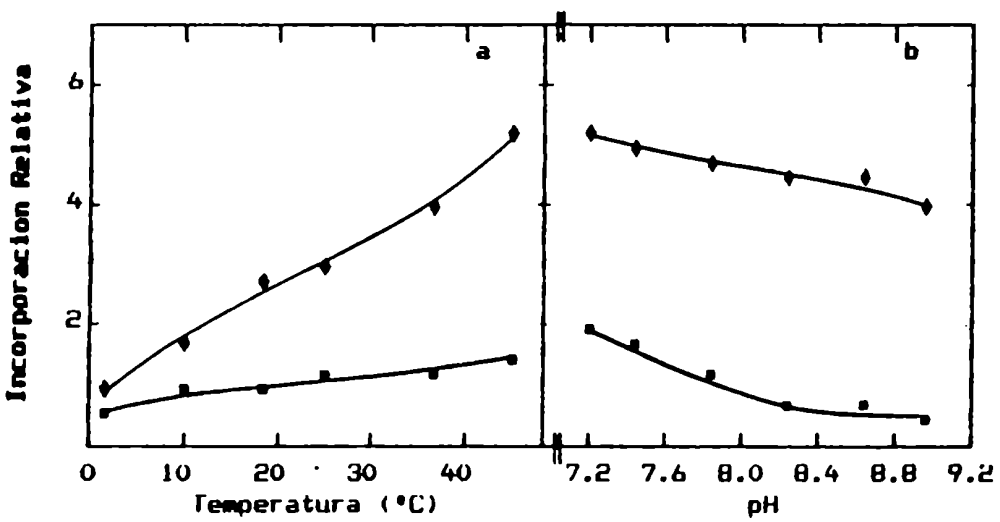


Figura 51. Efecto de la temperatura y el pH en la interacción de ^{125}I-FBPasa$_1$ (♦) e ^{125}I-RuBisCO (▪) con membranas tilacoides. Las ezimas se incubaron en buffer Iris-HCl como indica la leyenda de la figura 50 en presencia de las membranas tilacoides (40µg de Chl) a pH 7.9 (51a) y 23°C (51b)

Cuando se realizan las incubaciones a diferentes pH, en buffer Tris-HCl de 7.2 a 9.0, se determina que hay una disminución de la unión de ambas enzimas con el aumento del pH. En este caso, la ^{125}I-RuBisCO presenta más notable dicha disminución, en especial en la región de 7.2 a 8.0, que corresponde al cambio de pH en la transición oscuridad-luz. (figura 51b).El fundamento de la acción de la temperatura y el pH no puede ser claramente determinado ya que afectan a las membranas, a las proteínas y a la interacción entre las mismas.

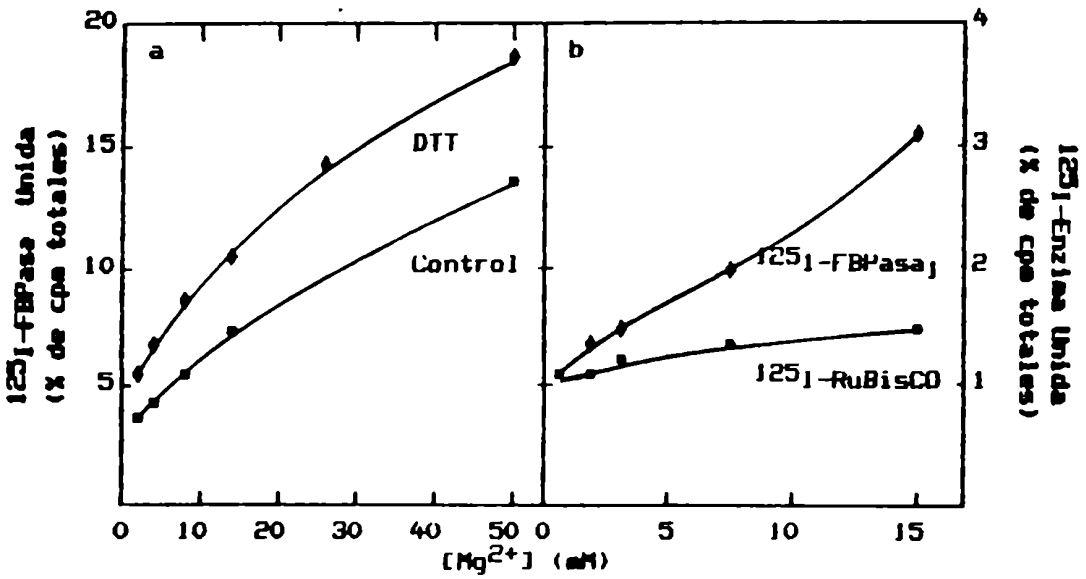


Figura 52. Efecto del Mg^{2+} en la incorporación de ^{125}I-FBPasa$_1$ e^{125}I-RuBisCO a membranas tilacoides. a) ^{125}I-FBPasa$_1$ con Iris-HCl pH 7.9 solamente (control) ó con 5mM DTT. b) Gráfico en relativo. Las incubaciones se realizaron en presencia de membranas tilacoides (40µg Chl) (ver figura 51).

iii) Cationes.

La neutralización de cargas en las membranas y en las proteínas disminuye las regiones polares en ambas

estructuras. El agregado de cationes produce la neutralización de los residuos aniónicos ($-COO^-$). En este sentido, se utilizó el Mg^{2+} por sus implicancias fisiológicas. Luego, se incubó la ^{125}I-FBPasa$_I$ con las membranas en presencia del catión bivalente observándose que la incorporación porcentual al precipitado de membranas aumenta con la concentración de Mg^{2+}. Este efecto resulta levemente incrementado en presencia de DTT (figura 52a).

Un análisis similar con la ^{125}I-RuBisCO muestra que el Mg^{2+} no produce modificación sobre su unión a las membramas (figura 52b). Si bien la incorporación de ^{125}I-FBPasa$_I$ al precipitado de membranas depende del Mg^{2+}, la misma es altamente potenciada a pH bajo como muestra el gráfico comparativo en la figura 53.

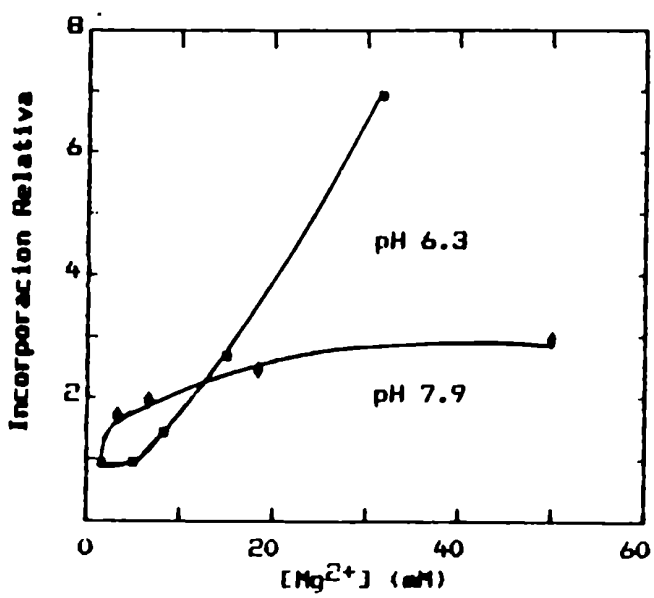


Figura 53. Efecto del Mg^{2+} en la incorporación de ^{125}I-FBPasa$_I$ a membranas tilacoides a pH 6.3 y 7.9. Se procedió como indica la figura 52a utilizando buffer <P_i pH 6.3.

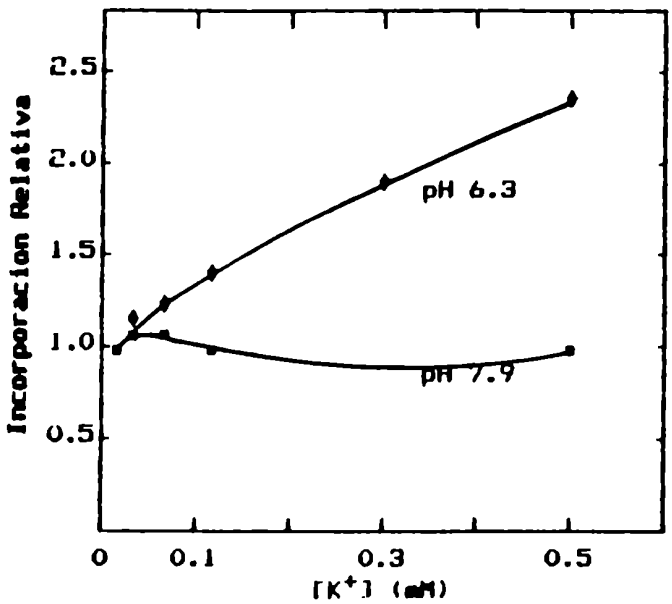


Figura 54. Efecto del K^+ en la incorporación de ^{125}I-FBPasa$_I$ a membranas tilacoides. Ver la leyenda de la figura 53.

Por otra parte, si el catión analizado es K^+, no se producen modificaciones a pH 7.9 y si las hay a pH 6.3 (figura 54). El hecho de que ambos efectos sean potenciados a pH bajo sugiere que los cambios residen en las estructuras de la membrana ó de la enzima (o de ambas), ya que al disminuir el pH los grupos $-COO^-$ también disminuirían. El pH podría constituir, entonces, una forma de bloquear dichos grupos.

iv) Modificaciones químicas.

La neutralización de los grupos $-COO^-$ con protones y otros cationes depende de la concentración de los reactantes; es decir que la propiedad relativa variará con la concentración absoluta. Si se trata a la enzima con reactivos específicos de grupo, se pueden obtener derivados

covalentemente modificados, los cuales son estables a la dilución.

Siguiendo el mismo razonamiento que con las micelas, se buscó determinar el efecto que el bloqueo de los grupos histidilo y $-COO^-$ presenta sobre la interacción de las enzimas con las membranas tilacoides. Con este fin se utilizaron DEPC y RKW, de efectos ya conocidos sobre la actividad de la FBPasa. Al tratar la ^{125}I-FBPasa$_I$ con RKW en concentraciones crecientes, se observa un aumento en su incorporación a las membranas tilacoides, de manera similar a lo que ocurre con las micelas de Triton X-114 (figura 55a). Sin embargo, cuando esta enzima es tratada con DEPC, dicha

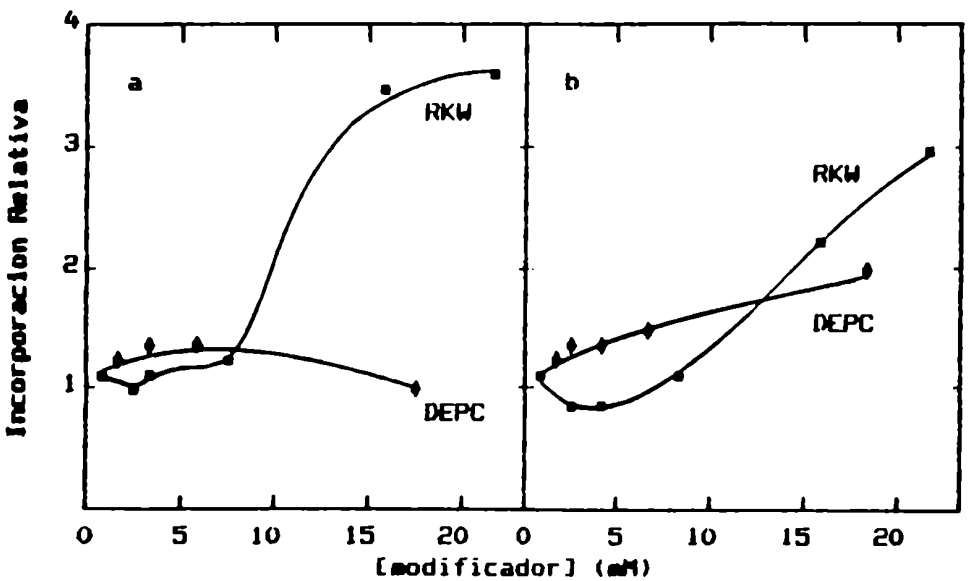


Figura 55. Efecto de las modificaciones quimicas en la incorporación de ^{125}I-FBPasa$_I$ e^{125}I-RuBisCO a membranas tilacoides. Las enzimas (a- FBPasa 5µg y b- RuBisCO 40µg) se incubaron en 0.2 ml de Mops-NaOH pH 8.0 (DEPC) ó Tris-HCl pH 7.9 (RKW) a 23°C con las concentraciones de modificadores indicadas por 20min. Luego, se detuvo la reacción con 10µl de EDTA 0.2M y se determinó la unión a membranas como se explica en las figuras anteriores.

incorporación no se ve modificada.

Se procedió, luego, a la modificación química y al análisis de la interacción de la ^{125}I-RuBisCO, observándose un aumento de incorporación a las membranas por tratamiento con ambos reactivos (figura 55b).

2- Estudios con ^{125}I-FBPasa$_4$ activa (tetrámero).

i) Interacción: requerimientos

En el análisis de la interacción con membranas tilacoides resulta importante estudiar el comportamiento de la ^{125}I-FBPasa$_4$ (activa) debido a la posibilidad de relacionar fenómenos <u>in vivo</u> con <u>in vitro</u> . Al preincubar

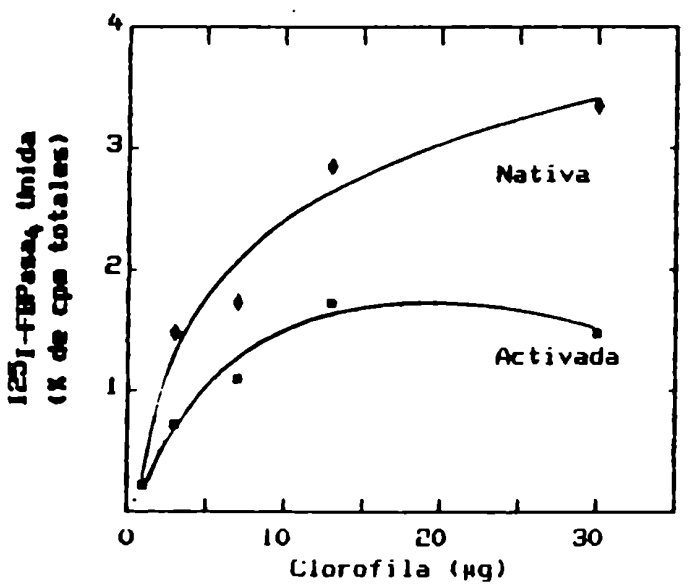


Figura 56. Incorporación de las formas nativa y activada de la ^{125}I-FBPasa$_4$ a membranas tilacoides. Se incubaron 5µg de la enzima a 23°C en 0.2 ml de Tris-HCl solamente (nativa) ó en presencia de la mezcla de activación Ih (activada) con las cantidades de membranas tilacoides indicadas en la figura. Luego se procedió como en la figura 50.

esta forma -sin tratar ó en presencia de DTT, FBP, Ca^{2+} y Th- con cantidades crecientes de membranas tilacoides, se observa incorporación de ^{125}I al precipitado que aumenta hasta llegar a una meseta a 15µg de Chl (figura 56). La enzima nativa -sin tratar- presenta una mayor interacción con respecto a la enzima activada por los moduladores.

Una vez establecida la existencia de interacción entre la forma tetramérica de la FBPasa y las membranas tilacoides, se analiza el efecto de los diferentes moduladores sobre la misma, como se indica en la tabla IX.

