

Tesis de Posgrado

Análisis de los procesos de modulación y catálisis en la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos de espinaca

Ballicora, Miguel Angel

1993

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 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:

Ballicora, Miguel Angel. (1993). Análisis de los procesos de modulación y catálisis en la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos de espinaca. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2587_Ballicora.pdf

Cita tipo Chicago:

Ballicora, Miguel Angel. "Análisis de los procesos de modulación y catálisis en la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos de espinaca". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1993.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2587_Ballicora.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**ANALISIS DE LOS PROCESOS DE MODULACION Y
CATALISIS EN LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA DE
LOS CLOROPLASTOS DE ESPINACA**

Miguel Angel Ballicora

Director: Ricardo A. Wolosiuk

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
(orientación en Ciencias Químicas).**

1993

Tesis
2587
dj2

- A los mediodías de sol en que la tía me iba a buscar al primario.
- A los mañaneros de frío y lluvia en que papá me alcanzaba al secundario.
- A los desayunos que mi abuela y mi tía me preparaban antes de un día de Facultad.
- A las velas que mamá prendió tantas veces para mis exámenes.
- A la espera paciente de Baby.
- A mis sacrificados sueños de Ajedrecista
- A la infinita trascendencia que hubiese tenido esta tesis para mi abuela y mi tía.

Agradecimientos

Al consejo directivo de la Fundación Campomar por haber permitido realizar mi trabajo de tesis en el Instituto.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado la beca "Doctoral" que posibilitó la continuidad del trabajo.

Al Dr. Ricardo A. Wolosiuk quien me dirigió como un *Maestro* logrando que nunca me sintiera ni solo ni agobiado. Siendo la guía cuando fue necesario y dándome la libertad suficiente en el momento adecuado, hizo que aprendiera muchísimo y me sintiera a gusto con mi trabajo.

Al Dr. Luis Ielpi por la eficiente y equilibrada tarea como Consejero de Estudios.

A Sergio Trombetta y Marcelo Sousa por la colaboración prestada en la revisión de muchos pre-borradores.

A mi mujer Gaby por pasar a la computadora muchos manuscritos y por el incondicional apoyo dado en todo este tiempo.

A todos los ex- y actuales miembros del Instituto y del laboratorio, que fueron y son muchos, que durante estos años compartieron conmigo estimulantes discusiones sobre el trabajo experimental.

Al Dr. Patricio Garrahan y al Dr. Rolando Rossi por su eficiente trabajo docente en dos cursos de post-gradado realizados en la Cátedra de Físicoquímica Biológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica; donde surgieron algunas ideas que fueron utilizadas en la presente Tesis.

A todo el personal técnico, de mantenimiento y biblioteca por la colaboración eficiente en sus tareas específicas. En especial al Ing. Jorge Pinto por el entusiasmo puesto al ayudar en la conexión del espectrofotómetro a la computadora. A Alejandra Raimondi por la amable ayuda en las corridas de FPLC en el primer año de la beca. A Susana Raffo (junto con Silvia Altabe y Antonio Uttaro) por el sabio asesoramiento en las cromatografías de papel.

A todas aquellas personas que entenderán que el agradecimiento volcado en estas páginas se refiere en forma específica sólo a la concreción del trabajo y a la escritura de la Tesis. Creo que la amistad y el compañerismo son demasiado valiosos como para ser comunicados y agradecidos sólo mediante un mensaje en un papel. En estos casos, siempre estuve agradecido pero espero haberlo demostrado en el momento oportuno.

Abreviaturas

ATP: Adenosina trifosfato

DHAP: Dihidroxiacetona fosfato

DTT: Ditionitrito

E4P: Eritrosa 4-fosfato

EDTA: Etilen diamino tetraacetato

EGTA: Etilenglicol-bis-(β -aminoetil eter)-N,N',N',tetraacetato

F6P: Fructosa 6-fosfato

FBP: Fructosa 1,6-bisfosfato

FBPasa: Fructosa-1,6-bisfosfatasa

Fd: Ferredoxina

GA3P: Gliceraldehído 3-fosfato

GA3PDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

NAD/NADH: Formas oxidada y reducida de la nicotinamida dinucleótido

NADP/NADPH: Formas oxidada y reducida de la nicotinamida
dinucleótido 2-fosfato

NaTCA: Tricloroacetato de sodio

Pi: Ortofosfato

3-PGA: 3-fosfoglicerato

PETS: Sistema fotosintético de transporte de electrones

PRK: Fosforibulokinasa

R5P: Ribosa 5-fosfato

Rubisco: Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa

RuBP: Ribulosa 1,5-bisfosfato

S7P: Sedoheptulosa 7-fosfato

SBP: Sedoheptulosa 1,7-bisfosfato

SBPasa: Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa

TNS: 2-(p-toluidinil)naftalen-6-sulfonato

Tris: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

TRX: Tiorredoxina

U.V.: Ultravioleta

Xu5P: Xilulosa 5-fosfato

Neologismos y palabras tomadas del inglés

Para una mejor comprensión de la presente tesis en algunos casos se utilizaron palabras extraídas del lenguaje inglés. Esto se realizó cuando el término es de amplia difusión en el ambiente científico y el intento de su traducción puede generar confusión o el neologismo acuñado no tiene una traducción muy difundida o exacta. En estos casos la palabra ha sido puesta en letra *italica* o "entre comillas".

Buffer: A veces traducida como solución reguladora, amortiguadora o tampón. Solución que permite controlar la concentración libre de un componente específico a pesar de que su concentración total cambie abruptamente (por ejemplo el pH, frente al agregado de un ácido o una base).

Quenching, quencher: Se refiere a la capacidad de un determinado compuesto para apagar, extinguir, cancelar o anular una señal medible. El término es ampliamente difundido en estudios de fluorescencia

Channeling: Término recientemente introducido para definir el pasaje de metabolitos del sitio activo de una enzima al de otra. Se comenta en el transcurso de la introducción.

Lag, Burst: Se refieren a un "retardo" y a una "aceleración" respectivamente, que se produce inicialmente en la curvas de producto vs. tiempo y se utilizan en la sección de activación de la enzima por FBP y Mg^{2+} . El concepto de estos términos se discute ampliamente en la introducción.

TEMARIO

Antecedentes Históricos sobre la Fotosíntesis

Reacciones de la Etapa Dependiente de Luz

La Fotosíntesis ocurre en membranas

Captación de la energía solar por la clorofila

Concepto de Centro de Reacción y Unidad Fotosintética

Reacciones en un fotosistema

Fotosíntesis en Plantas Verdes

Fotosistema II

Fotosistema I

Conexión de ambos fotosistemas por el citocromo bf

Síntesis de ATP

Fotofosforilación cíclica

Resumen de la etapa dependiente de luz

Ciclo de Benson y Calvin

Asimilación de CO₂

Rubisco

Reacción de Carboxilación

Reacción de Oxigenación

Formación de triosas fosfato y hexosas fosfato

Regeneración del aceptor del CO₂

Sistema Ferredoxina-Tiorredoxina

Ferredoxina

Ferredoxina-Tiorredoxina Reductasa

Tiorredoxina

Propiedades de las Enzimas Regulatorias

del Ciclo de Benson y Calvin

Histéresis Enzimática

Cinética de las enzimas cloroplásticas

Modulación de la actividad

Modulación por modificación de interacciones no-covalentes

Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GA3PDH)

Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa)

Otras enzimas

Modulación por modificaciones covalentes

Modulación por el sistema Ferredoxina-Tiorredoxina

Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GA3PDH)

Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa)

SBPasa

Fosforibulokinasa (PRK)

Modulación de la actividad Rubisco

Modulación de enzimas cloroplásticas por factores no fisiológicos

Participación de enzimas cloroplásticas en complejos supramoleculares.

Materiales

Métodos

Medición de masa de proteínas

Medición de la actividad enzimática por liberación de Pi:

Medición de actividad FBPasa acoplada a la reducción de NADP

Valoración de Pi hidrolizado en las curvas de velocidad vs.

[FBP]

Medición de Actividad con sustrato radiactivo

Determinación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa por ELISA

Estudios espectrofotométricos

Gráficos de Hidropatía

Estudios espectrofluorométricos:

Cálculo del parámetro "h" (exposición de tirosinas)

Regresión no lineal. Método de Gauss-Newton

Cálculo de los parámetros de la ecuación de Hill

Cálculo del Mg^{2+} libre en las curvas de actividad

Efecto del pH alcalino sobre la FBPasa de cloroplastos

Inactivación pH-dependiente de la FBPasa

Cromatografía de la FBPasa en columnas de filtración por geles.

Discusión

Acción de Aniones Caotrópicos sobre la FBPasa

Efecto sobre la actividad de la FBPasa

Acción del NaTCA sobre la fluorescencia intrínseca de la FBPasa

Respuesta de la fluorescencia del TNS frente al tricloroacetato en presencia de FBPasa

Espectro de cuarta derivada de la FBPasa

Efecto de los reductores sobre la FBPasa

Reversibilidad de acción del tricloroacetato

Hidrofobicidad de la FBPasa de cloroplastos

Discusión

Acción del 2-propanol sobre la FBPasa

Efecto del 2-propanol sobre la fluorescencia intrínseca

Efecto del 2-propanol sobre el espectro U.V. de la FBPasa

Estabilidad de la FBPasa

Efecto del FBP y el Ca^{2+} en la desnaturalización mediada por urea

Efecto del FBP y Ca^{2+} en los cambios inducidos por temperatura

Conclusión

Activación de la FBPasa por FBP y Mg^{2+}

Activación de la FBPasa por borohidruro de sodio

Conclusiones

Apéndice A

Apéndice B

Orden de reacción para una enzima con dos formas interconvertibles

Apéndice C

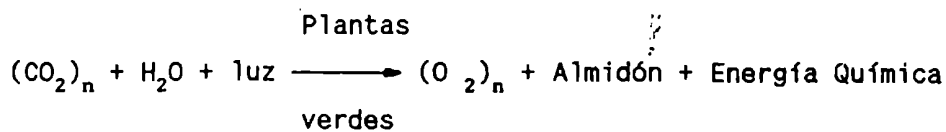
Referencias

ntroducción

ANTECEDENTES HISTORICOS SOBRE LA FOTOSINTESIS

Entre 1772 y 1775, el farmacéutico sueco Carl W. Scheele y el químico Joseph Priestley descubrieron el oxígeno en forma paralela [1] siendo este el punto de partida del estudio racional de la fotosíntesis. Posteriormente, Priestley realizó una serie de experimentos sobre combustión y respiración y llegó a la conclusión de que *las plantas verdes son capaces de revertir el proceso respiratorio de los animales*. El observó que en un recipiente cerrado una vela encendida puede arder sólo durante un cierto tiempo. En ese "aire" remanente no sólo la vela no puede seguir ardiendo sino que además un ratón se muere. Sin embargo, una rama verde de menta puede seguir viviendo en este ambiente residual por varias semanas. Pasado este tiempo, Joseph Priestley encontró que ahora una vela puede volver a arder y que un ratón puede volver a respirar en este aire "reactivado" por el vegetal [2]. Años después Ingenhouz descubrió la importancia de la luz solar en este fenómeno y que las partes verdes de la planta eran las responsables directas. En estos experimentos pioneros, se puso de manifiesto uno de los aspectos más importantes del proceso que hoy conocemos como fotosíntesis: *la capacidad de utilizar la energía solar para producir O₂, siendo este necesario para la respiración de los animales*. A partir de entonces, muchos experimentos importantes se llevaron a cabo para dilucidar los mecanismos fisiológicos que posibilitan este proceso que es propio de los vegetales y está ausente en los animales [3].

Durante el siglo pasado, se encontró que las plantas consumen CO₂ y H₂O. Además, la sustancia verde responsable de todas las observaciones mencionadas fue aislada y denominada *clorofila*. Se demostró que hay formación de materia orgánica, que ésta es almidón y además que por cada molécula de CO₂ consumido se produce una de O₂. Teniendo en cuenta estos datos y el concepto introducido por Mayer en 1845 según el cual *las plantas eran capaces de transformar la energía de la luz solar en energía química*, lo que se sabía de la fotosíntesis a principio de siglo podía resumirse en la siguiente ecuación:



A esta altura ya se había puesto de manifiesto otro de los aspectos importantes de la fotosíntesis: los organismos que la realizan tienen *la capacidad de armar compuestos orgánicos usando como ladrillo elemental el CO_2 y la capacidad de captar la energía proveniente del exterior del planeta*. Esta energía (luz solar) se transforma en energía química disponible para ser utilizada por el resto de los seres vivos, fotosintéticos o no. En ese momento ya se conocía cualitativamente cuáles eran los factores más importantes que intervenían en la reacción fotosintética. Paulatinamente, se fueron realizando mayor número de experimentos con el objetivo de cuantificar el proceso.

La fotosíntesis está controlada por *factores externos* determinados por el medio circundante y por los *factores internos* determinados por el código genético. Desde un punto de vista cuantitativo, los factores externos a la célula influyen significativamente sobre el proceso fotosintético. Este, depende no sólo de la intensidad de luz sino también de su composición espectral, la temperatura ambiente y la concentración de CO_2 en la atmósfera circundante. La velocidad de fotosíntesis puede valorarse midiendo el O_2 producido en función del tiempo. Experimentos hechos midiendo esta producción, en función de las variables antes mencionadas, permitieron realizar observaciones de gran trascendencia para la comprensión del proceso fotosintético.

A bajas intensidades luminosas, la velocidad de fotosíntesis se incrementa linealmente con la intensidad de luz. Esta zona se conoce como la *región de luz limitante*. Al seguir incrementando la intensidad, la fotosíntesis aumenta en forma no lineal, hasta que se alcanza una zona en la cual cualquier aumento en la intensidad de luz no induce ningún cambio en la producción de O_2 . Esta región de la curva con forma de meseta es la zona de *saturación de luz*. Si aquí se desea aumentar la velocidad de fotosíntesis, otros factores deberían ser tenidos en cuenta además de la intensidad de luz.

En la zona de saturación de luz, un aumento de la temperatura produce un incremento en la velocidad de fotosíntesis. Sin embargo, cambios de temperatura en la zona de luz limitante no producen ninguna variación. Esto coincide con el hecho de que las reacciones fotoquímicas verdaderas no son sensibles a la temperatura. Al mismo tiempo quiere decir, que en la zona de saturación de luz otros factores influyen en la fotosíntesis además de la simple absorción de un fotón. En la mayoría de las plantas verdes estos procesos funcionan adecuadamente entre 10°C y 35°C con un óptimo a 25°C.

La variación de la concentración de CO₂ en la zona de luz limitante no afecta a la velocidad de fotosíntesis lo cual sugiere que este no participa directamente en la reacción fotoquímica. Sin embargo, a altas intensidades lumínicas, la fotosíntesis se incrementa al aumentar el CO₂ presente. Buenas velocidades de fotosíntesis se obtienen a 0.1% de CO₂ pero valores excesivamente grandes dañan las hojas. Teniendo en cuenta que las plantas crecen en una intensidad luminosa suficiente para saturar la capacidad fotosintética (excepto p.e. en bosques frondosos) y que el contenido de CO₂ en la atmósfera es de 0.035%, podemos inferir que en general, las plantas no disponen del CO₂ suficiente para aprovechar toda la luz del sol que incide sobre ellas. La suma de los efectos de la [CO₂], temperatura e intensidad luminosa se ilustran en la fig. 1.

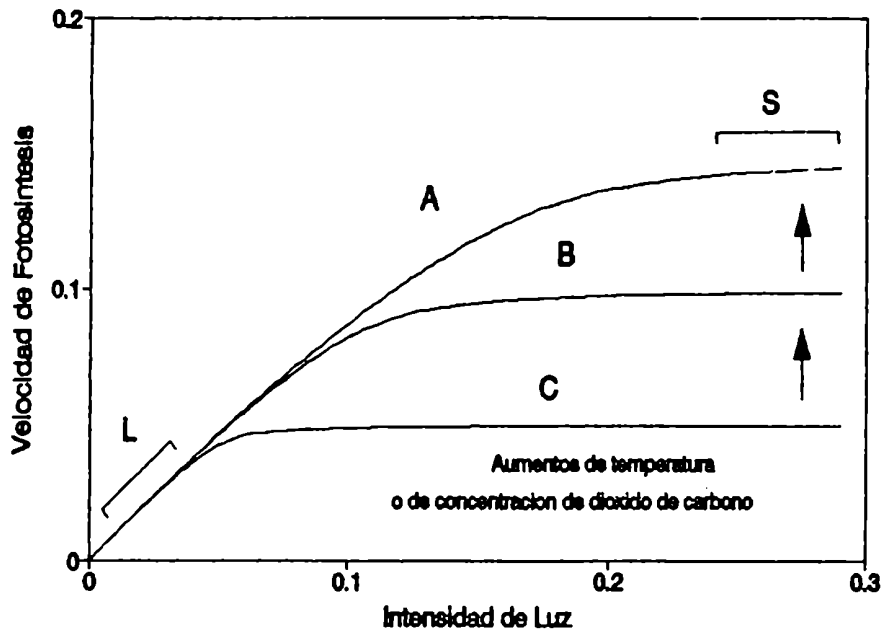


Figura 1. Influencia de diversos factores sobre la fotosíntesis. En este gráfico se observa la velocidad de fotosíntesis medida como producción de O_2 en función de la intensidad de luz. Ambas variables se expresan en unidades arbitrarias. La zona indicada por la letra L es la zona de luz limitante. La zona indicada por la letra S es la zona de saturación de luz. Las curvas A y B se pueden obtener a partir de la condición C, aumentando la concentración de CO_2 , la temperatura o ambas.

Ya en 1905 el fisiólogo vegetal F. F. Blackman [5] interpretó que la forma de las curvas de saturación por luz sugería que la fotosíntesis era un mecanismo de dos pasos que involucra una reacción fotoquímica y una no fotoquímica o reacción *oscura*. Al ser la reacción fotoquímica más rápida que la *oscura*, a altas intensidades de luz la velocidad fotosintética es dependiente en forma exclusiva de esta última etapa.

A continuación se describirán los procesos que se llevan a cabo en las dos etapas, tanto en la dependiente de luz (fotoquímica o *clara*) como en la que se asimila el CO_2 (etapa *oscura* o ciclo de Benson-Calvin). Por otra parte, los factores intrínsecos relevantes a la asimilación fotosintética de CO_2 también son considerados en los párrafos siguientes de esta introducción.

REACCIONES DE LA ETAPA DEPENDIENTE DE LUZ

La Fotosíntesis ocurre en membranas

Los experimentos realizados por D. Arnon [4] se tuvieron que confirmar que en las plantas verdes las reacciones de la fotosíntesis se producen totalmente en organelas especializadas denominadas *cloroplastos*. En la figura 2 se observa el esquema de un cloroplasto. Estos tienen dos membranas externas y una extensa membrana interna denominada membrana *tilacoide*. En las micrografías de cloroplastos seccionados, la membrana tilacoide parece conformar un gran número de vesículas achatadas, aunque es probable que sea una sola membrana altamente plegada. Al cerrarse sobre sí misma la membrana delimita dos compartimentos; una parte interna a los tilacoides (*lumen*) y otra externa a los mismos denominada *estroma*. En ciertos lugares esta membrana está muy apilada en estructura llamada *grana*. La clorofila en los cloroplastos está unida a proteínas hidrofóbicas en la membrana tilacoide y es aquí donde ocurren las reacciones fotoquímicas (absorción de luz y transformación en energía química). Además, en la membrana tilacoide hay transportadores de electrones y una ATPasa similar a la H⁺-ATPasa mitocondrial. Las enzimas responsables de la asimilación de CO₂ propiamente dicha y de la síntesis de hidratos de carbono son proteínas aparentemente solubles y residen en el *estroma* que rodea la membrana tilacoide. En las bacterias fotosintéticas las reacciones fotoquímicas se producen en la membrana plasmática.

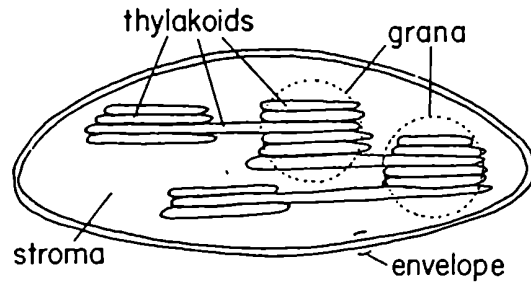


Figura 2. Esquema de la organización de un cloroplasto de hojas de plantas superiores. El cloroplasto está rodeado por una cubierta compuesta por dos membranas. Los tilacoides son vesículas achatadas de membrana que no están conectadas con la cubierta exterior y residen dentro de la parte soluble o estroma. Al mismo tiempo, existen dos zonas diferentes en los tilacoides: Unas apiladas en forma regular o granas y otras zonas no apiladas que conectan las anteriores.

Captación de la energía solar por la clorofila

El primer paso importante en la fotosíntesis es la absorción de luz por una molécula fotorreceptora. El principal fotorreceptor de las plantas verdes es una dihidroporfirina sustituida denominada *clorofila a*. En esta molécula, los cuatro átomos de nitrógeno coordinan a un átomo de magnesio. Otra característica es la presencia de fitol, un alcohol de 20 carbonos altamente hidrofóbico que esterifica una cadena lateral ácida. La clorofila *b* difiere de la *a* en que tiene un grupo formilo en lugar de un metilo en uno de sus pirroles. Estas moléculas son efectivas como fotorreceptores porque tienen una alta proporción de dobles enlaces conjugados. Además, tienen fuertes bandas de absorción en la región visible del espectro, donde es máxima la intensidad de luz que llega del sol. De hecho, la absorción molar máxima de las clorofila *a* y *b* son mayores que $10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ siendo de las más altas que se han observado para compuestos orgánicos. Estas dos moléculas poseen espectros de absorción ligeramente desplazados; de esta manera, se complementan entre sí para abarcar un rango mayor de longitudes de onda. Así, la luz del sol que no es absorbida por una de ellas es absorbida por el otro tipo de clorofila.

Concepto de Centro de Reacción y Unidad Fotosintética

En experimentos hechos en 1932 por R. Emerson y W. Arnold se observó que el rendimiento de la fotosíntesis era mucho menor al esperado. En las condiciones más favorables sólo una molécula de O_2 era producida por cada 2500 moléculas de clorofila por cada flash de luz. Hans Gaffron [5] propuso que la luz es absorbida por cientos de moléculas de clorofila, y que luego estas transfieren su energía de excitación a un sitio en el cual la reacción química ocurre. Actualmente este sitio se denomina *Centro de Reacción*. Así, muchas moléculas de clorofila absorben luz pero sólo una proporción de ellas, las del centro de reacción, median la transformación de luz en energía química. Las moléculas de clorofila que absorben la luz y que transmiten esta energía al centro de reacción forman parte de los sistemas colectores de luz o *antena*. Todas las moléculas de clorofila, las del centro de reacción junto con aquellas que le transfieren la excitación lumínica, constituyen una *unidad fotosintética* o *fotosistema*. En las clorofilas ubicadas en el centro de reacción el nivel de energía del electrón excitado (promovido por la absorción de un fotón) es más bajo que en las otras, lo cual permite que este centro atrape la energía de excitación del resto de la unidad. La transferencia de energía por interacciones electromagnéticas entre las clorofilas y luego hacia el centro de reacción es muy rápida y del orden de picosegundos. De esta manera, podemos decir que los fotones absorbidos por muchas clorofilas son dirigidos como a través de un embudo hacia el centro de reacción donde recién allí se transformarán en energía química.

Reacciones en un fotosistema

Cuando un fotón es absorbido por un fotosistema, este es conducido al centro de reacción para producir las reacciones fotoquímicas. Allí, un electrón de una molécula de clorofila es excitado y promovido a un nivel de energía superior. En estas condiciones, la molécula de clorofila excitada tiene una gran tendencia para transferir este electrón; dicho de otro modo, posee un gran poder reductor. Así, reduce a un aceptor electrónico adecuado quedando la molécula de clorofila ionizada. Esta, a su vez es un oxidante fuerte pues presenta una gran avidez para tomar un electrón del medio. Entonces, frente a un dador adecuado, la clorofila vuelve a neutra-

lizarse y el dador es oxidado. Todo el ciclo vuelve a repetirse ante a una nueva absorción de un fotón. De este modo, la energía luminosa de un fotón se convierte en energía química porque se produce una molécula de un oxidante (dador electrónico oxidado) y una molécula de un reductor (aceptor electrónico reducido). Esto puede ser ejemplificado en la fig. 3. Un fotosistema hace las veces de una célula fotovoltaica que se lleva a cabo una reacción en contra del potencial químico con lo cual genera una diferencia de potencial (pila). Este proceso guarda similitud con lo que sucede en la electrólisis del agua donde a expensas de la energía eléctrica se genera O_2 y H_2 .

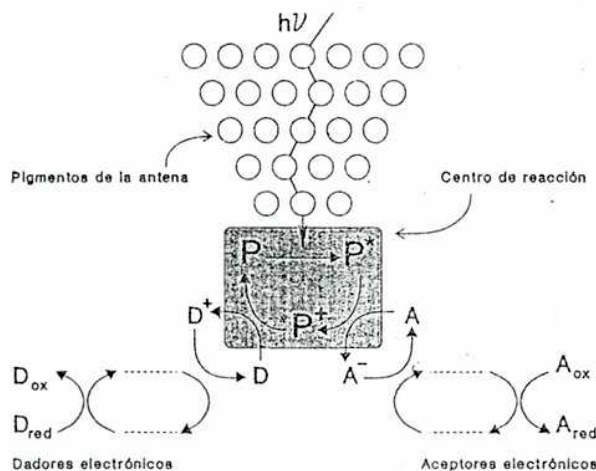
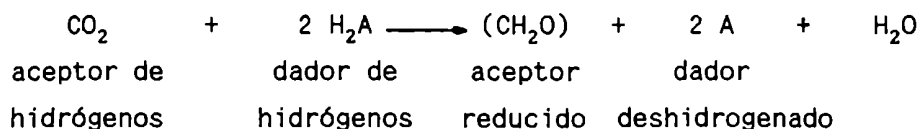


Figura 3. Acción de la luz sobre un fotosistema. P: Pigmento del centro de reacción (Chl). P*: Pigmento excitado. P+: Pigmento oxidado. A: Aceptor de electrones. D: Dador de electrones.

Van Niel sugirió que la esencia de la fotosíntesis, tanto en plantas como en bacterias, es la generación fotoquímica del poder reductor para llevar a cabo procesos anabólicos. Simultáneamente, también se generan compuestos oxidantes. Esta conclusión fue tomada luego de observar que ciertas bacterias fotosintéticas convierten H_2S en azufre en presencia de luz. Van Niel percibió un patrón común en las reacciones generales llevadas a cabo por las plantas verdes y aquellas bacterias [6].



El azufre formado por las bacterias fotosintéticas es análogo al oxígeno producido en las plantas. Entonces, Van Niel propuso un esquema general para el proceso:



De esta manera la fotosíntesis en plantas podría ser formulada como una reacción en la cual el CO_2 es reducido por el hidrógeno derivado del H_2O con la simultánea producción de oxígeno. Bajo esta hipótesis, el O_2 producido debería provenir del H_2O . Esto pudo ser confirmado en la década del cuarenta gracias a la disponibilidad del ^{18}O .

Los experimentos de Robert Hill en 1937 [4] apoyaron las ideas anteriores. El observó que los cloroplastos aislados producen O_2 cuando son iluminados en presencia de un aceptor electrónico adecuado; por ejemplo, el ferricianuro que se reduce a ferrocianuro. De esta manera se demostró que la producción de O_2 puede ocurrir sin que el CO_2 se reduzca. En este caso el ferricianuro actuó como aceptor final de electrones en lugar del CO_2 . Otra conclusión fue que al no estar presente el CO_2 , el O_2 producido debe provenir del H_2O . Queda aquí en evidencia que el evento primario en la fotosíntesis es la transferencia mediada por luz de un electrón de una sustancia a otra, en contra del potencial químico.

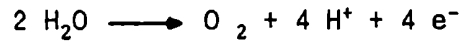
Fotosíntesis en Plantas Verdes

El proceso de fotosíntesis en los cloroplastos depende de dos fotosistemas conectados como dos pilas en serie. El fotosistema I puede ser excitado con longitudes de onda menores a 700 nm y genera un reductor fuerte que conduce a la formación de NADPH. El fotosistema II requiere fotones de longitud de onda menores a 680 nm y produce un oxidante fuerte que conduce a la formación de O_2 . Por otro lado el fotosistema I produce un oxidante débil y el II un reductor débil. La interacción de estos dos produce un gradiente protónico que luego generará ATP. Este proceso de síntesis de ATP se denomina *Fotofosforilación*.

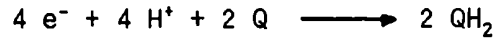
Fotosistema II

El fotosistema II es una estructura transmembrana de más de 10 cadenas polipeptídicas que cataliza la transferencia de electrones conducida por luz desde el agua a la plastoquinona. Esta se encuentra entre un estado oxidado (Q) y uno reducido denominado plastoquinol (QH₂). Para poder reducirla se necesitan dos electrones. Aquí, el intermediario de reducción es un radical libre semiquinona (QH•). Los protones necesarios para neutralizar la quinona cuando capta electrones provienen de la cara externa del tilacoide, es decir, del estroma. En cambio los protones producidos en la oxidación del H₂O quedan en la parte interna del tilacoide. Por este motivo, éste es uno de los puntos que genera una diferencia de pH entre los compartimentos, el intratilacoideo y el estroma. Las dos semirreacciones generadas en el fotosistema II son:

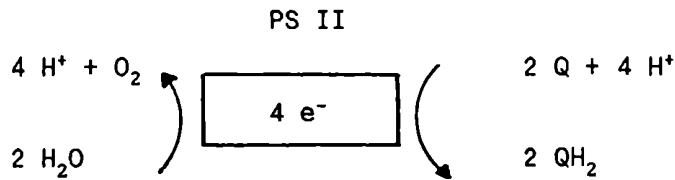
Espacio intratilacoideo:



Estroma:



Siendo la reacción general:



El fotosistema II consiste de un complejo colector de luz o LHC II (*Light Harvesting complex*), un núcleo con el centro de reacción y un complejo productor de oxígeno. El LHC II contiene cerca de 200 moléculas de clorofila *a* y *b* unidas a varias cadenas polipeptídicas y el núcleo tiene unas 50 moléculas adicionales de clorofila *a*. La excitación electrónica es dirigida a través del LHC II hacia la clorofila del centro de reacción denominada P680 (P de pigmento, 680 es la longitud de onda de máxima absorción en nm). Este pigmento en el estado excitado (P680*) es un reduc-

tor muy fuerte y cede un electrón a la feofitina (una molécula de porfirina como la clorofila en la cual el 2H^+ reemplazan al Mg^{2+}). Entonces, el P680^* queda como P680^+ convirtiéndose así en un oxidante fuerte.

El electrón donado a la feofitina es cedido a una plastoquinona que permanece unida a una proteína denominada Q_A . Posteriormente, esta primer plastoquinona cede el electrón a una segunda que está unida a la proteína Q_B . Cuando recibe un segundo electrón, esta segunda quinona es liberada al espacio hidrofóbico de la membrana. La captación simultánea de 2H^+ del estroma genera la forma reducida de la quinona (QH_2) o plastoquinol que es el producto final de reducción del fotosistema II.

La otra semirreacción del fotosistema II se produce cuando se genera el P680^+ . Este retorna a su estado basal por una enzima que contiene 4 iones Mn^{2+} en su centro catalítico. Este complejo de Mn^{2+} es oxidado por el P680^+ en varios pasos tomando cuatro electrones del mismo. 2 moléculas de H_2O ceden estos electrones liberándose una molécula de O_2 y 4H^+ .

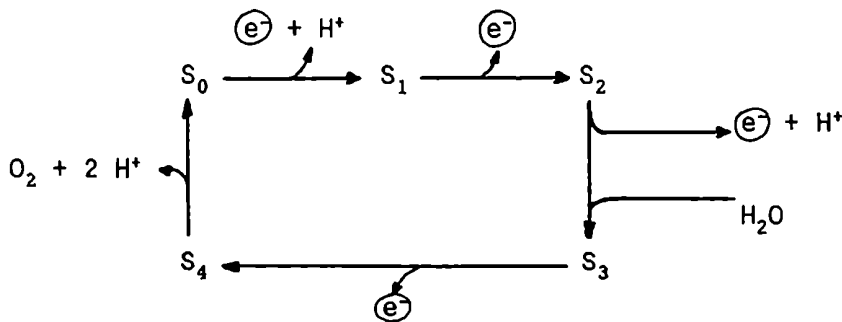


Figura 4. Modelo de la división del Agua. El centro de manganeso del PS II cataliza la secuencia de reacciones del esquema. La toma de 4 electrones por P680^+ conduce a la formación de O_2 y 4H^+ intratilacoidales a partir de agua. S_0 , S_1 , S_2 , S_3 , y S_4 son distintas estructuras que toma el centro de Mn.

Fotosistema I

El fotosistema I es un complejo transmembrana compuesto de por lo menos 13 cadenas polipeptídicas. La luz es captada por un complejo proteico (LHC I, *Light harvesting complex I*) que contiene 70 moléculas de clorofila *a* y *b* y también por una antena núcleo con 130 moléculas de clo-

rofila α . Luego, los fotones se dirigen al centro de reacción donde se encuentra el P700 (*Pigmento* clorofílico de absorción máxima a 700 nm). Cuando el P700 es excitado por un fotón, se forma un reductor fuerte que es el P700* excitado, el cual posee la capacidad de ceder un electrón a un aceptor de clorofila denominado A_0 . Así, se obtiene A_0^- y $P700^+$. El potencial redox de A_0^- ($E_0' = -1.1 V$) la convierte en la biomolécula más reductora conocida. El catión $P700^+$ revierte a su estado basal por captura de un electrón de la plastocianina reducida (proteína de la membrana tilacoide cuyo grupo redox contiene al Cu^+/Cu^{2+}). Ahora, el P700 puede volver a absorber un fotón. Mientras, el camino de los electrones cedidos por este P700 prosigue de la siguiente forma: El aceptor A_0^- traspasa el electrón a A_1 y luego a una serie de centros conteniendo hierro-azufre hasta que finalmente reduce a la *ferredoxina*. Esta es una proteína de 12 KDa que contiene un centro 2Fe-2S. Esta última reacción ocurre del lado estromático de la membrana tilacoide.