Tabla IX. Requerimientos para la interacción de la ^{125}I-FBPasa$_4$ con micelas de Triton X-114

Tratamiento	cpm (%)
Nativa (tetrámero)	2.0
DTT	0.9
FBP	3.6
Ca^{2+}	6.7
Th	3.4
Th,DTT	1.4
FBP,Ca^{2+}	3.8
Completo	1.4

Las concentraciones son las mismas que las utilizadas en la tabla VIII.

La incorporación de la ^{125}I-enzima, luego de ser incubada con DTT, FBP y Ca^{2+}, disminuye con respecto a la enzima nativa. Sin embargo, Ca^{2+} y FBP -activadores en ausencia del proceso de reduccion- pueden potenciar esta interacción.

ii) Efecto de reductores y pH

El efecto del proceso reductivo sobre la unión de la enzima a las membranas es relevante ya que la iluminación de los cloroplastos causa la reducción de varias proteínas tanto del estroma como de las membranas tilacoides (147). Con este fin, se incuba la ^{125}I-FBPasa$_4$ (activa) con las membranas en presencia de concentraciones crecientes de DTT. En la figura 57 se muestra que dicho reductor produce una disminución de la interacción bajo análisis.

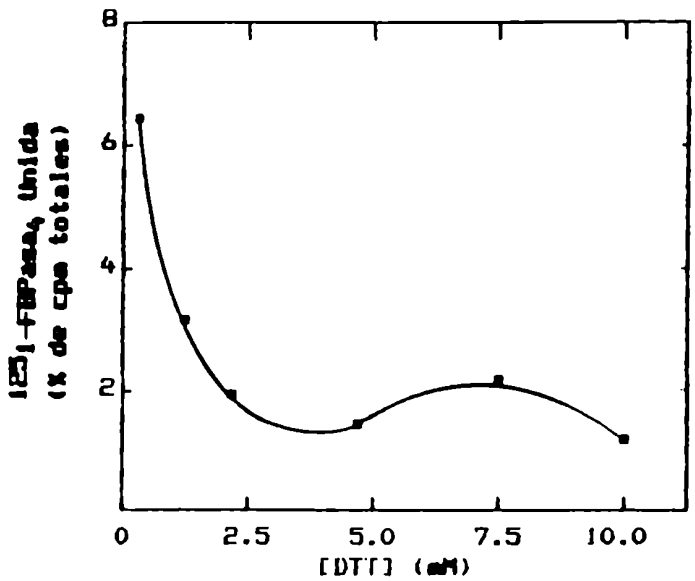


Figura 57. Efecto del DTT en la incorporación de la ^{125}I-FBPasa$_4$ a membranas tilacoides. Se incubó la enzima en presencia de Tris-HCl pH7.9 y las concentraciones indicadas de DTT, y se procedió como en la figura 56.

Otro aspecto importante a analizar, debido a su modificación en la transición oscuridad-luz, es el efecto del pH. Para ésto, se incuba la ^{125}I-FBPasa nativa ó activada via Th en presencia de membranas tilacoides y Tris-HCl a distintos pH segun se indica en el experimento. Como se observa en la figura 58, el aumento de pH no modifica la

interacción de la enzima nativa mientras que disminuye notablemente la de la enzima activada por los moduladores y Th.

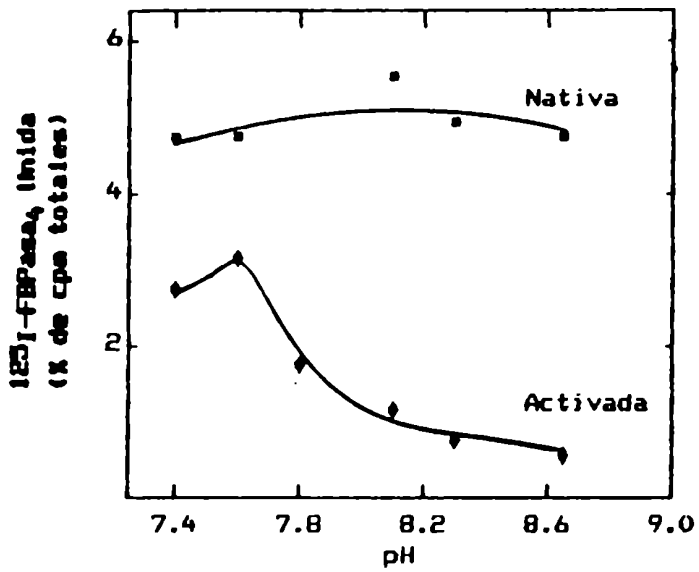


Figura 58. Efecto del pH sobre la incorporación de las formas nativa y activada de la ^{125}I-FBPasa$_4$ a las membranas tilacoides. Se incubaron 5µg de la enzima en 0.2 ml de Tris-HCl a los pH indicados por 30min en presencia de las membranas (20µg de Chl). Luego se procedió como en las demás figuras.

3- Conclusiones.

En la unión de una enzima a otras estructuras biológicas -membranas,proteínas- toman parte interacciones puente de hidrógeno, hidrofóbicas, electrostáticas y fuerzas de van der Waals. Estas interacciones dependerán:

a) de la enzima

b) de la estructura supramolecular

c) del medio en el que ocurre la reacción

A su vez el medio de reacción afectará tanto a la enzima como a la estructura supramolecular.

Estudios con cloroplastos intactos demostraron que hay un aumento de la concentración de K^+ en el estroma luego de la iluminación, si bien la permeabilidad de la envoltura a los cationes es baja (51). Se calcula que en condiciones basales la concentración de K^+ en el estroma es de 20 a 30mM.

La concentración de los iones Mg^{2+} y H^+ en el estroma, está también regulada por la luz. En la oscuridad las concentraciones de Mg^{2+} son bajas (similares a las del K^+) y el pH se encuentra a un valor de 7.0. Al recibir iluminación, la concentración de Mg^{2+} aumenta y el pH pasa a 8.0. (baja $[H^+]$)(14).

En el presente estudio, se analizó la respuesta de la interacción entre las membranas tilacoides y dos enzimas diferentes -FBPasa y RuBisCO- o dos formas de una misma enzima -$FBPasa_1$ y $FBPasa_4$-.

Del estudio comparativo entre $FBPasa_1$ y RuBisCO (inactivas) surgen diferencias en varios de los parámetros analizados. El cuadro siguiente resume los datos obtenidos de la comparación de ambas enzimas.

	Incorporación %	pH aumento	Temperatura aumento	DEPC	RKW	Mg^{2+}
FBPasa	2.7	↓	↑↑	—	↑↑	↑↑
RuBisCO	1.0	↓↓	↑	↑	↑	—

Se observa que existe una respuesta diferente de ambas enzimas: la FBPasa modulada por el sistema Fd-Th y la RuBisCO independiente de dicho sistema. La FBPasa muestra, en general una mayor incorporacion, asi como una mayor respuesta a pH, temperatura, Mg^{2+} y modificaciones quimicas. Este hecho, junto con la masiva presencia de la RuBisCO en el cloroplasto, sugiere una mayor flexibilidad de la FBPasa en su interacción con las membranas.

De la comparación de las membranas con las micelas, se observa que el pH causa una disminución en la unión a los tilacoides, siendo el comportamiento de la FBPasa opuesto al de la interacción con las micelas ya que en éste se produce una estimulación. El Mg^{2+} tiene un efecto positivo sobre la unión de las membranas, potenciado aun más por el pH; dicha potenciación también ocurre con el K^+. Sin embargo, el DTT no ejerce efecto alguno sobre esta unión, contrariamente a lo que ocurre en las micelas, donde los reductores aumentan la interacción hidrofóbica. Por otra parte, las modificaciones químicas producen un efecto estimulatorio más acentuado en el caso de las micelas. Si bien estos resultados se obtienen con ^{125}I-enzimas inactivas, muestran diferencias la interacción con las membranas tilacoides con respecto de las micelas. Estas diferencias no pueden ser extrapoladas a fenómenos fisiológicos si no se utilizan ^{125}I-enzimas activas.

Cuando se analiza la forma ^{125}I-FBPasa$_1$ frente a la ^{125}I-FBPasa$_4$ se comprueba que la respuestas de la interacción

de ambas con membranas tilacoides son similares. La incorporación de la ^{125}I-$FBPasa_4$ muestra diferencias entre sus formas nativa y activada, presentando la primera mayor incorporación. Al mismo tiempo, los requerimientos son opuestos a los de la incorporación a las micelas. La disminución de la interacción con las membranas por reducción con DTT, está aparentemente ligada al hecho de que en presencia de luz, tanto las proteinas del estroma como de las membranas tilacoides, sufren reducción de las uniones -S-S- a -SH. Por otra parte, el aumento del pH disminuye considerablemente la interacción de la enzima activada por moduladores y Th con dicha membrana, mientras que permanece invariable la unión de la $FBPasa_4$ nativa (sin tratar). En general, los tratamientos que favorecen la interacción con una estructura (ej, micelas), no lo hacen con la otra (ej, membranas) y viceversa.

Estos resultados sugieren que fenómenos asociados a la transición oscuridad-luz en el cloroplasto (aumento de pH, reducción de las proteinas, cambios en las concentraciones de metabolitos e iones) son capaces de producir diferencias marcadas en el comportamiento de las formas nativa y activada de la FBPasa en cuanto a su interacción con membranas tilacoides y con micelas de detergentes no-iónicos.

Es de notar, que, a diferencia de lo que se pensaba a priori, la interacción con las membranas difiere sustancialmente de la interacción hidrofóbica pura que tiene lugar con las micelas del detergente Triton X-114. Sería

necesario, pues, determinar la importancia de otros mecanismos en la unión de la FBPasa a dichas membranas.

IV- DISMINUCION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA FBPasa EN PRESENCIA DE MEMBRANAS TILACOIDES

Las membranas tilacoides están encargadas de la captación de la energía luminica, su transducción a energía eléctrica y finalmente la reducción del aceptor de electrones: la ferredoxina -proteína asociada a la membrana y presente en el estroma cloroplastico-. En presencia de los componentes del sistema Fd-Th y luz, participan en la activación de las enzimas cloroplásticas según se detalló en la introducción. Esta acción se detiene por la ausencia de energía (luz) necesaria para excitar el sistema de transporte de electrones (ver introducción). Si bien los procesos de desactivación de las enzimas cloroplásticas han sido poco estudiados, experimentos in vitro mostraron que las mismas pueden ser desactivadas por: a) oxidantes solubles (113,138,161,162), b) Th oxidada (91) y c) componentes presentes en las membranas tilacoides (165). Este último caso particular lo constituye la MDH, cuya inactivación en presencia de membranas mantenidas en la oscuridad es extremadamente rápida ($t_{0.5}$ < 2 min). En los estudios descriptos en la sección anterior se analizó la interacción FBPasa-membranas pero se desconoce el efecto de dichas membranas sobre la actividad de la enzima. Por ello, se plantea en esta sección el análisis del efecto que dichas membranas presentarían sobre la activación de la FBPasa.

A- INHIBICION DE LA ACTIVACION

1- Efecto de las membranas sobre la activación y la catálisis de la FBPasa

En experimentos iniciales se encontró que las membranas poseían un débil efecto activador si se preincubaba a la FBPasa con DTT, FBP y Ca^{2+} -sin Th-. Si esas membranas son dializadas exhaustivamente para eliminar metabolitos e iones, su efecto activador es reemplazado por un efecto inhibitorio en presencia de Th. Esto sugiere que el efecto activador puede deberse al Ca^{2+} unido a las membranas, que es eliminado por la diálisis. Sin embargo, al incubar la enzima con la

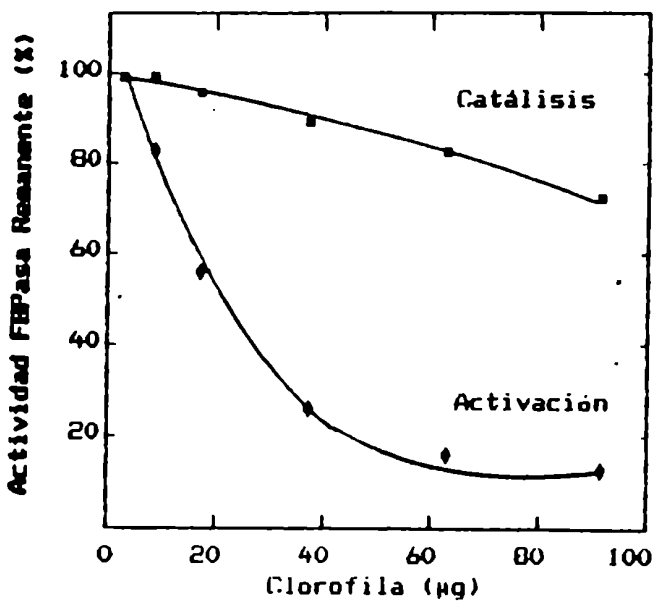


Figura 59. Efecto de las membranas tilacoides sobre la activación y la catálisis de la FBPasa. La enzima (5µg) se incubó en 0.2 ml de Tris-HCl pH 7.9 a 23°C por 30min con la mezcla de activación Th y las membranas tilacoides (activación) ó bien las mismas fueron agregadas posteriormente (catálisis). La actividad se determinó como se indica en proc. exp.. Actividad control: 10 µmol Pi.min^{-1}.mg prot^{-1}.

mezcla completa de activación (DTT, FBP, Ca^{2+} y Th) en presencia de las membranas dializadas, ocurre nuevamente la inhibición de la activación. Este efecto sólo afecta el proceso de activación ya que las membranas no afectan el proceso catalítico (figura 59).

Como se explicó en la introducción la actividad de la FBPasa puede ser determinada en una sola etapa en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg^{2+}. Resulta necesario analizar la inefectividad de las membranas en la inhibición de la catálisis en estas condiciones.

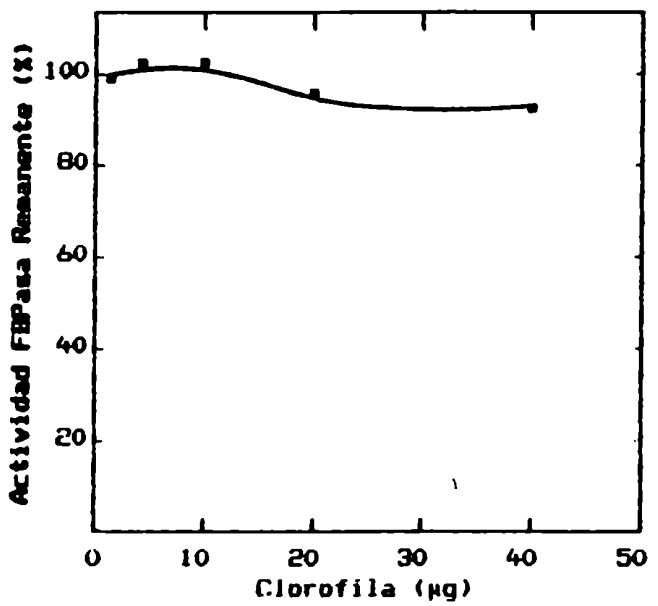


Figura 60. Efecto de las membranas tilacoides sobre la actividad de la FBPasa medida a altas concentraciones de FBP y Mg^{2+}. Se incubaron 5µg de la enzima en 0.2 ml de Iris-HCl pH 7.9 sin ningún agregado y las membranas tilacoides en las cantidades indicadas. Luego de 30min a 23°C, se procedió determinando la catálisis a altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} como se detalla en proc. exp.. Actividad control: 10 µmol Pi.min $^{-1}$.mg prot^{-1}.