La reacción general del fotosistema I es:



El alto potencial electrónico de la ferredoxina es transferido luego al $NADP^+$ para formar NADPH en una reacción catalizada por la ferredoxina- $NADP^+$ reductasa. Dos moléculas de ferredoxina aportan un electrón cada una para reducir una molécula de $NADP^+$ con la incorporación de un protón de la solución. Como esta reacción ocurre del lado estromático de la membrana, la toma de un protón contribuye a la generación de un gradiente protónico a través de la membrana.

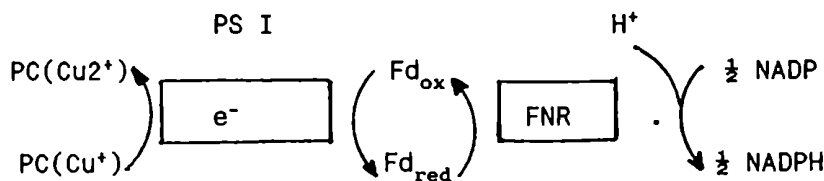
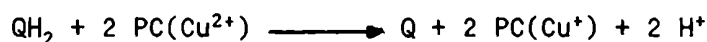


Fig 5. Esquema general de oxidorreducción del fotosistema I y ferredoxina-NADP reductasa. FNR: Ferredoxina-NADP reductasa, Fd: Ferredoxina, PC: Plastocianina.

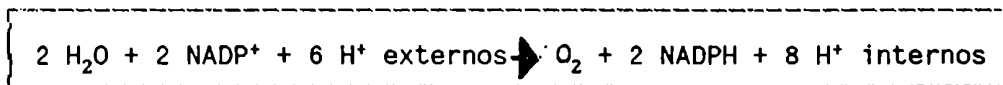
Conexión de ambos fotosistemas por el citocromo bf

El complejo del citocromo *bf* consiste de 4 subunidades: *cyt f* de 34 KDa, *cyt b₅₆₃* de 23 KDa, una proteína Fe-S de 20 KDa y una cadena polipeptídica de 17 KDa. Los dos fotosistemas están conectados por este complejo pues los electrones fluyen a través del mismo desde el fotosistema II hacia el fotosistema I. El complejo del citocromo *bf* cataliza la transferencia de electrones del plastoquinol (QH₂) a la plastocianina (PC). El plastoquinol (reductor débil) es el producto reducido del fotosistema II y la plastocianina (oxidante débil) es el producto oxidado del fotosistema I.



El citocromo *b* permite que un transportador de dos electrones (plastoquinol) interactúe con un transportador de un solo electrón que es el centro Fe-S de uno de los componentes del complejo. Aquí, en esta transferencia, el protón liberado es bombeado al espacio interior del tilacoide, siendo este punto clave para la formación del gradiente protónico. Luego, los electrones fluyen del centro Fe-S a la plastocianina, uniendo finalmente ambos fotosistemas.

La reacción neta entre ambos fotosistemas es:



El esquema general de las reacciones de los dos fotosistemas se resume en el denominado *esquema Z* por R. Hill [7,8] en la fig. 6.

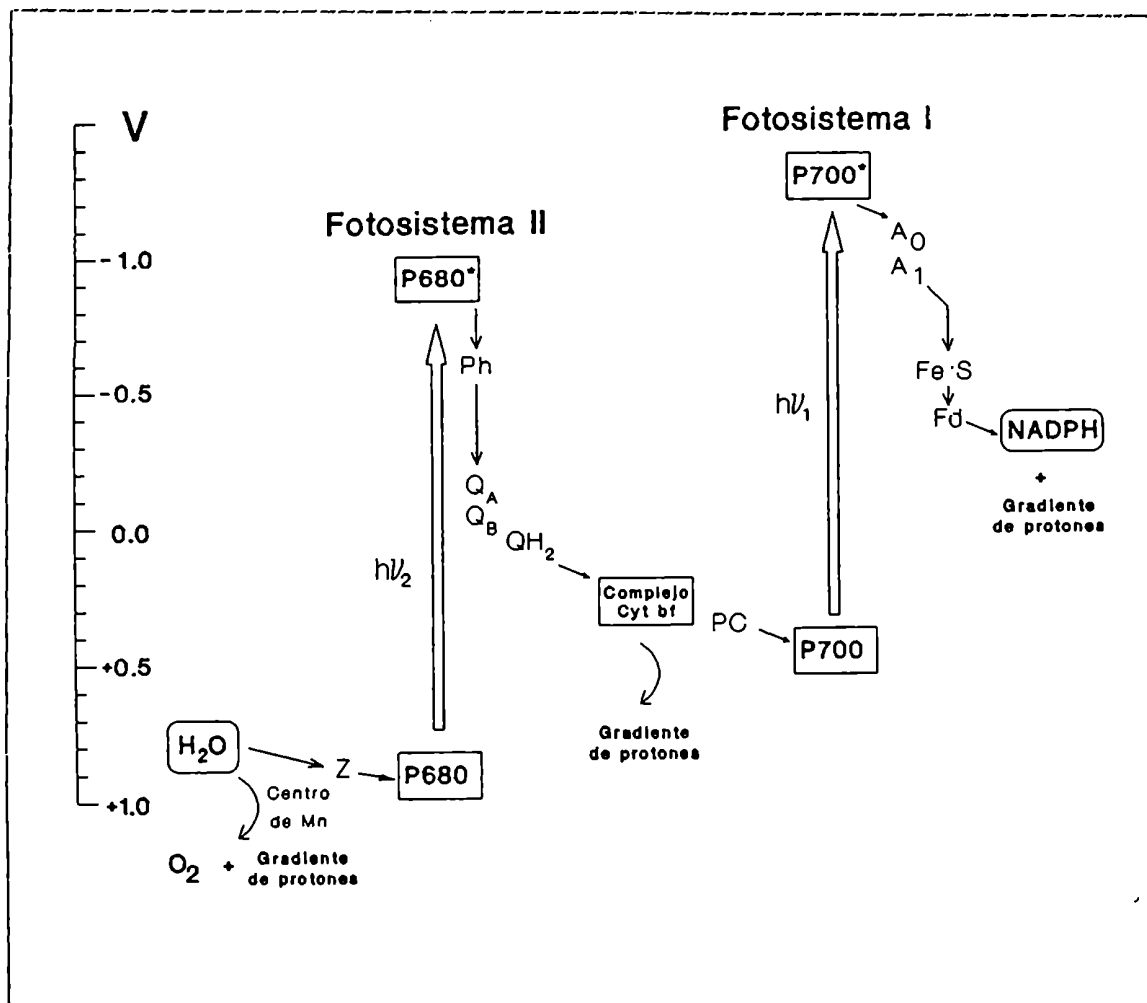


Figura 6. Esquema Z de la fotosíntesis. Este esquema representa el potencial de reducción de los diversos intermediarios en el transporte electrónico en y entre los fotosistemas I y II. P680: Pigmento de absorción a 680 nm. Clorofila del centro de reacción del fotosistema II. P680^{*}: P680 excitado. P700: Pigmento de absorción a 700 nm. Clorofila del centro de reacción del fotosistema I. P700^{*}: P700 excitado. Ph: Feofitina. Q_A, Q_B: Plastoquinonas unidas a proteínas A y B. QH₂: Plastoquinona. Cyt bf: Citocromo b y f. PC: Plastocianina. A₀, A₁: Aceptores electrónicos del fotosistema I. Fe-S: Transportador electrónico cuyo centro activo contiene Fe y S. Fd: Ferredoxina. Centro de Mn: Centro activo del complejo productor de O₂. Z: Intermediario entre el último y el centro de reacción del fotosistema II.

Síntesis de ATP

Los dos fotosistemas funcionan como dos pilas conectadas en serie que llevan a cabo un proceso de electrólisis en dos semipilas diferentes. Una de ellas se ubica en el espacio intratilacoideo y oxida el H₂O a O₂, en

tanto la otra se encuentra en el estroma y reduce el NADP^+ a NADPH , en un proceso que genera una acumulación de cargas positivas dentro del tilacoide en forma de H^+ . Como en toda electrólisis es necesario formar un puente salino entre las dos semipilas permitiendo que estas cargas fluyan y así, cerrar el circuito para permitir un flujo continuo de corriente. Este puente salino puede estar o no ligado al aprovechamiento de energía. En el proceso fotosintético el transporte de cargas se logra en primer término por un flujo de moléculas cargadas como el Mg^{2+} y el Cl^- debido a que la membrana tilacoidal es bastante permeable a estos iones. Esto genera electroneutralidad entre los dos compartimentos. De todos modos, persiste un gradiente de concentración de H^+ ahora equilibrado por un gradiente de Mg^{2+} del otro lado de la membrana. Existe un transportador de H^+ que regula este desequilibrio generado por el proceso fotosintético. La H^+ -ATPasa transporta H^+ del espacio intratilacoideo al estromático aprovechando la energía de este proceso para la síntesis de ATP. Al mismo tiempo la transferencia de 2 H^+ por este proceso es acompañada por el movimiento de dos Cl^- en la misma dirección o de una molécula de Mg^{2+} en la contraria. Este último evento es necesario para cerrar completamente el ciclo por el cual un gradiente químico (H^+) a través de una membrana es transformado en energía química (ATP) aprovechable para la célula. La síntesis de ATP en los cloroplastos constituye un excelente ejemplo de la teoría *quimiosmótica* desarrollada por Mitchell [9] y hoy aceptada ampliamente. El circuito de H^+ que conduce a la síntesis de ATP se observa en la figura 7.

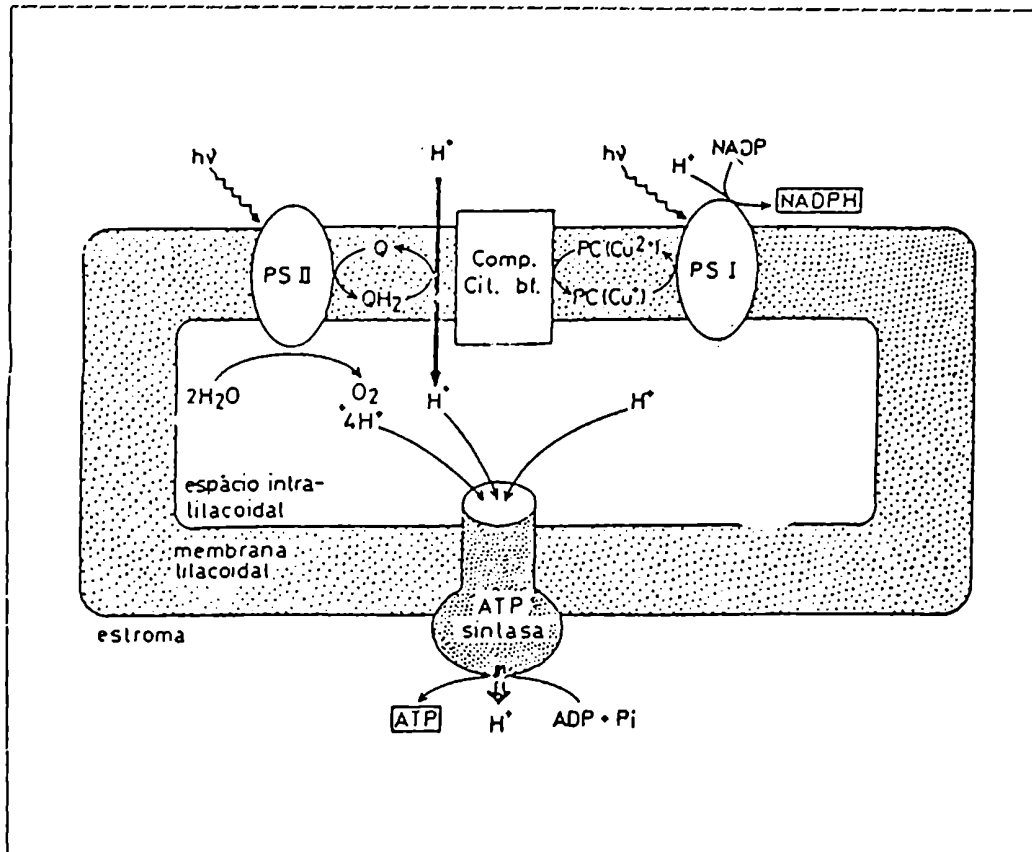


Figura 7. Síntesis de ATP. En el esquema se puede observar el circuito de H^+ que posibilita la síntesis de ATP. PS I, PS II: Fotosistemas 1 y 2. Q/QH₂: Plastoquinona/Plastoquinol. PC: Plastocianina.

La H^+ -ATPasa o ATP-Sintetasa de cloroplastos es también denominada complejo CF_1 - CF_0 y se asemeja al complejo mitocondrial F_1 - F_0 que participa en la fosforilación oxidativa. El CF_0 se encuentra en la membrana y conduce los protones a través de ella. El canal protónico está probablemente formado por un hexámero de cadenas de 8 KDa. De la misma manera que el F_1 , el CF_1 cataliza la formación de ATP a partir de ADP. El CF_1 tiene una composición $\alpha_3\beta_3\Gamma\delta\epsilon$. Las unidades α y β contienen los sitios de unión y catalíticos de ATP y ADP. La subunidad δ une el CF_1 al CF_0 y la subunidad Γ controla el flujo de protones. La subunidad ϵ inhibe la reacción catalítica del complejo en la oscuridad, hecho necesario para que no se produzca hidrólisis de ATP cuando no hay gradiente protónico. Un aspecto para destacar es que el CF_1 se encuentra en la cara estromática de la membrana tilacoidal, con lo cual el ATP sintetizado participa en las reacciones que tienen lugar en el estroma. Así, ambos productos de la foto-

síntesis, el ATP y el NADPH, serán las materias primas energéticas para la construcción en el estroma de esqueletos carbonados a partir de CO_2 .

Fotofosforilación cíclica

Un camino alternativo para los electrones provenientes del fotosistema I (P700) constituye lo que se denomina como *fotofosforilación cíclica*. El alto potencial de los electrones en la ferredoxina puede ser transferido al citocromo *bf* en lugar del NADP^+ . Este a su vez puede volver a reducir al P700^+ oxidado a través de la plastocianina. Como resultado final, este flujo de electrones cíclico permite solo el bombeo de protones a través del complejo del citocromo *bf*. Esto contribuye a la formación del gradiente protónico que luego conducirá a la síntesis de ATP. En este caso, el ATP es formado sin la reducción del NADP^+ y como el fotosistema II no participa, tampoco hay formación de O_2 . Todo este camino procede como una alternativa para aprovechar la energía de los electrones excitados del fotosistema I cuando no existe NADP^+ disponible en el medio.

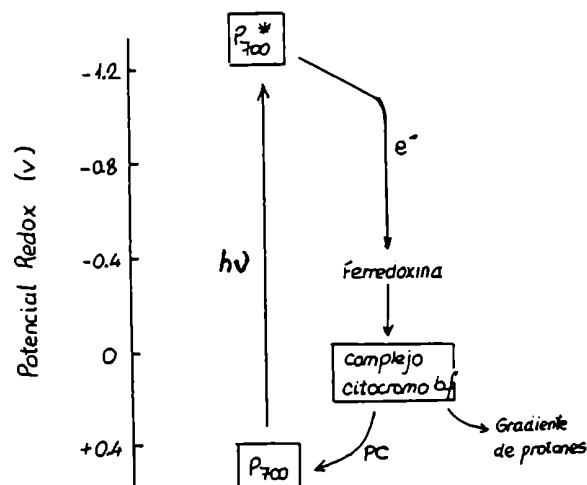


Fig 8. Fotofosforilación Cíclica. P700 : Pigmento de absorción a 700 nm. P700^* : P700 excitado. PC: Plastocianina. Cyt *bf*: complejo de citocromo *bf*.

Resumen de la etapa dependiente de luz

Luego de haber presentado las reacciones que ocurren en la *etapa dependiente de luz* podemos resumir los principales cambios que ocurren en el estroma del cloroplasto cuando este es iluminado:

1) *Aumento de la relación NADPH/NADP.* La ferredoxina transfiere electrones al NADP, reduciéndolo a NADPH. Este último es un producto final de toda la transferencia fotosintética de electrones.

2) *Aumento del pH.* Se origina como consecuencia del pasaje de H^+ del estroma al lumen del tilacoide acoplado al transporte electrónico.

3) *Aumento de la concentración de Mg^{2+} .* El pasaje de Mg^{2+} del lumen intratilacoideo hacia el estroma compensa la diferencia de cargas generada por la entrada de H^+ al lumen.

4) *Aumento de la concentración de ATP.* Se sintetiza aprovechando la diferencia de concentración de H^+ entre ambas caras de la membrana tilacoidal.

A estos procesos que conforman los cambios más importantes que la luz provoca en el estroma es necesario añadir:

5) *Aumento de la concentración de tiorredoxina reducida.* La ferredoxina además de reducir al NADP, también reduce una proteína de bajo peso molecular denominada tiorredoxina. (ver más adelante sección sistema ferredoxina-tiorredoxina).

El NADPH y el ATP serán los componentes energéticos principales para la asimilación de CO_2 (son sustratos de varias reacciones) y los restantes se comportarán fundamentalmente como factores regulatorios de ciertas enzimas del ciclo de Benson y Calvin que se describirá en la próxima sección.

CICLO DE BENSON Y CALVIN

La asimilación fotosintética de CO_2 en el ciclo de Benson y Calvin puede dividirse en diversas etapas. La primera sería de asimilación de CO_2 propiamente dicha. La siguiente es una etapa reductiva por la cual se obtienen triosas fosfato. Estas son usadas por la célula para aprovechar el CO_2 asimilado. De esta manera, parte del carbono incorporado sale del ciclo para entrar a otros caminos metabólicos. Finalmente, hay una etapa regenerativa que restituye el aceptor primario del CO_2 . Al principio de esta última etapa se obtienen hexosas fosfato que al igual que las triosas fosfato sirven para la utilización del CO_2 que fue asimilado. A continuación a partir de las hexosas fosfato y triosas fosfato formadas se regenera el aceptor inicial del CO_2 .

ASIMILACION DE CO_2

El primer paso del ciclo de Benson-Calvin es el que involucra la asimilación de una molécula de CO_2 . En esta carboxilación se utiliza como aceptor un azúcar bisfosfato de 5 carbonos para dar finalmente dos moléculas de 3 carbonos (3-fosfoglicerato o 3-PGA). Esta reacción es catalizada por una enzima denominada Ribulosa-1,5-bisfosfato Carboxilasa (Rubisco).

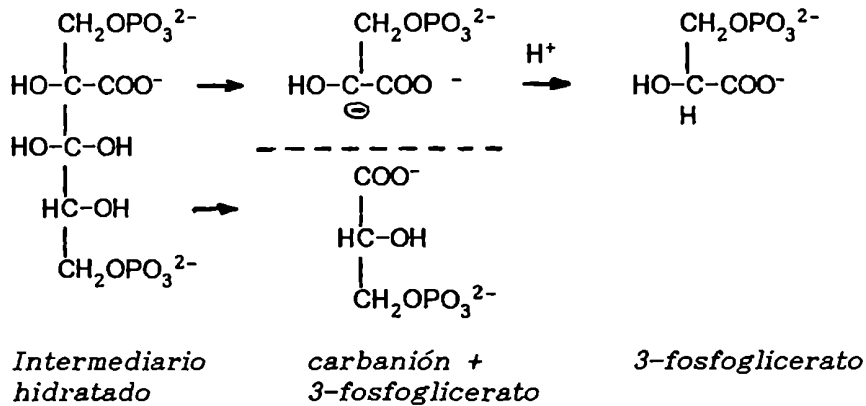
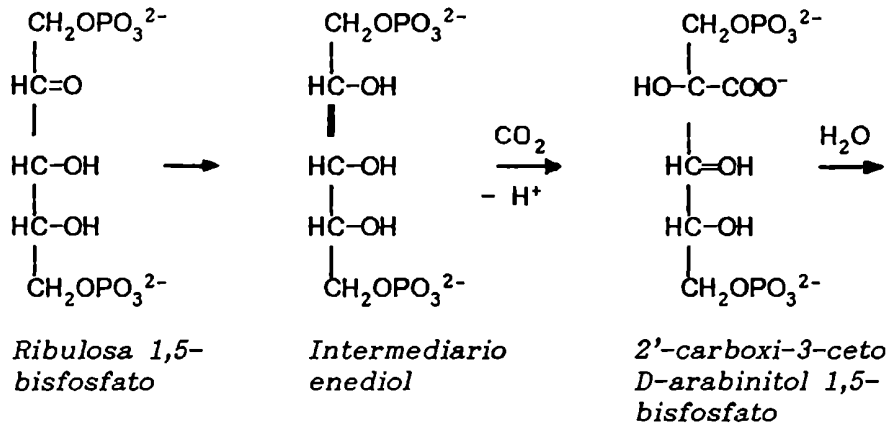
Rubisco

Esta enzima está compuesta de 8 subunidades grandes (L, 56 KDa) y ocho pequeñas (S, 14 KDa). Cada subunidad L contiene un sitio regulatorio y un sitio catalítico. El rol de las subunidades S es todavía desconocido. Esta enzima es muy abundante en los cloroplastos, constituyendo el 16% de la proteína total. De hecho, la Rubisco es probablemente la proteína más abundante en la biósfera [10].

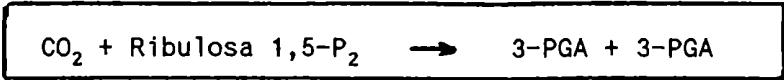
Reacción de Carboxilación

El primer paso en la reacción catalizada por la Rubisco es la formación de un intermediario enediol a partir de la ribulosa 1,5-bisfosfato

(RuBP), el cual luego reacciona con el CO₂ para producir un intermediario de 6 carbonos (2'-carboxi-3-ceto-D-arabinitol 1,5-bisfosfato). La hidratación de esta especie produce un diol en el carbono 3. El clivaje posterior de un enlace C-C origina una molécula de 3-PGA y el carbanión de una segunda. Esta especie se convierte en otra molécula de 3-PGA por la protonación del mismo [50].

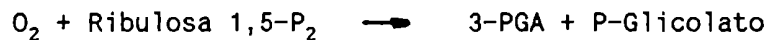


La reacción general tiene una gran variación de energía libre (G= - 12.4 Kcal/mol) lo cual la hace esencialmente irreversible.



Reacción de Oxigenación

La Rubisco es además una oxigenasa, pues cataliza la adición de O_2 a la RuBP para formar fosfoglicolato y 3-PGA. Esta reacción transcurre en el sitio activo utilizado por el CO_2 , con lo cual compete con la carboxilación. En realidad esta es una reacción colateral de la enzima pues se obtiene un producto (fosfoglicolato) que no es muy útil desde un punto de vista metabólico.

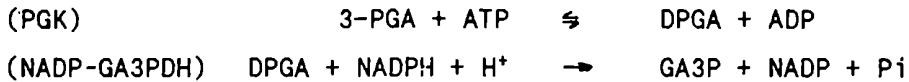


Parte del esqueleto carbonado del fosfoglicolato puede ser recuperado como energía en un camino metabólico denominado *fotorrespiración*. Por medio de una fosfatasa se obtiene glicolato que posteriormente entra a los peroxisomas para ser oxidado a glioxilato por una glicolato oxidasa. El glioxilato puede ser transaminado para obtener glicina. Luego, en las mitocondrias, a partir de 2 moléculas de glicina se obtiene serina con la liberación de CO_2 y NH_4^+ . El término fotorrespiración proviene del hecho de que se libera CO_2 y se consume O_2 en todo el proceso. Este proceso parece ser poco eficiente para la célula porque se desperdicia CO_2 sin producción de ATP o NADPH.

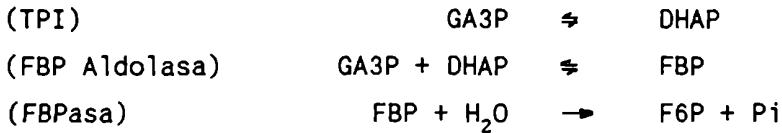
FORMACION DE TRIOSAS FOSFATO Y HEXOSAS FOSFATO

A partir del 3-PGA producido en la asimilación de CO_2 por la Rubisco, se forman triosas fosfato y posteriormente hexosas fosfato. Las reacciones que utiliza el cloroplasto para lograrlo son las mismas que las que existen en el camino gluconeogénico de los animales. Aquí la única diferencia es que la gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GA3PDH) de cloroplastos es específica para NADPH en lugar de serlo para NADH. Estas reacciones se detallan a continuación donde las enzimas son: PGK: *fosfoglicerato kinasa*, NADP-GA3PDH: *NADP-Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa*, TPI: *triosafosfato isomerasa*, FBPA: *fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa*, FBPa: *fructosa-1,6-bisfosfatasa*, y los intermediarios son FBP: *fructosa 1,6-bisfosfato*, F6P: *fructosa 6-fosfato*, DHAP: *dihidroxiacetona-fosfato*, GA3P: *gliceraldehído 3-fosfato*, 3-PGA: *glicerato 3-fosfato*, DPGA: *glicerato 1,3-bisfosfato*.

Fase Reductiva (formación de triosas fosfato)



Generación de hexosas fosfato

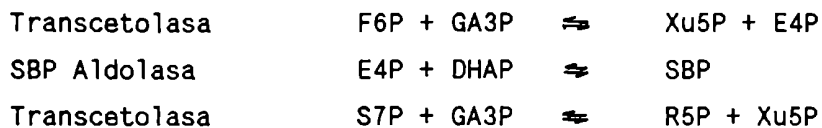


Las primeras dos reacciones de esta etapa constituyen la *fase reductiva* del ciclo de Benson-Calvin pues a partir del poder reductor generado por la luz (NADPH) el carbono asimilado es reducido para formar finalmente gliceraldehído 3-P (GA3P). La posibilidad posterior de formar hexosas-P es muy importante desde un punto de vista fisiológico. Tanto las triosas-P y las hexosas-P pueden ser utilizadas para almacenar energía y utilizar el carbono asimilado previamente. Las hexosas-P intervienen en la síntesis de almidón dentro del cloroplasto y las triosas-P pueden salir del cloroplasto traslocándose por Pi para luego entrar en otros caminos metabólicos en el citoplasma (por ejemplo la síntesis de sacarosa). Es decir, una parte de los azúcares fosfato son utilizados por la célula para la formación de estructuras y la obtención de energía. Por otra parte los azúcares fosfato son también usados para regenerar el aceptor del CO₂ y cerrar el ciclo. Por este último motivo las reacciones que involucran la obtención de hexosas fosfato junto con todos los pasos posteriores se han incluido siempre en una etapa denominada *fase regenerativa*.

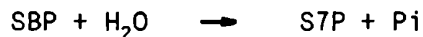
REGENERACION DEL ACEPTOR DEL CO₂

En esta etapa del ciclo de Benson y Calvin, el objeto es regenerar azúcares de 5 carbonos a partir de triosas-P y hexosas-P. Esto se logra por la acción de dos enzimas, la aldolasa y la transcetolasa. Esta última juega un rol importante en el ciclo de las pentosas. Es dependiente de tiamina pirofosfato (TPP) y transfiere una unidad de 2 carbonos de una cetosa a una aldosa. La Aldolasa lleva a cabo una condensación entre la dihidroxiacetona-P (DHAP) y un aldehído. Esta enzima es altamente especí-

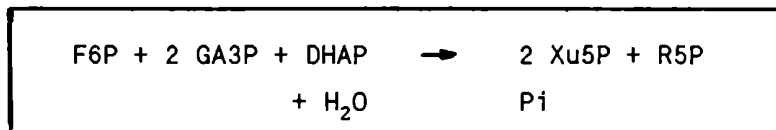
fica para DHAP pero acepta una gran variedad de aldehídos. Las reacciones catalizadas por estas enzimas son:



Donde Xu5P: xilulosa 5-P, E4P: eritrosa 4-P, SBP: sedoheptulosa 1,7-bisfosfato, S7P: sedoheptulosa 7-P, R5P: ribosa 5-P. Una sola reacción más es necesaria para reunir las 3 reacciones anteriores en una reacción general. La SBPasa cataliza la hidrólisis del SBP a S7P.



Entonces, el balance de estas cuatro reacciones es el siguiente:



Posteriormente los dos azúcares-P de 5 carbonos desembocan a un mismo producto: la ribulosa 5-P (Ru5P). Esto se realiza a partir de dos reacciones que también están presentes en el ciclo de las pentosas. La Xu5P lo hace a partir de una fosfopentosa epimerasa y la R5P a partir de una fosfopentosa isomerasa.



Este único producto de la fase regenerativa finalmente es convertido al aceptor del CO₂ (ribulosa 1,5-bisfosfato: RuBP) mediante la reacción catalizada por la fosforibulokinasa (PRK).



Esta enzima conjuntamente con la Rubisco, confieren al cloroplasto la característica de autótrofo (i.e., la capacidad de crecer utilizando CO₂ como única fuente de carbono). El esquema general del ciclo de Benson-Calvin se resume en la figura 9.

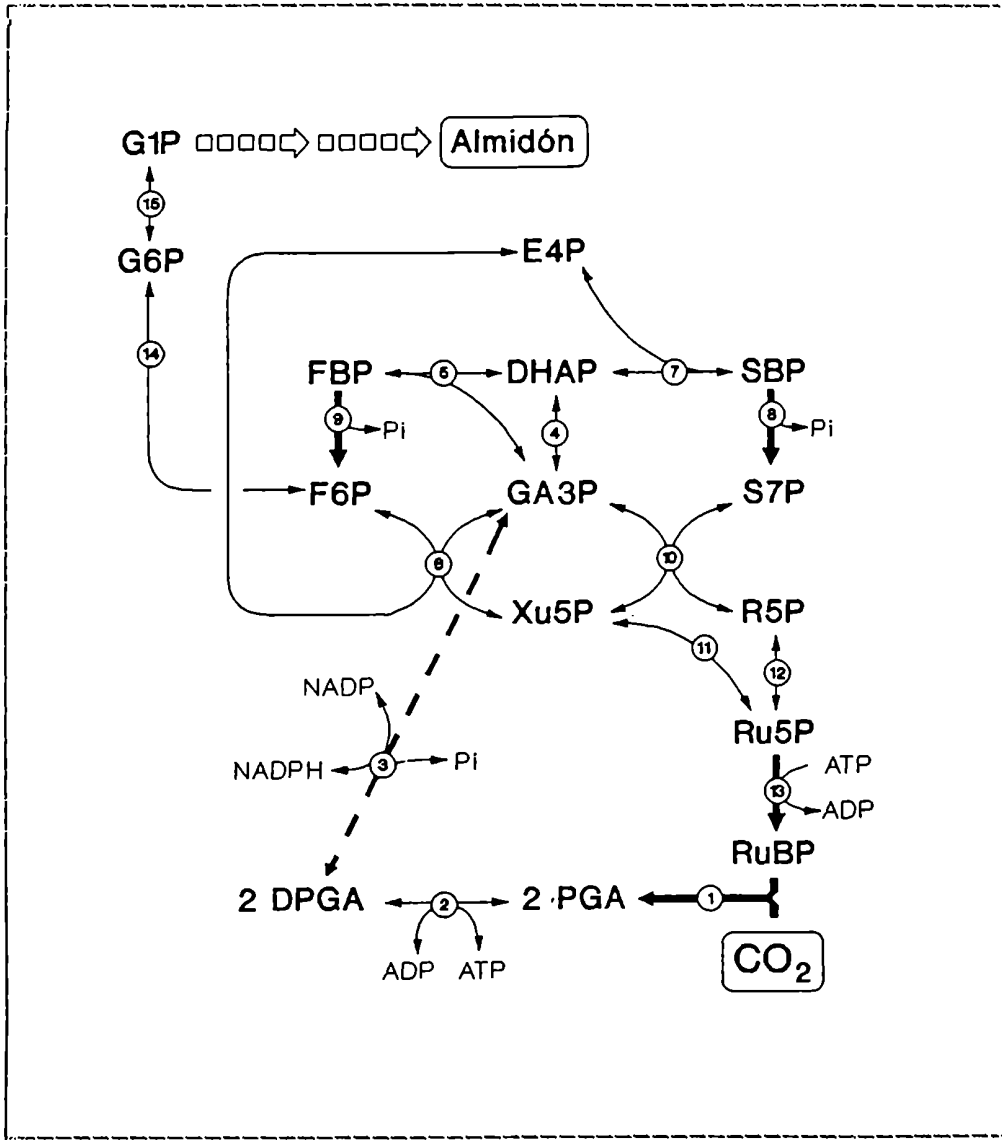


Figura 9. Esquema del Ciclo de Benson-Calvin o Reductivo de las Pentosas Fosfato. Las enzimas representadas en el ciclo son: 1: Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (Rubisco); 2: Fosfogliceratokinasa (PGK); 3: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GA3PDH); 4: Triosa fosfato isomerasa (TPI); 5: Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; 6,10: Transcetolasa; 7: Sedoheptulosa-1,7-bisfosfato aldolasa; 8: Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (SBPasa); 9: Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa); 11: Fosfopentosa epimerasa; 12: Fosfopentosa isomerasa; 13: Fosforibulokinasa (PRK); 14: Fosfohexosa isomerasa (PHI); 15: Fosfoglucomutasa (PGM).

SISTEMA FERREDOXINA-TIORREDOXINA

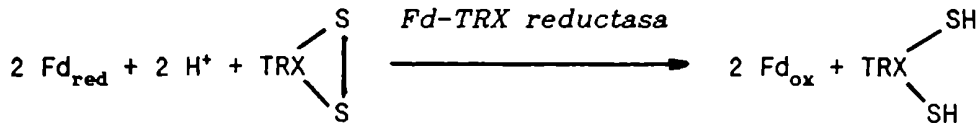
En los cloroplastos iluminados, la ferredoxina (Fd) además de reducir al NADP^+ para formar NADPH_2 puede intervenir en la reducción de puentes disulfuro en proteínas. Esto lo hace a través de una proteína de 12 KDa denominada tiorredoxina (TRX). Previamente, la ferredoxina transfiere electrones a la TRX en presencia de una tercera proteína (la Fd-TRX-Reductasa) que cataliza la reacción. Una vez reducida, la TRX (que es una proteína soluble) puede a su vez reducir diversos puentes disulfuro en proteínas que se localizan en el estroma. La Fd, TRX y Fd-TRX-Reductasa constituyen el *Sistema Ferredoxina-Tiorredoxina*. Varias enzimas del ciclo de asimilación fotosintética de CO_2 pueden ser reducidas por este sistema y como consecuencia ver alteradas sus actividades específicas (Fig. 10). Por este motivo, hoy está ampliamente aceptado que en las plantas superiores éste es el mecanismo principal mediado por luz de regulación del ciclo de Benson y Calvin.

Ferredoxina

Es el transportador electrónico mejor caracterizado entre el fotosistema I y el NADP^+ . Esta es una proteína sin grupo hemo, soluble y de 12 KDa. Cada molécula contiene dos átomos de Fe complejoado con dos átomos azufre y con otros grupos S de cisteínas de la proteína. La ferredoxina tiene un bajo potencial redox ($E = -0.43 \text{ V}$) y transfiere un electrón por molécula durante la reacción de reducción.

Ferredoxina-Tiorredoxina Reductasa

En la presencia de ferredoxina reducida, esta enzima cataliza la reducción del puente disulfuro del sitio activo de la TRX.



Fd: ferredoxina, TRX: tiorredoxina, red: reducida, ox: oxidada,
Fd-TRX-reductasa: ferredoxina-tioredoxina reductasa

Este es el único caso, dentro de las enzimas dependientes de ferredoxina, en el cual el segundo sustrato en la reacción es una proteína. Esta enzima fue purificada a homogeneidad de diversos organismos fotosintéticos oxigénicos y está constituida por dos subunidades, una de 13 KDa (inmunológicamente similar en los organismos estudiados) y otra de 17, 15 y 7 KDa en espinaca, maíz y *Nostoc Muscorum*, respectivamente [13,14]. Existe solamente en organismos fotosintéticos.

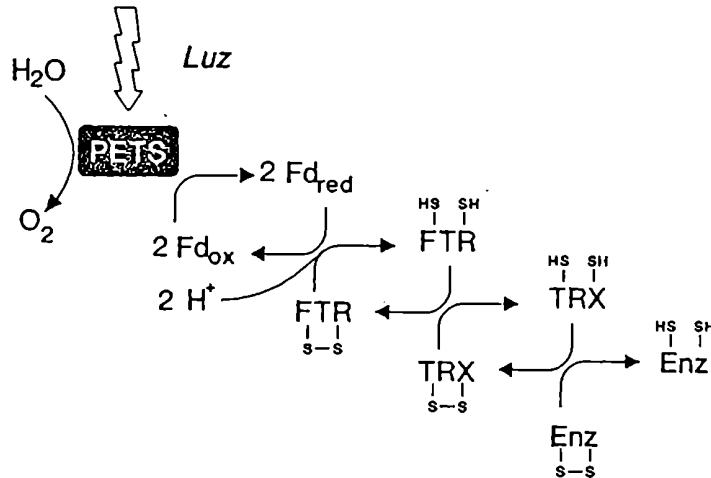
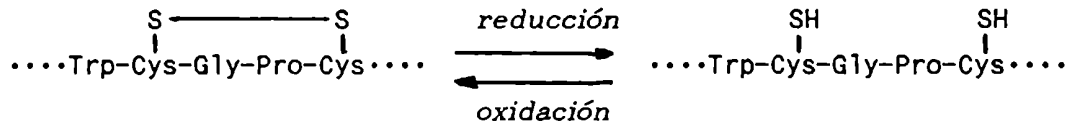


Fig. 10. Cadena de oxido-reducción en el sistema ferredoxina-tiorredoxina. En el esquema se detalla las reacciones que unen los eventos disparados por luz en las membranas tilacoides con la regulación de reacciones bioquímicas que ocurren en el estroma. La ferredoxina (Fd) se reduce en la cara estromática de las membranas tilacoides por la acción del sistema de fotosintético de transporte de electrones ("Photosynthetic electron transport system" PETS); simultáneamente, el O_2 se libera en el lado luminal. Tanto la transferencia de electrones desde la ferredoxina y la captación de protones del entorno convierte el puente disulfuro de la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR) en grupos tioles. El intercambio tiol/disulfuro entre la FTR reducida y la tiorredoxina (TRX) recompone el puente disulfuro en el primero y genera sulfidrilos en la última. En un intercambio posterior, el centro activo de la TRX se oxida y el puente disulfuro de la enzima blanca (Enz) es transformado a grupos tioles modificándose así la actividad de la misma.

Tiorredoxina

Es una proteína de 12 KDa que posee un centro activo constituido por la secuencia (W-C-G-P-C) que mantiene tanto en plantas como en microorganismos y animales [15]. Este sitio activo puede reducirse y oxidarse transfiriendo el poder reductor.



En plantas superiores se hallaron distintos tipos de TRX. Dos de ellas están en los cloroplastos (TRX-*m* y TRX-*f*) y una tercera en los compartimentos no-fotosintéticos (TRX-*h*) [16,17]. En los cloroplastos, las dos TRX parecen tener especificidad por diferentes proteínas. La TRX-*f* es más efectiva para activar a la FBPasa (de allí "*f*"), SBPasa, PRK y NADP-GAD3PDH. En cambio, la TRX-*m* preferentemente activa a la malato deshidrogenasa [12] (de allí "*m*") y también regula (desactiva en la luz) a la glucosa-6-P deshidrogenasa (enzima degradativa de hidratos de carbono).

A diferencia de la Fd-TRX reductasa, la tiorredoxina no existe sólo en organismos fotosintéticos. En organismos heterotróficos, la TRX es reducida por el NADPH (en lugar de la Ferredoxina) en presencia de la NADP-TRX reductasa [18]. Además, existe evidencia que la TRX-*h* es reducida por NADPH en los tejidos no-fotosintéticos de la planta o en fracciones no cloroplásticas de algas verdes. Desde un punto de vista evolutivo sería interesante conocer cual es el motivo por el cual los cloroplastos, que pueden generar NADPH, usan únicamente la ferredoxina para reducir tanto la TRX-*m* como la *f* aún cuando estos tengan orígenes evolutivos diferentes. Evolutivamente, la TRX-*m* está relacionada con cianobacterias y algas que realizan fotosíntesis oxigénica, en tanto la TRX-*f* lo está con los vertebrados.

In vitro la TRX reducida convierte los puentes disulfuro de diferentes polipéptidos en sulfhidrilos [15]. Más aún, el pentapéptido de se-

cuencia W-C-G-P-C también posee esta propiedad aunque con menor eficiencia [19]. Los estudios *in vitro* muestran la capacidad reductora de esta proteína sobre otras; pero, el funcionamiento de la misma depende de la concentración de los reductores y de los potenciales redox de las proteínas blanco.

PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS REGULATORIAS DEL CICLO DE BENSON Y CALVIN

La cinética de formación de producto de las enzimas regulatorias del ciclo de Benson-Calvin posee una característica particular: En general, la actividad enzimática aumenta durante el tiempo de medición. La formación del producto en función del tiempo se inicia con una fase denominada *lag*, en la cual la actividad es nula o muy baja, para luego incrementarse hasta hacerse constante (figura 11). Esta característica es típica para una clase particular de enzimas denominadas actualmente *histeréticas*.

HISTERESIS ENZIMATICA

Cuando se realiza una medición enzimática y se observa una aceleración en la formación de producto, la interpretación más simple para este fenómeno es la siguiente: Existen dos formas de la enzima con características cinéticas distintas (p. ej. activa e inactiva), siendo estas interconvertibles durante la medida. Además, la velocidad de la interconversión enzimática (activación) debe ser mucho menor que la velocidad con la cual los sustratos son transformados (catálisis) [21].

Dos décadas atrás Frieden caracterizó enzimas de diversos orígenes que lentamente se convierten, de una forma a otra con propiedades cinéticas distintas. A este fenómeno lo llamó *Histéresis enzimática* y se produce cuando la enzima "*responde en forma lenta a cambios rápidos de concentración de ligandos*" [22]. Se ha observado diferentes factores que pueden influir para obtener estos *lag*. Algunos de ellos son: Cambios conformacionales lentos (isomerizaciones), reacciones de asociación-disociación de la enzima, unión lenta de ligandos o desplazamiento de uno ya unido por otro. Al mismo tiempo, si en la solución de ensayo están dadas las condiciones para que exista modificación covalente que altere las propiedades cinéticas de la enzima, también se obtendrán curvas de producto versus tiempo con *lags* o *burst* [21,22]. De todas formas, siempre existe la posibilidad de que una isomerización lenta esté asociada a cualquiera de

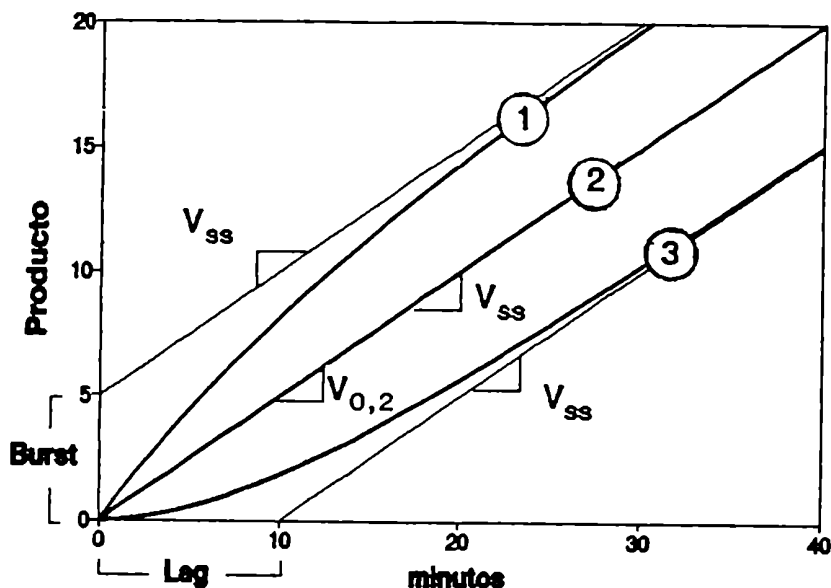


Figura 11. Comparación de cinéticas de formación de producto de enzimas con distintas propiedades histeréticas. Se comparan las curvas típicas de 3 enzimas con propiedades histeréticas diferentes, en el caso particular que en todas ellas se observa la misma velocidad al llegar al estado estacionario (V_{ss}). La curva 2 es la de una enzima que no presenta propiedades histeréticas, donde la velocidad inicial ($V_{0,2}$) es la correspondiente a la velocidad en estado estacionario (V_{ss}). Por lo tanto, esta curva se mantiene recta desde un principio. La curva 3 muestra un período inicial de baja actividad, luego del cual la misma va aumentando hasta que se hace constante. Este primer estadio se denomina *lag* (en el caso del gráfico es de 10 minutos). La curva 1 muestra un período inicial de alta actividad, luego disminuye hasta llegar al estado estacionario. El salto inicial de producto formado se denomina *Burst* [21].

los eventos anteriores para constituir el paso limitante que hace que la enzima sea histerética.

La existencia de un paso limitante, como los mencionados, puede generar curvas de producto en función del tiempo con características particulares (figura 11), pero también puede generar curvas de sustrato con sigmoidicidad, a pesar de que no existan interacciones alostéricas. Este fenómeno fue predicho por Rabin [23] en 1967 y posteriormente llamado

"cooperatividad histerética" [24] para diferenciarla de la cooperatividad generada por interacciones sitio-sitio. Un ejemplo de esto se pudo observar tanto en la glucokinasa de hígado [73] como en la hexokinasa de germen de trigo [72]. Estas enzimas presentan frente al sustrato curvas sigmoideas a pesar de ser proteínas monoméricas.

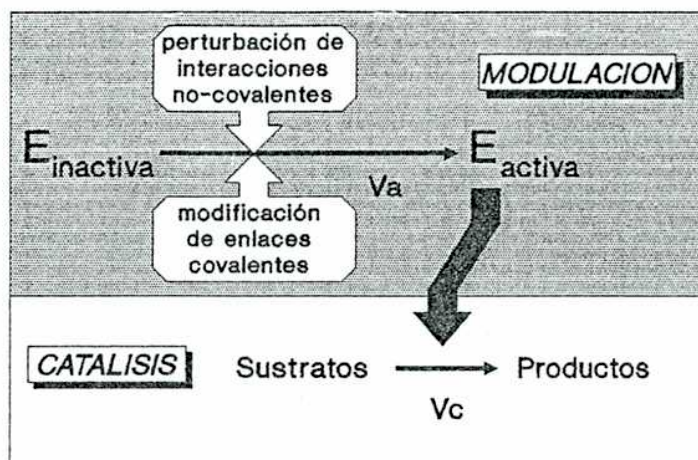


Figura 12. Composición de la actividad de enzimas cloroplásticas histeréticas. Ensayo de la actividad en dos etapas. En el esquema se representan las reacciones requeridas para que se forme producto cuando se analizan enzimas cloroplásticas histeréticas (E). La modificación concertada de interacciones no-covalentes y de enlaces covalentes, convierte la enzima inactiva en una forma activa (MODULACION). En la forma activa, la enzima facilita la transformación de sustratos (CATALISIS). La curva de producto en función del tiempo muestra una fase lag cuando la velocidad de conversión enzimática (V_a) es más lenta que la velocidad de transformación de sustratos (V_c). Para estudiar la modulación cuando $V_a \ll V_c$, la enzima es primero incubada con cantidades variables (a_1, a_2, \dots, a_n) de un metabolito (volumen constante), y posteriormente se ensaya la actividad. La solución para el ensayo de actividad, que espera recibir alícuotas de enzima preincubada, contiene b_1, b_2, \dots, b_n moles del metabolito en cuestión de tal manera que luego del agregado de la enzima se cumple que $a_1 + b_1 = c, a_2 + b_2 = c, \dots, a_n + b_n = c$ (volumen constante). De esta forma, al ser iguales las condiciones en todos los ensayos de actividad enzimática, los cambios observados en la misma solo pueden originarse por modificaciones durante la preincubación. Para estudiar el proceso catalítico, la enzima es preincubada bajo condiciones constantes y luego la velocidad de transformación de sustratos se estudia en la presencia de concentraciones variables de un metabolito. La aparición de diferentes constantes cinéticas para los dos procesos indica la acción dual de un metabolito sobre la enzima.

CINETICA DE LAS ENZIMAS CLOROPLASTICAS

Al estudiar los procesos metabólicos que ocurren en el cloroplasto, se ha prestado mucha atención en la fase *lag* observada en las enzimas correspondientes. Esta fase puede ser modificada por metabolitos cuyas concentraciones *in vivo* cambian con la luz.

Si la actividad de las enzimas regulatorias de cloroplastos involucra dos procesos con diferentes características, se hace necesario analizarlos por separado. Por este motivo, se recurre a una estrategia experimental en la cual los ensayos cinéticos se realizan en dos etapas: las enzimas son incubadas bajo condiciones específicas (*MODULACION*) y luego se ensaya la conversión de sustratos a productos (*CATALISIS*). De esta manera se puede estudiar la lenta conversión de una forma inactiva a otra activa, en forma independiente de la transformación rápida de sustratos (figura 12).

Es de tener en cuenta que cuando se realiza este tipo de ensayo, en la segunda etapa deja de manifestarse la fase *lag* que se observa cuando se mide la enzima en un solo paso. Para poder obtener actividad son necesarias tanto la modulación de la enzima (activación) como la catálisis. Por ser procesos diferentes, cabe la posibilidad de la existencia de efectos duales sobre la actividad enzimática. Esto es posible porque determinados compuestos pueden modificar la distribución de la enzima entre la forma inactiva y activa y simultáneamente alterar el proceso catalítico o formar parte de él. Teniendo en cuenta el control diferencial que puede ejercer un metabolito, es necesario adoptar una terminología precisa para los estudios cinéticos. Por lo tanto, se ha denominado con el término *MODULADORES* a aquellos compuestos que modifican la velocidad de activación enzimática. Se ha mantenido los nombres de sustratos, cofactores y *EFFECTORES* en general, para aquellos compuestos que participan en la reacción catalítica. Desde un punto de vista experimental los moduladores actúan en la primera parte del ensayo en dos etapas (*MODULACION*, figura 12) y los efectores en la segunda (*CATALISIS*).

Para caracterizar cuantitativamente el proceso de la modulación enzimática y la regulación de la catálisis, se definen distintas constantes cinéticas:

$A_{0.5}$	Concentración de modulador con la que se obtiene la mitad de la máxima actividad específica
$S_{0.5}$	Concentración de sustrato, cofactor o efector con la que se obtiene la mitad de la máxima velocidad de catálisis

Teniendo en cuenta estas definiciones y utilizando el ensayo en dos etapas se pudo observar un efecto dual de ciertos metabolitos sobre la actividad de enzimas cloroplásticas. Además, como se describe más adelante, pueden contribuir en forma similar u opuesta a la actividad final; por ejemplo, estimulando la formación de la forma activa de la enzima pero inhibiendo el proceso catalítico. También en estos estudios se observó que la activación de enzimas cloroplásticas por un metabolito (*modulador primario*) puede ser potenciada con concentraciones no estimulatorias de otros compuestos (*moduladores secundarios*). Experimentalmente, la acción concertada queda de manifiesto cuando el modulador secundario reduce el $A_{0.5}$ correspondiente al modulador primario. En estos casos dos compuestos que no tendrían acción a las concentraciones dadas, en forma concertada pueden activar a la enzima en estudio.

MODULACION DE LA ACTIVIDAD

En el ciclo reductivo de las pentosas fosfato, dos mecanismos son importantes en la modulación de enzimas. Uno de ellos se ejerce a través del control de iones y metabolitos sobre las interacciones no-covalentes intra e inter-subunidad. El otro mecanismo es mediante modificaciones covalentes.

MODULACION POR MODIFICACION DE INTERACCIONES NO-COVALENTES

Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GA3PDH)

La GA3PDH de cloroplastos está constituida por 2 subunidades de 36 KDa y 39 KDa respectivamente [25]. Purificando esta enzima a partir de hojas de espinaca, se obtienen distintas formas con distintas especificidades frente a piridín-nucleótidos. Una forma enzimática (600 KDa) tiene ac-

tividad en presencia de NAD pero es inactiva con NADP. Esta forma se disocia luego de ser incubada con Pi, ATP o NADPH (160 KDa) adquiriendo la capacidad de usar ambos piridín-nucleótidos como sustrato [26]. Es interesante que el incremento (mediado por moduladores) de la actividad asociada a NADP, se transforma de sigmoideo a hiperbólico por la adición de concentraciones no estimulatorias de metabolitos presentes en el cloroplasto. Por ejemplo, bajas concentraciones de Pi, NADPH o FBP disminuyen el $A_{0.5}$ de un modulador primario como el ATP [27]. De esta forma surge la idea de que cambios de concentración (influenciados por luz) de intermediarios metabólicos del estroma participen en la modulación de la GA3PDH por modificación de interacciones no covalentes [27].

Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa)

Es bien conocido que la iluminación de cloroplastos incrementa en el estroma tanto el pH como la concentración de Mg^{2+} . Por otro lado, la FBPasa es catalíticamente activa en soluciones ligeramente alcalinas y a altas concentraciones de Mg^{2+} . Estas dos observaciones sugieren que el Mg^{2+} y H^+ regulan la actividad de la enzima en los cloroplastos [28]. Sin embargo, el ensayo en dos etapas indica que el Mg^{2+} junto con el FBP no son sólo cofactor y sustrato respectivamente, sino que también participan como moduladores en la activación de la FBPasa [29]. De todas maneras, una separación clara de la modulación y la catálisis es técnicamente difícil cuando se utiliza FBP junto con Mg^{2+} porque hay hidrólisis simultáneamente con el proceso de activación. Sin embargo, otros azúcares bisfosfato y cationes bivalentes muestran la existencia de la modulación y la catálisis. La fructosa 2,6-bisfosfato y el Ca^{2+} estimulan la conversión a una forma más activa; pero, estos metabolitos inhiben la capacidad catalítica (bajo condiciones de estado estacionario) de la enzima totalmente activada [30,31 (fig. 4)]. Aunque estos experimentos ilustran la necesidad de separar las reacciones, la relevancia fisiológica no es clara porque la fructosa 2,6-bisfosfato está aparentemente ausente en los cloroplastos y la entrada a los mismos en presencia de luz es lenta [32,33]. En relación al metal bivalente, Kreimer y Col. observaron, en los dos primeros minutos de iluminación, que la activación de la FBPasa sigue una cinética similar al influjo de Ca^{2+} hacia los cloroplastos [(?)]. Dado que el Ca^{2+} es un inhibidor, para ser

funcional *in vivo* en la modulación de la FBPasa, debería estar espacial o temporalmente separado del paso catalítico [29]. Consistente con este punto de vista, el Ca^{2+} es requerido para el proceso de activación pero no para la estabilización de la forma activa [29]; aunque para lograr esto, es necesaria la reducción de puentes disulfuro (ver página 36) o un tiempo mayor de activación usando concentraciones mayores [34].

Otras enzimas

Acerca del control de la modulación por interacciones no-covalentes, no existe tanta información sobre otras enzimas del ciclo de Benson y Calvin. Con respecto a la SBPasa se encontró que el Ca^{2+} también participa en la modulación de la misma aunque inhibe su catálisis [36]. A diferencia de las enzimas ya descritas, en la modulación de la fosforibulokinasa (PRK) todavía no ha sido reportada ninguna modificación por interacciones exclusivamente no covalentes.

MODULACION POR MODIFICACIONES COVALENTES

Modulación por el sistema Ferredoxina-Tiorredoxina

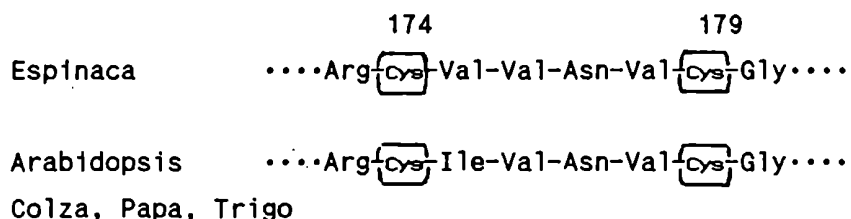
Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GA3PDH)

Estudios previos mostraron que la TRX aumenta la actividad específica relacionada con el NADP mientras que la asociada al NAD no se altera [37]. La disponibilidad de GA3PDH de diversos orígenes y de dos piridín-nucleótidos para ser usados como sustratos, permitió establecer que la TRX puede actuar como modulador primario en la estimulación de la actividad fisiológica (dependiente de NADP). Sin embargo, se encontró que la TRX es mucho más efectiva como modulador secundario. La concentración requerida para disminuir el $A_{0.5}$ de ATP, Pi, glicerato 1,3-bisfosfato o NADPH es 50 veces menor que la necesaria para actuar como modulador primario [38]. Estos experimentos realizados *in vitro* muestran como la actividad específica máxima se logra con reductores generados por luz en acción concertada con varios metabolitos presentes en cloroplastos. Como la concentración de estos depende de la luz y existe sinergismo entre

ellos, se puede pensar que todos estos factores funcionan como moduladores *in vivo*.

Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa)

El hecho de que la TRX-*f* aumente la actividad específica de la FBPasa de cloroplastos subraya la importancia de los mecanismos reductivos en la regulación de esta enzima [11]. Sin embargo, la participación en el proceso de modulación, tanto de intermediarios metabólicos del ciclo como de iones presentes en el estroma, indica que la regulación es aún más compleja. La acción concertada de azúcares bisfosfato y metales bivalentes reduce 50 veces la concentración de TRX-*f* necesaria para la máxima estimulación de la actividad. A su vez, la TRX-*f* disminuye el $A_{0,5}$ del FBP pero no cambia el del Ca^{2+} [29]. Se ha observado que la TRX-*m* en presencia de FBP y Ca^{2+} puede estimular la actividad específica de la FBPasa en la misma magnitud que la TRX-*f* [39]. Esto demuestra que la especificidad de las TRX puede ser alterada por metabolitos que interactúan no-covalentemente con la enzima. El incremento de actividad correlaciona con la reducción de un puente disulfuro por subunidad de FBPasa sin que influya en esto los moduladores secundarios [40,41]. Existe en la estructura primaria de las FBPasas cloroplásticas una secuencia que sería el sitio de acción de la reducción y por ende de la regulación de la actividad. Es destacable que esta secuencia de aminoácidos no se encuentra en las FBPasas citoplasmáticas conocidas.



Teniendo en cuenta estos datos, se puede pensar que en iluminación, el FBP y cationes bivalentes promueven concertadamente la reducción mediada por TRX de un puente disulfuro de la FBPasa de cloroplastos. Esto

permitiría que esta enzima comience a cumplir su rol fisiológico en el ciclo reductivo de las pentosas fosfato.

Hasta aquí se ha descripto como se puede incrementar la proporción de FBPasa activa. Sin embargo, existen procesos que imposibilitan tal aumento: *La desactivación y la inhibición de la modulación*. Estudios anteriores mostraron que ciertos oxidantes de bajo peso molecular pueden convertir la FBPasa activa a una forma inactiva revirtiendo el proceso de activación. Hoy en día se cree que en los cloroplastos mantenidos en oscuridad, la reversión ocurre por el proceso inverso a la activación [11,12]. Desde este punto de vista, la TRX sería un elemento que transmite hacia la enzima la información acerca del potencial redox del entorno. La importancia de esto se manifestaría en las transiciones luz-oscuridad y oscuridad-luz donde la TRX funcionaría como un interruptor todo o nada. R. Scheibe transformó recientemente esta visión estática en otra más dinámica, asumiendo que la conversión de la forma oxidada a la reducida y de la reducida a la oxidada también ocurren en luz [42]. Como consecuencia de una relación entre reductor (ferredoxina) y oxidante (O_2) se fija una relación de TRX reducida, la cual determina la concentración de la enzima activa. De esta manera en la luz, la alta concentración de TRX reducida conduce a las enzimas regulatorias del ciclo a formas activas. En la oscuridad al bajar la formación de ferredoxina reducida, las enzimas retornarían a formas oxidadas (inactivas) (figura 13).

Otra forma de disminuir la proporción de la FBPasa activa es impidiendo el proceso de activación. In vitro se demostró la factibilidad de este proceso usando como inhibidores de la activación a las poliaminas. Estos compuestos impedían la acción de la TRX sin alterar el proceso catalítico de hidrólisis del FBP; además, este efecto finalizaba al removerlos por diálisis o filtración por geles [43]. De todas maneras, este mecanismo es dudoso desde un punto de vista fisiológico, pues la concentración de poliaminas varía lentamente al iluminar los cloroplastos.

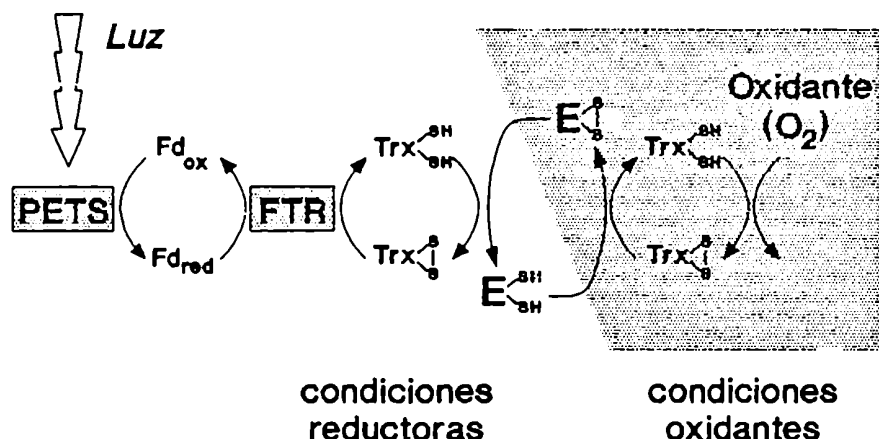


Figura 13. Efecto del estado metabólico del cloroplasto sobre la actividad de enzimas regulatorias del ciclo reductivo de las pentosas fosfato. El modelo ilustra el rol de la tiorredoxina (TEX) en el control de la actividad de las enzimas (E). La excitación por luz del sistema de transporte fotosintético de electrones (PETS) reduce a la ferredoxina, la cual a través de la ferredoxina-TRX reductasa (FTR) convierte a la TRX a su estado reducido. Por otro lado, oxidantes como el O_2 , conducen a la TRX a su estado oxidado. La proporción de reductores relativa a los oxidantes fija en el cloroplasto la proporción de TRX reducida, la cual a su vez determina el estado redox de la enzima.

En esta sección se detallaron varios factores que influyen en la actividad de la FBPasa y un resumen de los mismos se ilustra en la figura 14. En ella se puede observar que la hidrólisis de FBP a fru 6-P y Pi está regulada a varios niveles. La acción de diferentes moduladores en los procesos de activación y desactivación determinan la concentración de la FBPasa activa que participa en el ciclo reductivo de las pentosas fosfato. Por otro lado, los efectores modifican la velocidad de hidrólisis controlando la formación del complejo catalíticamente competente entre la enzima, la FBP y el metal bivalente. Esta separación facilita la caracterización del rol que los componentes del estroma juegan en la regulación de la actividad de la enzima. En este sentido, en la tabla 1, se ilustra claramente que la acción de los metabolitos en la modulación de la FBPasa de ninguna manera predice su posterior efecto en la catálisis. Un punto a destacar de la información que brinda la tabla 1 es que la regulación de la FBPasa cloroplástica mediada por el sistema Fd-TRX está relacionada al proceso de activación/desactivación sin tener participación en la reacción hidrolítica.

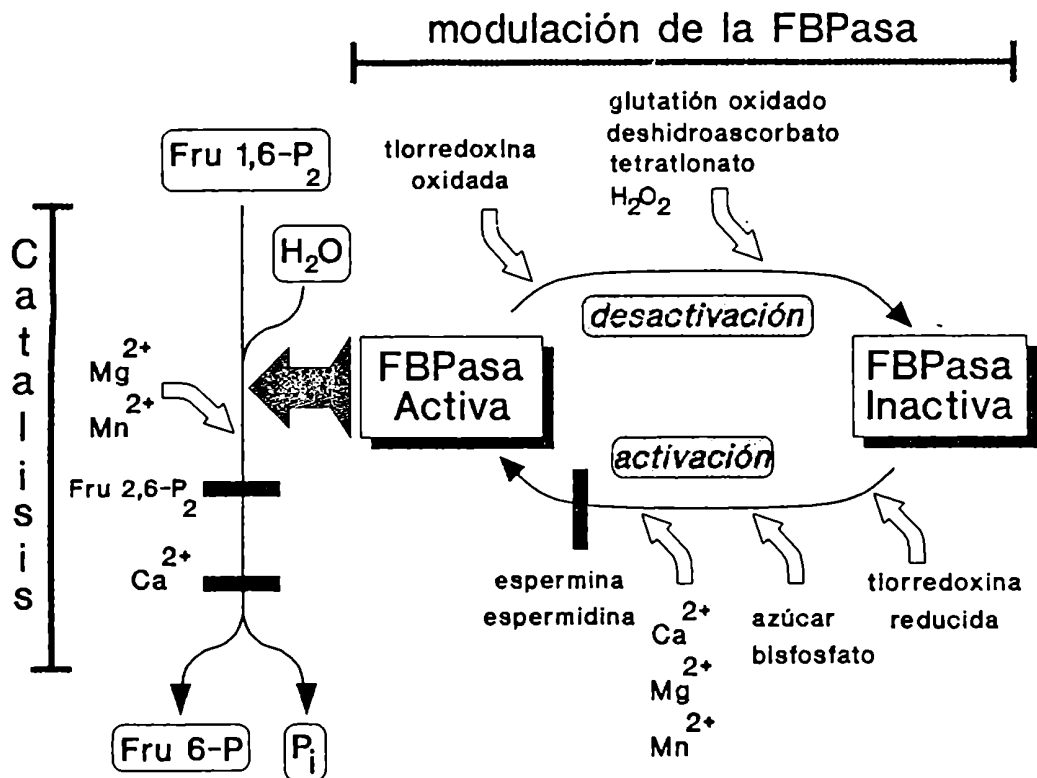


Figura 14. Actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa. Representación esquemática de la modulación y la catálisis de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos (FBPasa). La conversión de una forma inactiva a otra activa está mediada por la acción concertada de la TRX reducida, un azúcar bisfosfato y un catión bivalente. Este proceso se impide con el agregado in vitro de espermina o espermidina aunque esta prevención cesa cuando son removidas. En la forma activa, la FBPasa cataliza la transformación de FBP (fru 1,6-P₂) a fructosa 6-fosfato (fru 6-P) y ortofosfato (Pi). El paso hidrolítico es inhibido por fructosa 2,6-bisfosfato (fru 2,6-P₂) o Ca²⁺. La forma activa de la FBPasa vuelve al estado inactivo por la acción de TRX oxidada u oxidantes de bajo peso molecular (glutatión oxidado, deshidroascorbato, tetratlonato, H₂O₂).

TABLA 1. Efecto de ciertos metabolitos en la modulación y la catálisis de la FBPasa de cloroplastos.