Se procede, entonces, preincubando a la enzima solamente en presencia de membranas (por 30 min) y luego se determina la actividad a altas [FBP] y [Mg^{2+}] (figura 60).

Como se describió anteriormente, existen varias vías alternativas de activación de la FBPasa: tiorredoxina, solventes orgánicos, aniones caotrópicos y alta presión hidrostática, todas actuando en conjunto con DTT, FBP y Ca^{2+}. Para determinar si la inhibición de la activación depende del mecanismo utiilizado, se incuba la FBPasa con las membranas y los moduladores no fisiológicos -2-propanol ó tricloroacetato-. Se observa que la disminución de la actividad es menor que la observada en presencia de Th

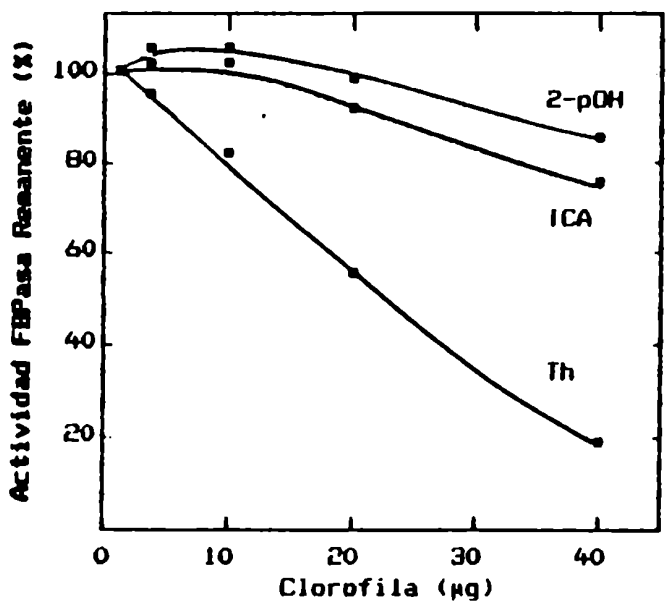


Figura 61. Efecto de las membranas tilacoides sobre los diferentes mecanismos de activación de la FBPasa. La enzima (5µg) se incubó en presencia de las respectivas mezclas de activación (0.2 ml) detalladas en proc. exp. y en presencia de las cantidades de membranas indicadas. Luego se determinó la actividad como muestra la figura 59. Actividad control: 10 µmol $Pi.min^{-1}.mg\ prot^{-1}$.

(figura 61). Si al incubar con 2-propanol y membranas, se omite el agregado de DTT -la activación ocurre en forma lenta con la sola presencia de FBP y Ca^{2+}-, se observa una importante disminución mostrando que la falta de inhibición no se debe a la alteración de las membranas por el 2-propanol (figura 62).

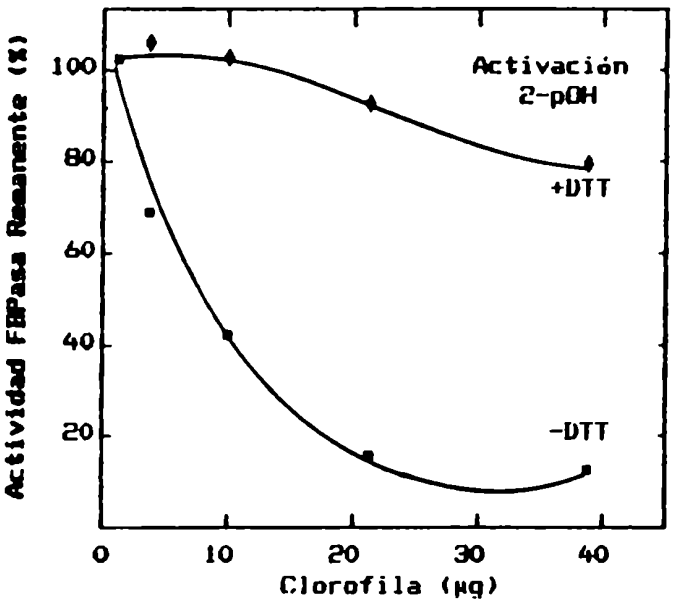


Figura 62. Inhibición de la activación -mediada por 2-propanol, FBP y Ca^{2+}- de la FBPasa por membranas tilacoides en presencia ó ausencia de DTT. Al igual que la figura 61, se incubó la enzima con la mezcla de activación 2-propanol (Actividad control: 10 µmol $Pi.min^{-1}.mg\ prot^{-1}$), ó se omitió el agregado de 2mM DTT (Actividad control: 2 µmol $Pi.min^{-1}.mg\ prot^{-1}$).

Se observa que en ausencia de DTT, la capacidad de inhibición de las membranas permanecería inalterada.

Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio de las membranas difiere según el mecanismo de activación. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que los diferentes

moduladores conducen a formas conformacionalmente distintas, según se determinó por modificaciones químicas (sección I).

2- Cinética de la inactivación.

Cuando se incuba a la FBPasa con membranas durante la

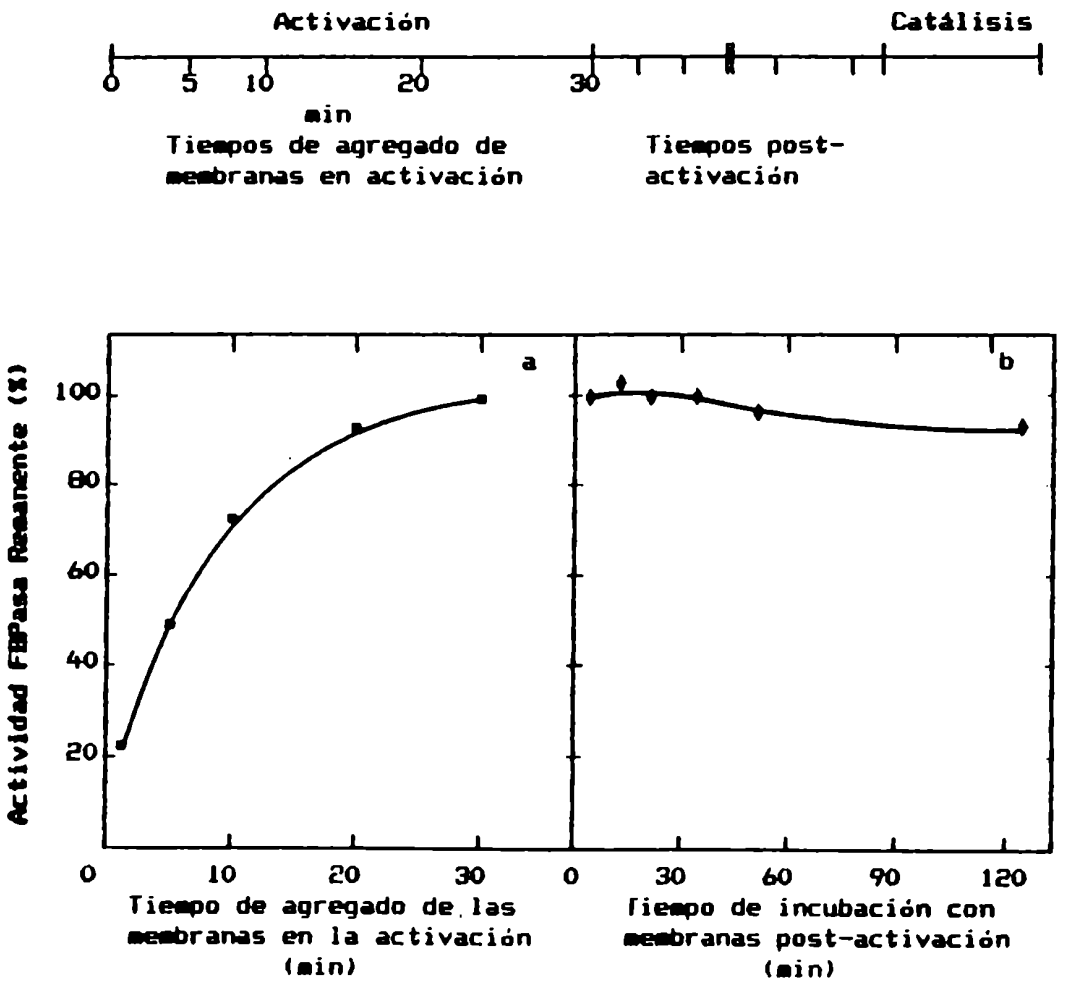


Figura 63. Efecto de las membranas tilacoides en función del tiempo de activación y post-activación de la FBPasa. a) Se incubó según la figura 59 y las membranas (40µg Chl) fueron agregadas a los tiempos indicados. b) Las membranas fueron agregadas luego de la activación 7h y se incubó según indica los tiempos de la figura. Actividad control: 10 µmol Pi.min^{-1}.mg prot^{-1}.

activación, se observa que la inhibición es mayor cuanto mayor es el tiempo en que las membranas permanecen en contacto con la enzima (figura 63a). Por el contrario, si las membranas son agregadas luego de la activación, la inhibición no tiene lugar dentro de las primeras 2 horas (figura 63b).

Estos resultados indican que las membranas **previenen** la activación in vitro pero no **revierten** dicho proceso una vez ocurrido (desactivación).

B- EFECTO SOBRE LAS CONSTANTES CINETICAS DEL PROCESO DE ACTIVACION ($A_{0.5}$).

1- $A_{0.5}$ para la FBP.

La FBP posee un efecto activador sobre la FBPasa, en la sola presencia de DTT y Ca^{2+} (sin Th). La curva que describe la modificación de la actividad específica por la variación de concentración de FBP posee forma sigmoidea. En presencia de membranas tilacoides, en cantidades inhibitorias, no se observa desplazamiento de dicha curva; es decir, no se modifica el $A_{0.5}$ para FBP (2.4 mM) en ausencia de Th (figura 64a).

La Th produce una disminucion del $A_{0.5}$ para FBP (0.8mM). Cuando se ensaya el efecto de las membranas con la mezcla de activación incluyendo a la Th, se observa que las mismas desplazan el $A_{0.5}$ para FBP en presencia de Th hacia valores mayores (de 0.8 a 2.5mM). Este resultado indica que se

requiere la presencia de Th para que ocurra la disminución de la actividad específica de la FBPasa. De esta manera las membranas tilacoides inhiben unicamente la activación por Th (figura 64b).

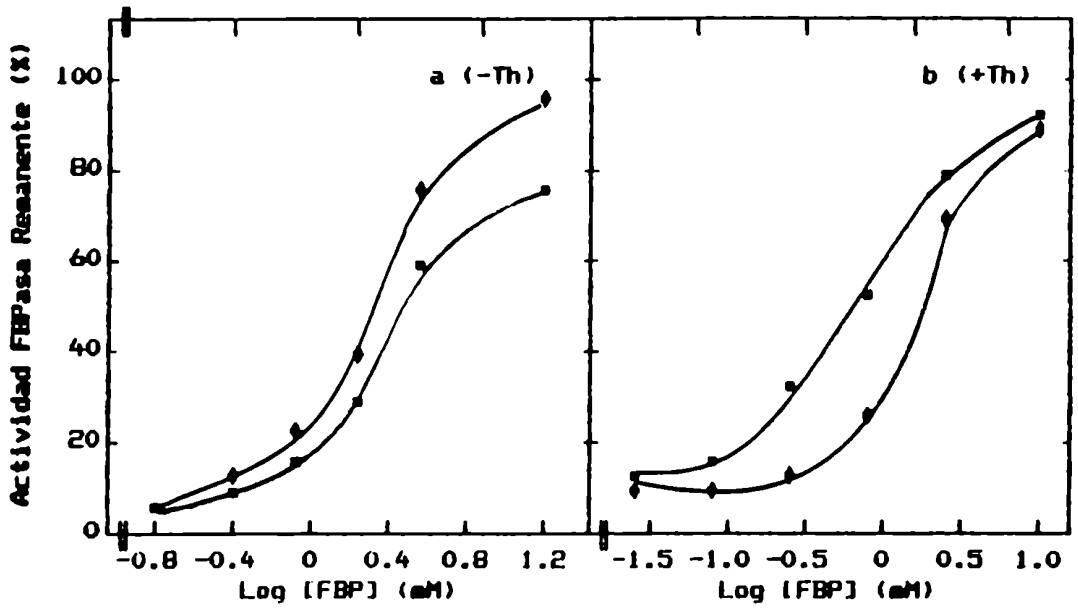


Figura 64. Efecto de las membranas tilacoides sobre la curva de concentración de FBP para la activación de la FBPasa, en presencia ó en ausencia de tiorredoxina. Se procedió como detalla la figura 59, variando las concentraciones de FBP a) con ó b) sin Th, agregando (♦) ó sin agregar (■) membranas tilacoides (40µg Chl). Actividad control: 13 µmol Pi.min^{-1}.mg prot^{-1}.

2- $A_{0.5}$ para Ca^{2+}.

La Th y los perturbantes no fisiológicos (cosolventes, aniones caotrópicos y presión) producen una disminucion del $A_{0.5}$ para el FBP, asi como de las constatnes cinéticas de otras enzimas (ver introducción). No obstante, ninguno de estos agentes es capaz de modificar las curvas de Ca^{2+} en un sentido potenciador de la activacion. Si se incuba la FBPasa

con FBP, DTT, Th y concentraciones crecientes de Ca^{2+}, se obtiene un incremento de la actividad en forma sigmoidea ($A_{0.5}$ 60μM); en presencia de membranas tilacoides esta curva es desplazada a zonas de mayor concentración del catión bivalente ($A_{0.5}$ 180μM), implicando disminución de la actividad especifica (figura 65). De esta manera, las membranas tilacoides resultan el primer mecanismo capaz de desplazar la curva de Ca^{2+} para la activación

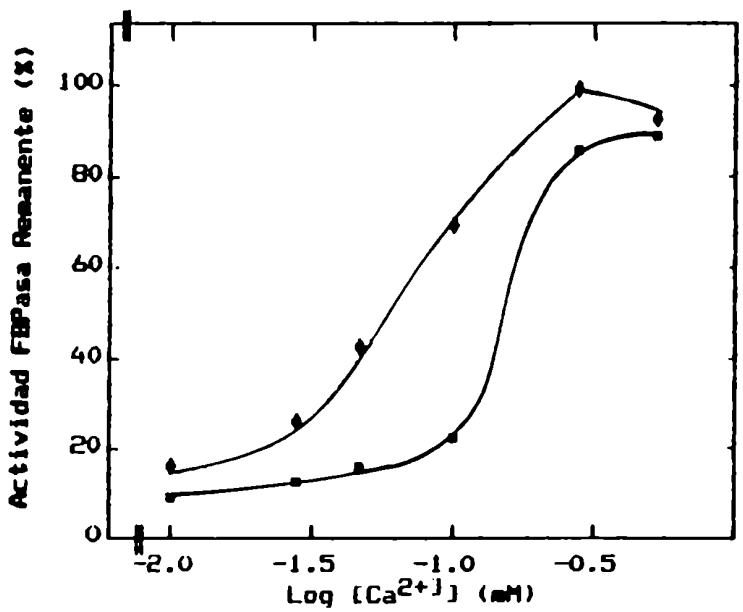


Figura 65. Efecto de las membranas tilacoides sobre la curva de concentración de Ca^{2+} para la activación de la FBPasa. Se trató del mismo modo que la figura 64b pero variando las concentraciones de Ca^{2+} (♦, sin membranas; ▪, con membranas). Actividad control: 13 μmol Pi.min^{-1}.mg $prot^{-1}$.

3- DTT y Th.

Actuando en forma concertada con los restantes moduladores de la activación, la Th y el DTT tienen un efecto

estimulatorio sobre dicho proceso. Cuando se agregan las membranas en la incubación, se obtiene un desplazamiento de ambas curvas, DTT y Th (figuras 66a y b). El $A_{0.5}$ para Th pasa de 0.2 a 6.5µg mientras que para el DTT, la inhibición es demasiado pronunciada como para poder determinar el valor de $A_{0.5}$.

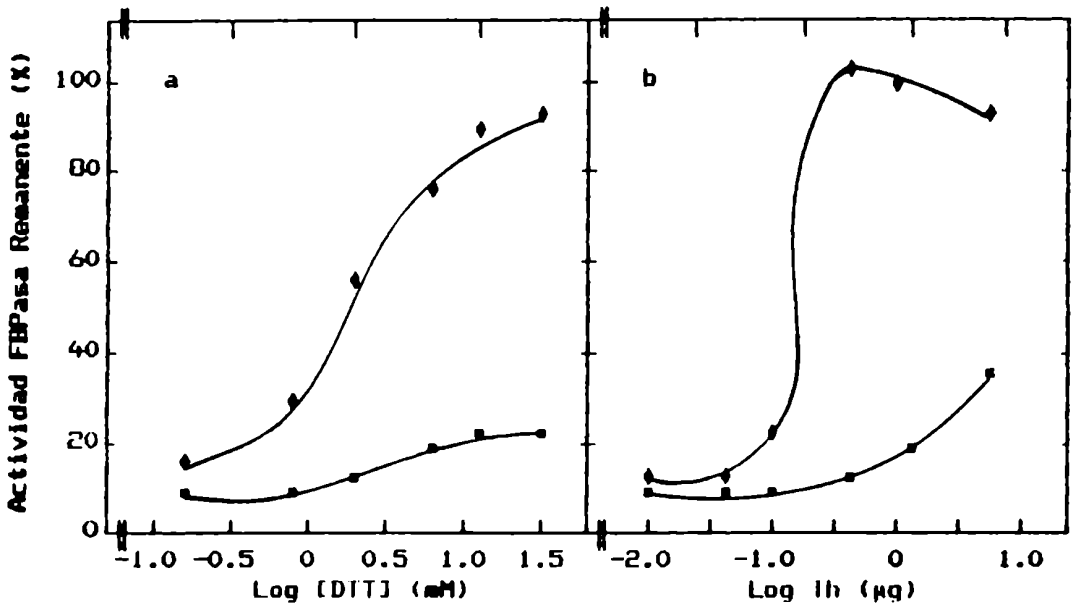


Figura 66. Efecto de las membranas tilacoides sobre las curvas de concentración de DTT y tiorredoxina para la activación de la FBPasa. Se procedió igual que la figura 65, variando las concentraciones de a) DTT y b) Th (♦, sin membranas; ▪, con membranas). Actividad control: 10 µmol Pi.min^{-1}.mg prot^{-1}.

C - REVERSION DEL EFECTO INHIBITORIO.

Una vez que la enzima está activada, las membranas no producen una disminución de la actividad (figura 63b). Surge, luego, la pregunta de si una vez inhibida la enzima, ésta puede ser reactivada por el agregado de moduladores. Para

responder esto, se incuba a la FBPasa con los moduladores de la activacion. (DTT, FBP, Ca^{2+} y Th) en presencia de las membranas tilacoides. Luego de 30 min, se agrega a la solución exceso de FBP, Ca^{2+} o DTT en forma separada. Como se observa en la figura 67, en presencia de membranas el Ca^{2+} revierte parcialmente la inhibición, mientras que el FBP lo hace en mayor medida. El DTT no produce tal efecto, permaneciendo con valores similares al control.

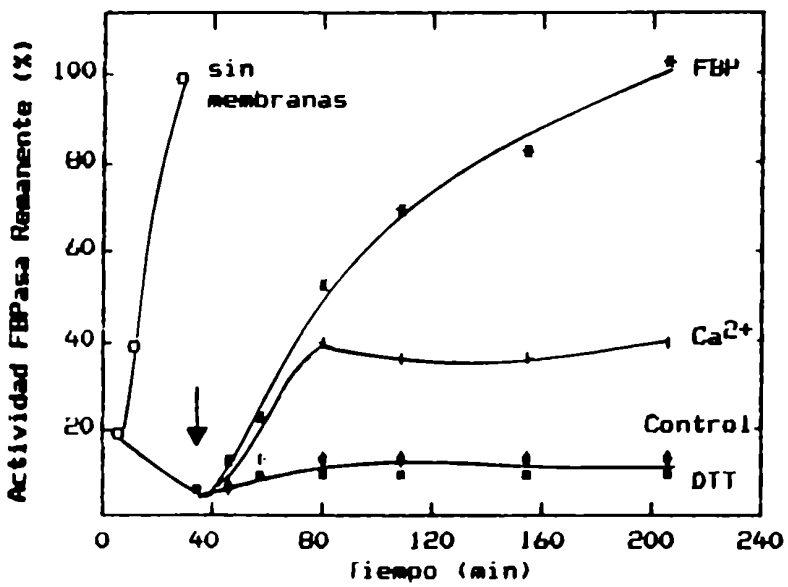


Figura 67. Reversion del efecto inhibitorio de las membranas tilacoides por agregado de moduladores. Se incubo la enzima con la mezcla de activacion Th con las membranas (40µg Chl). A los 30min se agrego (en mM final): FBP 3, DTT 30, $CaCl_2$ 0.3 y control (solo buffer), y se tomaron alicuotas a los tiempos indicados. Actividad control: 10 µmol Pi.min^{-1}.mg prot^{-1}

Otra forma de realizar el analisis de la reversion, consiste en separar las membranas por centrifugación y analizar la actividad FBPasa remanente en el sobrenadante. Al

proceder de esta manera se observa que, sin ningún agregado posterior a la separación de las membranas, la actividad en el sobrenadante permanece baja (figura 68). Al agregar FBP se obtiene una recuperación de la actividad, igual que cuando las membranas están presentes. En cambio el Ca^{2+} en este caso revierte en forma completa, a diferencia de la recuperación parcial en presencia de las membranas (figura 67).

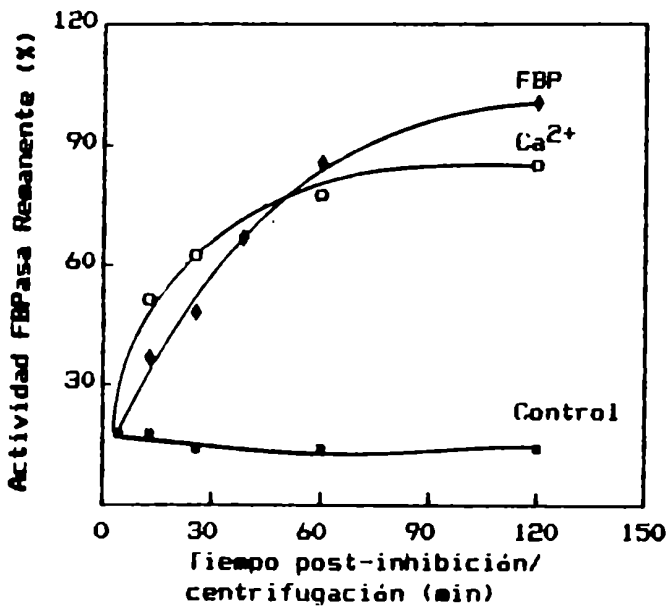


Figura 68. Reversión del efecto inhibitorio de las membranas tilacoides por agregado de moduladores luego de centrifugación. Se procedió como en la figura 67 as diferencia de que las membranas fueron separadas por centrifugación luego de los 30min de incubación. Actividad control: 10 µmol Pi.min^{-1}.mg $prot^{-1}$

D- INHIBICION DE LA ACTIVACION DE FBPasa POR ESFERAS DE VIDRIO POROSO SILICONIZADO (SPG).

Las esferas de vidrio poroso controlado (CPG) constituyen estructuras con gran capacidad de adsorcion de

partículas virales ó macromoléculas. Esto se debe a su alta relación superficie/volumen. Para aumentar las propiedades hidrofóbicas de las esferas, se procedió a la adsorción de aceite de siliconas sobre las mismas, obteniéndose suspensiones acuosas de las esferas siliconizadas (SPG)(107). En experimentos preliminares se observó que la FBPasa interacciona con SPG en mayor medida que con CPG. Se recurrió a estas estructuras para determinar si la interacción con la FBPasa inactiva impedía su posterior activación como ocurría en el caso de las membranas tilacoides. Para analizar el efecto de las SPG, se incuba a la enzima con DTT, FBP, Ca2+ y Th, y cantidades crecientes de dichas partículas.

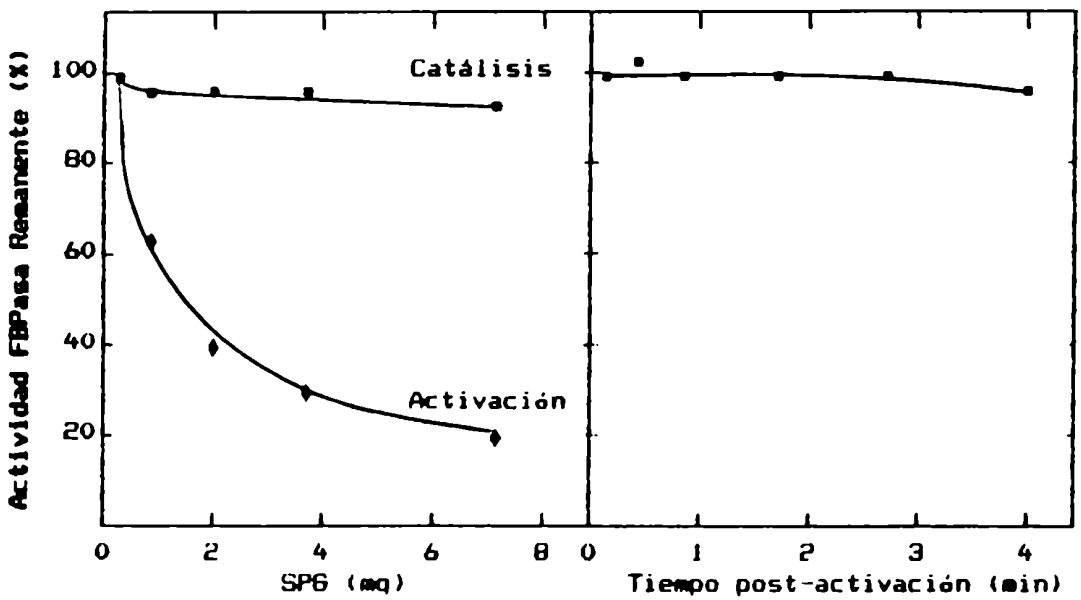


Figura 69. Efecto de las esferas de vidrio siliconizado sobre la activación y catálisis de la FBPasa. a) Se incubó la FBPasa (5µg) con la mezcla de activació Th y las SPG en las cantidades que se indica en la figura, ó se agregaron luego de la activación. En b) se activó la enzima, se agregó las SPG y se incubó por tiempos variables en los que se tomaron alícuotas y se determinó la actividad remanente. Actividad control: 10 µmol $Pi.min^{-1}.mg\ prot^{-1}$

Como se observa en la figura 69 (a y b), si las SPG son agregadas durante la activación se produce un efecto inhibitorio pronunciado, mientras que no hay disminución si las mismas son agregadas durante el proceso catalítico, luego de haber activado a la enzima. Aunque no se muestra, las CPG (sin siliconizar) producen un efecto inhibitorio similar.

Con el fin de averiguar si las SPG pueden inhibir a la FBPasa una vez que la misma ha sido activada, se agregan las esferas luego de la activación. Se incuba por tiempos variables y posteriormente se determina la actividad enzimática remanente. En la figura 69b se observa que dicha actividad permanece invariable durante 4 horas.

Estos resultados sugieren que la union de la FBPasa inactiva (nativa) a una superficie -SPG, membranas-, impide su posterior activación por moduladores. Teniendo en cuenta que las SPG han sido dializadas exhaustivamente contra agua bidestilada, se descarta que el efecto inhibitorio se deba a algun contaminante. Por otra parte, una vez que la enzima ha sido activada, las SPG no son capaces de inhibir dicho proceso.

E- CONCLUSIONES

A diferencia de lo que ocurre bajo iluminación y con el sistema Fd-Th completo, las membranas disminuyen la actividad especifica de la FBPasa. Este hecho ocurre durante la

activación, no teniendo efecto una vez que la enzima ya fue activada. De la misma manera, las membranas no tienen efecto sobre la catálisis en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg^{2+}, a pesar de que la enzima inactiva se preincuba por 30 min con dichas membranas. La inhibición es marcada en presencia de Th en tanto que resulta leve en el caso de la activacion por moduladores no fisiológicos. Esto apoyaría la idea de que distintas vías de activacion pueden dar lugar a diferentes conformaciones de la enzima (ver secc 1-modificaciones químicas). Sin embargo, no se descarta que los perturbantes químicos puedan modificar las propiedades de las membranas, con lo que disminuiría su capacidad inhibitoria. Por otra parte la Th interaccionaría específicamente con las mismas o con la enzima (o ambas).

Es de notar que la presencia de las membranas produzca un aumento de las constantes cinéticas para todos los moduladores: DTT, FBP, Ca^{2+} y Th. Esto sugiere que la inhibición no altera la accion de solo modulador sino la de todos ellos. Este efecto generalizado podría deberse a que la union de la enzima a las membranas impide cualquier tipo de modificación por parte de los moduladores, imposibilitando el proceso de activacion. Esta observacion está en línea con el hecho de que las esferas de vidrio siliconizadas (SPG) también presentan un efecto inhibitorio sobre la activacion, sin poseer efecto alguno una vez que la enzima fue activada. Debido a que las SPG están libres de contaminacion, y que poseen una muy alta relacion superficie/volumen, la

inhibición se debería a la interacción de la enzima con estas esferas. Por otra parte, el efecto de las membranas constituye el primer mecanismo reportado capaz de modificar la curva de Ca^{2+}, reforzando la idea de este catión como funcional en la regulación enzimática por la luz.

En presencia de las membranas, solo el FBP en exceso es capaz de revertir totalmente la inhibición. Esto puede deberse al efecto del FBP sobre la catálisis, del mismo modo que la reacción con altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} no es afectada por las membranas. En presencia de éstas, el Ca^{2+} revierte solo parcialmente, mientras que luego de centrifugar (para separar las membranas), tanto el FBP como el Ca^{2+} permiten recuperar totalmente la actividad de la enzima solubilizada. Esta recuperación no surge de la simple incubación, ya que en ausencia de FBP ó Ca^{2+} la enzima permanece inactiva.

En estudios efectuados en otros laboratorios se observó que concentraciones elevadas de FBP, además de estimular la actividad específica de la enzima, prevenían la desactivación en la oscuridad (136). En dicho trabajo se propuso que la enzima formaría un complejo estable a pH 8.0 con el FBP en concentraciones fisiológicas. La desactivación en la oscuridad se debería al O_2 luego de una disminución en el pH (de 8 a 7). Sería necesario, entonces, determinar si el efecto inhibidor de la activación descripto en el presente capítulo estaría relacionado con el efecto desactivador observado anteriormente.