Metabolito	Efecto en Modulación	Efecto en Catálisis
TRX	activador	sin efecto
Fru 1,6-P ₂	activador	sustrato
Fru 2,6-P ₂	activador	Inhibidor
Ru 1,5-P ₂	activador	sin efecto
Mg ²⁺	activador	cofactor
Ca ²⁺	activador	Inhibidor
Glutatión oxidado	desactivador	sin efecto
Espermina	Inhibidor	sin efecto

SBPasa

Esta enzima se parece a la FBPasa en varios aspectos cinéticos. Se ha establecido que la actividad específica aumenta por la acción concertada de TRX-*f*, azúcares bisfosfato y cationes bivalentes. Además, el Ca²⁺ estimula la modulación mientras que inhibe la catálisis [36,44]. A pesar de la gran similitud entre estas dos hidrolasas de la fase regenerativa, el conocimiento reciente de la secuencia de aminoácidos de la SBPasa de trigo, revela la inesperada ausencia de la secuencia aminoacídica que en la FBPasa sería el sitio para la acción de la TRX [45]. Tanto la SBPasa como la FBPasa de trigo contienen 7 cisteínas. Sin embargo, ninguno de estos residuos se alinea cuando se enfrentan las secuencias primarias de ambas enzimas. Este hecho indicaría que no existe un mecanismo común de reducción. A pesar de ello, los aminoácidos situados en el sitio activo de la

FBPasa de riñón de cerdo (una enzima no regulada por luz) tienen una total identidad tanto con la FBPasa como con la SBPasa de trigo [45,46]. Este último hecho induce a pensar que estas enzimas comparten sitios activos similares. De hecho, la FBPasa de cloroplastos puede utilizar como sustrato a la SBP.

Fosforibulokinasa (PRK)

En la PRK de plantas superiores, la máxima actividad se correlaciona con la reducción de un puente disulfuro entre la Cys-16 y Cys-55. La región cercana a la Cys-16 es homóloga con otras PRK que son insensibles a la regulación por luz y con el sitio de unión a ATP de proteínas no relacionadas [47]. Recientemente, mediante técnicas de mutagénesis dirigida se observó que el reemplazo de la Cys-16 baja un 50% la actividad específica mientras que la sustitución de la Cys-55 la reduce en un 95%. A diferencia de la FBPasa, la secuencia de inserción en la PRK participaría tanto en la modulación como en la catálisis. Otro aspecto interesante es que el sitio regulatorio entre los residuos cisteína no existe en los organismos fotosintéticos cuyo ciclo de Benson-Calvin no es regulado por luz (Bacterias púrpuras no sulfurosas) [48].

Para resumir lo visto anteriormente sobre la modulación por modificación de enlaces no-covalentes, podemos decir que la TRX reducida actúa concertadamente con moduladores específicos en la activación de la GA3PDH, FBPasa y SBPasa. En cambio, la PRK necesita para activarse a la TRX como requerimiento único y absoluto. Este conjunto de enzimas, controladas por la misma proteína, (TRX) no comparten una misma secuencia regulatoria. Además, en la PRK esta secuencia formaría parte no sólo del proceso de modulación sino también el catalítico [49]. Por lo tanto, el conjunto de la evidencia experimental hace pensar que la regulación de la actividad tiene distintas características para cada enzima, no sólo respecto a los moduladores, sino también al mecanismo de modificación de los puentes disulfuro junto con los cambios que acarrearía a las enzimas mismas.

Modulación de la actividad Rubisco

La purificación de la Rubisco a partir de hojas, produce la forma inactiva. Es por ello necesario convertirla previamente a una forma catalíticamente competente para poder ensayar la actividad. Para este proceso de activación se requiere la presencia de CO_2 y Mg^{2+} . El CO_2 carbamila el grupo amino de la Lys-201 de la subunidad grande de la enzima y luego el catión bivalente interactúa con el carbamato y estabiliza la forma activa [50]. Este proceso constituye una forma novedosa de modulación por modificación covalente. Esta activación ocurre espontáneamente *in vitro*; sin embargo, no parece funcional *in vivo* pues la RuBP se une fuertemente a la enzima previniendo la carbamilación [51,52].

Actualmente se sabe que en este proceso de activación interviene una proteína denominada Rubisco-Activasa constituida por dos polipéptidos de 41 y 45 KDa [53]. La Rubisco-Activasa cambia el carácter de la RuBP convirtiéndolo de modulador negativo a modulador positivo. Esto sucede porque interacciona con el complejo formado por la enzima y el azúcar bisfosfato para liberar a éste último. De ese modo, se facilita el posterior acceso del CO_2 y el Mg^{2+} para la carbamilación [54]. En este proceso la Rubisco-Activasa hidroliza ATP por cuanto se autofosforilaría [55]. Si bien existen numerosas preguntas sin contestar, se puede decir que la Rubisco-Activasa en acción concertada con otros componentes del cloroplasto disminuye la concentración de CO_2 necesaria para la activación de la Rubisco.

En algunas especies de plantas la activación de la Rubisco es inhibida por el 2-carboxi-arabinitol fosfato (2-CAP). En la oscuridad este compuesto aumenta su concentración en cloroplastos pero en iluminación se hidroliza para dar 2-carboxi-arabinitol (2-CA). Aparentemente es un inhibidor que semeja la estructura del intermediario en el ciclo catalítico (2'-carboxi-3-ceto-D-arabinitol 1,5-bisfosfato, ver página 20). La alta afinidad de este inhibidor por la enzima es disminuida por la Rubisco-Activasa [56]. Por este motivo puede plantearse el siguiente modelo para las plantas que sintetizan 2-carboxi-arabinitol fosfato: En la oscuridad, el 2-carboxi-arabinitol fosfato se une a la Rubisco y no permite la carbamilación de la enzima por CO_2 , por lo tanto impide la obtención de una forma activa. En la luz, la acción concertada de los moduladores y la Rubisco-Activasa median la disociación del 2-carboxi-arabinitol fosfato de la

enzima con la posterior degradación a 2-carboxi-arabinitol por una fosfatasa específica. Aquí entonces la enzima puede carbamilarse con el consecuente aumento de la actividad específica, esencial para la asimilación de CO₂ durante el día.

Modulación de enzimas cloroplásticas por factores no fisiológicos

Uno de los postulados de la regulación de enzimas cloroplásticas es que la TRX funciona como proteína disulfuro reductasa. Si el rol de la TRX se restringe a la reducción de puentes disulfuro, su reemplazo requeriría un factor funcional en procesos de óxido-reducción o transferencia de hidrógenos a las enzimas activables. Sin embargo, solventes orgánicos miscibles en agua (cosolventes), ciertas sales o alta presión, pueden reemplazar a la TRX aumentando la actividad específica de la FBPasa, PRK y GA3PDH [41,57-61]. Por otro lado, la Rubisco, una enzima cloroplástica que no es regulada por TRX, o enzimas análogas de organismos heterotróficos (GA3PDH de levaduras, FBPasa de músculo de conejo) no han sido estimulados por los perturbantes proteicos mencionados [61]. Es de destacar que los perturbantes mencionados estimulan el proceso de modulación aumentando la concentración de enzimas en estado activado; sin embargo, estas no han sido capaces de realizar catálisis en presencia del perturbante.

Debido a que la FBPasa puede activarse *in vitro* de diversas maneras, surge el interrogante sobre si los estados activados que se obtienen son conformacionalmente similares. Si bien estos estados se comportan en forma semejante frente a ciertos reactivos específicos para grupos [41], otros tratamientos químicos de la FBPasa muestran diferencias originadas por las distintas vías de activación [62]. Los cosolventes, aniones caotrópicos y la alta presión han sido extensamente usados para alterar la estructura terciaria o cuaternaria de proteínas. Estos agentes modifican las interacciones hidrofóbicas inter e intramoleculares. Teniendo en cuenta esto, el mecanismo por el cual estos actúan como moduladores debería ser también la modificación de interacciones no-covalentes. El reemplazo de la TRX por los perturbantes proteicos, nos hace pensar que su acción sobre las enzimas no sólo se debe a su sitio activo reductor. Además, hay otros dos hechos que apoyan esta idea: Primero, la modulación de enzimas de cloroplastos muestra grandes variaciones en función de las distintas TRX, a

pesar de que la secuencia redox W-C-G-P-C está conservada en todas ellas. Segundo, la especificidad de la TRX en la activación de la FBPasa es modificada tanto por moduladores que no alteran enlaces covalentes como por mutagénesis en la TRX dirigida sobre aminoácidos que no pertenecen al centro redox [39,63].

De los estudios descriptos se pueden extraer evidencias que nos conducen a pensar lo siguiente: *La TRX, además de sus propiedades redox, modificaría interacciones no covalentes de sus enzimas blanco.*

PARTICIPACION DE ENZIMAS CLOROPLASTICAS EN COMPLEJOS SUPRAMOLECULARES.

Hasta hace muy poco tiempo la mayoría de los caminos metabólicos se habían descrito como la simple suma de reacciones enzimáticas aisladas e independientes. En muchos casos estos caminos pudieron ser reproducidos *in vitro* con enzimas purificadas. Además las enzimas al ser purificadas se obtenían en forma soluble y sin ningún tipo de interacción aparente con otros elementos macromoleculares. Estos hechos distrajeron la atención de la posibilidad de que estas enzimas participaran en otras interacciones además de las observadas con sus ligandos específicos. Uno de los puntos que se había omitido es que la concentración de las enzimas *in vivo*, es decir en los compartimentos en los cuales se encuentra, es en general muchísimo más elevada de la que se obtiene *in vitro* cuando se ensaya la actividad respectiva. Si en aquellos compartimentos la enzima en estudio estuviese asociada a otro elemento, al romper las células y membranas de las organelas, se generaría una dilución que favorecería la disociación del complejo (simplemente por la ley de acción de masas). Si la constante de disociación del complejo no es lo suficientemente baja, podríamos tener el caso de una enzima que *in vivo* esté asociada a algún elemento pero que *in vitro* se observe soluble y aislada de cualquier otro componente. Numerosos investigadores ya han observado que este fenómeno no sólo ocurre, sino que además tiene una gran relevancia desde un punto de vista regulatorio. Un ejemplo de ello lo tenemos en un camino metabólico tan importante como la glucólisis [71]. Se ha observado que existen asociaciones entre enzimas que se encuentran en forma consecutiva en el camino metabólico. Es decir, cuando el producto de la primera enzima es el sus-

trato de la segunda. Se ha demostrado en ciertos casos que este hecho permite la transferencia del producto de la primer enzima directamente al sitio activo de la segunda, logrando una eficiencia catalítica muy superior a la esperada en caso de que el producto de la primera debiera pasar previamente a la "solución" diluyéndose. A este fenómeno se lo denominó *channeling* de metabolitos [74].

Probablemente en el ciclo de Benson-Calvin, ocurren eventos como los expuestos anteriormente. En general está descripto como un camino metabólico cuyos componentes son solubles. Esto es así porque al ultracentrifugar cloroplastos, que han sido rotos osmóticamente, se obtienen todas las enzimas en la fracción sobrenadante. Sin embargo, las condiciones del entorno de las enzimas que están en el cloroplasto, difieren bastante de la de una solución acuosa diluída. De hecho, la alta concentración de Rubisco en el estroma hace evidente que la actividad del agua en ese compartimento no es la misma que se tiene cuando se realiza un ensayo de actividad. Como consecuencia, variaciones en la actividad de agua podrían alterar la hidratación de las proteínas y su actividad. Existen evidencias que estas consideraciones no son solo especulativas: La actividad de las enzimas cloropásticas puede ser alterada por factores químicos y físicos que cambian la cantidad de agua unida a las proteínas [38,41,57,58,61].

Experimentos pioneros mostraron que la iluminación de cloroplastos de arvejas adaptados a la oscuridad disminuyeron la fuerte unión a membranas tilacoides de la PRK, G6PDH, y NADP-GA3PDH. En cambio la unión de la Rubisco, 3-PGK, Aldolasa y transcetolasa no se alteraron [64]. Por otro lado, se ha observado en *Scenedesmus obliquus* que existe una forma proteica compuesta por subunidades con actividad GA3PDH y otras con actividad PRK. Estas se pueden disociar en presencia de TRX, DTT y NADPH.

Mediante técnicas de *Inmuno-Oro* y microscopía electrónica se ha observado que la FBPasa y la TRX se localizan tanto en las membranas tilacoides como en el estroma [65]. Además, se sabe de la existencia de 1) formas de ferredoxina y TRX unidas a la membrana, 2) un complejo conteniendo los componentes del sistema Fd-TRX y 3) la asociación entre TRX y FBPasa [66,67]. Estos datos permitirían pensar que la luz controla la asociación-disociación de las membranas tilacoides con el sistema Fd-TRX y las enzimas asociadas. Todavía, este punto de vista es controvertido

porque la transición Luz-oscuridad inactiva a la FBPasa en los cloroplastos de lechuga pero no altera la asociación de esta con la membrana [68].

Gontero y Col. purificaron de plantas superiores la actividad PRK asociada con otras cuatro enzimas del ciclo reductivo de las pentosas fosfato: Ribosa 5-P isomerasa, Rubisco, fosfogliceratokinasa, y Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa [69], como se puede ver en la figura 9 estas cinco enzimas catalizan reacciones consecutivas en el ciclo. Este hecho hace pensar que existe la posibilidad de que ocurra *channeling* de metabolitos. De hecho, Anderson postuló la existencia de este fenómeno en las reacciones *in vitro* entre la R5PI y la PRK [70].

Las evidencias obtenidas sobre la FBPasa, NADP-GA3PDH y PRK están de acuerdo con un modelo en el cual en el estroma la asociación del sistema Fd-TRX con enzimas del ciclo está regulada por eventos dependientes de la luz. Numerosos puntos acerca de este tema no han sido resueltos pero parecería como que las enzimas de este ciclo pueden interactuar con otros elementos del cloroplasto (otras enzimas; proteínas, membranas). A su vez, es probable que este fenómeno tenga importancia desde un punto de vista regulatorio. Teniendo en cuenta esto y las posibles características de estas interacciones, surge como muy interesante el estudio en estas enzimas de sus propiedades conformacionales que brindarían cambios en la superficie de la proteína. Estas, son las que determinarían la factibilidad y la especificidad de las interacciones con otros elementos.

Procedimientos Experimentales

MATERIALES

Los reactivos bioquímicos fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (St.Louis, Mo) y el Ultrogel AcA 44 a LKB (Suecia). Para remover cationes divalentes y trivalentes contaminantes, las soluciones de fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) y de NaTCA fueron tratadas con resina Chelex-100 (BioRad, Richmond, CA) como está descrito en [29]. Todas las soluciones *buffer* fueron ajustadas al pH dado a 23°C. El 2-propanol "Spectro ACS" se obtuvo de Eastman Kodak (Rochester, NJ).

La fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) fue purificada a homogeneidad de hojas de espinacas congeladas por el procedimiento ya publicado [59]. En algunas ocasiones el paso de purificación en columnas de QAE-Sephadex fue reemplazado mediante columna de Mono-Q en un equipo de FPLC en las condiciones que se describen en [75]

METODOS

Medición de masa de proteínas

Se realizó mediante el procedimiento de Lowry [76]. En el caso de muestras que contengan interferencias se realizó precipitando previamente la proteína con ácido tricloroacético y desoxicolato como se indica en [77]. En todos los casos se tomó como estándar a la seroalbúmina bovina.

Medición de la actividad enzimática por liberación de Pi:

i. Ensayo "en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg²⁺":

Una alícuota variable se agrega a una solución de ensayo [50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 2.8 mM FBP, 10 mM MgCl₂, y 0.2 mM EGTA] (Vol. final: 0.5 - 1ml). Si no se especifica, luego de 10 minutos a 23°C se detiene la reacción con reactivo de Chen & al. [78] para valorar el Pi liberado.

ii. Ensayo "en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg²⁺"

Para ello la enzima fue preincubada con moduladores para que adquiera actividad pues la enzima nativa hidroliza FBP en estas condiciones. A una alícuota se le mide actividad agregándola a la solución [50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 0.8 mM FBP, 1 mM MgCl₂, y 0.02 mM EGTA] (Vol. final: 0.5 - 1ml.). Si no se especifica, luego de 10 minutos a 23°C la reacción se detiene con reactivo de Chen & al [78] para valorar el Pi liberado.

Medición de actividad FBPasa acoplada a la reducción de NADP

Este método mide la formación de Fru 6-P a través de un aumento de absorbancia a 340 nm por reacción acoplada con 2 unidades/ml de fosfoglucoisomerasa, 2 unidades/ml de glucosa 6-P deshidrogenasa y 1 mM de NADP. En este caso el aumento de absorbancia a 340 nm es debido a la formación de 1 mol de NADPH por mol de Fru 6-P producida. La reducción de 0.1 μ moles de NADP por ml de reacción producen un aumento de absorbancia de 0.622.

Valoración de Pi hidrolizado en las curvas de velocidad vs. [FBP]

Se realizó mediante una ligera modificación del método de Chen & al [78]. Luego de realizada la reacción colorimétrica, este método puede leerse tanto en una meseta a 650 nm como en un pico de absorción a 825 nm. A bajas concentraciones de Pi, el uso de cubetas diferentes ocasiona una mayor variación en las medidas. Para lograr mayor precisión en la medida, el Pi presente en la solución se calculó a partir de la diferencia entre la absorbancia a 825 nm y 650 nm que demostró ser proporcional a la [Pi] e independiente de las cubetas usadas. La diferencia de absorbancia entre 825 y 650 nm fue realizada en un espectrofotómetro Gilford Response II que puede leer hasta 5 cubetas simultáneamente y a más de una longitud de onda.

En ningún caso el producto liberado superó el 15% del sustrato agregado inicialmente. Para evitar contaminación con Ca²⁺ en todos los tubos se incluyó 0.2 mM de Mg-EGTA. Debido que las curvas en función del tiempo presentan "lag" que está entre 3 y 4 minutos, el Pi liberado se mi-

dió luego de 30 minutos de reacción. El cálculo de la velocidad se realizó de acuerdo a la ecuación:

$$v = P_t - P_0 / (t - \tau)$$

Donde P_t : es el Pi liberado en el tiempo de reacción (30 minutos); P_0 es el blanco de catálisis a tiempo 0; t : es el tiempo de reacción (30 minutos) y τ es el "lag" que se tomó, en este caso fue de 4 min (ver fig. 47 en "Resultados").

Medición de Actividad con sustrato radiactivo

La FBPassa se incubó a 23°C en Tris-HCl (pH 7.9) durante el tiempo indicado con las concentraciones indicadas de cofactor. El sustrato radiactivo usado fue [^{14}C]Fructosa 1,6-bisfosfato y para obtener la actividad específica indicada se combinó con soluciones de sustrato frío. Luego de la incubación se detuvo la reacción con EDTA en las concentraciones y volúmenes necesarios como para quelar todo el Mg^{2+} presente. Una alícuota (25 μl) de la mezcla de reacción se sembró en tiras de papel Whatman n° 1 de 2 cm de ancho y 45 cm de largo a 8 cm de uno de los bordes (el que hizo contacto con el solvente de corrida). Se realizó una cromatografía descendente en solvente Etanol/ AcONH_4 (pH 3.8) 70:30 durante 16 horas [81]. Las tiras se secaron y se cortaron cada 0.5 ó 1 cm y se contaron por centelleo líquido en una mezcla de tolueno/ PPO. En este sistema cromatográfico se separa el sustrato radiactivo (^{14}C FBP) del producto (^{14}C Fru 6-P) que corren 16 cm y 21 cm aproximadamente (ver fig. 15). Además, tiene la ventaja de ser muy reproducible y no verse influenciado por las sales que contiene la siembra. Luego que se midió la radiactividad presente en ambos picos, (descontando el fondo por cada una de las tiras) se calculó la cantidad de moles de Fru 6-P producida con la siguiente ecuación:

$$\text{Moles Fru 6-P} = V_{\text{reacc}} \cdot [\text{FBP}] \cdot (\text{Fr}_t - \text{Fr}_0) / (1 - \text{Fr}_0)$$

Donde V_{reacc} : es el volumen de reacción; $[\text{FBP}]$: es la concentración de FBP en la reacción enzimática; Fr_0 es la fracción de Fru 6-P respecto del total y Fr_t es la fracción de Fru 6-P respecto del total en el tiempo de medida (t). Estas fracciones se calculan:

$$Fr_0 \text{ ó } Fr_t = \text{Pico Fru 6-P} / (\text{Pico Fru 6-P} + \text{Pico FBP})$$

Donde "Pico Fru 6-P" y "Pico FBP" representan la suma de las c.p.m. de los respectivos picos en la cromatografía en papel. Para verificar la validez del método, en forma paralela al experimento de la figura 15, se midió el Pi liberado con el método de Chen & al. coincidiendo con el cálculo con la ecuación anterior de la Fru 6-P formada. En todos los experimentos que se describirán en la sección "Resultados" la cantidad de sustrato hidrolizado nunca superó el 20%.

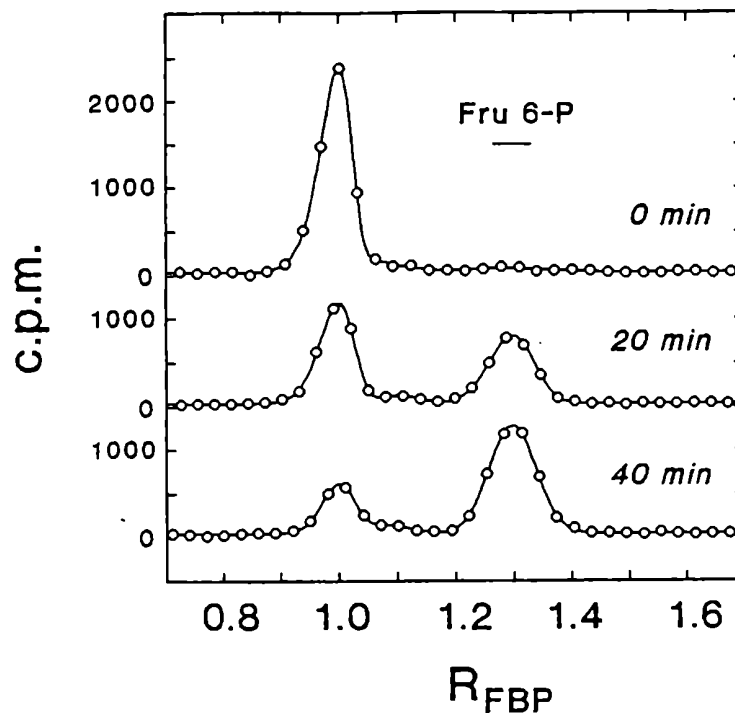


Fig. 15. Separación cromatográfica del FBP y Fru 6-P. La enzima (0.7 μ g) fue incubada en 0.320 ml de una solución de 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)/ 20 mM $MgCl_2$ / 0.2 mM EGTA/ 5 mM FBP (78000 cpm/ μ mol). Al tiempo indicado se sacó una alícuota de 20 μ l y se mezcló con 5 μ l de EDTA 0.2 M para frenar la reacción. Luego se sembró en papel para correr una cromatografía en las condiciones detalladas en el texto. En forma paralela se corrieron patrones fríos de Fru 6-P y FBP (0.5 μ moles) que fueron revelados por tinción con plata según [Ref]. Los datos fueron normalizados respecto a la distancia recorrida por el FBP.

Determinación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa por ELISA

La FBPassa de cloroplastos fue estimada por el ensayo no competitivo de ELISA desarrollado por Hermoso y col. [82] excepto que la concentración de o-fenilendiamina y H_2O_2 fueron 0.08% (w/v) y 0.006% (v/v) respectivamente.

Estudios espectrofotométricos

Espectrofotómetro Hitachi 220A (doble haz): Se realizaron en cubetas de 1 ml (volumen mínimo: 0.6 ml). Las condiciones fueron las siguientes: velocidad de barrido= 30 nm/min, constante de tiempo= 1 s, Slit= 1 nm. Los datos fueron colectados cada 1 nm para el posterior procesamiento de los mismos en una microcomputadora IBM-AT. Todos los espectros se realizaron contra H_2O . La derivada cuarta fue obtenida en forma numérica con un intervalo de derivación de 1 nm a partir del espectro original suavizado con 5 ciclos con una convolución de función (0.25, 0.50, 0.25) [83]. En el caso de la derivada primera el espectro fue suavizado con un ciclo.

Espectrofotómetro Gilford Response II: Se utilizaron cubetas de 0.5 ml. La velocidad de barrido si no se indica otra cosa fue de 60 nm/min y el intervalo de datos adquirido fue de 0.1 nm. Las derivadas de los espectros fueron hechas con intervalos sucesivos de 1.0, 1.4, 1.8, 2.2 nm como se aconseja en [83]. Posteriormente el espectro fue suavizado por el método de Savitsky y Golay [84] utilizando 51 puntos de promediación (grado 2). Los espectros diferenciales se realizaron restando el espectro "muestra" menos el respectivo espectro "base" que fue almacenado previamente en la computadora.

Transferencia de Datos: En todos los casos los datos fueron transferidos a una computadora IBM-AT a través de una interface RS-232C para el procesamiento posterior de los mismos. El programa utilizado para tal fin fue diseñado en lenguaje de programación Pascal. Este permitió tanto coleccionar los datos como controlar el aparato.

Gráficos de Hidropatía

Para calcular los patrones de hidropatía de las proteínas se realizó un programa en lenguaje Pascal (turbo pascal 3.0) que corre en una computadora IBM-AT. Este programa utiliza el algoritmo de "tamizado de datos" desarrollado por Bangham [79] con un "mesh" de 5 residuos. Este algoritmo tiene la ventaja que permite luego de obtenido el patrón, observar los dominios en forma clara siendo más fácil la interpretación de los datos. La tabla de hidrofobicidad de los aminoácidos que se usó fue la de Kyte y Doolittle [80].

Estudios espectrofluorométricos:

Fueron realizados en un espectrofluorómetro JASCO (modelo FB-770) en cubetas de 1.0 x 1.0 cm. La longitud de onda de excitación de la FBPasa fue 280 nm y si no se indica otra cosa la de emisión fue 332 nm. Ambos slit fueron de 5 nm.

La excitación del 2-(p-toluidinil)naftalen-6-sulfonato (TNS) en presencia de la FBPasa se realizó en las mismas condiciones que las anteriormente descritas con la excepción que la longitud de onda de excitación fue 366 nm y la de emisión 404 nm.

Cálculo del parámetro "h" (exposición de tirosinas)

Los cambios conformacionales en las proteínas que involucran algún cambio en los entornos de las tirosinas de las mismas han sido estudiados mediante la técnica de espectrofotometría diferencial en el ultravioleta [85]. En estos casos, una exposición de las tirosinas hacia solvente se puede evaluar por la intensidad de un pico negativo ubicado entre 287 y 288 nm. El espectro diferencial se puede realizar en forma automática mediante una resta de espectros en un espectrofotómetro de doble haz, colocando en el haz de referencia la proteína en las condiciones iniciales. Otra alternativa es acumular los espectros en una computadora (p. ej. en función del tiempo) y luego restarlos digitalmente. Si no se dispone de una gran concentración de proteína (> 1 mg/ml) pequeñas variaciones en la línea de base pueden perturbar el espectro diferencial. Por tal motivo, en estos casos, se decidió estudiar sobre el espectro diferencial la derivada

primera debido a que este procedimiento anula cualquier tipo de variación que sea constante a lo largo de la longitud de onda (la derivada de una constante es igual a 0). Al mismo tiempo, atenúa cualquier variación que tenga una pendiente pequeña. Con este objeto, se midió la intensidad de la señal (h) que se ilustra en la fig. 16 entre el máximo y el mínimo que se encuentran inmediatamente por encima y por debajo de 287 nm respectivamente. Este parámetro h es proporcional a la variación del pico negativo de 287 nm y la determinación del mismo está sujeta a mucha menor variación experimental.

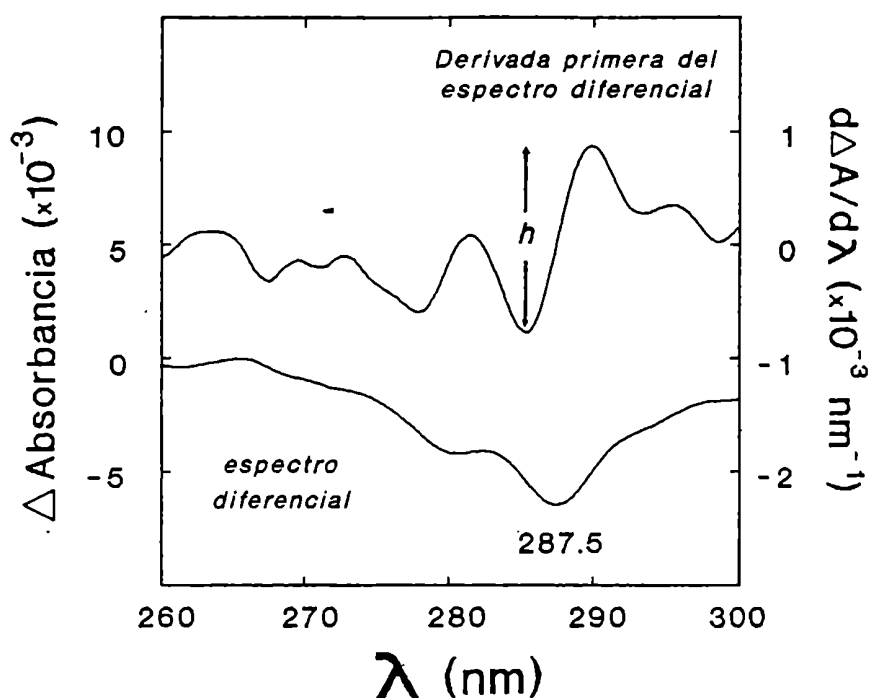


Fig. 16. Derivada 1ª del espectro diferencial de absorción U.V. La FBPasa de cloroplastos (140 µg) se incubó durante 20 minutos en una solución que contenía 50 µmoles de Tris-HCl (pH 7.9), volumen final: 0.85 ml. Se agregó 0.15 ml de 2-propanol y se registró un espectro inmediatamente y otro 20 minutos después. En el gráfico se muestra el espectro diferencial, que resulta de restar el espectro de 20 minutos menos el de 0 minutos. Sobre este espectro diferencial se calculó la derivada primera que se grafica desplazada verticalmente y con las unidades expresadas a la derecha de la figura.

Regresión no lineal. Método de Gauss-Newton

Cuando se indica, los datos experimentales fueron ajustados a una ecuación dada por el método de Gauss-Newton según lo descrito por Fraser y Susuki [86]. Para tal fin, se desarrolló un programa que corre en una computadora IBM-AT con coprocesador matemático 80287 en lenguaje Pascal (Turbo Pascal 3.0). Este programa permite optimizar los parámetros de una ecuación dada ($Y f(X)$) de modo tal de disminuir al máximo las desviaciones cuadráticas entre los datos experimentales y la curva descrita por tal ecuación. Para lograr esto es necesario introducir una estimación inicial de los parámetros a optimizar. El programa permite además, fijar uno o más parámetros a un valor dado (transformándolo en una constante) y también realizar el ajuste de una ecuación a una familia de curvas ($Z f(X, Y)$).

Cálculo de los parámetros de la ecuación de Hill

Los datos de velocidad en función de la concentración de cierto ligando de la enzima fueron ajustados por el método de Gauss-Newton a la ecuación de Hill:

$$v = \frac{V_M \cdot A^n}{A_{0.5}^n + A^n}$$

Cuya variable dependiente es v (velocidad), la variable independiente es A (concentración del ligando) y los parámetros son: V_M : velocidad máxima, que se obtiene a concentraciones infinitas de A . $A_{0.5}$: concentración de A con cual se obtiene una velocidad igual a la mitad de la V_M , n : exponente de Hill.

Cuando las concentraciones de A son bajas y los parámetros V_M y $A_{0.5}$ están muy indeterminados la ecuación anterior se puede reducir a:

$$v = \frac{V_M \cdot A^n}{A_{0.5}^n} = k \cdot A^n$$

Donde la ecuación ahora tiene dos parámetros k y n . De esta manera se puede hallar el valor de n a bajas concentraciones de A .

Cálculo del Mg^{2+} libre en las curvas de actividad

Teniendo en cuenta que el FBP compleja al Mg^{2+} con una constante de disociación de 2 mM al pH usado en los ensayos [87], para realizar las curvas de FBP a una concentración de Mg^{2+} libre constante, se tuvo presente que: A una concentración de Mg^{2+} libre el FBP se compleja con él en la siguiente proporción.

$$\frac{[Mg-FBP]}{FBP_t} = \frac{[Mg^{2+}]}{K_d + [Mg^{2+}]}$$

Entonces, en toda la curva en la cual se quiere mantener una concentración X mM de Mg^{2+} libre se prepara agregando X mM de $MgCl_2$ y FBP en concentración Y mM con un exceso de $MgCl_2$ de $[X \cdot Y / (2+X)]$ mM.

Resultados

EFECTO DEL PH ALCALINO SOBRE LA FBPASA DE CLOROPLASTOS

La FBPasa nativa de hojas de espinaca es un tetrámero de 170 Kda compuesto de subunidades idénticas. Este se disoció a dímeros al ser expuesto a un pH alcalino [88,89,91]. También se observó que la actividad enzimática disminuye luego de la exposición de la enzima a pH más altos que 8.5 [89]. Por tal motivo, ha sido aceptado durante bastante tiempo que la pérdida de actividad enzimática se debe a la disociación de la enzima. Sin embargo, no se realizó una correlación cinética entre la disminución de actividad y el cambio de estructura cuaternaria. En los cloroplastos iluminados, la FBPasa, componente del ciclo de Benson-Calvin, puede funcionar paradójicamente en un estroma cuyo pH es alcalino. En condiciones de iluminación, se detectó un aumento de pH cuya magnitud está comprendida entre 0.8 y 1.0 unidades [90]. Por lo tanto, fue de interés examinar los requisitos para mantener la capacidad catalítica de la enzima en tales condiciones. Además, se analizó paralelamente la acción del pH sobre la capacidad catalítica y sobre la estructura cuaternaria de la FBPasa usando la técnica de filtración por geles.