DISCUSION GENERAL

Los experientos realizados en el presente trabajo de tesis estuvieron dirigidos hacia la comprensión de la relación estructura-funcion en las enzimas cloroplásticas que son moduladas por la luz. En particular, se estudió en detalle a la FBPasa, modelo de enzima modulada por el sistema Fd-Th y que cataliza una reacción clave en la fijación de CO_2 (CRPP). Para ello no se analizó el concepto clásico de enzima como ente exclusivamente funcional (catalítico) sino que se apuntó al análisis de la estructura como hecho regulatorio. Este trabajo se basa, además en el comportamiento de las enzimas histeréticas descripto en la introducción. Estas presentan dos reacciones como componentes de la actividad enzimática -activacion y catálisis-. Este fenómeno resulta crucial ya que permite analizar dos procesos totalmente diferentes: a) cambios en la estructura de la enzima y b) cambios en el complejo enzima sustrato. Es posible la separacion de las dos reacciones, y, por estar relacionado al fenómeno de activacion luminica, los estudios fueron concentrados sobre el proceso de activacion.

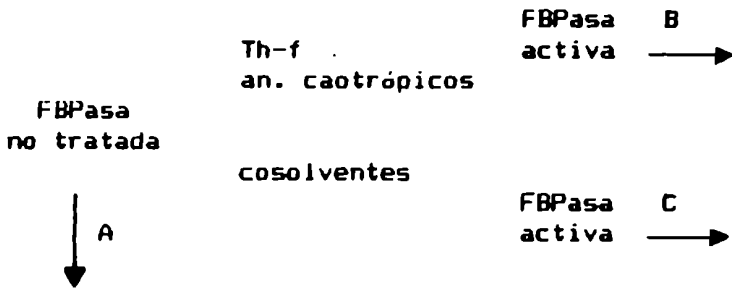
Recientemente se ha descripto la interacción de enzimas multimericas entre si y con membranas, con significacion de tipo regulatorio; a este fenómeno se le dió el nombre de **regulación topodinámica** (81). En contraste con otros niveles de regulacion (transcripcion, traducción, efectos alostéricos, mensajeros secundarios y modificacion quimica de enzimas), la regulacion topodinámica surge exclusivamente en

el cambio de distribucion espacial de las proteinas en los compartimientos celulares. Este tipo de regulación está caracterizado por reacciones rápidas y por flexibilidad de las estructuras involucradas (enzimas, membranas) y está basada en la difusion térmica de las moleculas. De la misma manera, nuevos enfoques con énfasis en lo estructural han surgido también con respecto a procesos metabolicos fundamentales como la glucólisis; en los mismos se propone asociación-disociacion de enzimas y complejos multienzimáticos como forma de regulación (114). Otros estudios otorgan importancia regulatoria a la interaccion de enzimas con membranas (154).

Para analizar los cambios estructurales en la FBPasa se opto por modificar in vitro el medio de incubación mediante moduladores, Th, aniones caotropicos, cosolventes y presion, los que causan la activacion de la enzima. Los cambios conformacionales resultantes fueron analizados utilizando reactivos especificos de grupo.

A partir de estos estudios se determinó que la FBPasa sufre un cambio conformacional -detectado por espectroscopia diferencial- durante su activación. La forma activa, presenta diferencias -con respecto a la nativa- en los grupos modificados titulables por espectrofotometria. Desde el punto de vista cinetico se analizaron diferencias en el grado de inhibición tanto por RKW como por DEPC. Los grupos analizados fueron los histidilos -ya descriptos como esenciales en otras FBPasas (98)- y los carboxilos. Los grupos esenciales para la

actividad son afectados en la forma nativa, en tanto que la presencia de los moduladores los protege ó causa un cambio en la estructura que dificulta su reactividad. Estos grupos pueden ser protegidos si se activa la enzima por cualquiera de las tres vias alternativas: Th, cosolventes ó aniones *caotrópicos*. La excepcion la constituye el DEPC, cuya inactivación no puede ser prevenida cuando la activacion es mediada por cosolventes.



Reactivo	Efecto sobre etapas		
	A	B	C
RKW	inactivación	inactivación parcial	inactivación parcial
DEPC	inactivación	inactivación parcial	inactivación

La reactividad diferencial de la FBPasa indica que las diferentes formas activadas poseen distintas conformaciones que mantienen su capacidad catalitica. Esta flexibilidad estructural podria constituir un fenomeno asociado a la regulacion; asimismo, seria necesario establecer si esta

caracteristica puede ser comun a otras enzimas del CRPP moduladas por la luz.

Las uniones disulfuro proveen estabilidad a las proteinas globulares a traves de su contribucion al plegado de las cadenas polipeptidicas (156). Se sabe, ademas que las enzimas moduladas por la Th poseen uniones -S-S- sobre las que esta proteina actua reduciendolas a -SH. Recientemente se ha demostrado en la NADP-MDH que el sitio de regulacion por la luz via Fd-Th seria un puente disulfuro ubicado en la region N-terminal (37). Luego, resulta fundamental el estudio de las uniones disulfuro desde el punto de vista cinético-estructural. Trabajos previos en el laboratorio mostraron la relación entre grupos -SH modificados y las distintas vias de activación de la FBPasa (143). En dichos estudios se demostro que la modificacion de los -S-S- está asociada a un cambio conformacional, por lo que la reduccion estaria directamente relacionada a la flexibilidad estructural.

Por otra parte, la modificacion de las interacciones hidrofóbicas intramoleculares juega también un papel fundamental en la activacion de estas enzimas, segun se determino en nuestro laboratorio. Tanto los solventes organicos como los aniones caotropicos son capaces de reemplazar, en su efecto activador, al modulador fisiologico: la Th. La activacion enzimatica con perturbantes de naturaleza quimica llevo al analisis de un perturbante fisico de la estructura proteica: la alta presion hidrostática (APH). La misma modifica la estructura de las proteinas sin

alterar la composicion del medio. En la presente tesis se describe por primera vez, un efecto activador de la APH sobre las enzimas cloroplásticas, siendo las mismas enzimas oligoméricas.

En el caso de la FBPasa, el efecto de la presion se basa en la modificacion del $A_{0.5}$ para FDP, sin variar el $A_{0.5}$ para Ca^{2+}. Esto resulta en una estimulacion concertada de la FBPasa por APH y los efectores, del mismo modo que el observado en presencia de Th y los perturbantes quimicos.

Para la GAPD, la APH estimula su actividad dependiente de NADP en ambos sentidos. Es destacable Que esta actividad es la fisiológicamente regulada por la luz a través del sistema Fd/Th. Sin embargo, a diferencia de la FBPasa, para la acccion de APH no es necesaria la presencia de DTT. En forma similar se observó que el reductor no es necesario para la activacion de esta enzima por las tres diferentes vias: moduladores, aniones caotropicos, cosolventes, APH y por el detergente CTAB (171).

Un hecho relevante en la GAPD, que marca diferencias con las otras formas de activacion, es que la presión ejerce un efecto inhibitorio cuando actua en forma concertada con P_i y ATP. Este efecto es opuesto a lo que acontece con la activacion por Th y perturbantes quimicos. Asimismo, resulta importante el hecho de que en el caso de la GAPD la Th y los perturbantes quimicos difieren de APH. Esto fortalece la idea de que las diferentes formas de activación conducen a distintas conformaciones las cuales comparten la actividad

catalítica mientras que en este caso hay una pérdida de la actividad.

El efecto de APH sobre la FBPasa y la GAPD es irreversible, ya que una vez liberada la presión, las enzimas mantienen su actividad en niveles elevados. De aqui se desprende que no seria un fenomeno de asociación-disociacion reversible, sino un cambio en la conformacion de las proteinas. Los efectos de APH sobre las enzimas oligoméricas descriptos hasta el momento son de tipo reversible: disociación acompañada de inhibicion y luego asociacion conjuntamente con la recuperación de la actividad (117).

La PRK, por otra parte, mantiene su estimulación a las presiones más altas. Como se vio, esta enzima también está modulada por el sistema Fd-Th. En contraposición a las enzimas mencionadas, la RuBisCO, que no es regulada por dicho sistema, es inhibida tanto por la presión como por los aniones caotropicos. Por otra parte, los solventes orgánicos

Tabla X . Efecto de la tiorredoxina y moduladores no-fisiológicos sobre enzimas cloroplásticas.

Enzima	Tiorredoxina	Solventes orgánicos	Aniones caotrópicos	Alta presión
NADP-GAPD	Activación	Activación	Activación	Activación
FBPasa	Activación	Activación	Activación	Activación
NADP-MDH	Activación	Activación	Activación	No ensayada
PRK	Activación	Activación	No ensayada	Activación
RuBisCO	Sin efecto	Sin efecto	Inhibición	Inhibición

no producen efecto alguno y la precipitan al aumentarse su concentración.

En la tabla X se resumen los resultados obtenidos en éste y anteriores trabajos referidos al efecto de los moduladores sobre las diferentes enzimas cloroplásticas.

Este conjunto de evidencias sugiere que las enzimas moduladas por el sistema Fd/Th responden en forma similar a determinados perturbantes; esta respuesta es diferente en el caso de la RuBisCO. De esta manera, las enzimas pueden ser modificadas -con aumento de su actividad catalítica- por moduladores no-fisiológicos que producen perturbaciones en la estructura proteica; en el caso de la RuBisCO, estos moduladores conducen a su inactivación.

Se concluye, además, que la posibilidad de reemplazar a la Th por perturbantes físicos y químicos indica que su rol no sería exclusivamente el de un reductor de tipo fisiológico, sino que además tendría la capacidad de interaccionar con las enzimas introduciendo cambios importantes en la estructura de las mismas. Esto podría ser válido tanto para la Th del cloroplasto como para las que participan en otros sistemas.

La modificacion de las interacciones hidrofobicas intramoleculares trae como consecuencia un cambio conformacional para dar una enzima con alta actividad especifica. El producto de este cambio conformacional es la exposición de nuevos dominios de la enzima con lo cual se modifica la superficie de la enzima. Este cambio implica que

las interacciones con estructuras supramoleculares resultarán alteradas. Por este motivo, se estudiaron las formas inactiva y activada de la FBPasa y RuBisCO en su interacción con estructuras supramoleculares de características hidrofóbicas como lo son las micelas de los detergentes no-iónicos y las membranas tilacoides de características complejas. Los datos obtenidos con la enzima inactiva indican la existencia de una interacción de la forma monomérica con las estructuras mencionadas que puede ser afectada por diversos factores. Se analizó la interacción de la $FBPasa_I$ (inactiva) con membranas tilacoides debido al interés fisiológico de éste hecho. Si bien los datos de esta enzima inactivada no pueden ser extrapolados a fenómenos in vivo, se observa una diferencia en la interacción con ambas estructuras. Además, esta forma de la enzima presenta un comportamiento diferente con respecto de la RuBisCO, cuya actividad no está modulada por el sistema Fd-Th. En la tabla XI se resumen los datos obtenidos, indicando claramente que el tipo de interacción no es el mismo.

Tabla XI. Interacción de ^{125}I-$FBPasa_I$ (inactiva) con membranas tilacoides y micelas de Triton X-114.

Tratamientos	Membranas	Micelas
Temperatura	↑ al aumentar t°	no ensayado
pH	↓ al aumentar pH	↑ al aumentar pH
DTT	sin efecto	↑ monotioles ↑↑ ditioles
Mg^{2+}	↑↑	—
K^+	↑	↑↑

La posibilidad de marcar la FBPasa manteniendo su actividad, permitio analizar factores que son relevantes en su interacción con las membranas; tal es el caso del pH ó el estado redox. La interacción de la $FBPasa_4$ (activa), tanto con las micelas como con las membranas tilacoides, está afectada diferencialmente por los factores antes nombrados, los que varian en la transicion oscuridad-luz del cloroplasto. Se observa, entonces, que la enzima activada en presencia de DTT, FBP, Ca^{2+} y Th presenta una mayor interacción con las micelas que la enzima sin tratar, ocurriendo lo opuesto con las membranas tilacoides. Del mismo modo, los efectos del DTT y del pH son encontrados para ambas estructuras, como se aprecia en la tabla XII. Se cree que las uniones -S-S- mantienen plegadas zonas hidrofóbicas de las proteinas globulares y que al ser reducidas se expondrian (156).

Tabla XII. Interacción de ^{125}I-$FBPasa_4$ (activa) con membranas tilacoides y micelas de Triton X-114. Comparación de las formas nativa y activada.

Tratamiento	Membranas	Micelas
Aumento de la incorporación	↑ activada ↑↑ nativa	↑↑ activada – nativa
pH	↓ activada – nativa	↑ activada ↓ nativa
DTT	↓ nativa	↑ nativa

Aparentemente el tipo de interacción predominante con las membranas no sería el hidrofóbico, ya que existen marcadas diferencias con respecto a la interacción con las micelas, que es de naturaleza hidrofóbica exclusivamente.

¿Qué función tendría, entonces, la interacción con las membranas tilacoides?. Para contestar ésto se estudió el efecto de estas estructuras sobre la actividad de la enzima. En este sentido se observó que las membranas sin iluminar (dializadas exhaustivamente) disminuyen ó impiden la activación de la FBPasa mientras que no afectan el proceso catalítico. Esto sugiere la existencia de un mecanismo regulatorio ligado a la union de la enzima a las membranas. La enzima nativa en presencia de dichas membranas no puede ser activada por los moduladores. No se ha determinado aun si este efecto inactivador está relacionado a los mecanismos de desactivación propuestos con anterioridad (ver seccion IV resultados y conclusiones)

Un hecho similar ocurre con las esferas de vidrio poroso (SPG), que poseen una gran relacion superficie-volumen e impiden que la enzima sea activada. Esto implica que el estado de la enzima (nativa o activada) depende de la presencia de una estructura supramolecular. Por otra parte, la enzima nativa tiene mayor afinidad por las membranas, mientras que su interaccion con las micelas es menor; lo contrario ocurre con la enzima activada. Debido a la diferente naturaleza de las estructuras, las interacciones serán distintas al igual que las respuestas a determinados

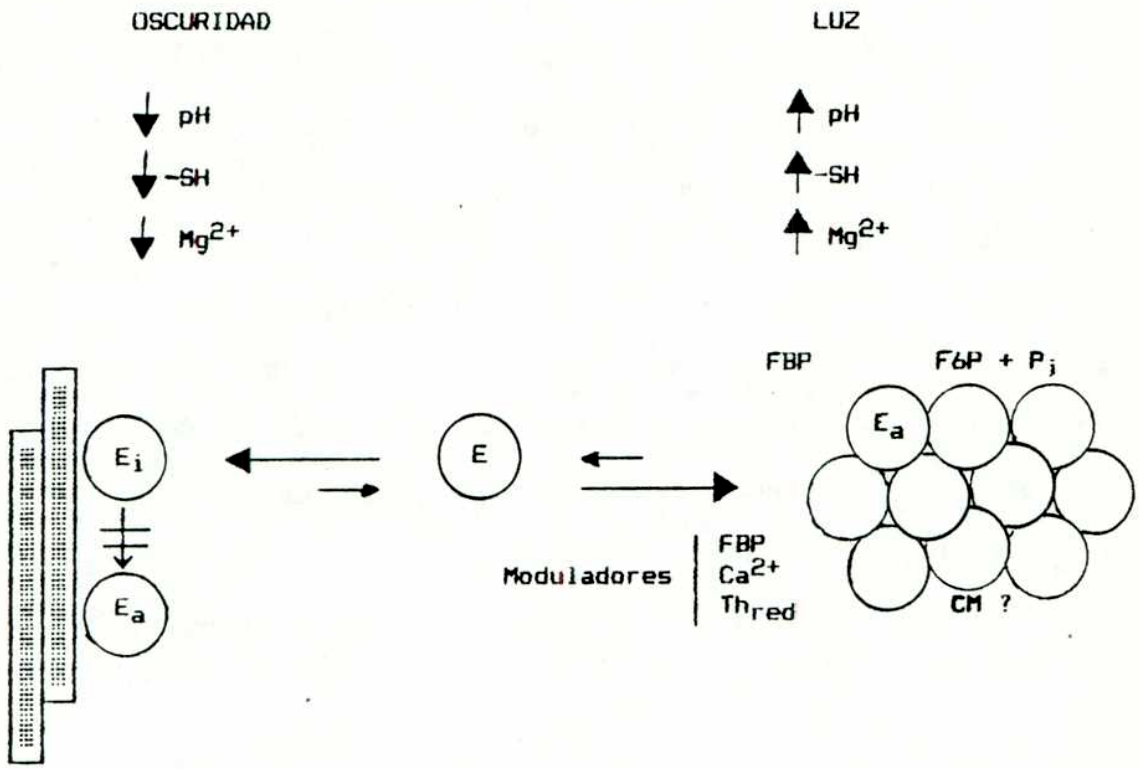
factores (pH, reducción). La importancia de los factores analizados, radica en que son variables fundamentales en la transicion oscuridad-luz; por lo tanto podrian reflejar lo que ocurre in vivo . El efecto cinético de las membranas es el de modificar los $A_{0.5}$ para DHI, FBP, Th y Ca^{2+}. Es destacable que el Ca^{2+} no habia sido modificado por los moduladores de la activacion en los estudios previos; en el presente estudio, los $A_{0.5}$ son llevados a valores mayores ya que se trata de inhibición.

Otro factor importante en la transición oscuridad luz es la variación del contenido de agua del cloroplasto, la cual modificaria no solo la concentración de iones y metabolitos, sino que podria, además, modificar el estado de agregación de los complejos multienzimáticos. Se determino que los cloroplastos en la oscuridad poseen un mayor contenido de agua (102). Esto llevaria a una dilución de iones y metabolitos y favoreceria la disociacion de complejos de enzimas en la oscuridad, por el desplazamiento del equilibrio asociacion-disociacion. De esta manera se integraria la redistribución del agua con el movimiento de iones y el cambio de distribucion espacial de las enzimas contemplado en la regulacion topodinamica.

La FBPasa es una enzima que presenta dos formas cinética y conformacionalmente distintas, capaces de interaccionar diferencialmente con estructuras de distinta naturaleza. Las membranas tilacoides están presentes en el cloroplasto y las

micelas podrian representar estructuras supramoleculares dentro del estroma, ej., complejos multienzimáticos.

Esquema propuesto para la FBPasa



Membrana tilacoides

E_i: Enzima inactiva
E_a: Enzima activa
CM: Complejo multienzimático

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

I- Reactivos

II- Preparaciones

- A- FBPasa y Th
- B- NADP-GAPD y PRK
- C- RuBisCO
- D- Cloroplastos y membranas tilacoides

III- Determinaciones

- A- Actividades enzimáticas
  - 1- FBPasa
  - 2- Th
  - 3- NADP-GAPD
  - 4- PRK
  - 5- RuBisCO
- B- Clorofila
- C- Proteinas

IV- Métodos

- A- Marcación de proteinas con ^{125}I

V- Técnicas desarrolladas

- A- Reactivos especificos de grupo
  - 1- Tratamientos
  - 2- Análisis de los datos
  - 3- Espectroscopia diferencial al UV
- B- Alta presión
  - 1- Descripcion del aparato
  - 2- Activación enzimática mediada por la presión
- C- Micelas de Triton X-114
  - 1- Procedimiento
- D- Preparación de vidrio siliconizado (SPG)
- E- Unión a membranas tiacoides
  - 1- ^{125}I-enzimas

I- Reactivos

Los reactivos utilizados son de la mayor pureza y calidad posibles. Todas las soluciones se preparan en agua deionizada y bidestilada. Las soluciones de FBP, DTT, TCA y cationes monovalentes, son tratadas con la resina Chelex-100. para eliminar cationes bi- ó trivalentes (65). La FBP es tratada en algunos casos con carbon activado para eliminar por adsorción productos de oxidación del azucar y P_i, previo a su titulación.

Las soluciones de DEPC se preparan semanalmente en etanol absoluto y el RKW diariamente en agua a pH 3.

El Triron X-114 se repurifica según (21). El Iodogen se disuelve en cloroformo y se vierte en los tubos de ensayo, evaporando a continuación el solvente.

II- Preparaciones

Todos los pasos de purificación se efectúan a 4°C a menos que se indique lo contrario.

A- FBPasa y Th

El metodo de purificación es esencialmente el descripto en (123,142,170) obteniéndose la enzima purificada a homogeneidad. En la misma preparacion se obtiene también la Th, segun el siguiente esquema:

Hojas frescas de espinaca

Homogeneización a pH 7.9 y filtrado

Precipitación a pH 4.5

Precipitado	Sobrenadante
Disolución y ajuste pH 7.6	Liofilización
Fraccionamiento salino 35-85% $SO_4(NH_4)_2$	Calentamiento a 80°C 3min
DEAE-celulosa pH 5.5	DEAE-celulosa pH 7.9
Hidroxiapatita pH 7.3	Th -f y -m
QAE-sefadex A-25	
FBPasa	

B- NADP-GAPD y PRK

La purificación de la NADP-GAPD se realiza según el método descripto en (160). En la misma preparación se puede obtener la PRK, como se indica en el siguiente esquema:

Hojas frescas de espinaca

Homogeneización a pH 7.9 y filtrado

Centrifugación y descarte del precipitado

Fraccionamiento salino
24-38% $SO_4(NH_4)_2$

Precipitación al 50% de acetona a -15°C

DEAE-celulosa a PH 7.9

Precipitación del eluído al 50% $SO_4(NH_4)_2$

Disolución del precipitado y
siembra en Biogel $A_{1.5m}$

NADP-GAPD	PRK

C- RuBisCO

Se efectúa según el procedimiento rápido, descripto en la referencia (57), obteniendose una preparación de enzima homogénea y de alto rendimiento.

Hojas frescas de espinaca

Precipitación con PEG 18% y descartar precipitado

Precipitación de RuBisCO con $MgCl_2$

Disolución, centrifugación (eliminar precipitado)

Cromatografía en DE-52 a pH 8.0

RuBisCO

D- Cloroplastos y membranas tilacoides.

Los cloroplastos se preparan según el procedimiento descripto en (121). Dos precauciones fundamentales deben tenerse en cuenta cuando se preparan cloroplastos, cualquiera sea su origen: no congelar nunca y mantener siempre la tonicidad del medio. Aproximadamante de 15 a 20 hojas frescas de espinaca se homogeneizan en una licuadora en 300 ml de un buffer isotónico (Tris-HCl 30 mM pH 7.9; 0.3 M sacarosa; 1 mM EDTA). Se filtra y centrifuga sin pasar de 300 x g, por no más de 90 segundos de tiempo total. Se descarta el sobrenadante y al precipitado (cloroplastos) se le agregan 0.5 ml de solución hipertónica (1.5 M sacarosa). A continuación se agregan 15 ml de una solución hipotónica (Tris-HCl 5 mM pH 7.9; 1 mM Mg Cl_2; sin sacarosa), donde estallan los cloroplastos; luego se centrifuga a 27000 x g y

se descarta el sobrenadante (estroma diluído). Los cloroplastos rotos se resuspende en el buffer hipotónico.

PURIFICACION DE LAS MEMBRANAS TILACOIDES.

Para separar las membranas tilacoides del resto de las fracciones se siembra la suspensión de membranas cloroplásticas en un gradiente discontinuo (0.6; 0.9; 1.2; 1.5 M) de sacarosa. Las membranas tilacoides purificadas se ubican en la interfase 1.2-1.5 M sacarosa. Se resuspenden en buffer hipotónico, se centrifugan y se guardan en suspensión a 4°C.

III- Determinaciones

A- Actividades enzimáticas

1- FBPasa

La determinación de la FBPasa se efectúa en una ó dos etapas.

ENSAYO EN UNA ETAPA

Se incuba a la enzima en una solución de 1ml de volumen final que contiene (en µmoles): Tris-HCl pH 7.9,50; $MgCl_2$, 10; FBP, 3 y EGTA, 0.1. La reaccion se detiene por el agregado de reactivo de Chen, estimándose luego el P_i liberado (31). Este ensayo es el que se utiliza para la determinacion de la FBPasa en columnas (ensayo a altas [FBP] y [Mg^{2+}]).

ENSAYO EN DOS ETAPAS

La enzima se preincuba en Tris-HCl 0.1 M pH 7.9 a 23°C en un volumen final de 0.1 ml por 20-30 min en presencia de los moduladores indicados en cada experimento. Una solución estándar de activación (mezcla de activación), contiene los siguientes componentes (en µmoles): Tris-HCl pH7.9, 50; DTT, 2; FBP, 0.24 y $CaCl_2$, 0.05; y, alternativamente según se indique, 2-propanol, TCA, Th ó APH. Posteriormente, se inyecta la solución de catálisis, llevando a un volumen final de 1 ml y conteniendo (en µmoles): Tris-HCl pH 7.9, 50; FBP,0.8; $MgCl_2$, 1 y EGTA, 0.1. A continuación se estima el P_i liberado por el método de Chen (31).

2- Tiorredoxina

Al no tener la Th una actividad enzimática medible directamente, la determinación de su actividad consiste en su capacidad de activar a enzimas cloroplásticas como la FBPasa. Para ésto, se incuba a esta última en presencia de los moduladores de la activación, en concentraciones que no estimulan a la enzima (ver ensayo en dos etapas) y se agrega la Th.

3- NADP-GAPD

Esta enzima se ensaya en dos etapas, como se describe en (160); tanto en la dirección reductiva como la oxidativa.

REDUCTIVA

Se incuba la NADP-GAPD a 23°C durante 10 min en una solución que contiene los moduladores indicados en cada caso. Una incubación estándar se lleva a cabo en un volumen final de 0.1 ml y contiene (en µmoles): Tris-HCl pH 7.9, 10; KP_i,

1; ATP, 0.1 y Th ó el perturbante que se analice. La catálisis se determina por una reacción enzimática auxiliar, inyectando la muestra en un volumen final de 1 ml que contiene 5 unidades de PGAquinasa y los siguientes componentes (en µmoles): Tris-HCl pH 7.9, 50; $MgCl_2$, 10; PGA, 1; ATP, 5; NAD(P)H, 0.12. La reacción se sigue por la variación de absorbancia a 340 nm por el NAD(P) en un espectrofotómetro Gilford 200 con un registrador acoplado.

OXIDATIVA

Cuando se ensaya la dirección oxidativa, la solución de catálisis de volumen final 1 ml contiene (en µmoles): Tris-HCl pH 7.9, 50; Na_2HAsO_3, 20; EDTA, 2; G3P, 0.14 y NAD(P), 1.

4- PRK

Para esta determinación, se efectúa también un ensayo en dos etapas (162). La solución de activación contiene (en µmoles): Tris-HCl pH 7.9, 50; DTT, 0.5 y Th ó el perturbante en estudio, en 0.1 ml y se incuba 15 min a 23°C. Se toma una alícuota de 50 µl y se inyecta en la mezcla de catálisis de 1 ml de volumen final que contiene las enzimas auxiliares (PK/LDH, 3.5 y 5 unidades respectivamente y PRI, 2 unidades) y los siguientes componentes (en µmoles): Tris-HCl pH 7.9, 50; ATP, 1; PEP,1; KCl, 10; $MgSO_4$, 10; NADH, 0.1; R5P, 2. Posteriormente se determina la variación de absorbancia a 340 nm en función del tiempo.

5- RuBisCO

La determinación de la actividad carboxilásica se realiza según se describe en (57). La enzima (2 mg/ml) es

previamente activada 10 min a 30°C en una mezcla de un volumen final de 0.2ml conteniendo 10 mM $NaHCO_3$, 20 mM $MgCl_2$ y 2 mM DTT. Luego a 0.22 ml de buffer de catálisis (100 mM Bicine-KOH pH 8.0 a 30°C, 0.2 mM EDTA, 20 mM $MgCl_2$ y 1 mM DTT) se le agrega 10 µl de $NaH^{14}CO_3$ -de actividad especifica conocida- y 10 µl de12.5 mM RuBP. Se deja equilibrar 2 min a 30°C y se agregan 10 µl de la enzima activada. Se detiene la reacción luego de 1 a 3 min. con 0.2 ml de HCl 2N y se cuenta la radiactividad incorporada (^{14}C-PGA) previa eliminación del $^{14}CO_2$ por secado con aire.

B- Clorofila

La determinación de la concentración de Chl en las preparaciones de membranas tilacoides, se basa en el método de Arnon (10). Se toma una alicuota de 25 µl y se lleva a 5 ml con acetona 80%. Se agita por inversión, se filtra para eliminar el precipitado de proteínas y se determina la absorbancia a 652 nm. Dicho valor, se multiplica por el factor de conversión 5.56 y se obtiene el valor estimado de la [Chl] en mg/ml.

C- Proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se efectúa espectrofotométricamente siguiendo la absorbancia a 280 nm (89), en el caso de columnas de cromatografía ó de filtración por geles. Cuando se tiene muestras de escaso volumen ó se desea mayor sensibilidad, se determina por el

método de Bradford (23). Para obtener valores absolutos por este método, se realiza una curva de calibración utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

IV- Métodos

A- Marcación de proteínas con ^{125}I

Preparación de tubos de Iodogen: se prepara una solución de 1 mg/ml de Iodogen en cloroformo. Se agregan 0.1 ml (100 µg) en tubos de vidrio y se deja evaporar a 37°C.

Marcación: se toman los tubos de Iodogen y se incuban cantidades variables de las proteínas en 0.5 ml de Tris-HCl 0.1M pH 7.9 a 0 ó 25°C por 20 min. Luego se pasa la mezcla por columnas de filtración por geles (sephadex G50 ó AcA 54) para separar el ^{125}I no incorporado. Finalmente se toman las fracciones que contienen la proteína marcada, se dializan toda la noche contra acetato de sodio 50 mM pH 5.5 y se guardan a -20°C.

V- Técnicas desarrolladas

A- Reactivos específicos de grupo

1- Tratamiento de la FBPasa

Las formas activas de la FBPasa son generadas a pH 7.9 por incubación con DTT, FBP, Ca^{2+} y alternativamente Th, TCA ó 2-propanol; el proceso de activación no ocurre a valores de pH menores a 7.4 (34,64,65,134,138,142). Por otra parte la forma inactiva de la FBPasa corresponde a la enzima nativa

(no tratada). Los tratamientos con DEPC ó RKW se hacen antes (enzima nativa) ó después (enzima activadada) de la incubación con moduladores.

ENZIMA NATIVA

La FBPasa nativa (10 µg) se incuba a 23°C en 0.25 ml de buffer MOPS-NaOH 50 mM (pH 7.8), con el reactivo especifico correspondiente. Luego de incubaciones a diferentes tiempos, se toman alícuotas para el ensayo de la actividad FBPasa remanente: a) en una etapa ó b) en dos etapas, agregando Imidazol-HCl (60 mM) para frenar la reacción del DEPC. Posteriormente, en ambos casos, se determina el P_i liberado por el método de Chen (31).