Inactivación pH-dependiente de la FBPasa

La capacidad catalítica "in vitro" de la FBPasa de cloroplastos de espinaca -ensayada a bajas concentraciones de FBP (1 mM) y Mg^{2+} (1 mM)- requiere la preincubación de la enzima con DTT, FBP, Ca^{2+} y un modulador fisiológico (tioredoxina) o algún otro modulador no fisiológico (cosolventes, aniones caotrópicos, alta presión) [27,29,59,57,61]. No obstante, el ensayo de actividad utilizando "altas concentraciones de FBP y de Mg^{2+} " no requiere la preincubación [92]. Como este último procedimiento es el más rápido para determinar la actividad de la enzima funcional, se lo usó para estudiar el efecto del pH sobre la estabilidad de la FBPasa. Así, la enzima se incubó a distintos pH y posteriormente se ensayó la actividad a pH 7.9 con 2.8 mM de FBP y 10 mM de $MgCl_2$. Como muestra la Fig. 17 la enzima perdió la capacidad de hidrolizar FBP por la progresiva alcalinización del medio de preincubación. Luego de 30 minutos de incubación,

la pérdida de la actividad enzimática fue 50% a pH 8.6 y máxima a pH 8.9. Sin embargo, la incorporación al medio de incubación de 1.0 mM FBP y 0.1 mM CaCl_2 previno el proceso de inactivación. Se sabe que el Ca^{2+} y el Mg^{2+} son inhibidor y cofactor respectivamente de la FBPasa [29]. Teniendo en cuenta esto, no se examinó el efecto del Mg^{2+} en la preincubación para evitar tener hidrólisis del sustrato durante la misma. En cambio, en presencia del Ca^{2+} , la concentración del FBP pudo permanecer inalterada.

El estudio de la inactivación en función del tiempo a pH 8.9 se muestra en la Fig. 18. El proceso fue relativamente rápido en los primeros 10 minutos ($t_{0.5}$: 6 min) y luego se tornó más lento. La estabilidad provista por la presencia de FBP y Ca^{2+} se evidencia porque estos moduladores alargaron el período de inactivación ($t_{0.5}$: 50 minutos). La estabilidad conferida por el FBP y el Ca^{2+} explica el hecho que se haya observado en estudios anteriores una alta actividad cuando la FBPasa se ensayó a pH 8.8 [92]. En esos experimentos, la inactivación no se observó porque la enzima permanece por cortos períodos de tiempo en la presencia de FBP y de Mg^{2+} . Estas evidencias junto con los experimentos de la fig. 18 indicarían que el Mg^{2+} en altas concentraciones (10-20 mM) podría reemplazar al Ca^{2+} en la protección frente a la pérdida de actividad ocasionada por el pH alcalino.

En estudios previos en el laboratorio, se encontró que ciertos azúcares bisfosfato son moduladores de la FBPasa; p. ej. la fructosa 1,6-bisfosfato (FBP), sedoheptulosa 1,7-bisfosfato (SBP), fructosa 2,6-bisfosfato, ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) y la glucosa 1,6-bisfosfato participan en el incremento concertado de la actividad específica junto con tioles y cationes bivalentes [29,59,57]. Por otro lado, en la reacción catalítica la fructosa 1,6-bisfosfato y la sedoheptulosa 1,7-bisfosfato son sustratos, la ribulosa 1,5-bisfosfato y la glucosa 1,6-bisfosfato son inefectivos y la fructosa 2,6-bisfosfato es un inhibidor. La diversidad de efectos cinéticos ejercidos por estos compuestos nos permite analizar sus capacidades en disminuir la velocidad de la inactivación mediada por pH alcalino. Como se muestra en la tabla 2, sólo la sedoheptulosa 1,7-bisfosfato parcialmente reemplazó a la fructosa 1,6-bisfosfato en la protección de la actividad enzimática. Además, este experimento muestra claramente que la retención de la actividad requiere la acción concertada del azúcar bisfosfato y el Ca^{2+} ;

la omisión de cualquiera de los dos causó la total pérdida de actividad. La selectividad por los azúcares bisfosfato y las bajas concentraciones de CaCl_2 para retener la actividad permitieron descartar la posibilidad de estabilización inespecífica mediada por sal [93].

Cromatografía de la FBPasa en columnas de filtración por geles.

Si la inactivación proviene de la disociación de la enzima, cambios en la estructura cuaternaria deben acompañar la pérdida de actividad. Como corolario, si la inactivación ocurre antes que la disociación, algún cambio conformacional constituye un evento previo en el proceso. Para estudiar las modificaciones en la estructura cuaternaria de la FBPasa, se analizó los perfiles de elución de la misma en columnas de filtración por geles (Ultrogel AcA 44). Sin embargo, se debió ser cuidadoso en la comparación de perfiles de elución con datos de actividad porque las concentraciones de proteínas en los experimentos de filtración por geles son en general más altas que aquellas usadas en los análisis cinéticos. Previo a los análisis cinéticos, como control, se estableció que la inactivación de la FBPasa a pH 8.9 no fue modificada por cambios de concentración en el rango de 4-40 $\mu\text{g/ml}$ (no mostrado).

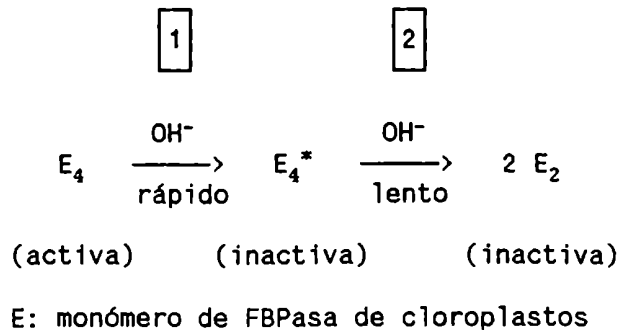
La FBPasa incubada por 20 minutos a pH 8.9 (23°C) y posteriormente sometida a una cromatografía de filtración por geles al mismo pH, mostró la aparición de formas de bajo peso molecular (Fig. 19). Sin embargo, en un período en que se perdió el 80% de la actividad total, la FBPasa disociada sólo es aproximadamente el 25% del total de la enzima. Más aún, en un experimento complementario, los resultados indican que el proceso de disociación fue extremadamente lento. Luego de una incubación de 3 horas a pH 8.9, se observó en el patrón de elución que la FBPasa disociada fue el 60% de la enzima total (Fig. 19).

En esos experimentos es posible que la FBPasa incubada por cortos tiempos a pH 8.9 pueda dar lugar a formas de bajo peso molecular debido al largo tiempo de elución (3 hs). A pesar que el porcentaje de dímeros obtenidos no justifica la pérdida de actividad. La FBPasa fue (i) incubada a pH 8.9, (ii) sembrada en una columna de Ultrogel AcA 44, y (iii) eluída con 50 mM *buffer* Na-acetato (pH 5.5). El motivo del cambio del pH desde 8.9 (incubación) a 5.5 (cromatografía) es que previene una posterior diso-

ciación de la enzima. Es de mencionar que la estabilidad de la enzima a pH 5.5 permite su almacenamiento a -15°C por largos períodos (> 1 año) [59]. En este experimento el uso de anticuerpos policlonales en la técnica de ELISA facilitó la detección de formas inactivas de la FBPasa en las fracciones eluidas. Como se muestra en la Fig. 20 el volumen de elución de la FBPasa incubada por 20 minutos fue similar al de la enzima nativa. Así, una incubación en la cual la actividad decae un 80% no produce los respectivos dímeros. Para ver que a pH 5.5 no haya una rápida reasociación se incrementó a 6 horas el tiempo de preincubación a pH alcalino. En favor de la existencia de una lenta disociación de la FBPasa a pH 8.9, este perfil de elución mostró formas de bajo peso molecular. Aunque no se muestra, el agregado de FBP y Ca^{2+} en la incubación a pH 8.9 no cambia los perfiles de elución observados. Como consecuencia, el FBP y el Ca^{2+} fueron capaces de proteger a la enzima de la inactivación que ocurre en los primeros 20 minutos pero no de la lenta disociación posterior.

Discusión

Los resultados descriptos en esta sección indican que la inactivación de la FBPasa de cloroplastos a pH alcalino constituye un evento separado de la disociación de la forma tetramérica. Ambos procesos ocurren con cinéticas diferentes. El tiempo requerido para lograr aproximadamente el 60% de inactivación y el 60% de disociación fueron 10 minutos y 3 horas respectivamente. De este modo, se resumen los resultados en el siguiente esquema:



Bajas concentraciones de H^+ dan lugar a cambios en la enzima con una concurrente pérdida de actividad (reacción 1); así, esta modificación produce una estructura inestable que posteriormente se disocia a dímeros (reacción 2). Se omiten en el esquema anterior las reacciones que causan la reversión del proceso porque la polimerización de la enzima con la concomitante recuperación de la actividad no se logra con una acidificación del medio.

El curso de la pérdida de actividad en función del tiempo obtenido en los experimentos anteriores, correlaciona con los análisis espectroscópicos llevados a cabo por otros autores [91]. El $t_{0.5}$ para la inactivación de la FBPasa (6 min) es similar al encontrado por Buc y col. para cambios en absorbancia y fluorescencia intrínseca que acompañan la variación de pH de 7.5 a 8.5. Sin embargo las técnicas adecuadas para el estudio de la estructura cuaternaria (filtración por geles) muestran que el proceso de disociación fue mucho más lento que la inactivación. Estos resultados se contraponen con la suposición que la disociación de la FBPasa es un proceso rápido que causa la pérdida de actividad [89,91,94]. Por el contrario, una forma inactiva y tetramérica de la FBPasa aparece con la alcalinización del medio; luego, la inestabilidad de esta forma da lugar al cambio de estructura cuaternaria. Es decir, la inactivación de la FBPasa a pH alcalino constituye un evento separado de la disociación de la forma de tetrámero.

Los presentes resultados brindan dos importantes elementos a tener en cuenta en el análisis de la regulación de la enzima:

1) En forma similar a otras enzimas regulatorias del ciclo de Benson y Calvin (NADP-Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa, Fosforibulokinasa) la exposición frente a perturbantes específicos por ciertos períodos, causan la despolimerización de la FBPasa. Sin embargo, aunque la disociación a pH alcalino fue un proceso termodinámicamente factible, su lentitud hace que no se pueda tener en cuenta como factor fisiológico en los rápidos cambios en el metabolismo del cloroplasto. Más aún, la ausencia de cambios de agregación en el control de la actividad está sustentada por experimentos en los cuales la FBPasa de cloroplastos permanece como tetrámero durante la estimulación de la actividad por la acción concertada de diversos moduladores [29,59,57].

2) Es obvio que la alcalinización produciría tanto cambios lentos en la estructura cuaternaria como la inactivación rápida de la enzima. Sin embargo, este efecto es contrario al que sucedería "in vivo"; puesto que en los cloroplastos iluminados el pH aumenta y la enzima adquiere mayor actividad. Frente a esta evidencia surge como corolario que "in vivo" deben existir además de los factores que estimulan la actividad, otros que eviten la inactivación. Se ha encontrado que mínimas concentraciones de FBP y Ca^{2+} retardan sustancialmente esta inactivación. Aunque por sí solos no justifiquen una completa estabilización de la FBPasa durante varias horas de iluminación, constituyen un aporte importante en este sentido si se tiene en cuenta que: (i) las concentraciones usadas de FBP guardan relación con las fisiológicas y que si bien las de Ca^{2+} fueron más altas, este metal bivalente podría llegar a ser reemplazado en tal función en el cloroplasto por el Mg^{2+} . (ii) Algún otro factor más podría existir que complemente la función estabilizadora de estos moduladores. Este último aspecto revela una nueva función de los azúcares bisfosfato y los cationes bivalentes. Además de su rol como moduladores y efectores del proceso catalítico, ellos estabilizan la estructura de la FBPasa cloroplástica. Es concebible que "in vivo" estos metabolitos del estroma estén involucrados en cambios conformacionales que determinen las características superficiales la proteína y como consecuencia controlen las interacciones de la misma con estructuras supramoleculares (membranas, proteínas).

Fig. 17. Efecto del pH en la estabilidad de la FBPasa de cloroplastos. La enzima (0.48 μg) fue incubada a 23 °C en 0.1 ml de un buffer 50 mM Tris-HCl ajustado a distintos pH. Cuando se indica, esta solución contenía 1 mM FBP/ 0.1 mM CaCl_2 . Luego de 30 minutos en una alícuota (50 μl) se determinó la actividad FBPasa "en presencia de altas concentraciones de FBP y de Mg^{2+} " como se describe en procedimientos experimentales. Actividad control (100%): 81 $\mu\text{moles de Pi liberados} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot.}^{-1}$.

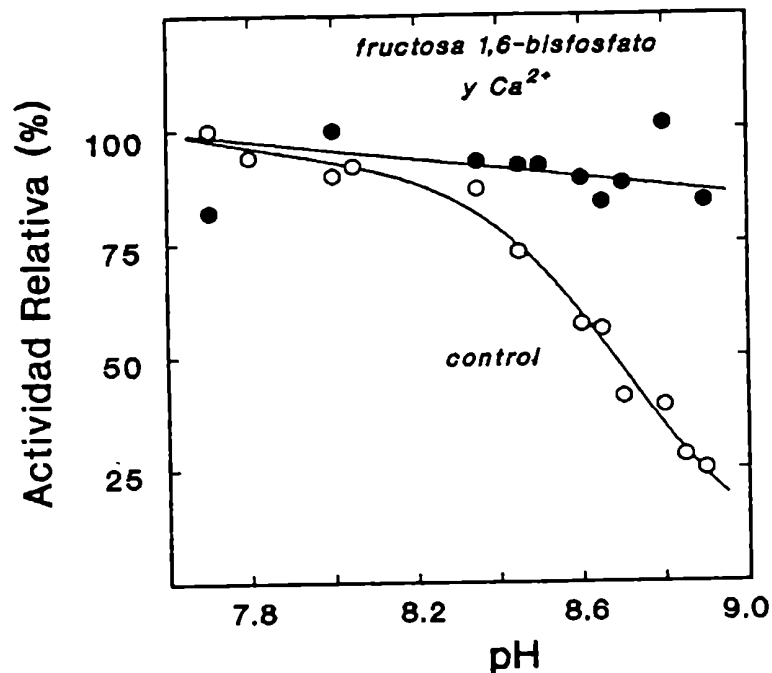


Fig. 18. Inactivación de la FBPasa a pH 8.9. La enzima (3 μg) fue incubada a 23 °C en 0.5 ml de un buffer 50 mM Tris-HCl (pH 8.9) conteniendo cuando se indica, 1 mM FBP/ 0.1 mM CaCl_2 . Luego de distintos tiempos de incubación en alícuotas de 50 μl se determinó la actividad FBPasa "en presencia de altas concentraciones de FBP y de Mg^{2+} " como se describe en procedimientos experimentales. Actividad control (100%): 83 $\mu\text{moles de Pi liberado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$.

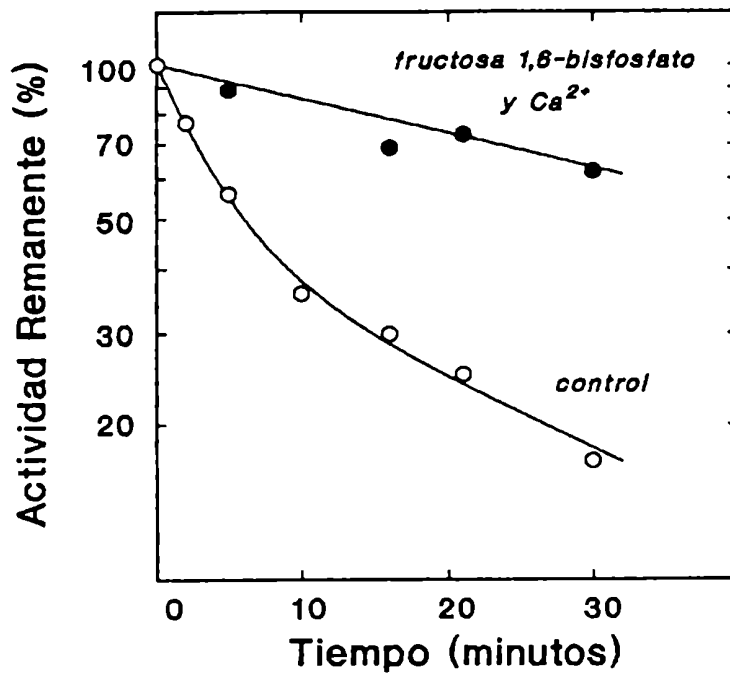


Fig. 19. Cromatografía a pH 8.9 de la FBPasa de cloroplastos tratada a pH 8.9. La enzima (28 μ g) fue incubada a 23 °C en 0.4 ml de un buffer 50 mM Tris-HCl (pH 8.9). Luego de 20 minutos o 3 horas, esta solución de enzima fue sembrada en una columna de filtración por geles Ultrogel ACA 44 (1 x 46 cm.) y eluida con 50 mM Tris-HCl (pH 8.9). Velocidad de Flujo: 8 ml/hr. Para realizar el perfil de elución de la FBPasa se midió la fluorescencia intrínseca de la misma en cada fracción (excitación: 280 nm, emisión: 332 nm). El volumen "Vo" de la columna fue determinado midiendo el volumen de elución del azul dextrano. Los marcadores que se ilustran de 147 KDa y 64 KDa fueron aldolasa y hemoglobina, respectivamente.

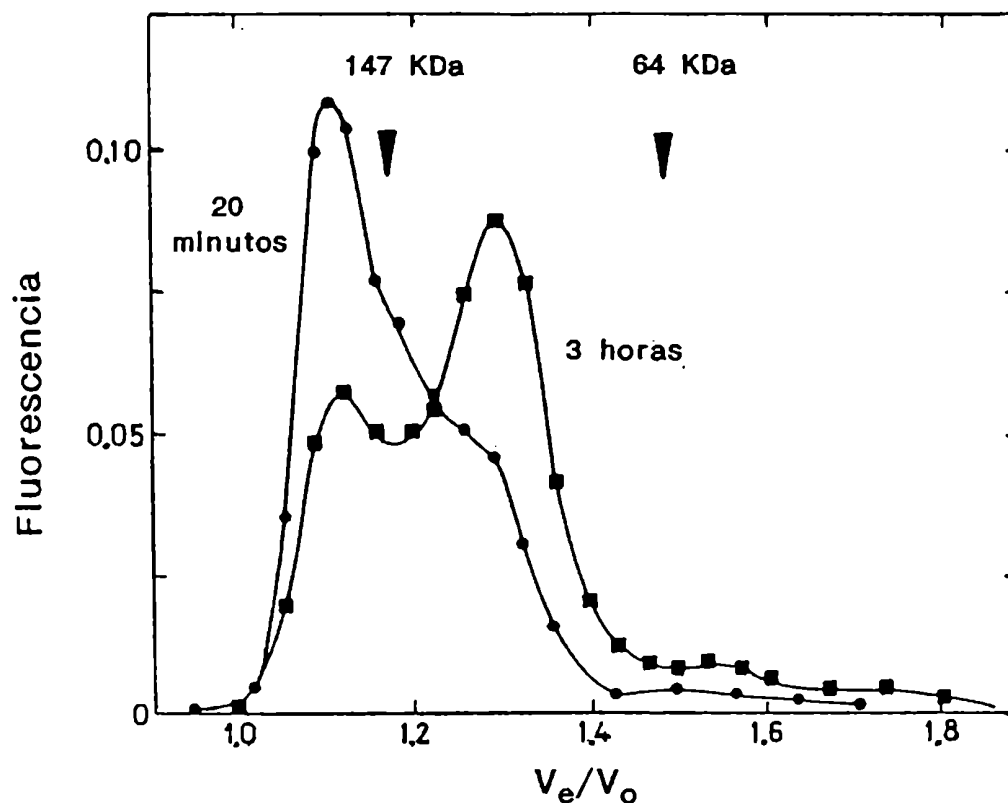


Fig. 20. Cromatografía a pH 5.5 de la FBPasa de cloroplastos tratada a pH 8.9. La enzima (28 μ g) fue incubada a 23 °C en 0.1 ml de un buffer 0.1 M Tris-HCl (pH 8.9). Luego de 20 minutos o 6 horas, 0.3 ml de buffer 50 mM Na-acetato (pH 4.4) fue agregado para dar un pH final de 5.5. Esta solución de enzima fue sembrada en una columna de filtración por geles Ultrogel ACA 44 (1 x 46 cm) y eluída con 50 mM Na-acetato (pH 5.5). Velocidad de flujo: 8 ml/hr. La presencia de FBPasa en cada fracción fue detectada por ELISA tal como se describe en procedimientos experimentales. El volumen "Vo" corresponde al volumen de elución del azul dextrano.

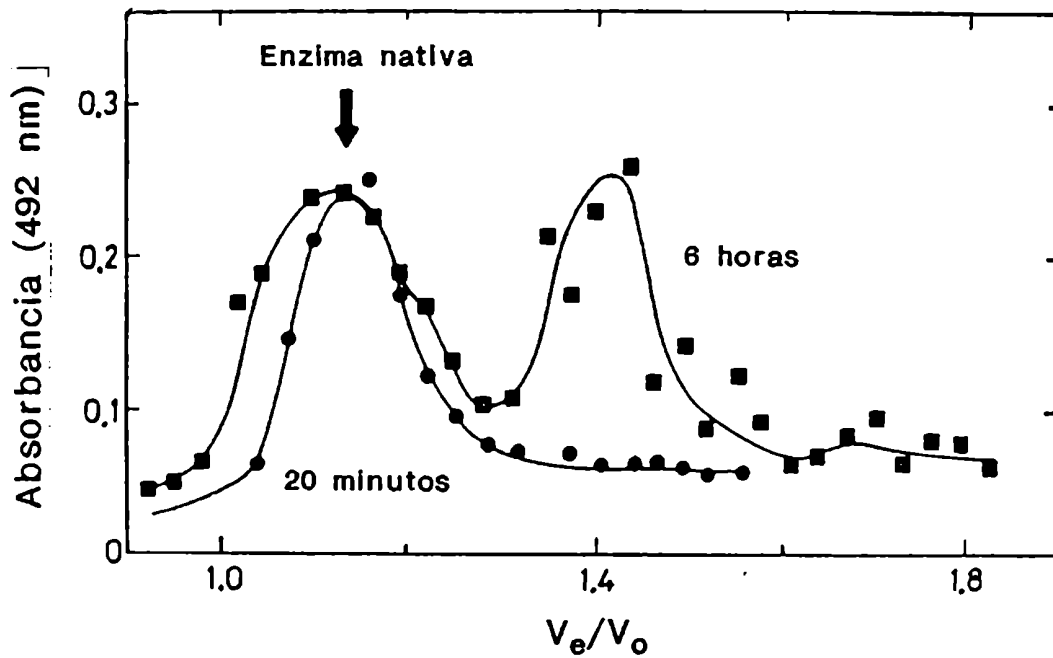


Tabla 2. Efectividad de los azúcares bisfosfatos en retardar la inactivación de la FBPasa a pH alcalino. La enzima (0.48 µg) se incubó a 23°C en 0.2 ml de 0.1 M Tris-HCl (pH 8.9)/ 0.1 mM CaCl₂ y cuando se indica, en presencia de 1 mM azúcar bisfosfato. Luego de 30 minutos, con una alícuota (0.025 ml) se ensayó la actividad FBPasa "en presencia de altas concentraciones de FBP y de Mg²⁺" como se describe en procedimientos experimentales. Actividad control (100%): 50 µmoles Pi liberado · min⁻¹ · mg prot⁻¹.

Azúcar Bisfosfato	Actividad Relativa
Ninguno	12
Fructosa 1,6-bisfosfato	100
Sedoheptulosa 1,7-bisfosfato	45
Fructosa 2,6-bisfosfato	22
Glucosa 1,6-bisfosfato	10
Ríbulosa 1,5-bisfosfato	11
Fructosa 1,6-bisfosfato menos Ca ²⁺	22
Ninguno menos Ca ²⁺	16

ACCION DE ANIONES CAOTROPICOS SOBRE LA FBPASA

Efecto sobre la actividad de la FBPasa

Estudios previos mostraron que la actividad de la FBPasa depende de las condiciones en que se realiza el ensayo de la velocidad de hidrólisis del FBP. La enzima nativa, incubada con DTT, FBP, Ca^{2+} y TRX (modulador fisiológico) se convierte en una forma catalíticamente competente a bajas concentraciones de FBP (0.8 mM) y Mg^{2+} (1 mM) [29]. También se pudo comprobar que en esa preincubación, la TRX puede ser reemplazada por moduladores no fisiológicos como aniones caotrópicos, solventes orgánicos y alta presión [59,57,61]. Sin embargo, si la enzima se ensaya en la presencia de altas concentraciones de FBP (3 mM) y Mg^{2+} (10 mM) la preincubación no es necesaria para la expresión de la actividad [92]. Por otro lado, la incubación de la FBPasa bajo condiciones desnaturizantes produce una forma enzimática incompetente para realizar catálisis. Desde este punto de vista se definen 3 tipos de estados de la FBPasa.

a) *La forma inactiva*, pero potencialmente activa, es funcional sólo en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} . Esta forma está representada por la enzima que se obtiene luego de ser purificada por el método descrito en procedimientos experimentales (enzima nativa).

b) *La forma activa*, que es catalíticamente competente también en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} (un ejemplo es la enzima activada por TRX reducida).

c) *La forma inactivada*, que no presenta actividad a ninguna concentración de FBP y Mg^{2+} (p.ej. FBPasa desnaturizada).

Los aniones caotrópicos son en general considerados como desnaturizantes de proteínas, los cuales, en el caso particular de las enzimas, causan la pérdida de la actividad catalítica. La figura 22 ilustra que la FBPasa no es una excepción a esta regla. Luego de una incubación de 6 minutos con 0.15 M tricloroacetato de sodio (NaTCA), la enzima perdió el 90% de su actividad ($t_{0.5} = 2$ min). Luego de este período, la enzima no re-

cuperó su capacidad catalítica ni "en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} " (no mostrado), ni "en bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} " luego de la incubación con el sistema completo de activación (fig. 22). La incorporación al medio de 1 mM FBP o de 0.1 mM $CaCl_2$ antes del agregado de NaTCA no previno la pérdida de actividad. Tampoco el agregado en forma posterior la restituyó. Sin embargo, la enzima retuvo la capacidad de hidrolizar el sustrato cuando se incorporó el FBP junto con el Ca^{2+} antes de la adición del NaTCA. Este experimento claramente indica que la expresión de la actividad de la FBPasa no sólo depende de los moduladores que estén presentes sino que también depende del orden de agregado de los mismos. Analizando el orden entre el FBP, Ca^{2+} y NaTCA, se obtiene las siguientes conclusiones: El anión caotrópico debe seguir al agregado de los dos primeros sin preceder a ninguno si se quiere obtener a la FBPasa activa. Es decir, sólo las dos secuencias que finalicen con el agregado de tricloroacetato son posibles (FBP, Ca^{2+} , NaTCA o Ca^{2+} , FBP, NaTCA).

La concentración de FBP y Ca^{2+} que se usó en la mayoría de los ensayos fueron de 1 mM y 0.1 mM, respectivamente. Se eligieron estas concentraciones para asegurarse una protección efectiva como la observada en la fig. 22. Por debajo de 0.3 mM FBP, la protección frente a la inactivación por NaTCA disminuye considerablemente (fig. 23). Por otro lado, la presencia de 0.1 mM $CaCl_2$ es suficiente (en presencia de 1 mM FBP) para que la inactivación sea prácticamente nula ($\approx 0\%$) a los 8 minutos de incubación (fig. 22); por otra parte la reducción de la concentración de este catión bivalente a 0.05 mM, disminuye un 30% la actividad en ese mismo período (no mostrado).

Los análisis previos mostraron que la FBPasa tiene una alta especificidad por el sustrato (FBP); en tanto que otros azúcares fosfato son funcionales en la estimulación de la actividad enzimática [29,59,57, ver página 57]. Para conocer si otros metabolitos reemplazan al FBP en la protección concertada de la inactivación de la enzima por NaTCA, primero se incubó la FBPasa con 0.1 mM $CaCl_2$ y 1 mM de azúcar bisfosfato en la presencia de 0.15 M de NaTCA y posteriormente se ensayó la actividad con 2.8 mM FBP y 10 mM $MgCl_2$. La tabla 3 resume estos estudios cinéticos. La velocidad de inactivación más lenta fue obtenida cuando el azúcar bisfos-

fato presente en el medio de incubación fue el FBP. En este caso, Luego de una hora la enzima retiene más del 85% de la actividad. Otros azúcares bisfosfato no evitaron la inactivación de la FBPasa por NaTCA. Para analizar si algún otro catión bivalente es funcional en mantener la actividad de la enzima se realizó el experimento detallado en la tabla 4. Como se observa, el Ca^{2+} pudo ser reemplazado por otros cationes bivalentes; bajas concentraciones de Mn^{2+} o altas concentraciones de Mg^{2+} en la presencia de FBP previnieron la pérdida de actividad enzimática causada por NaTCA.

La protección de la FBPasa frente a la inactivación mediada por NaTCA está dada por la presencia simultánea de FBP y Ca^{2+} . Con el objeto de saber si el azúcar bisfosfato y el metal bivalente son requeridos en todo momento para mantener la función enzimática o si producen cambios estables en la estructura de la enzima se realizó el siguiente experimento: Se incubó la FBPasa con 0.15 M de NaTCA en la presencia de 1 mM FBP y 0.1 mM CaCl_2 y luego de 5 minutos se agregó EGTA para quelar todo el Ca^{2+} libre. Como se muestra en la figura 24, la remoción del Ca^{2+} por la adición de EGTA, disminuyó inmediatamente la actividad enzimática. Esta inactivación fue más rápida ($t_{0.5} < 0.5$ min) que la observada cuando el NaTCA fue agregado directamente a la forma nativa de la enzima que ya estaba en presencia de EGTA (fig. 22, $t_{0.5} = 2$ min). En experimentos paralelos se observó que la adición posterior de CaCl_2 (0.4 mM) no restituye la actividad original aún después de 1 hora de incubación (no mostrado). Tampoco la reducción (activación) de la enzima agregando DTT al medio previene la inactivación por EGTA (fig. 25). La pérdida total de la capacidad catalítica cuando el Ca^{2+} es quelado indica un requerimiento permanente del catión bivalente para prevenir la inactivación de la FBPasa mediada por NaTCA. Este requerimiento vale tanto para la enzima nativa (oxidada) como para la activa (reducida).

En apariencia, los resultados de las figuras 24 y 25 están en contradicción con estudios previos de la activación de la FBPasa mediada por NaTCA [59]. En esos experimentos, la actividad permaneció alta aunque la enzima fue incubada con FBP, Ca^{2+} y NaTCA y luego fue agregada a una solución que contenía EGTA. Los resultados en la tabla 4 sugieren que en el último caso la presencia de Mg^{2+} (1 mM) en la solución de ensayo co-

opera para mantener a la FBPasa en la forma activa. Además, la efectividad del NaTCA declina porque la concentración se disminuye 20 veces luego del agregado [59]. Otro experimento es coherente con la acción protectora del Mg^{2+} . La reacción catalítica permaneció inalterada cuando la velocidad de formación de fosfato fue estimada en "*altas concentraciones de FBP y Mg^{2+}* " en la presencia de 0.15 M NaTCA (fig. 26). Además, este experimento claramente indica que el tricloroacetato no ejerce ningún efecto sobre el paso catalítico propiamente dicho pues la actividad específica es la misma tanto en ausencia como en presencia del anión caotrópico. En los primeros experimentos en que se observó que el tricloroacetato podía reemplazar a la TRX en la modulación, se obtenía una forma activa de la FBPasa pero que en la presencia de NaTCA no lograba una alta velocidad de hidrólisis del sustrato [59]. Por tal motivo, se había utilizado la estrategia de usar NaTCA en la etapa de modulación y diluirlo al examinar la velocidad catalítica. Así, se había concluido que el anión caotrópico era activador en la fase de modulación e inhibidor en la reacción catalítica. A la luz de los experimentos reportados aquí en esta tesis, se puede concluir que en la etapa de catálisis el NaTCA inactivaba irreversiblemente a la FBPasa. La reacción catalítica puede transcurrir en presencia de NaTCA si se eleva la concentración de Mg^{2+} (en presencia de FBP) para estabilizar a la enzima.

Como conclusión de todos estos resultados, el FBP y un catión bivalente no sólo producen una enzima activable, sino que también previenen la transformación a una forma inactivada por tricloroacetato.

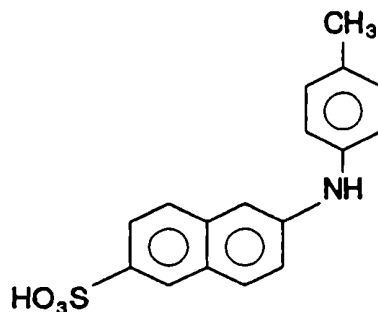
Acción del NaTCA sobre la fluorescencia intrínseca de la FBPasa

La FBPasa es un tetrámero que contiene 2 triptofanos por subunidad [98]. Debido a que la emisión de fluorescencia de estos residuos es sensible a las características del entorno, estos son potenciales sondas intrínsecas para seguir cambios conformacionales. Teniendo en cuenta esto, se estudió la fluorescencia en el máximo de emisión a 330-332 nm (ver fig. 40, sección *Estabilidad de la FBPasa*). Como se muestra en la fig. 27 la emisión a 332 nm disminuyó en forma continua cuando la FBPasa fue excitada a 280 nm en la presencia de concentraciones crecientes de NaTCA. Sin embargo, este efecto del anión caotrópico no puede ser adjudicado directa-

mente a cambios en la posición relativa del cromóforo porque el decaimiento de la emisión de la enzima correlacionó estrictamente con el "quenching" mediado por tricloroacetato de la emisión del N-Acetil triptofanil etil éster (N-AcTrpOEt) en solución. Si la acción del tricloroacetato fuera exclusivamente colisional e independiente de la conformación de la proteína, el decaimiento observado sería insensible a la presencia de moduladores. Que el "quenching" de la fluorescencia del triptofano depende de su exposición al solvente es sustentado por la prevención en forma parcial al decaimiento de la fluorescencia intrínseca cuando la FBPasa fue incubada con 2 mM FBP y 0.2 mM CaCl_2 . Además, el decaimiento de la fluorescencia del triptofano siguió una cinética diferente en la presencia del azúcar bisfosfato y el metal bivalente. Como se ve en fig. 28 la emisión a 332 nm de la FBPasa nativa excitada a 280 nm al principio cayó rápidamente ($t_{0.5} = 2$ minutos) y luego lo hizo en forma lenta. El primer decaimiento coincidió con el hecho de que la actividad se perdió en tiempos similares (fig. 22). Durante todo el transcurso de la medida, a pesar de que la intensidad de fluorescencia baja, el máximo de emisión no varió manteniéndose en 332 nm. Este hecho indica que la forma enzimática generada no está totalmente desnaturalizada, a pesar de haber perdido actividad, pues el máximo de emisión de la enzima totalmente desnaturalizada es de aproximadamente 350 nm (ver fig. 40, sección *Estabilidad de la FBPasa*) al igual que el de todas las proteínas desnaturalizadas que contienen triptofano [97] y el del propio triptofano en solución. La respuesta de la enzima frente al tricloroacetato en la presencia de FBP y Ca^{2+} fue diferente; hubo una declinación lenta de la fluorescencia ($t_{0.5} = 15$ min) y luego alcanzó un valor constante (67% del original luego de 45 minutos). La protección parcial por el FBP y el Ca^{2+} al "quenching" producido por tricloroacetato es consistente con los estudios cinéticos reportados anteriormente, sustentando el hecho de que la FBPasa nativa es modificada por FBP y Ca^{2+} previniendo cambios conformacionales que induce el tricloroacetato.

Respuesta de la fluorescencia del TNS frente al tricloroacetato en presencia de FBPasa

Para proveer una evidencia independiente de la interacción no-covalente del FBP y el Ca^{2+} con la FBPasa, se analizó la emisión de fluorescencia de sondas extrínsecas. Se sabe que ciertos derivados de sulfonatos de aminonaftalenos fluorescen con mayor intensidad y hacia longitudes de onda menores en solventes o entornos no polares [99]. Además, estos compuestos tienen mayor solubilidad en esos medios que en el H_2O . Sobre esta base, se concluye que el incremento de la emisión de estas moléculas en soluciones proteicas se produce debido a la incorporación de las mismas a los dominios hidrofóbicos de las proteínas. Dadas estas características, este tipo de moléculas han sido usadas para sensar cambios conformacionales en proteínas porque pueden unirse diferencialmente a conformeros que les permitan acceder a estos dominios hidrofóbicos. El 2-(p-toluidinil)naftalen-6-sulfonato (TNS) fue usado con ese objeto sobre la FBPasa de cloroplastos.



2-(p-toluidinil)naftalen-6-sulfónico (TNS)

Una solución conteniendo 80 μM de TNS y 0.03 μM de FBPasa se excitó a 366 nm y se monitoreó la emisión de fluorescencia a 404 nm (donde se registró el cambio máximo). La fig. 29 muestra que en contraste con lo esperado por los efectos de "quenching", la incorporación de 0.14 M de NaTCA incrementó la emisión de TNS. Por otro lado, la fluorescencia relativa del TNS permaneció sin variaciones cuando la FBPasa fue incubada por 20 minutos con 1 mM FBP y 0.1 mM CaCl_2 , sin embargo la adición posterior de tricloroacetato incrementó la emisión a 404 nm. Aunque el tricloroacetato estimuló la fluorescencia en ambos casos, el proceso fue más rápido en la presencia de FBP y Ca^{2+} . El $t_{0.5}$ fue de 15 minutos en este

último caso respecto de 40 minutos cuando se omitió el FBP y el Ca^{2+} . En estos experimentos se evidenció la capacidad del tricloroacetato de exponer dominios hidrofóbicos tanto en la enzima nativa como en la enzima tratada previamente con FBP y Ca^{2+} .

La respuesta de la fluorescencia de la sonda extrínseca frente al tricloroacetato fue contraria a la respuesta de la fluorescencia intrínseca. Por lo tanto, se decidió asegurarse que el incremento de la fluorescencia se originó debido a un cambio conformacional de la proteína que contribuye a incorporar la sonda (TNS) a un dominio hidrofóbico inaccesible al "quencher". Con este fin se analizó la fluorescencia de 0.2 mM de TNS luego de la incorporación a un bolsillo hidrofóbico de un oligosacárido cíclico: β -ciclodextrina (1 mM) [100]. Como se muestra en la figura 30, aunque la β -ciclodextrina estimuló la emisión de fluorescencia, la adición de 0.15 M de tricloroacetato bajó el 80% del máximo de emisión. Así, el tricloroacetato canceló ("quenching") la emisión a 460 nm porque la inserción a esa estructura hidrofóbica rígida hizo accesible al solvente al TNS incorporado. Sobre esta base, es posible que la modificación estructural de la FBPasa por el tricloroacetato facilite la incorporación del TNS a un dominio hidrofóbico lejos de la superficie de la proteína.

Espectro de cuarta derivada de la FBPasa

En el espectro convencional de absorción U.V. de proteínas no siempre se ponen de manifiesto aspectos estructurales que son importantes. Esto es así porque las interacciones del solvente con la proteína y las transiciones rotacionales y vibracionales ensanchan los picos con la consecuente superposición de los mismos. El reciente desarrollo en la adquisición de datos y el manejo computacional de los resultados facilitó el cálculo de la cuarta derivada del espectro de absorción, que resuelve las bandas de interés en la misma posición que en el espectro original [101,102,(?)]. Variaciones en las longitudes de onda que caracterizan estos picos proveen información cualitativa del entorno que rodea a los cromóforos en las proteínas. Por lo tanto, después de la incubación con diferentes moduladores, el espectro de absorción de la FBPasa se registró y transfirió a una computadora. Posteriormente la cuarta derivada fue obtenida con un programa desarrollado en lenguaje Pascal. Este método permitió

detectar cambios en el entorno de los crómoforos triptofano, tirosina y fenilalanina [101,102,108]. Dado el número de fenilalaninas (9), tirosinas (19) y triptofanos (2) por monómero de FBPasa [98] fue de esperar que la mayor contribución del espectro (entre 260 nm y 300 nm) estuviese dada por parte de los residuos tirosilo.

Como se ilustra en la figura 31, los dos picos principales en el espectro de cuarta derivada de la FBPasa (279.5 nm y 287.5 nm, curva 1) no fueron modificados ni por el FBP (1.25 mM) ni por el CaCl_2 (0.12 mM) (curva 2). Sin embargo, la acción concertada del azúcar bisfosfato y el catión bivalente desplazó los máximos a 278 nm y 288 nm (curva 3). Cuando se agregó EGTA para quelar todo el Ca^{2+} libre presente, el espectro retornó al observado con la enzima nativa (curva 4). Luego de la adición de NaTCA (0.15 M) a esta solución, aparecieron en el espectro 3 picos bien definidos, localizados a 277 nm, 284 nm y 290.5 nm (curva 5). Confirmando que el efecto del NaTCA es irreversible cuando los moduladores están ausentes, no hubo diferencias significativas en el perfil de la cuarta derivada por el agregado de CaCl_2 (0.4 mM) a la solución. Más aún, cuando a la enzima nativa se le agregó NaTCA se obtuvo un espectro similar al de la curva 5 (no mostrado). Por el contrario, la incorporación de NaTCA a la solución conteniendo FBPasa en la presencia de FBP (1.0 mM) y CaCl_2 (0.1 mM) produjo un espectro radicalmente diferente (curva 6): sólo 2 picos, uno localizado a 277 nm y el otro a 287 nm, aparecieron después de la adición del anión caotrópico. Se infiere de todos estos datos que la acción concertada del FBP y el Ca^{2+} determinan el efecto del NaTCA sobre la estructura terciaria de la FBPasa. Claramente, la acción del anión caotrópico en la FBPasa nativa produce una enzima irreversiblemente inactivada cuya estructura terciaria es diferente de la forma activable obtenida en la presencia de FBP y Ca^{2+} .

Un resumen de los experimentos espectrofotométricos se puede ver en el siguiente esquema.

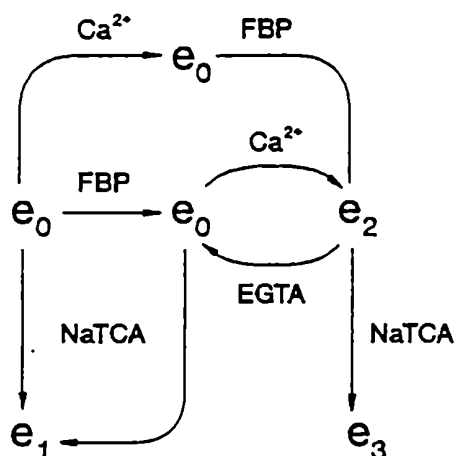


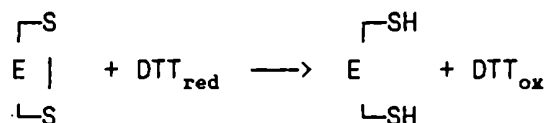
Fig. 21. Esquema de los patrones espectrales obtenidos sobre la FBPasa. En el esquema, e_x representa un tipo de espectro de derivada cuarta de absorción U.V. Cuando los subíndices son iguales, los espectros son indistinguibles.

Efecto de los reductores sobre la FBPasa

Aunque es bien sabido que los ditioles (los monotioles en menor grado) estimulan la capacidad hidrolítica de la FBPasa "en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} " [12,103], los experimentos anteriores fueron llevados a cabo en la ausencia de reductores. El objetivo fue caracterizar los efectos cinéticos y estructurales de los moduladores que interactúan no-covalentemente con la enzima. Se observó la existencia de dos formas activables de la FBPasa: Una originada por la interacción con FBP y Ca^{2+} y otra que además requiere la presencia de NaTCA. De esta manera, la interacción de los moduladores podría alterar la estructura de la enzima y como consecuencia condicionar la activación posterior por DTT. Por lo tanto, se trató la FBPasa durante 15 minutos con 1.25 mM FBP y 0.125 mM de Ca^{2+} en la presencia y en la ausencia de tricloroacetato y después de incubar con DTT se ensayó la actividad a 0.8 mM FBP y 1 mM Mg^{2+} para estudiar la cinética de formación del estado activo de la FBPasa. Como ilustra la figura 32, la presencia de 0.15 M NaTCA previa a la adición de 16 mM DTT produjo una enzima totalmente activada en 5 minutos; por el contrario, una hora de incubación fue necesaria para lograr la actividad máxima cuando el tricloroacetato fue omitido (fig. 32-control). Además, otros dos parámetros determinaron la actividad específica final de la

FBPasa de cloroplastos: La concentración de DTT y el tiempo de incubación.

La importancia de los agentes reductores (tioles) en estimular la actividad de la FBPasa de cloroplastos radica en que posibilitan la siguiente reacción:



La velocidad de modificación enzimática $-d[\text{ES}_2]/dt$ está dada por $k \cdot [\text{ES}_2] \cdot [\text{DTT}]$ donde k : constante de velocidad de segundo orden, E_2 : Enzima oxidada y DTT: ditioneitol. En los experimentos descritos, la concentración de DTT ($> 2 \text{ mM}$) excedió largamente la concentración de la FBPasa ($< 10 \text{ }\mu\text{M}$); por lo tanto, la reacción descrita en la ecuación anterior debería seguir una cinética de pseudoprimer orden, es decir: $k' = k \cdot [\text{DTT}]$. Sobre esta base, al integrar la velocidad de conversión de la enzima se obtiene que $\ln(2) = k' \cdot (t_{0.5})$, cuyo reordenamiento conduce a $1/t_{0.5} = k \cdot [\text{DTT}] / \ln(2)$. Teniendo esto presente, se obtuvieron los respectivos $t_{0.5}$ de los datos de la fig. 32 usando el método de regresión no lineal de Gauss-Newton. Como se puede ver en la fig. 33 existió una dependencia lineal entre el proceso de activación ($1/t_{0.5}$) y la concentración de DTT. Además, la figura 33 nos muestra que el pretratamiento de la enzima con el anión caotrópico aceleró 13 veces la velocidad de activación mediada por DTT. Cuando la FBPasa fue incubada con FBP y Ca^{2+} la constante de velocidad de segundo orden (k) fue $48.1 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ y $3.7 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ en la presencia o ausencia de 0.15 M NaTCA , respectivamente. De esta forma se ve que la conversión de puentes disulfuro a grupos sulfidrilo es el factor determinante en la velocidad de activación de la FBPasa, pues $1/t_{0.5}$ varía en forma lineal respecto de la concentración de DTT. Si existiese algún paso conformacional que limitase la transformación a la enzima activa, tal dependencia lineal no existiría: a altas concentraciones de DTT, cuando la reducción propiamente dicha es rápida, debería ponerse de manifiesto cualquier otro paso en la reacción convirtiéndose en limitante, aunque a bajas concentraciones de DTT no lo hubiese sido. Así, bajo esta

suposición, se debería obtener una curva de $1/t_{0.5}$ vs. DTT en la cual a altas concentraciones de DTT se obtendría una meseta y no una recta. El hecho de obtener una recta y que no exista un efecto de saturación, implica que si existe algún paso conformacional extra debería ser extremadamente rápido y como consecuencia, no-limitante de la reacción.

Si existiese algún paso previo a la reducción que limitase la reacción de activación, la preincubación de la enzima con todos los moduladores exceptuando el reductor, debería dar una velocidad de activación mayor que cuando la enzima no es preincubada. La preincubación de la enzima durante 0 minutos o 15 minutos con FBP (1.25 mM), CaCl_2 (0.125 mM) y NaTCA (0.15 M) generaron curvas de activación similares frente a la adición de DTT 8 mM. Ambas curvas tuvieron un $t_{0.5}$ de 2.5 minutos (no mostrado).

Como conclusión de los datos anteriores, la reducción del grupo S-S es el paso limitante de la velocidad en el proceso que genera la forma de la FBPasa que puede realizar catálisis en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} .

Reversibilidad de acción del tricloroacetato

El NaTCA actuó sobre la FBPasa incrementando la velocidad de reducción (activación) por DTT. Si la acción del anión caotrópico fuera reversible, al incubar la FBPasa con él y luego diluirlo debería obtenerse una forma enzimática con potencialidad de ser activada por DTT pero a una velocidad baja, como si no hubiese estado en presencia del anión caotrópico. Con el objeto de verificar esto se realizó el experimento de la fig. 34. Una solución de FBPasa conteniendo FBP y Ca^{2+} fue sucesivamente incubada con (i) 150 mM de NaTCA por 5 minutos, (ii) 15 mM de NaTCA por 5 minutos, (iii) 5 mM de DTT por tiempos variables; finalmente, (iv) se ensayó la actividad FBPasa "en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} ". Al igual que la FBPasa tratada continuamente con 15 mM tricloroacetato, la enzima incubada en forma alternada con 150 mM y 15 mM incrementó su actividad lentamente con el agregado de DTT. Por el contrario, la presencia constante de 150 mM tricloroacetato acortó el tiempo para la activación de la enzima. Como conclusión, la presencia permanente de concentraciones estimuladoras de tricloroacetato permiten una rápida ac-

tivación reductiva de la FBPasa; de otra manera, la enzima revierte a una forma cuya actividad es estimulada lentamente por el DTT.

Hidrofobicidad de la FBPasa de cloroplastos

Teniendo en cuenta que los aniones caotrópicos pueden actuar sobre las proteínas facilitando la exposición de sitios hidrofóbicos, y que además pueden activar a la FBPasa, se estudió el patrón de hidrofobicidad de dos FBPasas cloroplásticas (de trigo y espinaca) activables por luz y de una gluconeogénica como la de riñón de cerdo. De estas enzimas se conocen las secuencias de aminoácidos [98,95,96]. Las FBPasas de cloroplastos presentan, a diferencia de las gluconeogénicas conocidas [98] un péptido extra que tiene 2 cisteínas que intervendrían en la regulación mediada por luz. Los patrones de hidrofobicidad estimados de las enzimas cloroplásticas son muy similares entre sí, (fig. 35) pero varían significativamente de la gluconeogénica. Como se puede observar en la figura 35, el péptido extra se encuentra en una zona de gran hidrofobicidad. Por este motivo es probable que esta zona no esté disponible fácilmente al solvente, y que el agregado de perturbantes faciliten su exposición o la accesibilidad a la misma por parte de reactivos químicos. Este hecho está de acuerdo con un modelo en el cual los aniones caotrópicos facilitan la acción de los reductores que activan a la enzima.

Discusión

Para dilucidar el mecanismo por el cual la luz activa a la FBPasa en el estroma de los cloroplastos, es importante lograr una comprensión acabada del proceso por el cual los moduladores incrementan la actividad enzimática. La meta de los experimentos presentados en este capítulo fue caracterizar cómo las modificaciones no-covalentes están relacionadas con las modificaciones covalentes para convertir a la FBPasa de una forma inactiva a otra activa. Hasta el presente, se ha asumido que la modificación mediada por la TRX del estado redox del par tiol/disulfuro en la FBPasa, potencia la capacidad de hidrolizar el FBP. La alta concentración de TRX necesaria en el proceso de activación (2-3 μM), hace técnicamente difícil caracterizar, mediante un análisis espectral (absorción U.V. o fluorescencia), cualquier modificación no covalente en la enzima. La TRX, al

ser una proteína que contiene triptofanos y tirosinas, absorbe en el U.V. y también fluoresce, por lo que interfiere en los ensayos. Por lo tanto, se ha utilizado un procedimiento no fisiológico para resolver claramente la secuencia de eventos que finalizan con una FBPasa competente para la catálisis. Para este propósito, se seleccionó un perturbante de proteínas (tricloroacetato) que reemplaza a la TRX y no interfiere en los análisis espectrales. A pesar de que por debajo de 260 nm el NaTCA comienza a absorber, esta banda de absorción es muy ancha; por tal motivo en la cuarta derivada queda totalmente abolida [83,108]. Junto con el NaTCA se utilizó como reductor el DTT.

Como se acepta generalmente para un desnaturizante proteico, el tricloroacetato inactivó irreversiblemente a la forma nativa de la FBPasa, aunque sin lograr una desnaturización completa. Luego de la remoción del caotrópico no se recuperó la actividad. Se describió la formación de un estado diferente, donde en presencia de tricloroacetato, se obtiene un espectro con características distintas al de la enzima nativa. Entonces, el efecto del tricloroacetato sobre la enzima nativa puede describirse como:



donde E_0 : forma nativa de la FBPasa y E_1 : enzima inactivada por tricloroacetato. La formación de E_1 estuvo acompañada además por un decaimiento en la fluorescencia intrínseca de la FBPasa.

Por otro lado, el FBP y el Ca^{2+} dieron lugar a un espectro U.V. de la FBPasa diferente al de la forma nativa. Esta modificación de la posición relativa de los residuos tirosina fue revertida por la remoción de los moduladores (fig. 31 curvas 2, 3 y 4) De estos datos se desprende que la acción del FBP y la del Ca^{2+} sobre la FBPasa puede ser representada mínimamente por:



donde E₂: forma de la FBPasa inducida por FBP y Ca²⁺. En este aspecto se considera que la activación lograda con altas concentraciones de FBP y Ca²⁺ [34,31 (fig. 4)] no es similar a la de la ecuación 2 porque en estos casos es necesario elevar la concentración de los moduladores (5 mM FBP, 1 mM Ca²⁺), el tiempo de incubación entre 10 y 20 minutos y la temperatura a 30°C. En el caso de la ecuación 2 los cambios se completan en menos de 2 minutos y las concentraciones de los moduladores son mucho menores (1 mM FBP, 0.1 mM Ca²⁺)

Como se presenta en esta tesis, la incubación con azúcar bisfosfato y metales bivalentes no sólo previnieron la inactivación por tricloroacetato, sino también aquellas producidas por pH y Urea (Ver sección *Estabilidad de la FBPasa*). Dados estos resultados no es sorprendente que la fluorescencia de sondas intrínsecas y extrínsecas y los estudios de espectrofotometría U.V. hayan indicado la presencia de nuevas especies cuando la FBPasa fue tratada con tricloroacetato si previamente en la solución había FBP y Ca²⁺. Además de la modificación de las constantes cinéticas, la respuesta a los cambios mediados por tricloroacetato, (i) decaimiento de la fluorescencia intrínseca, (ii) incremento de la fluorescencia del TNS y (iii) cuarta derivada del espectro U.V. de la FBPasa, se propone la siguiente conversión:



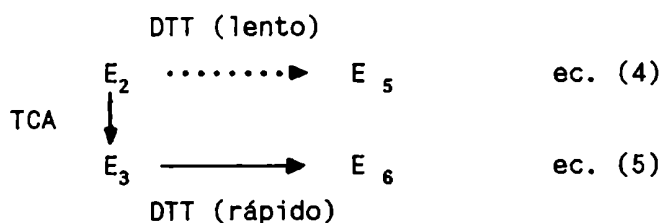
donde E₃: es la forma de FBPasa tratada primero con FBP/Ca²⁺ (E₂) y luego con tricloroacetato.

Aunque se sabe que la estructura terciaria de las proteínas puede ser modificada por sales [93], Damodaran observó que la variación de la termoestabilidad de la α-Lactalbúmina dada por los aniones caotrópicos es

la opuesta a como se comporta la albúmina sérica bovina [104]. Así, a diferencia de la noción general en la cual los iones caotrópicos son sólo desnaturalizantes de las proteínas, estos experimentos indican que la perturbación es condicionada por la proteína bajo consideración. Los resultados presentados aquí, extienden este nuevo concepto a características funcionales de varios estados de una enzima (FBPasa) porque ciertas formas se vuelven activas en respuesta al tricloroacetato mientras otras son irreversiblemente inactivadas.

En los estudios descriptos, el FBP y el Ca^{2+} mediaron la transformación de E_0 a E_2 . La existencia de estas dos formas (E_0, E_2) da una base para explicar la acción dual del tricloroacetato sobre la FBPasa. El tricloroacetato fue muy efectivo para conducir a la generación de E_1 (a partir de E_0) y E_3 (a partir de E_2) seguramente por modificación de interacciones no-covalentes. A diferencia de los estados de la FBPasa descriptos hasta aquí (E_0, E_1, E_2, E_3 , inactivos a bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+}), la reducción de los puentes disulfuro por DTT genera una forma de enzima que es funcional en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} .

Zimmerman y Col. mostraron que la incubación con 20 mM DTT en 24 horas incrementa la actividad de la enzima [92]. Sin embargo, tratando la FBPasa con FBP, Ca^{2+} y tricloroacetato se aceleró en gran medida la activación.



Donde E_5 y E_6 : Formas enzimáticas generadas por reducción con DTT. E_5 y E_6 probablemente tengan conformaciones similares.

En base a las ecuaciones 1,2,3,4 y 5 se propone el siguiente modelo (fig. 36) para la activación de la FBPasa que explica los datos obtenidos.

En este modelo, la enzima nativa (E_0) es susceptible de ser inactivada por el tricloroacetato. En general, un anión caotrópico como el tricloroacetato produce una desorganización general de la estructura proteica al permitir que se expongan inespecíficamente dominios hidrofóbicos. La fructosa 1,6-bisfosfato y el Ca^{2+} al estabilizar la enzima y producir un cambio conformacional para pasar al estado E_2 permiten una acción "controlada" del tricloroacetato. El FBP y el Ca^{2+} protegerían los dominios correspondientes al sitio activo de la enzima "congelando" o estabilizando la estructura de la proteína en esa zona. La acción "controlada" de los aniones caotrópicos sería la exposición selectiva de algunas zonas hidrofóbicas de la macromolécula mientras la estructura general de la enzima y de su sitio activo se conservan. En el modelo propuesto se facilitaría la accesibilidad a la zona hidrofóbica donde está el extrapéptido regulatorio putativo. Al ocurrir esto, los reductores podrían ejercer su efecto sobre los puentes disulfuro que son responsables de la activación de la enzima. Esta sería la base del mecanismo de acción por el cual los aniones caotrópicos activan a la FBPasa de cloroplastos.

Es posible que la forma intermediaria E_3 ya exista en solución en equilibrio con la forma E_2 en una proporción dada. la función del tricloroacetato en este caso sería la de desplazar el equilibrio hacia la forma E_3 . Bajo esta hipótesis, el DTT en ausencia de tricloroacetato podría reaccionar con el porcentaje de la forma E_3 existente; de esta manera, se justificaría la baja velocidad de activación en ausencia del caotrópico (sin necesidad de considerar la reacción 5). La forma de enzima sujeta a reducción sería E_3 y el tricloroacetato controlaría la velocidad de la misma variando la proporción de las formas E_2 y E_3 en solución. Desde este punto de vista, si la reducción mediada por TRX se lleva a cabo sobre un intermediario como E_3 , la presencia de tricloroacetato en la solución debería tener una acción sinérgica con la TRX sobre la activación de la FBPasa. Esta suposición fue confirmada por experimentos hechos con TRX-*f* de espinaca (S. Mora García, datos no publicados). Por otra parte, el tricloroacetato no habría tenido efecto sobre la TRX pues en un experimento control, no modificó su espectro de derivada cuarta de absorción ultravioleta (no mostrado).

El NaTCA no actúa como mediador redox sino como modificador de la estructura de la FBPasa permitiendo una mayor accesibilidad de los reactivos reductores. En este sentido no se puede descartar que *in vitro* también la TRX tenga un comportamiento análogo, actuando como un componente estructural, permitiendo el acceso al DTT, además de funcionar como mediador redox.

Se ha descrito la función de ciertos moduladores de la enzima y la acción del NaTCA en la activación mediada por caotrópicos, agentes que tradicionalmente son considerados desnaturalizantes de las proteínas. Los resultados presentados no sólo contribuyen al conocimiento sobre la relación estructura-función de una enzima cloroplástica como la FBPasa, sino que además contribuyen al conocimiento del efecto de estos perturbantes sobre las enzimas en general. Conociendo la forma de activación de estos agentes, se podría aplicar y extender estos resultados a enzimas de interés biotecnológico.

Fig. 22. Inactivación de la FBPasa por NaTCA. Protección por FBP y Ca^{2+} . La enzima (3.5 μg) se incubó en 0.5 ml de una solución 50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 0.15 M Na-tricloroacetato y, cuando se indica, 0.1 mM CaCl_2 y 1 mM FBP. Cuando no se agregó CaCl_2 la solución tenía 0.1 mM EGTA. A los tiempos indicados una alícuota (0.05 ml) se agregó a 0.2 ml de una solución activadora, siendo las concentraciones finales en todos los tratamientos de 0.15 M NaTCA/ 5 mM DTT/ 1 mM FBP/ 0.1 mM CaCl_2 / 50 mM Tris-HCl (pH 7.9). Se activó por 10 minutos y en una alícuota de 0.05 ml se midió actividad enzimática "en presencia de bajas concentraciones de FBP y de Mg^{2+} " como se indica en procedimientos experimentales. Todas las incubaciones se realizaron a 23°C. Actividad control (100%): 57 $\mu\text{moles de Pi liberado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$.

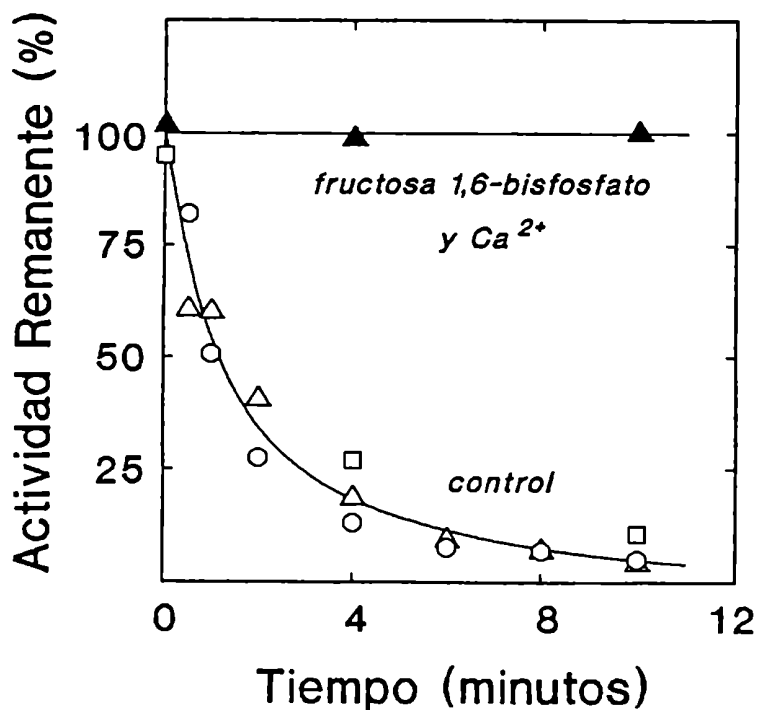
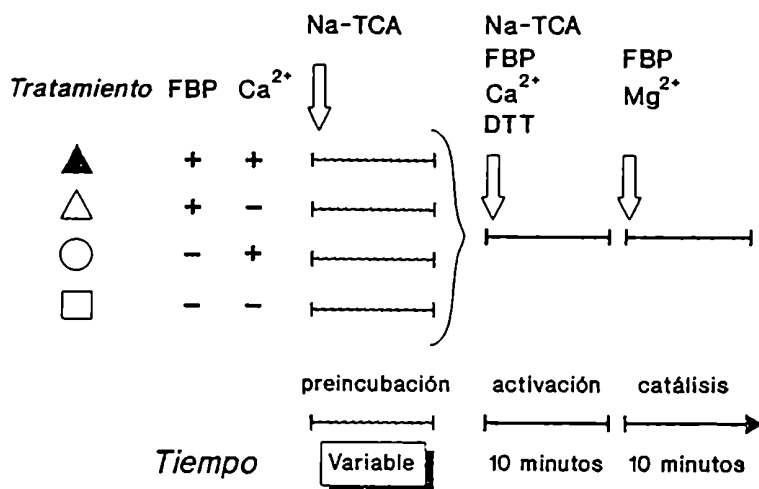


Fig. 23. Efecto de la concentración de FBP sobre la protección a la inactivación mediada por NaTCA. La enzima (0.06 μg) se incubó en una solución de 50 mM Tris-HCl (pH 7.9)/ 0.070 mM CaCl_2 / 150 mM NaTCA y las concentraciones indicadas de FBP. Luego de 8 minutos se determinó la actividad FBPasa "en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} ".

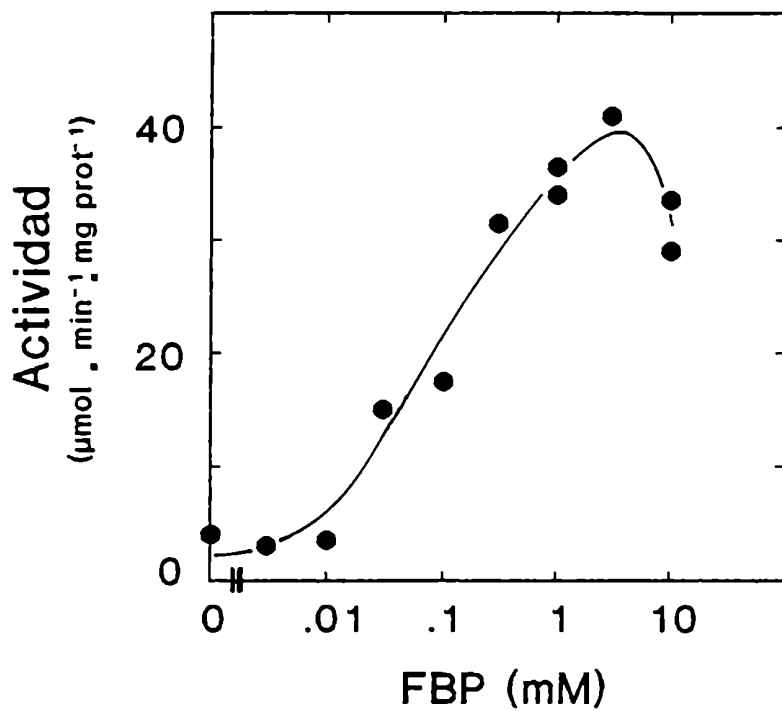


Tabla 3. Efecto de los azúcares bisfosfato sobre la inactivación de la FBPasa mediada por tricloroacetato. La enzima en todos los casos fue incubada a 23 °C en una solución de *buffer* Tris-HCl 50 mM (pH 7.9) / 0.1 mM CaCl₂ / 0.15 M NaTCA y distintos azúcares bisfosfato en concentración 1 mM. Se tomaron alícuotas en función del tiempo y se les determinó la actividad remanente "en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg²⁺" como se indica en procedimientos experimentales. Para cada azúcar bisfosfato se realizó una curva de actividad en función del tiempo y se determinó el t_{0.5} de inactivación correspondiente.

Azúcar bisfosfato (1 mM)	t _{0.5} (min)
fructosa 1,6-bisfosfato	60
sedoheptulosa 1,7-bisfosfato	3
fructosa 2,6-bisfosfato	1
ribulosa 1,5-bisfosfato	1.5
glucosa 1,6-bisfosfato	1.5
ninguno	2

Fig. 24. Inactivación de la FBPasa por EGTA luego de la incubación con FBP, Ca^{2+} y NaTCA. La enzima (2.4 μg) fue incubada a 23°C en una solución que contenía 50 μmoles de Tris-HCl (pH 7.9), 0.5 μmoles de FBP, 0.05 μmoles de CaCl_2 y 75 μmoles de NaTCA en un volumen final de 0.5 ml. A distintos tiempos se retiraron alícuotas de 50 μl y se les midió actividad "en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} " como se indica en procedimientos experimentales. A los 8 minutos se agregaron 0.1 μmoles de EGTA (alícuota de 10 μl) suficiente para quelar todo el Ca^{2+} presente.