EXPERIMENTOS DE PROTECCION

El efecto de RKW y DEPC sobre las formas activas de la FBPasa se analizó incubando a la enzima (10 µg) por 30 min a 23°C en 0.22 ml de solución conteniendo (en µmoles): MOPS-NaOH pH 7.8, 12.5; DTT, 1.25; FBP, 0.2; $CaCl_2$, 0.04 y el modulador bajo análisis. Posteriormente, se agregan 30 µl del reactivo especifico de grupo respectivo y a distintos tiempos de incubación, 25 µl de esta solución se inyectan en 75 µl de una solución de activación, conteniendo el mismo modulador utilizado en la reacción inicial. Luego de 20 min a 23°C, se toma una alícuota y se inyecta en la mezcla de catálisis (ensayo en dos etapas), determinándose posteriormente el P_i liberado.

2- Análisis de los datos

Se efectúa por regresión lineal y se analizan los datos cinéticos cuyos coeficientes de correlación son mayores que 0.98.

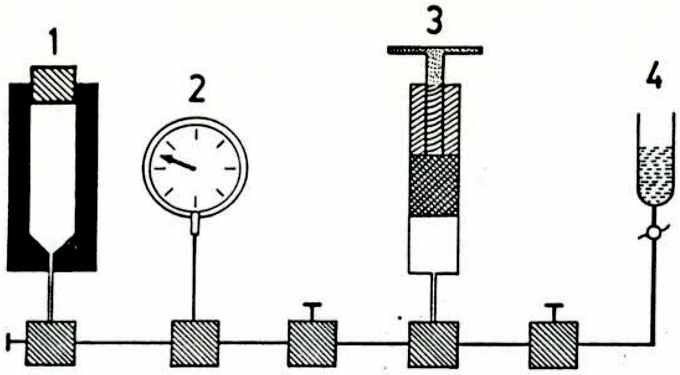
3- Espectroscopia diferencial al UV

Los espectros de la FBPasa se obtienen utilizando el dispositivo de celdas en tándem del espectrofotómetro de doble haz Hitachi 220-A. En la posición de la muestra, se ubica una celda rectangular (1 cm) de cuarzo, conteniendo la enzima nativa ó tratada con moduladores; en el mismo paso de luz (en tándem) se ubica una cubeta similar con buffer. En la posición de referencia, la celda que contiene la enzima (sola) es alineada con otra que contiene los moduladores. Luego de ajustar la línea de base con el microprocesador incorporado al aparato, se agregan cantidades adecuadas de los reactivos específicos de grupo y se registran los espectros a intervalos discretos.

B- Alta presión hidrostática

1- Descripción del aparato

El aparato consta principalmente de: a) una bomba ó cámara de presión donde se realizan las incubaciones; b) un monitor tipo Bourdon de presión; y c) un pistón, con el que se genera la presión. Las diferentes partes del aparato están interconectadas por tuberías de metal que contienen el etanol (fluido hidráulico). Una descripción completa del aparato es efectuada por Paladini en la referencia (116).



1- Cámara de alta presión
2- Manómetro
3- Bomba Hidráulica
4- Reservorio de fluido

2- Ensayos de activación enzimática mediada por presión

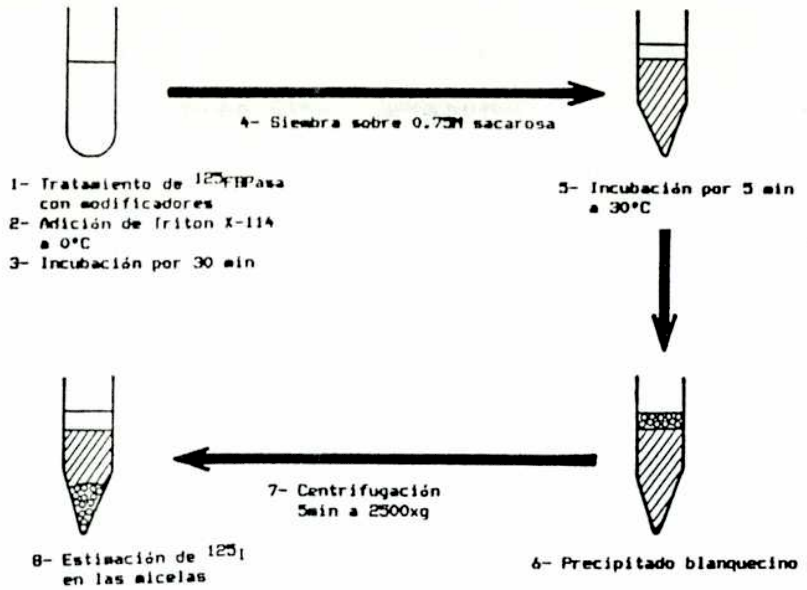
Para efectuar los ensayos, se procede de la siguiente manera: i) la enzima en análisis se mezcla con los correspondientes moduladores (volumen final 0.2 ml) y se introduce en un tubo de polietileno colapsable; ii) el tubo se tapa con un tapón de vidrio; iii) se introduce en la bomba de presión, sumergiéndola en el etanol; y iv) se cierra la bomba y se aplica la presión manualmente con el pistón a tornillo del aparato. Con el fin de evitar variaciones temporales de temperatura, la velocidad de aumento de presión es de 10 bar/segundo. Luego de la incubación (10 min), se libera la presión y se toma una alícuota para determinar la actividad enzimática. El ensayo de catálisis se hace a presión atmosférica. El efecto de la APH sobre la fase catalítica se analiza incubando la enzima con la mezcla de catálisis respectiva en el tubo de polietileno. Este se

introduce en el aparato y luego se aumenta la presión. Cuando culmina el tiempo de incubación, la presión se libera y se determina la formación de producto para las diferentes enzimas, según se indica en la sección III- de este capitulo. En estos experimentos se mantiene el tiempo total de compresión y descompresión en un 20% del tiempo de reacción. En todos los estudios se utiliza el buffer Tris-HCl debido a que su pK_a no varia con la presión hidrostática (111).

C- Micelas de Triton X-114

1- Procedimiento

El procedimiento se basa en el método original de Bordier (21). Es necesario trabajar con la enzima marcada con ^{125}I para poder ser determinada su incorporación a las micelas. Luego, se incuba la enzima en Tris-HCl 50 mM pH 7.9 con los modificadores a analizar en un volumen final de 0.2 ml por 1 hora a 24°C en tubo de ensayo. Luego se agrega el Triton X-114 a la solución y se lleva a 0°C por 30 min para que se forme una solución. Se transfiere posteriormente, todo el volumen a un tubo Eppendorf sobre 0.6 ml de una solución (colchón) compuesta por: 0.25 M sacarosa, 0.1 M KCl, 0.05% Triton X-114 y 50 mM Tris-HCl pH 7.9. Se incuba 10 min a 30°C y se forma un precipitado blanquecino en la fase superior (micelas). Se centrifuga 5 min en centrifuga clinica y se toman 50 µl del fondo del tubo (fase rica en detergente) para contar la radiactividad.



D- Preparación del vidrio siliconizado (SPG)

El procedimiento se basa en el método descripto en (107). Se toman 0.4 g de vidrio de poro controlado (CPG, controlled porous glass) y se agregan a un vaso de precipitados de 150 ml que contiene 3 ml de Cl_4C. Posteriormente se agregan 0.2 ml de aceite de siliconas y se agita lentamente bajo campana, hasta que se evapora el solvente orgánico. Una vez que está seco, se lleva a estufa 2 hs a 200°C. Se deja enfriar y se agrega agua bidestilada (2 ml), obteniéndose suspensiones de 0.2 g/ml de SPG listas para ser utilizadas.

E- Unión a membranas tilacoides

Se incuba a la ^{125}I-enzima en presencia de las membranas tilacoides, en un tubo Eppendorf, en un volumen final de 0.2 ml. Las incubaciones se hacen en buffer Tris-HCl pH 7.9 -ó el

buffer indicado-, en presencia de los moduladores que se analicen. Luego de 1 hora a 24°C se centrifuga 5 min y se elimina el sobrenadante. Se lava el precipitado de membranas con 0.2 ml del buffer y se resuspende bien con una varilla de vidrio de extremo romo. Se centrifuga nuevamente, se descarta el sobrenedante, se resuspende el precipitado en agua bidestilada y se transfiere a un vial para contar la radiactividad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1) Akamba, L.M. y Anderson, L.E. (1981) Plant Physiol. 70, 728-734.

2) Anderson, J.M. y Andersson, B. (1988) Trends Biochem. Sci. 13, 351-355.

4) Anderson, L.E. (1982) Encyclopedia of Plant Physiology. Gibbs, M. y Latzko, E., Eds.. New Series, vol. V, pag. 271-281. Springer Verlag, Berlin.

5) Anderson, L.E. y Avron, M. (1976) Plant Physiol. 57, 209-213.

6) Anderson, L.E. y Ben-Bassat, D. (1981) Photosynthesis. Akoyunoglou, G. Ed., Vol IV, pag. 373-378. Balaban International, Science Services, Philadelphia.

7) Anderson, L.E., Chin, H.M. y Gupta, V.K. (1979) Plant Physiol. 64, 491-494.

8) Anderson, L.E., Mohamed, A.H., Ashton, A.R., Scheibe, R. y Duraini, O. (1983) Thioredoxins, Structure and Functions. Gadal, P., Ed. pag. 269-276. Editions du CNRS, Paris.

9) Aragnol, D., Pradel, J. y Cecchini, J.P. (1985) Biochim. Biophys. Acta 829, 275-281.

10) Arnon, D.I. (1949) Plant Physiol. 24, 1-15.

11) Arnon, D.I. (1977) Encyclopedia of Plant Physiology. Trebst, A. y Avron, M, Eds., vol V, pag 7-56. Springer Verlag, Berlin.

12) Arnon, D.I. (1988) Trends Biochem. Sci. 13, 30-33.

13) Arnon, D.I., Allen, M. y Whatley, F. (1954) Nature 164, 394-396.

14) Barber, J. (1976) in The Intact Chloroplast. Barber, J., ed. pag 89-134. Elsevier, Amsterdam.

15) Barber, J. (1984) Trends Biochem. Sci. 9, 79-80.

16) Barber, J. (1987) Trends Biochem. Sci. 12, 321-326.

17) Bassham, J.A. y Krause, G.H. (1969) Biochim. Biophys. Acta 189, 207-221.

18) Benson, A.A., Bassham, J.A., Calvin, M., Goodale, T.C., Hass, V.A. y Stepka, W (1950) J. Am. Chem. Soc. 235, 2910-2916.

19) Bodlaender, P., Feinstein, G. y Shaw, E. (1969) Biochemistry 8, 4941-4949.

20) Bogorad, L. (1981) J. Cell. Biol. 91, 256s-270s.

21) Bordier, C. (1981) J. Biol. Chem. 256, 1604-1607.

22) Boyer,P.D. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 957-966.

23) Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254.

24) Brezeale, V.D., Buchanan, B.B. y Wolosiuk, R.A. (1978) Z. Natrforsch. 33c,521-528.

25) Brooks, K. y Criddle, R. (1966) Arch. Biochem. Biophys. 117, 650-659.

26) Buchanan, B.B. (1980) Ann. Rev. Plant Physiol. 31, 343-374.

27) Buchanan, B.B., Schurmann, P.y Kalberer, P. (1971) J. Biol.Chem. 246, 5952-5959.

28) Buchanan, B.B., Wolosiuk, R.A. y Schurmann, P. (1979) Trends Biochem. Sci. 4, 93-96.

29) Carlson, G.M. (1984) Biochim. Biophys. Acta 789, 347-350.

30) Champigny, M.L. y Bismuth, E. (1976) Physiol. Plant. 36, 95-100.

31) Chen, P.S., Toribara, T.Y. y Warner, H, (1956) Anal. Chem. 28, 1756-1758.

32) Cline Love, L.J., Habarta, J.G. y Dorsey, J.G. (1984) Anal. Chem. 56, 1132a-1148a.

33) Cohen, S.S., Marcu, D.E. y Balint, R.F. (1982) FEBS Lett. 141, 93-97.

34) Corley, E. y Wolosiuk, R.A. (1985) J. Biol. Chem. 260, 3978-3983.

35) Crawford, N.A., Yee, B.C., Hutchenson, S.W., Wolosiuk, R.A. y Buchanan, B.B. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 244, 1-15.

36) Damodaran, S. (1989) Int. J. Biol. Macromol., 11, 2-8.110b

37) Decottignies, P., Schmitter, J.M., Mignac-Maslow, M., Le Maréchal. P., Jacquot, J.P. y Gadal, P. (1990) Progress in Photosynthesis Research, vol IV, pag. 247-250.

38) Dunn, B.M., Afinsen, C.B. y Shrager, R.I. (1974) J. Biol. Chem. 249, 3717-3723.

39) Edwards, G. y Walker, D.A. (1983) C_3,C_4: Mechanisms, and cellular and environmental regulation of photosynthesis. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

40) Eisenberg, D. y Mc Lachlan, A.D. (1986) Nature 319, 199-203.

41) Ellis, R.J. (1979) Trends Biochem. Sci. 4, 241-244.

42) Emerson, R., Chalmers, R. y Cederstrand, C. (1957) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 43,133-143.

43) Feinstein, G., Bodlaender, P. y Shaw, E. (1969) Biochemistry 8, 4949-4955.

44) Ferri, C., Comerio, G., Iadarola, P., Zapponi, M.C. y Speranza, M.L. (1978) Biochim. Biophys. Acta 522, 19-31.

45) Fink, R.M. y Fink, K. (1948) Science 107, 253.

46) Fisher, K.H. y Latzko, E. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 300-306.

47) Ford, D.M., Jablonski, P.P., Mohamed, A.H. y Anderson, L.E.(1987) Plant Physiol. 83, 628-632.

48) Fraker, P.J. y Speck, J.C. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849-857.

49) Frieden, C. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5788-5799.

50) Gardemann, A., Schimkat, D. y Heldt, H.W. (1986) Planta 168, 536-545.

51) Gimmler, H. Schafer, G. y Heber, U. (1974) in Proceedings of the Third International Congress on Photosynthesis. Avron, M., ed. pag 1381-1392. Elsevier, Amsterdam.

52) Glazer, A.N. y Melis, A. (1987) Ann. Rev. Plant Physiol. 38, 11-45.

53) Gontero, B., Meunier, J.C., Buc, J. y Ricard, J. (1984) Eur. J. Biochem. 145, 485-488.

54) Greaney, G.S. y Somero, G.N. (1979) Biochemistry 18, 5322-5332.

55) Hader, D.P. y Trevini, M. (1987) General Photobiology. Pergamon Press, Oxford.

56) Hall, D.O. y Rao, K.K. (1987) Photosynthesis. Edward Arnold Ed., Baltimore.

57) Hall, N. P. y Tolbert, N. E. (1978) FEBS Lett. 96, 167-169.

58) Hammel, K.E. y Buchanan, B.B. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 3681-3685.

59) Hanstein, W.G., Davis, K.A. y Hatefi, Y. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 147, 534-544.

60) Heber, U., Takahama, U., Neimanis, S y Shimizu-Takahama, M. (1982) Biochim. Biophys. Act 679, 287-299.

61) Heldt, H.W. (1976) The Intact Chloroplast, pag. 215-234. Barber, J. Ed., Elsevier, Amsterdam.

62) Heldt, H.W., Werdan, K., Milovancev, M. y Geller, G. (1973)Biochim. Biophys. Acta 314, 224-247.

63) Helenius, A., McCaslin, D.R., Fries, E. y Tanford, C. (1979) Meth. Enzymol. 56, 734-749.

64) Hertig, C.M. y Wolosiuk, R.A. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 325-333.

65) Hertig, C.M. y Wolosiuk, R.A. (1983) J. Biol. Chem. 258, 984-988.

66) Hertig, C.M., Wolosiuk, R.A., Perelmuter, M.E. y Chehebar, C. (1980) FEBS Lett. 109, 289-293.

67) Hill, R. (1975) Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 1-11.

68) Hill, R. y Bendall,F. (1960) Nature 186, 136-137.

69) Hind, G. y Jagendorff, A.T. (1963) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 49, 715-722.

70) Hirasawa, M., Droux, M., Gray, K.A., Boyer, J.M., Davis, D.J., Buchanan, B.B. y Knaff, D.B. (1988) Biochim. Biophys.Acta 935, 1-8.

71) Holmgren, A. (1985) Ann. Rev. Biochem. 54, 237-271.

72) Holmgren, A. (1986) Thiredoxin and Glutaredoxin Systems, Structure and Functions. Holmgren, A. et al Eds. pag 1-9, Raven Press, New York.

73) Hoober, J.K. (1984) Chloroplasts. Philip Siekevitz, Ed., Plenum Press, New York.

74) Jacquot, J.P., Buchanan, B.B., Martin, F.y Vidal, J. (1981) Plant Physiol. 68, 300-304.

75) Jacquot, J.P., Joly, C. y Gadal, P. (1983) Biochim. Biophys. Acta 745,97-101.

76) Jacquot, J.P., Vidal, J., Gadal, P.y Schürmann, P. (1978) FEBS Lett. 96, 243-246.

77) Jaenicke, R. (1983) D. Naturwiss. 70, 332-341.

78) Jagendorff, A.T. y Uribe, E. (1961) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55, 170-177.

79) Joliot, P. (1965) Biochim. Biophys. Acta 102, 116-134.

80) Kamo, M., Tsugita, A., Wiessner, C., Wedel, N., Bartling, D., Herrmann, R.G., Aguilar, F., Gardet-Salvi, L. y Schürmann, P. (1989) Eur. J. Biochem. 182, 315-322.

81) Kaprelyants,.A.S. (1988) Trends Biochem. Sci. 13, 43-46.

82) Kelly, G.J. (1983) Trends Biochem. Sci. 8, 151-152.

83) King, L. y Weber, G. (1986) Biochemistry 25, 3632-3637.130.

84) Kleczkowsky, L.A. y Randall, D.D. (1985) Plant Physiol. 79,274-277.

85) Knaff, D.B. (1988) Trends Biochem. Sci. 13, 460-461.

86) Krause, G.H. (1977) Biochim. Biophys. Acta 460, 500-510.

87) Kreimer, G., Melkonian, M., Holtum, J.A.M. y Latzko, E. (1988) Plant Physiol. 86, 423-428.

88) Langlotz, P. y Follman, H. (1987) Z. Naturforsch. 42c, 1364-1366.

89) Layne, E. (1957) Meth. Enzymol. 3, 447-454.

90) Lazaro, J.J., Chueca, A., Lopez-Gorge, J. y Mayor, F. (1975) Plant Sci. Lett. 5, 49-55.

91) Leegod, R.C. y Walker, D.A. (1980) Biochim. Biophys. Acta 593, 362-370.

92) Leonard, N.J., Mc Donald, J.J., Henderson, R.E.L. y Reichman, M.E. (1971) Biochemistry 10, 3335-3342.

93) Levy, H.M., Leber, P.D. y Ryan, E.M. (1963) J. Biol. Chem. 238, 3654-3659.

94) Lorimer, G.H., Badger, M.R. y Andrews, T.J. (1976)Biochemistry 15, 529-536.

95) Lorimer, G.H., Woo, K.C., Berry, J.A. y Osmond, C.B. (1978) Proceedings of the Fourth International Congress in Photosynthesis. Hall, D.O., Coombs, J. y Goodwin, T.W. Eds. pag. 311-322.

96) Low, P.S. y Somero, G.N. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 3014-3018.

97) Maeda, K., Tsugita, A., Dalzoppo, D., Vilbois, F. y Schürmann, P. (1986) Eur. J. Biochem. 154, 197-203.

98) Marcus, F., Harrsch, P.B., Moberly, L., Edelstein, I. y Latshaw, S.P (1987) Biochemistry 26, 7029-7035.

99) Maretzki, D., Reimann, B. y Rapoport, S. M. (1989) Trends Biochem. Sci. 14, 93-96.

100) Martin, A.J.P. y Synge, R.L.M. (1952) Le Prix Nobel, Norstedt, Estocolmo.

101) Mc Kinney, D.W., Buchanan, B.B. y Wolosiuk, R.A. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 86, 1178-1184.

102) McCain, D.C., Croxdale, J. y Markley, J.L. (1988) Plant Physiol. 86, 16-18.

103) Meloche, H.P. (1967) Biochemistry 6, 2273-2280.

104) Mills, J.D., Mitchell, P. y Schurmann, P. (1980) FEBS Lett. 112, 173-177.

105) Mitchell, P. (1961) Nature 191, 144-148.

106) Miziorko, H.M. y Lorimer, G.H. (1983) Ann. Rev. Bioch. 52, 507-535.

107) Mizutani, T. (1980) J. Cromatogr. 196, 485-488.

108) Molrid, E (1981) Adv. Prot. Chem. 34, 93-166.

109) Muhlrad, A., Hegyi, G. y Horanyi, M. (1969) Biochim. Biophys. Acta 181, 184-190.

110) Nemethy, G. (1986) Methods Enzymol. 127, 183-186.

111) Neuman, R.C., Kauzmann, W. and Zipp, A. (1973) J. Phys. Chem. 77, 2687-2691.

112) Nicholson, S., Eastbery, J.S. y Powls, R. (1987) Eur. J. Biochem. 162, 423-431.

113) Nishizawa, A., Wolosiuk, R.A. y Buchanan, B.B. (1979) Planta 145, 7-12.

114) Ovádi, J. (1988) Trends Biochem. Sci. 13, 486-490.

115) Pacold, I. y Anderson, L.E. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 139-143.

116) Paladini, A.A.(h) (1986) Meth. Enzymol. 130, 493-518.

117) Paladini, A.A. (h) y Weber, G. (1981) Biochemistry 20, 2587-2593.

118) Pedersen, T.A., Kirk, M. y Bassham, J.A. (1966) Physiol. Plant. 19, 219-231.

119) Penniston, J.T. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 142, 322-332.

120) Petra, P.H. (1971) Biochemistry 10, 3163-3170.

121) Photosinthesis: energy transduction (1986)). A Practical Approach series. Hipkins, M.F. y Baker, N. R., eds. IRL Press, Oxford.

122) Pradel, J., Soulie, J., Buc, J., Meunier, J.C. y Ricard, J. (1981) Eur. J. Biochem. 113, 507-511.

123) Prat Gay, G. y Wolosiuk, R.A. (1989) Biochim.et Biophys. Acta 973, 457-464.

124) Pryde, J.G. (1986) Trends Biochem. Sci. 11, 160-163.

125) Pupillo, P. y Giuliani-Piccari, G. (1975) Eur. J. Biochem.51, 475-482.

126) Quayle, J.R., Fuller, R.C., Benson, A.A. y Calvin, M. (1954) J. Am. Chem. Soc. 76, 3610-3611.

127) Racker, E. (1955) Nature 175, 249-251.

128) Rosa, L. y Whatley, F.R. (1984) Plant Physiol. 75, 131-137.

129) Ruben, S. y Kamen, M. (1941) Physiol. Rev. 59, 49.

130) Rupley, J.A., Gratton, E. y Careri, G. (1983) Trends in Biochem. Sci. 8, 18-22.

131) San Pietro, A. y Lang, H.M. (1958) J. Biol. Chem. 231, 211-229.

132) Scheibe, R. (1981) FEBS Lett. 133, 301-304.

133) Scheibe, R. y Beck, E. (1979) Plant Physiol.64, 744-748.

134) Scheibe, R., Fickenscher, K. y Ashton, A.R. (1986) Biochim. Biophys. Acta 870, 191-197.

135) Schmid, G., Ludemann, H.D. y Jaenicke, R. (1978) Eur. J. Biochem. 86, 219-224.

136) Schürmann, P. (1983) in Workshop on Light Dark Modulation of Plant Enzymes (Scheibe, R. ed) pag 11-18, Universitat Bayereuth, RFA.

137) Schürmann, P. Wolosiuk, R.A., Brezeale, V.D. y Buchanan, B.B. (1976) Nature 263, 257-258.

138) Schürmann, P. y Wolosiuk, R.A. (1978) Biochim. Biophys. Acta 522, 130-138.

139) Schwenn, J.D. y Schriek, U. (1984) FEBS Lett. 170, 76-80.

140) Slovacek, R.E. y Vaughn, S. (1982) Plant Physiol. 7), 978-981.147.

141) Stein, M. (1989) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.

142) Stein, M. y Wolosiuk, R.A. (1987) J. Biol. Chem. 262, 16171-16179.

143) Stein, M., Lazaro, J.J. y Wolosiuk, R.A. (1989) Eur. J. Biochem., 185, 425-431.

144) Tanford, C. y Reynolds, J.A. (1976) Biochim. et Biophys. Acta 457,133-170.

145) Tischner, R. y Huttermann, A. (1978) Plant Physiol. 62,284-286.

146) Tischner, R. y Schmidt, A. (1982) Plant Physiol. 70, 113-116.

147) Trebst, A.V., Tsujimoto, H.Y. y Arnon, D.I. (1958) Nature 182, 351-355.

148) Van Niel, C.B. (1941) Adv. Enzymol. 1, 263-328.

149) Vogt, K. y Follman, H. (1986) Biochim. Biophys. Acta 873, 415-418.

150) Von Hippel, P.H. y Wong, K.Y. (1964) Science 145, 577-580.

151) Wara-Aswapati, O., Kemble, R.J. y Bradbeer, J.W. (1980) Plant Physiol. 66, 34-39.

152) Washabaugh, M.W. y Collins, K.D. (1986) J. Biol. Chem. 261, 12477-12485.

153) Weber, G. y Drickamer (1983) Quat. Rev. Biophys. 16, 89-112.

154) Weissbach, A., Smyrniotis, P.Z. y Horecker, B.L. (1954) J.Am. Chem. Soc. 76, 3611.

155) Werdan, K., Heldt, H.W. y Milovancev, M. (1975) Biochim. Biophys. Acta 396, 276-292.

156) Wetzel, R. (1987) Trends Biochem. Sci. 12, 478-482.

157) Wilson Miles, E. (1977) Methods Enzymol. 47, 431-442.

158) Wink, M. y Hartmann, T. (1981) Plant Cell Reports 1, 6-9.

159) Wolosiuk, R.A. (1986) Thiredoxin and Glutaredoxin Systems, Structure and Functions. Holmgren, A. et al Eds., pag 253-266. Raven Press, New York.

160) Wolosiuk, R.A. y Buchanan, B.B. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6456-6461.

161) Wolosiuk, R.A. y Buchanan, B.B. (1977) Nature 266, 565-567.

162) Wolosiuk, R.A. y Buchanan, B.B. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 189, 97-101.

163) Wolosiuk, R.A. y Buchanan, B.B. (1978) Plant Physiol. 61,669-671.

164) Wolosiuk, R.A. y Hertig, C.M. (1983) en Thioredoxins, structure and functions. Gadal, P., ed. pag 167-173. Editions CNRS, Paris.

165) Wolosiuk, R.A., Buchanan, B.B. y Crawford, N.A. (1977) FEBS Lett. 81, 253-258.

166) Wolosiuk, R.A., Corley, E., Crawford, N.A. y Buchanan, B.B. (1985) FEBS Lett. 189, 212-216.

167) Wolosiuk, R.A., Crawford, N.A., Yee, B.C. y Buchanan, B.B. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1627-1632.

168) Wolosiuk, R.A., Hertig, C.M. y Busconi, L. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 246, 1-8.

169) Wolosiuk, R.A., Hertig, C.M., Nishizawa, A.N. y Buchanan, B.B. (1982) FEBS Lett. 140, 31-35.

170) Wolosiuk, R.A., Schürmann, P. y Buchanan, B.B. (1980) Meth. Enzymol. 69c, 382-391.

171) Wolosiuk, R.A., Stein, M. y Busconi, L. (1987) Progress in Photosynthesis Research, Vol III, Pag. 459-462. J.Biggins Ed., Martinus Nijhoff Publishers, Dodrecht.

172) Wolosiuk, R.A., Stein, M., Prat Gay, G. y Lazaro, J.J. (1989) en Nuevas tendencias en Bioquimica. Consejo superior de Investigaciones (CSIC), España. (en prensa).

173) Woodward, R.B. y Olofson, R.A. (1961) J. Amer. Chem. Soc. 83, 1007-1009.

174) Wynn, R.M. y Malkin, R. (1988) FEBS Lett. 229, 293-297.

175) Yee, B.C., de la Iorre, A., Crawford, N.A., Lara, C., Carlson, D.E. y Buchanan, B.B. (1981) Arch. Microbiol. 130, 14-18.

ABREVIATURAS

$A_{0.5}$	Concentración de efector requerida para lograr la mitad del máximo de actividad específica.
ADP	5' Adenosina difosfato
AHP	Alta presión hidrostática
ATP	5' Adenosina trifosfato
ATPasa	Adenosina trifosfatasa
Chl	Clorofila
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTT	Ditiotreitol
E_m	Potencial redox
E4P	Eritrosa 4-fostato
EGTA	Etilenglicol-bis-(ß-aminoetil éter)-N,N,N',N', tetraacetato
F2,6BP	Fructosa 2,6-bisfosfato
F6P	Fructosa 6-fosfato
FBP	Fructosa 1,6-bisfosfato
FBPasa	Fructosa-1,6-bisfosfatasa
Fd	Ferredoxina
GAP	Gliceraldehido 3-fosfato
GAPD	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
^{125}I-FBPasa$_1$	Forma monomérica (inactiva) de la FBPasa marcada con ^{125}I
^{125}I-FBPasa$_4$	Forma tetramérica (activa) de la FBPasa marcada con ^{125}I
^{125}I-RuBisCO	RuBisCO marcada con ^{125}I
NAD^+, NADH	Formas oxidada y reducida del nicotinamina dinucleótido

$NADP^+$, NADPH	Formas oxidada y reducida del nicotinamina dinucleótido 2'fosfato
MDH	Malato deshidrogenasa
PGA	3-fosfoglicerato
Pi	Fosfato inorgánico
PRK	Fosforribuloquinasa
R5P	Ribosa 5-fosfato
RKW	N-etil-5-fenilisoxazolium-3'-sulfonato, reactivo K de Woodward
Ru5P	Ribulosa 5-fosfato
RuBisCO	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
RuBP	Ribulosa 1,5-bisfosfato
$S_{0.5}$	Concentración de sustrato ó cofactor requerida para lograr la mitad del máximo de actividad específica
SBP	Sedoheptulosa 1,7-bisfosfato
SBPasa	Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa
SPG	Esferas de vidrio poroso siliconizadas
TCA	Tricloroacetato
Th	Tiorredoxina
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
Xu5P	Xilulosa 5-fosfato

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Wolosiuk, por enseñarme a experimentar con seriedad y libertad y por estimular mis inquietudes científicas.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas, por otorgarme la posibilidad de efectuar el presente trabajo de tesis doctoral.

A las fundaciones Bunge y Born y Campomar por confiar en mi capacidad y brindarme el apoyo económico que otros me negaron.

A los miembros del instituto que me ayudaron y estimularon para llevar adelante esta tesis.

Finalmente quiero agradecer el apoyo incondicional de mis padres y hermanos sin el cual no hubiera llegado a escribir estos agradecimientos.