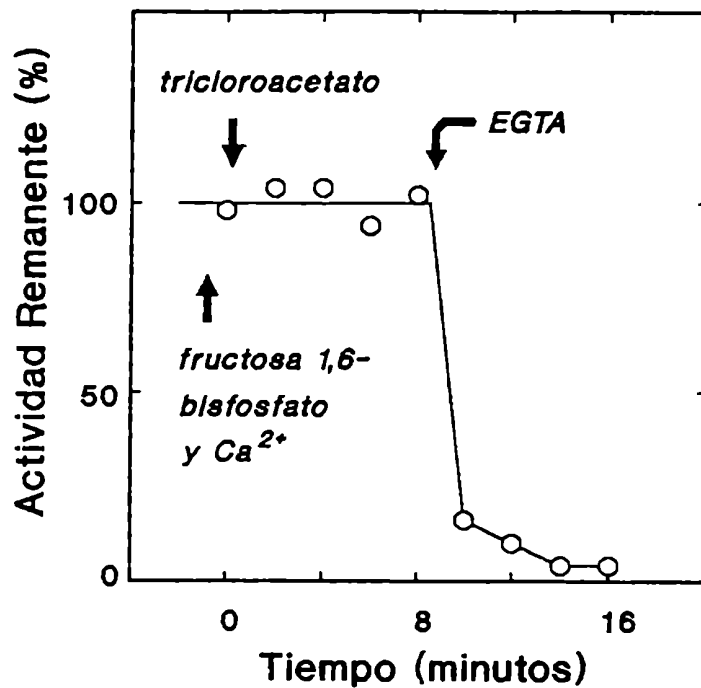


Fig. 25. Inactivación de la forma activa de la FBPasa por EGTA en presencia de FBP, Ca^{2+} , NaTCA y DTT. La enzima (2.4 μg) fue incubada a 23 °C en una solución de activación que contenía 50 μmoles de Tris-HCl (pH 7.9), 0.5 μmoles de FBP, 0.05 μmoles de CaCl_2 , 75 μmoles de NaTCA y 2.5 μmoles de DTT en un volumen final de 0.5 ml. A los tiempos indicados se retiraron alícuotas de 50 μl y se les determinó actividad "en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} " como se indica en procedimientos experimentales. A los 20 minutos de incubación (tiempo suficiente para tener la forma activa de la enzima) se agregaron 0.1 μmoles de EGTA (alícuota de 10 μl); suficiente para quelar todo el Ca^{2+} presente.

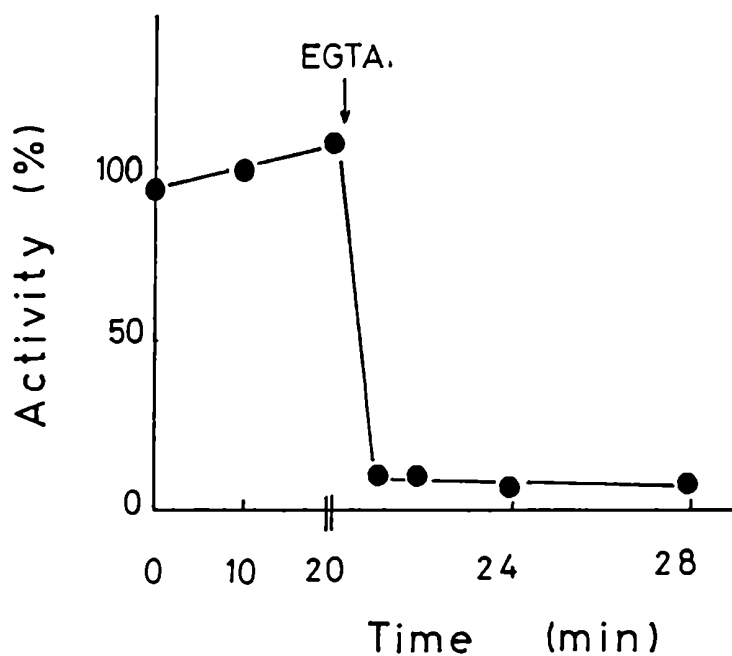


Tabla 4. Efecto de los cationes bivalentes sobre la inactivación de la FBPasa mediada por tricloroacetato. La enzima fue incubada a 23 °C en una solución de *buffer* Tris-HCl 50 mM (pH 7.9), NaTCA 0.15 M y distintos cationes. Se tomaron alícuotas a los 5 minutos y se les determinó la actividad enzimática remanente "en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg²⁺" como se indica en procedimientos experimentales. La actividad enzimática se expresa como el porcentaje relativo a la actividad a tiempo 0 de incubación. Actividad control (100%): 47 μ moles de Pi liberado \cdot min⁻¹ \cdot mg prot⁻¹.

Metal bivalente	cc. (mM)	actividad FBPasa %
-	-	13
Ca ²⁺	0.1	100
Mn ²⁺	0.2	120
Mg ²⁺	1.0	60
Mg ²⁺	10.0	100

Fig. 26. Efecto del NaTCA sobre el proceso catalítico de la FBPasa ensayada en "altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} ". La enzima (1.2 μg) fue incubada a 23 °C en 0.5 ml de 0.1 M Tris-HCl (pH 7.9)/ 2.8 mM FBP/ 10 mM $MgCl_2$ conteniendo NaTCA como se indica. Luego de 7 minutos, la hidrólisis de FBP fue detenida agregando el reactivo para la determinación del Pi (ver procedimientos experimentales).

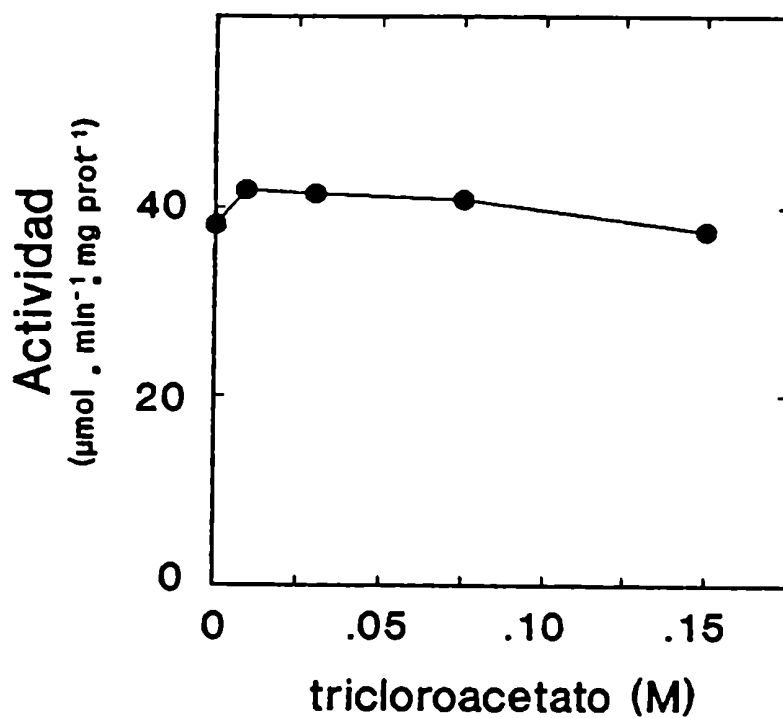


Fig. 27. Variación de la fluorescencia intrínseca de la FBPasa con la concentración de NaTCA. La enzima (10 μg) fue incubada durante 30 minutos en una solución acuosa que contenía 100 μmoles de Tris-HCl (pH 7.9) y cuando se indica 3 μmoles de FBP y 0.3 μmoles de CaCl_2 (volumen final: 2.7 ml). Luego se agregó 0.3 ml de NaTCA de concentración suficiente para completar la concentración final indicada en abscisas. Después de 5 minutos de este agregado se midió la fluorescencia intrínseca en el máximo de emisión (330 nm) excitando a 280 nm. Para el caso del éster etílico del N-Acetil-Triptofano (N-Ac-Trp-OEt) se realizó el mismo procedimiento, excepto que el máximo de emisión se encontró en 350 nm. Todos los valores de fluorescencia son referidos a F_0 que es el valor de emisión en ausencia de NaTCA. (- -) Fluorescencia a 350 nm de N-Ac-Trp-OEt (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (-o-) Fluorescencia a 332 nm de FBPasa. (-*-) Fluorescencia a 332 nm de FBPasa con 1 mM FBP y 0.1 mM CaCl_2 previo al agregado de NaTCA.

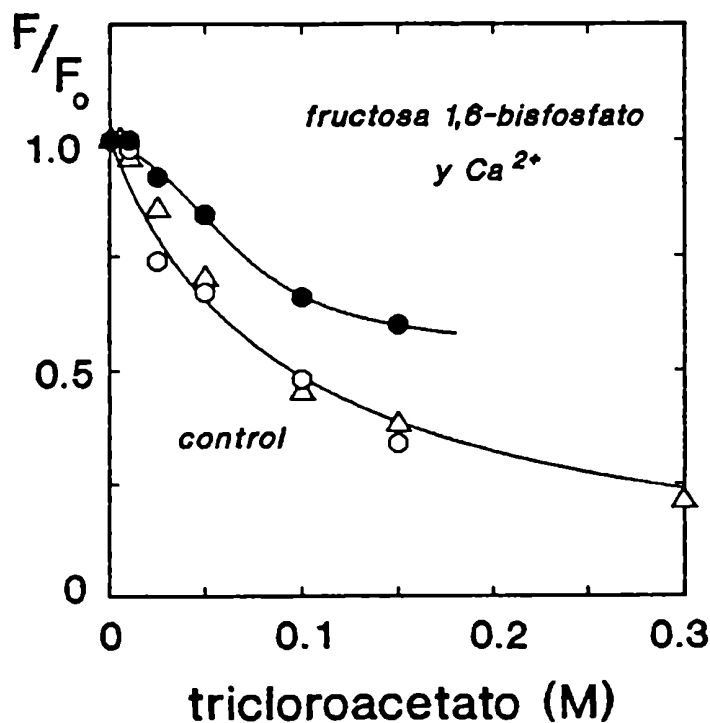


Fig. 28. Variación de la fluorescencia de la FBPasa frente al agregado de NaTCA. La enzima (12 μg) fue disuelta en 2.16 ml de una solución que contenía 100 μmoles de Tris-HCl (pH 7.9), y cuando se indica FBP 2.4 μmoles y CaCl_2 0.24 μmoles . A tiempo 0 se agregaron 360 μmoles de NaTCA (volumen final: 2.4 ml) y se registró la intensidad de fluorescencia a 332 nm a distintos tiempos. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm. Dado que F_0 representa la fluorescencia antes de agregar NaTCA, los valores posteriores fueron corregidos por la dilución generada al realizar el agregado.

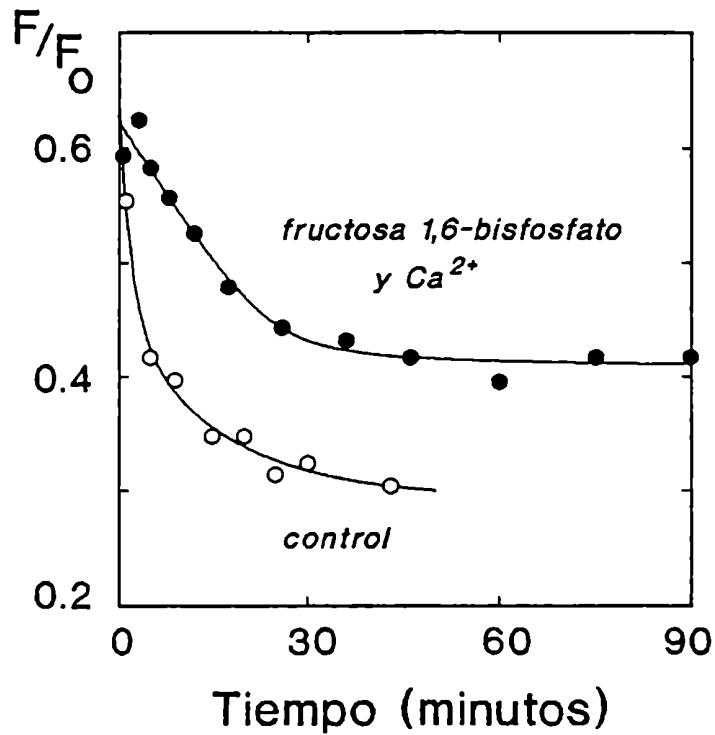


Fig. 29. Efecto del NaTCA sobre la fluorescencia del TNS en la presencia de la FBPasa. La enzima (15 μ g) se disolvió en 2.7 ml de una solución que contenía 150 μ moles de Tris-HCl (pH 7.9) y 0.30 μ moles de TNS. La muestra fue excitada a 366 nm y la emisión de fluorescencia fue medida a 404 nm. Si se indica, se agregó 3 μ moles de FBP y 0.3 μ moles de CaCl_2 (volumen total: 3.0 ml) y posteriormente 0.45 μ moles de NaTCA (volumen final: 3.3 ml). La emisión de fluorescencia a 404 nm fue monitoreada. () y () son las lecturas de la intensidad de fluorescencia antes y después, respectivamente del agregado de NaTCA. Los datos experimentales se encuentran desplazados verticalmente para una mejor observación de los mismos.

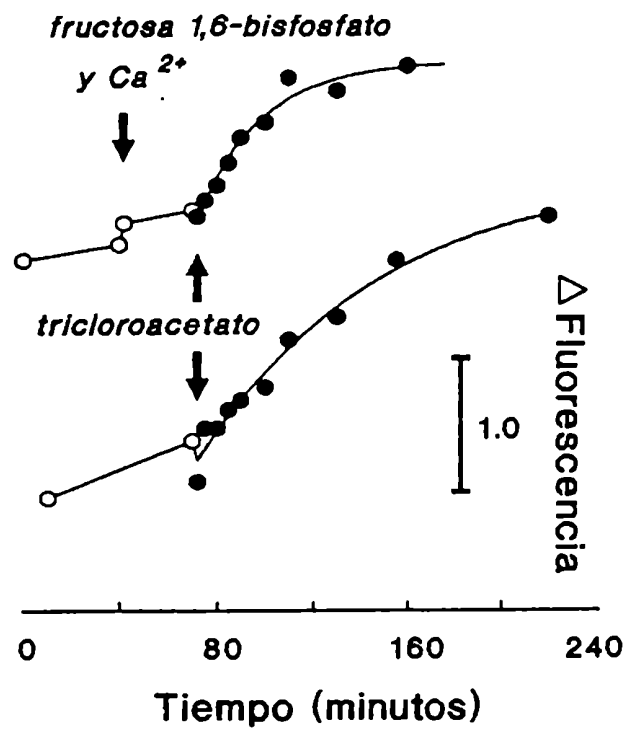


Fig. 30. Efecto del NaTCA sobre la emisión de fluorescencia del TNS en la presencia de β -ciclodextrina. El TNS (0.4 μ moles) se disolvió en 1.6 ml de una solución que contenía 100 μ moles de Tris-HCl (pH 7.9), y se registró la emisión de fluorescencia excitando la muestra a 366 nm (1). Posteriormente, se agregó 2.0 μ moles de β -ciclodextrina (en 0.2 ml) y la emisión de fluorescencia fue nuevamente determinada (2). Finalmente, se agregaron 0.2 ml de 1.5 M NaTCA a la solución y se repitió el registro del espectro de fluorescencia (3).

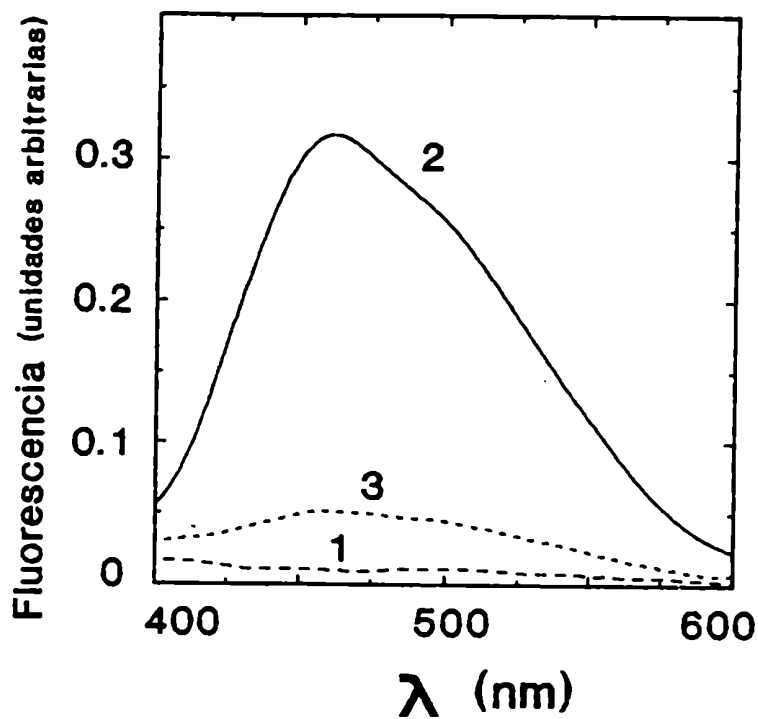


Fig. 31. Análisis de la cuarta derivada del espectro U.V. de la FBPassa. La enzima (140 μ g) fue incubada a 23 °C durante 20 minutos en 0.8 ml de una solución que contenía 50 μ moles de Tris-HCl (pH 7.9). Posteriormente, el espectro U.V. fue registrado tres veces, los datos fueron transferidos a una computadora y la cuarta derivada fue calculada a partir del promedio de los 3 espectros como se indica en procedimientos experimentales. Sucesivamente, 0.1 ml de 10 mM FBP; 0.1 ml de 1 mM CaCl_2 ; 0.02 ml de 10 mM EGTA; y 0.1 ml de 1.5 M NaTCA fueron agregados. Los datos digitalizados (por triplicado) fueron primero almacenados en una computadora, corregidos por los cambios de volumen y finalmente procesados para obtener la cuarta derivada del espectro ultravioleta.

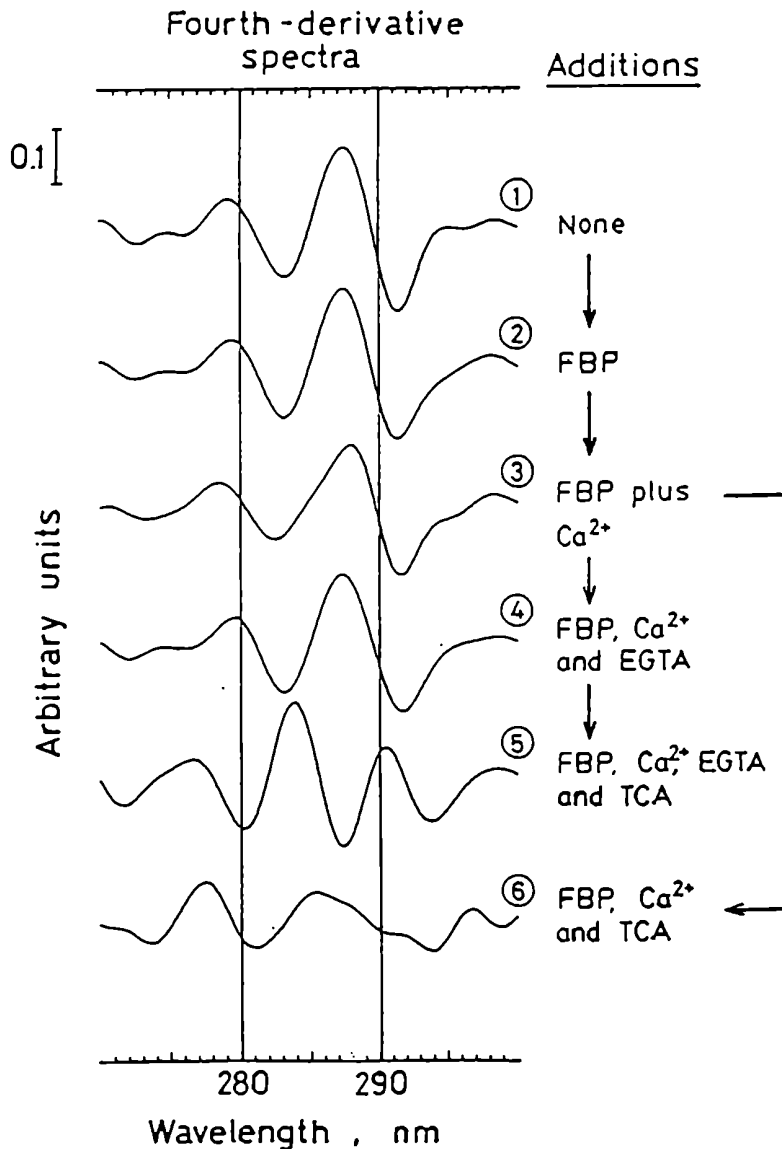


Fig. 32. Efecto de la concentración de DTT en la activación de la FBPasa en presencia y en ausencia de NaTCA. La enzima (1.8 μg) fue incubada a 23 °C durante 15 minutos en una solución que contenía 50 μmoles de Tris-HCl (pH 7.9), 0.05 μmoles de CaCl_2 , 0.5 μmoles de FBP y cuando se indica 75 μmoles de NaTCA (Volumen final: 0.4 ml). Luego, se agregó DTT en concentraciones variables hasta un volumen final de 0.5 ml. Las concentraciones de DTT del gráfico son las concentraciones de la solución final. A partir del agregado de DTT se tomaron alícuotas a los tiempos indicados y se les midió actividad FBPasa "en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} " como se indica en procedimientos experimentales.

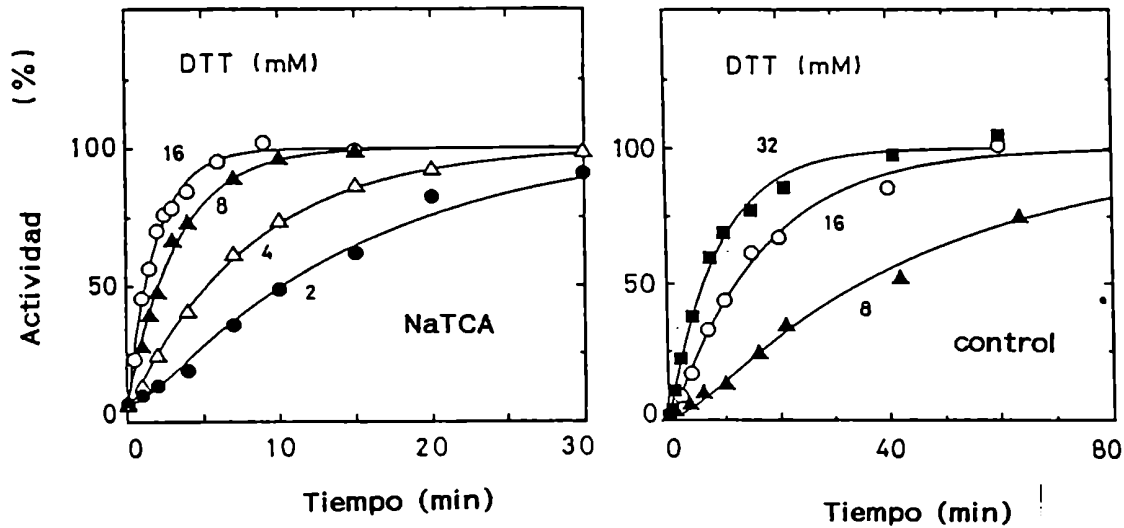


Fig. 33. Efecto del NaTCA sobre los $t_{0.5}$ de activación de la FBPasa en presencia de FBP y Ca^{2+} y concentraciones variables de DTT. Los $t_{0.5}$ de activación de la FBPasa realizada en los experimentos de la fig. 32 fueron determinados por el método de regresión no lineal de Gauss-Newton. Las inversas de los mismos se grafican en función de la concentración de DTT en la solución activadora.

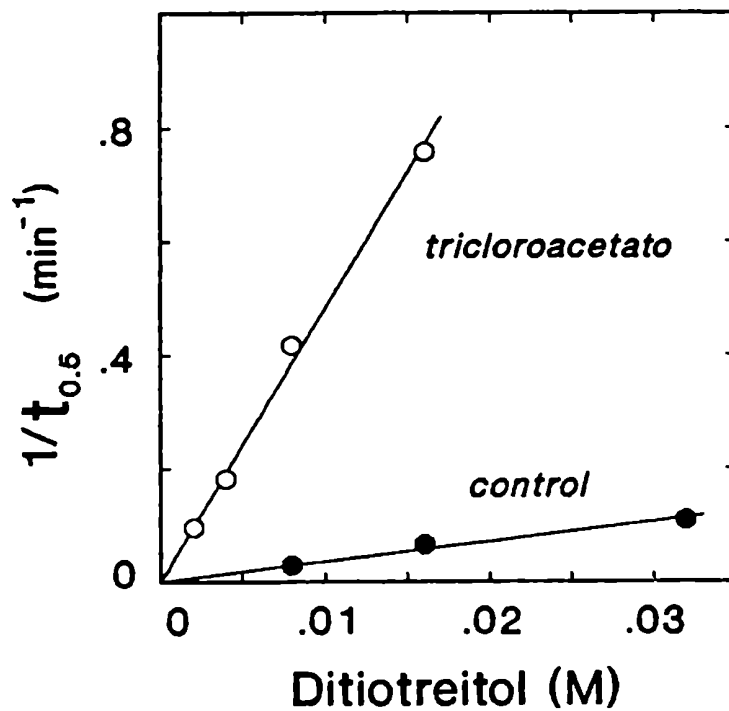


Fig. 34. La enzima (2.5 µg) fue incubada en 50 µl de una solución A (1 mM FBP/ 0.1 mM Ca²⁺/ 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)) conteniendo la la concentración de NaTCA indicada en el esquema. Luego de 5 minutos se agregó 450 µl de solución A que contenía 15, 150 y 0 mM de NaTCA, respectivamente. Las concentraciones finales de NaTCA fueron las que se indican en el esquema. Luego de 5 minutos de incubación se agregó 25 µl de DTT 0.1 M para iniciar la activación de la enzima. Se tomaron alícuotas (50 µl) a distintos tiempos y se les determinó actividad FBPasa "en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg²⁺" como se indica en procedimientos experimentales. Se construyó una curva de actividad en función del tiempo y se determinó el t_{0.5} de activación por el método de Gauss-Newton de regresión lineal como está indicado en procedimientos experimentales. Todas las incubaciones se realizaron a una temperatura de 23 °C.

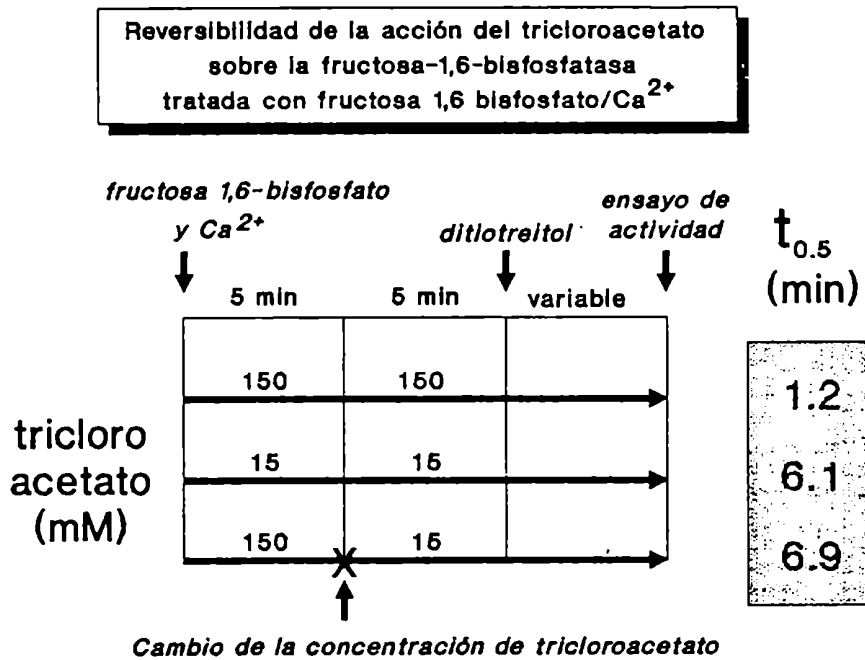


Fig. 35. Patrones de hidrofobicidad de diferentes FBPasas. Los patrones de hidrofobicidad fueron calculados según se describe en procedimientos experimentales. Posteriormente se alinearon las secuencias para permitir un máximo de homología. Por este motivo el patrón de la FBPasa de riñón de cerdo está discontinuado donde las FBPasas cloroplásticas contienen un péptido extra.

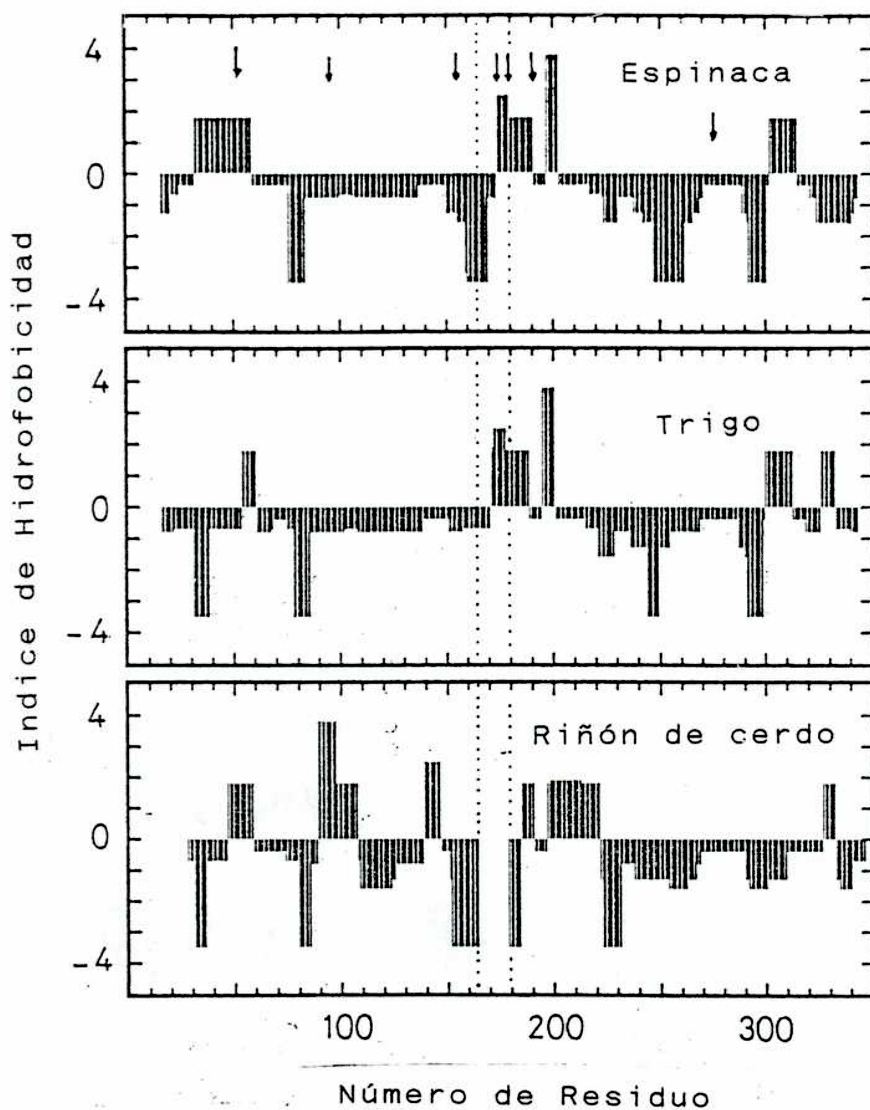
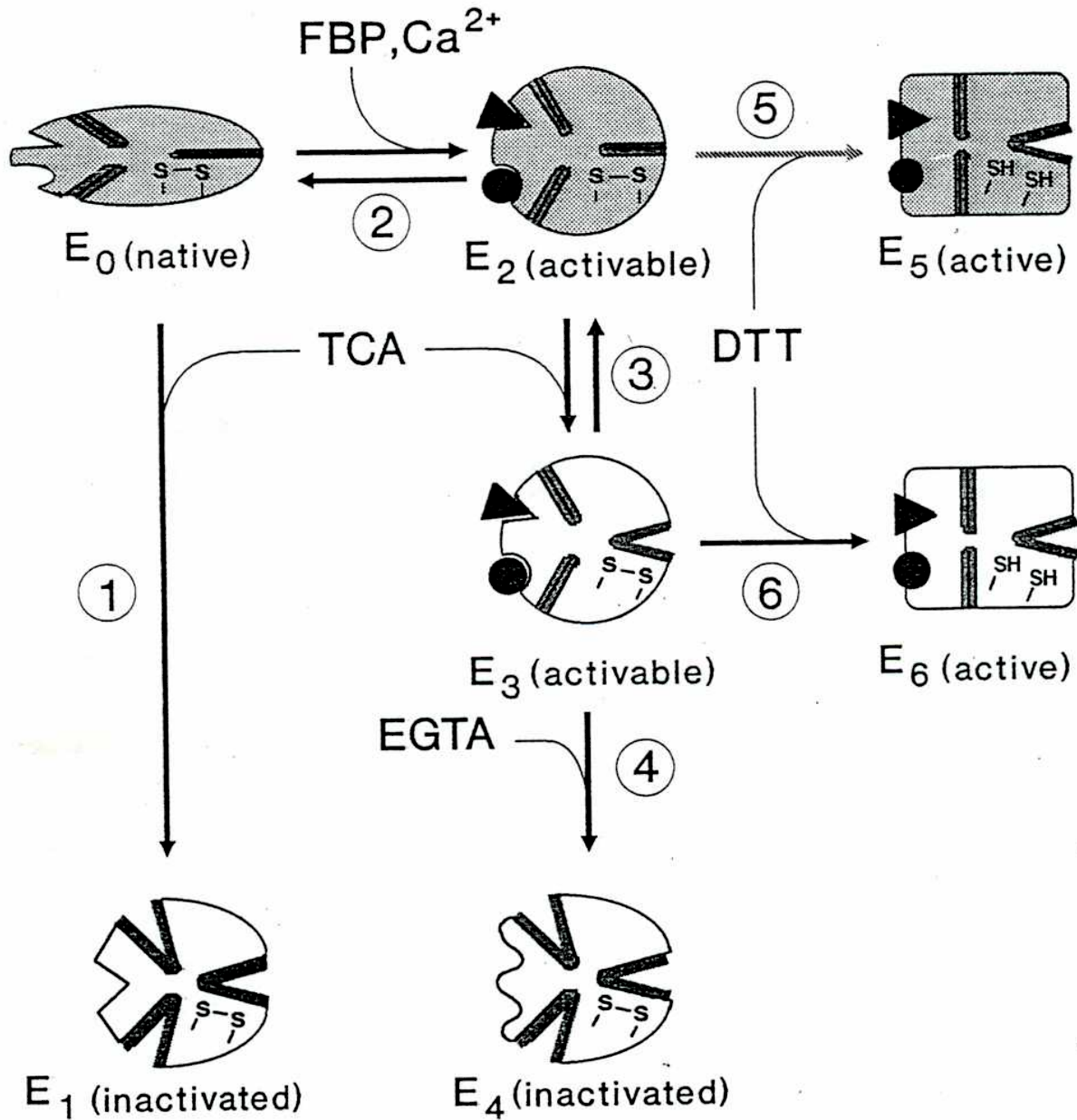


Fig. 36. Modelo de la acción del tricloroacetato sobre la FBPasa de cloroplastos. Las formas enzimáticas representadas en blanco son aquellas que están en presencia de tricloroacetato y las representadas en gris claro las que están en ausencia. Las formas E_0 , E_2 , E_3 , E_6 representan, en ese orden, el camino de activación de la FBPasa. Las zonas de la enzima en gris oscuro representan dominios hidrofóbicos. La enzima es un tetrámero, por lo tanto, las formas representadas en este esquema sólo son una representación esquemática de las subunidades.



ACCION DEL 2-PROPANOL SOBRE LA FBPASA

La FBPasa de cloroplastos de espinaca puede aumentar su actividad específica si es incubada (5-10 minutos) con TRX en presencia de FBP, Ca^{2+} y ditiotreitól [29]. Este mismo efecto se logró reemplazando a la TRX con aniones caotrópicos [59] o con solventes orgánicos en solución (cosolventes) [57]. En el capítulo anterior se estudió el mecanismo de activación de un anión caotrópico (NaTCA) sobre la FBPasa de cloroplastos. Teniendo en cuenta que además de los aniones caotrópicos también los solventes orgánicos tienen capacidad para reemplazar a la TRX en la activación de la enzima, se utilizó el 2-propanol como cosolvente modelo para verificar si ejerce efectos estructurales similares a los producidos por el anión caotrópico tricloroacetato. La concentración de 2-propanol elegida fue de 15% (v/v) debido a que es la concentración óptima para reemplazar a la TRX en el ensayo de activación de la FBPasa [57].

En la figura 37 se observa que 15% de 2-propanol condujo a la pérdida de la capacidad catalítica de la FBPasa. Progresivamente, la enzima perdió su actividad ($t_{0.5} = 12$ min) obteniéndose finalmente una forma que no es competente en ninguno de los siguientes sistemas de medición: (i) ni "en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} " (no mostrado) (ii) ni "en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} " con una incubación previa con el sistema completo de activación (2-propanol, DTT, FBP, Ca^{2+}). Por otro lado, la fig. 37 muestra que si se agrega FBP y Ca^{2+} antes del agregado del cosolvente, la enzima retiene totalmente la potencialidad de activarse e hidrolizar el FBP aún después de 30 minutos de incubación. Esta acción protectora del FBP y el Ca^{2+} fue concertada: fue necesaria la presencia de ambos para observar el efecto. Tanto la curva con el FBP (sin Ca^{2+}) como la que tiene el Ca^{2+} (sin FBP) no se diferenciaron de la curva control que no contiene a ninguno de ellos (ver figura 37).

Al igual que el NaTCA, el 2-propanol inactivó irreversiblemente a la enzima en la ausencia de otros moduladores. Sin embargo, el FBP y Ca^{2+} evitaron este efecto negativo sobre la actividad enzimática posibilitando que el perturbante deje a la enzima en un estado "sensible" para ser ac-

tivada por el DTT. Para correlacionar estos datos cinéticos con cambios conformacionales se realizó el estudio del efecto del 2-propanol sobre el espectro de emisión de fluorescencia y de absorción U.V. de la FBPasa.

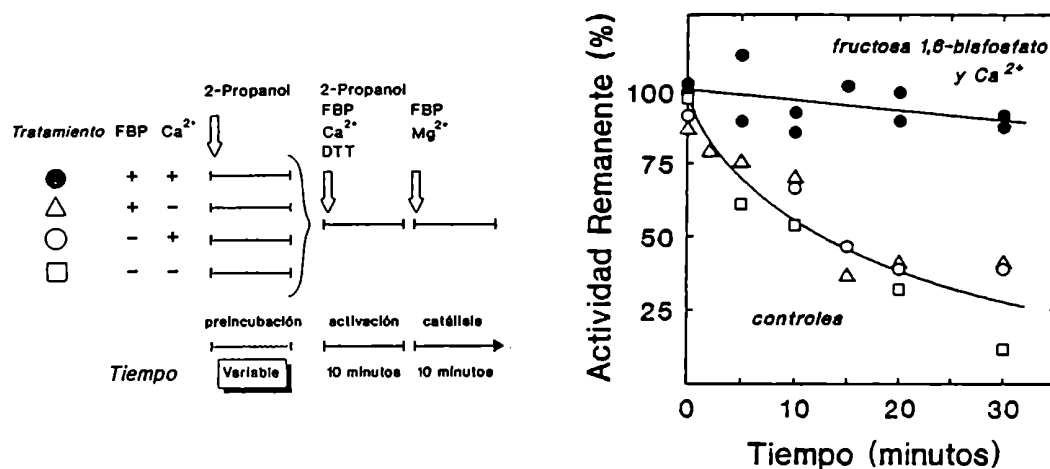


Fig. 37. Inactivación de la FBPasa por 2-propanol y protección por FBP y Ca²⁺.
La enzima (3.5 μg) se incubó en 0.5 ml de una solución de 50 mM Tris-HCl (pH 7.9)/ 15% (v/v) de 2-propanol y cuando se indica, contenía además 0.1 mM CaCl₂/ 1 mM FBP. Cuando no se agregó CaCl₂ la solución contenía 0.1 mM EGTA para asegurarse la ausencia de Ca²⁺. A los tiempos indicados una alícuota (0.05 ml) se agrega a una solución activadora llegando a concentraciones finales en todos los tratamientos de 15% (v/v) 2-propanol/ 5 mM DTT/ 1 mM FBP/ 0.1 mM CaCl₂/ 50 mM Tris-HCl (pH 7.9); volumen final: 0.25 ml. Se activó por 10 minutos y a una alícuota de 0.05 ml se le midió actividad enzimática "en presencia de bajas concentraciones de FBP y de Mg²⁺" como se indica en procedimientos experimentales. Todas las incubaciones se realizaron a 23 °C. Actividad control (100%): 40 $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Efecto del 2-propanol sobre la fluorescencia intrínseca

Para estudiar el efecto del 2-propanol sobre la fluorescencia intrínseca a pH 7.9, la enzima se diluyó en soluciones de este pH y se incubó un

tiempo adecuado hasta estabilizar la medida. Esto se hizo teniendo en cuenta que la FBPasa se conserva concentrada en soluciones de *buffer* 50 mM Na-acetato (pH 5.5) y que un aumento de pH de 5.5 a 7.9 ocasiona una disminución de la fluorescencia intrínseca (no mostrado).

Cuando se agregó 2-propanol sobre la FBPasa no se observó un cambio en el máximo de emisión de la FBPasa (330-332 nm, ver fig. 40, pag. 110), pero sí se vió un progresivo decaimiento en la intensidad en el pico. Esta intensidad decayó hasta un 30% luego de una hora de incubación con un $t_{0.5}$ de aproximadamente 13 min. Al mismo tiempo existió una ligera deformación en el espectro pues en 60 minutos la intensidad de emisión a 300 nm aumentó un 30% (no mostrado). Si se añade 1 mM FBP/ 0.1 mM Ca^{2+} previo al agregado del cosolvente, no ocurren estos cambios en el espectro de fluorescencia. Tanto el aumento de intensidad a 300 nm como la disminución a 332 nm fueron prevenidos (fig. 38). Más aún, en el experimento de la figura 38, luego de los 60 minutos de incubación con 2-propanol, el agregado de 1 mM FBP y 0.1 mM $CaCl_2$ no revirtió la caída de fluorescencia observada, permaneciendo constante durante 30 minutos más. Este último hecho sugiere que el cambio observado fue irreversible.

Como se vió anteriormente (ver pag. 91) la disminución de la fluorescencia intrínseca luego de agregar NaTCA se debe tanto a cambios en la proteína como a un efecto directo del caotrópico sobre el fluoróforo. Sin embargo, en este caso la disminución de fluorescencia no puede deberse a un efecto directo del 2-propanol sobre los fluoróforos de la proteína (principalmente triptofano) pues la fluorescencia del derivado N-acetilado y esterificado del triptofano (N-AcTrpOEt) fue mayor en 2-propanol 15% (v/v) (no mostrado) y además porque estos cambios se produjeron a lo largo del tiempo.

El 2-propanol induce cambios conformacionales que disminuyen la fluorescencia intrínseca porque afectan de algún modo el entorno de los residuos triptofano. Estos cambios correlacionaron en el tiempo con la pérdida de la actividad enzimática y ambos fenómenos fueron prevenidos por la presencia de FBP y Ca^{2+} .

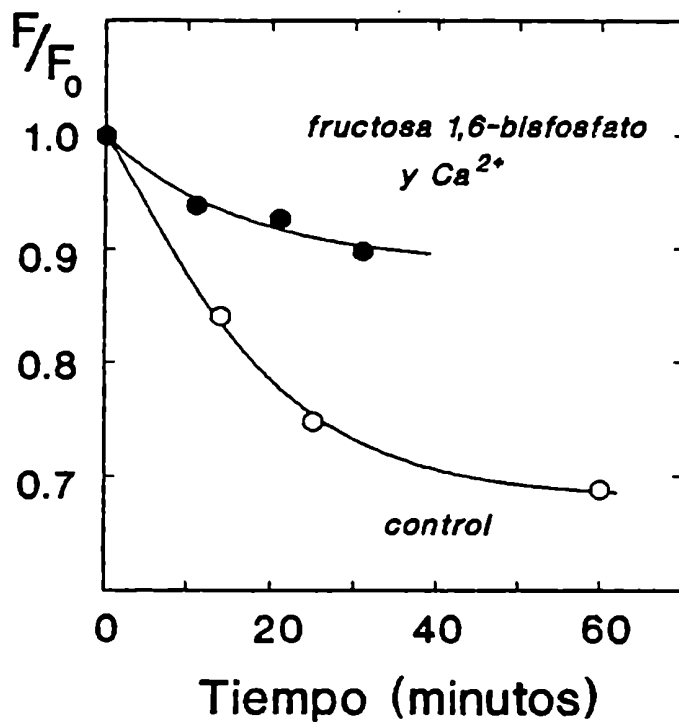


Fig. 38. Variación de la fluorescencia intrínseca de la FBPasa frente al agregado de 2-propanol. La enzima (12 μg) se preincubó durante 60 minutos en 1 ml de una solución de 50 mM Tris-HCl (pH 7.9). Luego, se agregó 0.7 ml de una solución que contenía 50 μmoles de Tris-HCl (pH 7.9) y si se indica 2 μmoles de FBP y 0.2 μmoles de CaCl_2 . Inmediatamente se agregó 0.3 ml de 2-propanol completándose el volumen a 2 ml. Por lo tanto, las concentraciones finales fueron 50 mM Tris-HCl (pH 7.9)/ 15% (v/v) 2-propanol y cuando se indica 1 mM FBP/ 0.1 mM Ca^{2+} . A distintos tiempos, se registraron los espectros de emisión excitando a 280 nm. De estos espectros se tomó la fluorescencia en el máximo (332 nm). F_0 representa el valor a tiempo 0.

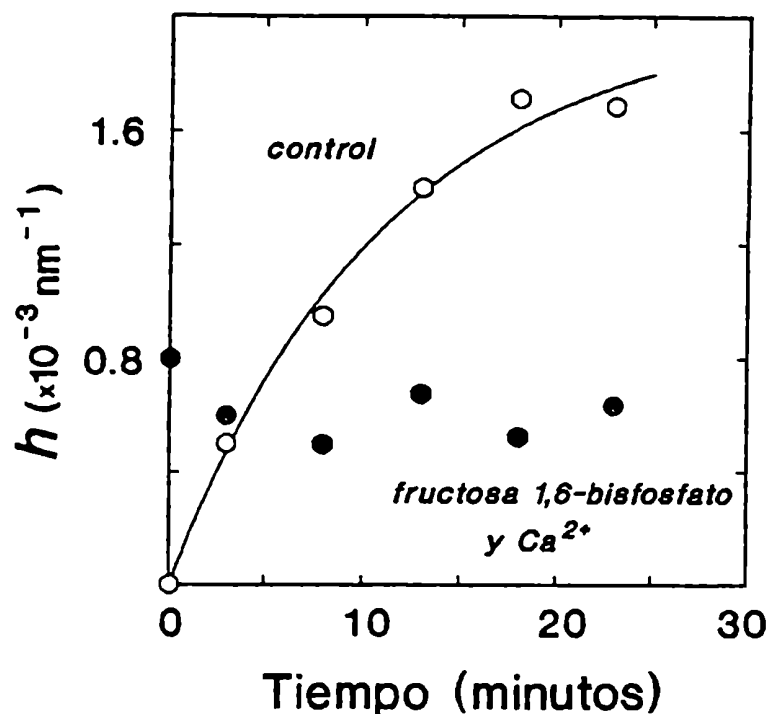


Fig. 39. Cinética de los cambios espectrofotométricos de la FBPasa frente al agregado de 2-propanol. La enzima (140 µg) se agregó a una solución que contenía 50 µmoles de Tris-HCl (pH 7.9) en un volumen final de 0.75 ml. Luego de 20 minutos se registró el espectro base. Cuando se indica, se agregó 1 µmol FBP/ 0.1 µmol CaCl₂ o H₂O en el experimento control (volumen final: 0.85 ml). Se incubó 20 minutos y se registró el espectro "tiempo 0"; luego se agregó 0.15 ml de 2-propanol y se registraron los espectros a los respectivos tiempos. De cada espectro se restó el espectro base y se efectuó la derivación; a partir de la misma se calculó la amplitud de la señal (h) descrita en procedimientos experimentales. La curva control fue ajustada a los datos experimentales con una ecuación exponencial por el método de regresión no lineal de Gauss-Newton. El $t_{0.5}$ graficado es de 11 minutos con un cambio máximo de $2.0 \cdot 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$.

Efecto del 2-propanol sobre el espectro U.V. de la FBPasa

Cuando se agregó 2-propanol (15% v/v) sobre una solución que contiene FBPasa, se observaron cambios radicales en la forma del espectro de la cuarta derivada de absorción U.V. Luego de 23 minutos de incubación se vió un corrimiento en el pico principal (287-284) y la aparición de un pico a 291 nm (no mostrado). Este cambio espectral es similar al que se produjo cuando se agregó NaTCA (ver fig. 31). A diferencia del anión

caotrópico, el 2-propanol inactivó a la enzima en forma más lenta. Este hecho posibilitó el estudio espectrofotométrico a distintos tiempos y permitió correlacionarlo con los datos cinéticos. Con este objetivo y para cuantificar los cambios, se utilizó el parámetro h (ver descripción en procedimientos experimentales) que correlaciona con la exposición de tirosinas al solvente. Como se observa en la figura 39, el parámetro h varió con el transcurso del tiempo indicando que el 2-propanol indujo una exposición de las tirosinas de la FBPasa. La mitad del cambio máximo se logró aproximadamente a los 9 minutos, lo cual está en concordancia con los datos cinéticos y de fluorescencia. Si se incluye en la solución 1 mM FBP/ 0.1 mM Ca^{2+} , h aumenta inicialmente pues estos dos moduladores por sí mismos producen un cambio conformacional (fig. 39 y fig. 31). Sin embargo, frente al agregado de 2-propanol previenen una posterior exposición de tirosinas.

Al igual que frente al NaTCA, el FBP y Ca^{2+} evitan cambios conformacionales inducidos por el 2-propanol, que a su vez, acompañan a la pérdida de la actividad de la enzima.

Teniendo en cuenta que el FBP y el Ca^{2+} ejercen un efecto protector frente a la inactivación mediada por NaTCA y por cosolventes se decidió estudiar si estos moduladores ejercen un efecto estabilizador sobre la estructura de la proteína. Con este objeto se eligieron dos factores muy conocidos como perturbantes de la estructura terciaria de las proteínas: Urea y temperatura.

Efecto del FBP y el Ca^{2+} en la desnaturalización mediada por urea

La urea, usada en altas concentraciones, tiende a desestabilizar las interacciones intramoleculares que permiten un plegado correcto de los distintos dominios de la proteína [105]. La disminución de la diferencia de energía libre entre el estado nativo y los estados desplegados o "unfolded", favorece la formación de estos últimos [106]. Existen diferentes formas de monitorear el "unfolding" o la desnaturalización de las proteínas mediada por urea. Se escogió seguir la fluorescencia intrínseca debido a que es muy sensible y a que hay una gran diferencia espectral entre la forma nativa y desnaturalizada. Como se puede ver en la fig. 40 la FBPasa nativa posee un máximo a 330 nm característico de una proteína que contiene triptofanos en un entorno diferente al acuoso [97]. La FBPasa en presencia de urea 8 M (desnaturalizada) tuvo un espectro de emisión con un máximo a 350 nm, característico de proteínas que no tienen ninguna estructura terciaria y que tienen totalmente expuesto los residuos triptofano al solvente [97]. Además, la intensidad de emisión de fluorescencia fue claramente superior en el caso de la enzima nativa. De esta forma, existen dos parámetros que caracterizan la pérdida de la estructura en la FBPasa: (i) un corrimiento hacia longitudes de onda mayores de 330 nm en el máximo de emisión y (ii) una disminución en la intensidad de fluorescencia a 330 nm.

La FBPasa en urea 8 M se desnaturalizó en forma prácticamente instantánea obteniéndose el espectro de la figura 40. Por este motivo, para estudiar la cinética de desnaturalización de la FBPasa se usó una concen-

tración de urea (2 M) que permita seguir los cambios conformacionales realizando espectros a distintos tiempos. La pérdida de la estructura nativa se evaluó por los dos parámetros mencionados en el párrafo anterior. Como se aprecia en la figura 41, luego de 10 minutos, la presencia de urea 2 M ocasionó una disminución de la emisión a 330 nm de 4 veces respecto de la original lográndose la mitad del cambio en 1.5 minutos. Simultáneamente, luego de 30 minutos, existió un corrimiento pronunciado desde 330 nm hasta 340 nm en el máximo de emisión. El agregado de FBP y Ca^{2+} produjo un cambio drástico en la cinética observada. Estos dos moduladores, disminuyeron la velocidad de descenso de la fluorescencia a 330 nm. Luego de 35 minutos, la intensidad de emisión sólo se redujo a la mitad. En cambio, para producir el mismo efecto en ausencia de FBP y Ca^{2+} , fueron necesarios aproximadamente 3 minutos. Al mismo tiempo, no fue tan rápido el corrimiento del máximo de emisión a longitudes de onda superiores. Un corrimiento de 5 nm se logró en 5 minutos pero en presencia de FBP y Ca^{2+} fue necesario un tiempo 6 veces mayor.

Efecto del FBP y Ca^{2+} en los cambios inducidos por temperatura

Cuando la FBPasa es calentada, progresivamente va perdiendo su estructura nativa. Esto se pudo observar en los espectros de absorción U.V. Para monitorear los cambios a distintas temperaturas se realizaron espectros diferenciales desde 260 a 310 nm tomando como referencia el espectro a 20°C. Calentando la muestra hasta 40°C, se observaron cambios espectrales como la aparición de dos picos negativos a 288 nm y 279 nm (Fig 42). La magnitud de estos cambios fueron lineales con el aumento de temperatura. Esto indica que este cambio se debió a la influencia que ejerce la temperatura sobre los espectros de los cromóforos de la proteína, que ocurre aún en ausencia de cambios de entorno [107]. Por lo tanto, no se puede decir que hay cambios conformacionales dentro de ese rango de temperaturas. Además, esos cambios espectrales fueron totalmente reversibles al volver a enfriar la muestra (no mostrado). A partir de 40°C comenzó a aumentar la pendiente de la curva que relaciona la magnitud del pico que aparece a 288 nm con la temperatura (fig. 42). A partir de 55°C los cambios fueron irreversibles y a partir de allí la pendiente cambió abruptamente, manifestándose un gran cambio en la conformación de la

enzima. Este reflejaría una desnaturalización de la proteína pues el pico negativo a 288 nm indica una gran exposición de las tirosinas de la misma [85] (fig. 42). El análisis de estos mismos datos realizando la derivada cuarta de la absorbancia respecto de la longitud de onda confirmó lo anterior: Hay un corrimiento del pico principal de tirosina de 287.8 nm a 284.5 nm (datos no mostrados). Esto es característico de un cambio de entorno hacia un solvente como el agua [108]. Entonces, la curva de calentamiento de la FBPasa mostró 3 zonas: la primera hasta 40°C donde no habría habido cambios conformacionales demostrables; la segunda de 40°C a 55°C donde comenzó a haber exposición de grupos tirosina, y la tercera donde existió un gran cambio, probablemente hacia un estado desplegado de la enzima. La inclusión en el medio de FBP y Ca^{2+} prácticamente no modificó las dos primeras partes de la curva. Sin embargo, alteró la tercera parte corriendo la curva 5°C hacia la derecha. Es decir, en esa etapa, serían necesarios 5°C más para producir el cambio de estado. En el experimento control la temperatura a la cual se produjo la mitad de ese cambio fue 60°C y cuando se incluyó FBP y Ca^{2+} en la solución fue 65°C (fig 42).

Conclusión

Estos experimentos permiten ver claramente que el FBP y el Ca^{2+} ejercen un efecto estabilizador sobre la estructura terciaria de la FBPasa. Disminuyen en un orden de magnitud la velocidad de la desnaturalización inducida por urea 2 M. Esto indica que la barrera energética a vencer es superior en presencia del azúcar bisfosfato y el metal bivalente. Además, si se agrega 1 mM FBP/ 0.1 mM Ca^{2+} se eleva en 5°C la temperatura necesaria para desnaturalizar a la FBPasa.

Fig 40. Espectro de emisión de la FBPasa nativa y desnaturalizada. La enzima (3 μg) fue agregada a una solución que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 7.9) y cuando se indica 8 Molar de urea en un volumen final de 2 ml. Luego, se realizó un espectro de emisión de fluorescencia excitando a 280 nm como está descrito en procedimientos experimentales. El espectro de la enzima en urea 8 M representa el de la enzima desnaturalizada. Todos espectros fueron corregidos sustrayendo un espectro blanco en el cual se hicieron los mismos agregados exceptuando a la enzima.

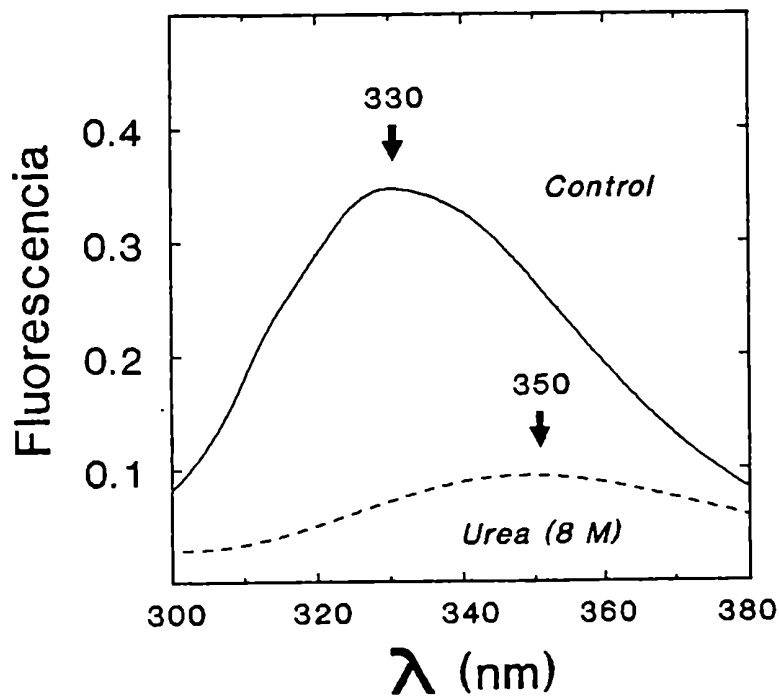


Fig. 41. Efecto del FBP y Ca^{2+} sobre la cinética de los cambios mediados por urea en la fluorescencia intrínseca de la FBPasa. La enzima (3 μg) fue incubada en una solución que contenía 2 M urea/ 50 mM Tris-HCl (pH 7.9) y cuando se indica 1.5 mM FBP/ 0.15 mM CaCl_2 en un volumen final de 2 ml. Luego del agregado de la enzima, a distintos tiempos, se realizaron espectros de emisión de fluorescencia excitando a 280 nm como está descrito en procedimientos experimentales. En el gráfico superior se grafica la fluorescencia a 330 nm y en el inferior la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión. Entre cada espectro el obturador de luz de excitación permaneció cerrado para evitar degradación de la muestra. El espectro a tiempo cero fue registrado en una muestra que contenía todos los agregados excepto la urea. Todos los espectros fueron corregidos sustrayendo un espectro blanco en el cual se hicieron los mismos agregados exceptuando a la enzima.

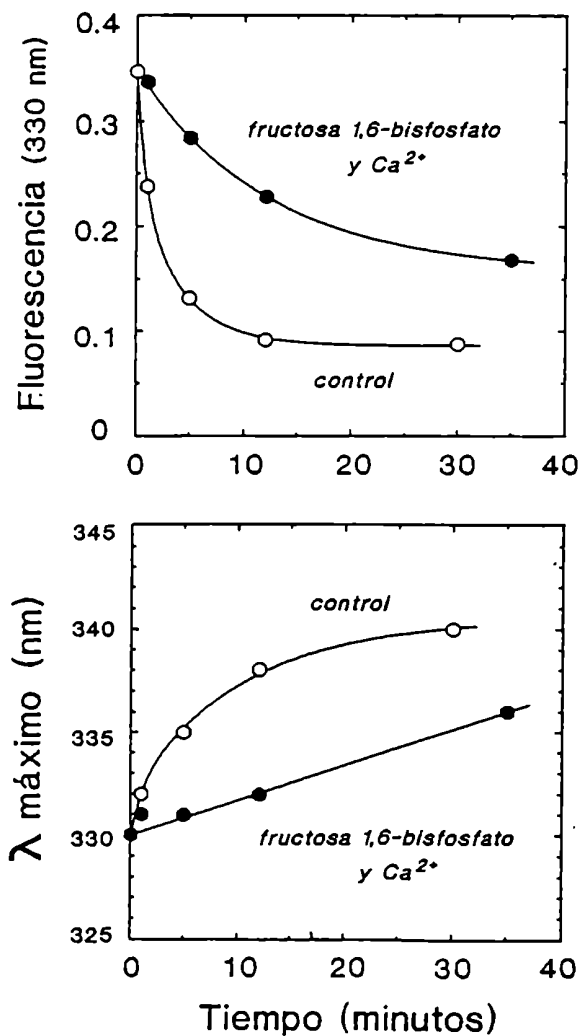
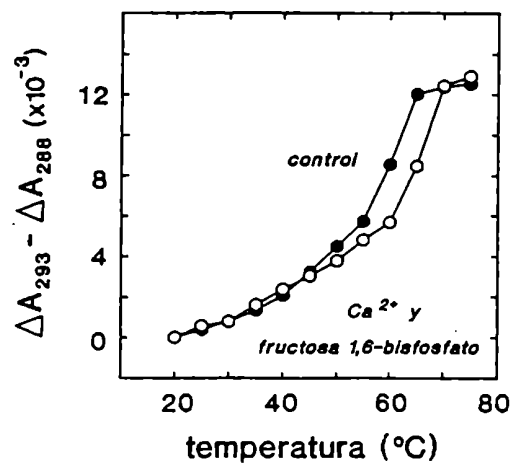
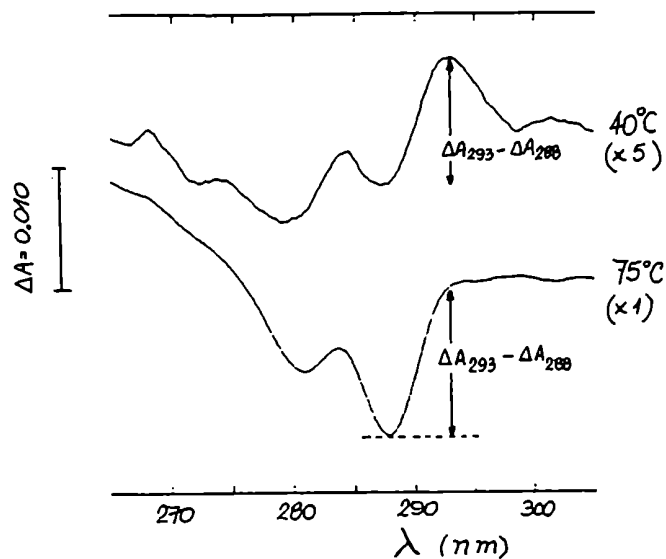


Fig. 42. Cambios en los espectros de absorción U.V. en función de la temperatura. La enzima (150 μg) fue incubada en 100 mM MOPS (pH 7.9) en un volumen de 0.5 ml. Cuando se indica la solución además contenía 1 mM FBP/ 0.1 mM CaCl_2 . Se realizaron espectros desde 260 a 310 nm elevando la temperatura desde 20 °C hasta 75 °C cada 5 °C. En cada temperatura se realizaron 3 espectros antes de modificar la misma. El tiempo que tomó realizar estos 3 espectros fue de 10 minutos. En todos los casos se realizó el espectro diferencial tomando como referencia el espectro realizado a 20 °C. Estos se procesaron como se indica en procedimientos experimentales. En el panel superior se observa el espectro diferencial control tomado a 40 ° y 75 °C. En el panel inferior se graficó la diferencia entre 293 y 288 nm de los espectros diferenciales.



ACTIVACION DE LA FBPASA POR FBP Y Mg^{2+}

Se había planteado que los sistemas de activación no eran necesarios para obtener actividad FBPasa pues en altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} la enzima tenía una actividad específica alta [92]. Posteriormente, teniendo en cuenta las cantidades de sustrato y metal bivalente presentes en el cloroplasto y la naturaleza endógena de los activadores, quedó de manifiesto la importancia fisiológica del sistema de modulación (ferredoxina-tiorredoxina). Con este sistema, la enzima se adquiere alta actividad específica en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} [109,11].

Con el objeto de estudiar en la enzima nativa (oxidada) el efecto del FBP y Mg^{2+} sobre la velocidad de formación de producto cuando se alcanza el estado estacionario, se midió la formación de fosfato variando la concentración de FBP y de Mg^{2+} como se indica en procedimientos experimentales. Una curva sigmoidea describe la respuesta de la actividad enzimática a la variación de la concentración de FBP; este perfil se mantiene aunque se varíe la concentración de Mg^{2+} (fig. 48). Estas curvas pudieron ser descritas empíricamente mediante la ecuación de Hill [110]. Con los datos de la figura 48 se calcularon los parámetros que caracterizan a estas curvas y estos mismos se regraficaron en la figura 49. Allí se observa que la variación de la concentración del Mg^{2+} libre no afecta la sigmoicidad de las curvas de FBP (fig. 49-f). El n de Hill para el FBP se mantiene constante con un valor promedio de 2.72. El mayor efecto del Mg^{2+} se manifiesta sobre la afinidad aparente del FBP sobre la enzima pues al aumentar la concentración de Mg^{2+} disminuye considerablemente el $S_{0.5}$ para el azúcar bisfosfato (fig. 49-e). En el rango de concentración estudiado, no parece haber un gran efecto del metal bivalente sobre la velocidad máxima que puede alcanzarse con el FBP (fig. 49-d). De todas maneras la V_M tiene tendencia a disminuir a menores concentraciones de Mg^{2+} . Esto fue observado a 5 mM de Mg^{2+} pero la determinación de la V_M y el $S_{0.5}$ tuvo bastante error y no fue incluida en el gráfico.

Manteniendo constante la concentración de FBP y variando la concentración de Mg^{2+} libre también se puede construir curvas que son des-

criptas empíricamente con ecuaciones de Hill. Al igual que lo descrito anteriormente, el n de Hill para el Mg^{2+} permanece casi invariable en el rango de concentraciones de FBP estudiado (fig. 49-c). En este caso, se obtuvo un valor promedio de 3.70, lo cual caracteriza a estas curvas como fuertemente sigmoideas. El FBP afecta la velocidad máxima de las curvas de Mg^{2+} (fig. 49-a) pero además, tiene un marcado efecto sobre la afinidad aparente del Mg^{2+} . El aumento en la concentración de FBP disminuyó el $S_{0.5}$ del Mg^{2+} desde 21 mM hasta 7 mM como se puede observar en la fig. 49-b.

El hecho de que las curvas no sean michaelianas complica el análisis; sin embargo, se puede recalcar lo siguiente: El efecto más importante de estos dos efectores (sustrato y cofactor) sobre la cinética de la enzima oxidada es la acción recíproca sobre las afinidades aparentes. Ambos disminuyen los $S_{0.5}$ del otro ligando sin afectar la forma (sigmoidicidad) de las curvas. Un efecto de este tipo se produce cuando existe cooperatividad positiva en la unión de los dos ligandos sobre la enzima. Es decir, cuando la enzima une a cualquiera de ellos se favorece la unión del otro (y viceversa). Sin embargo, otra explicación es posible: la existencia de cualquier transformación o isomerización del complejo de la enzima con los dos efectores hacia otro estado intermediario también podría producir curvas donde un ligando disminuye el $S_{0.5}$ del otro. En el estado estacionario al existir una forma posterior a la unión de los ligandos, se estabiliza la unión de los mismos por desplazamiento de los equilibrios. El ligando que entra en segundo lugar se distribuye entre las dos formas enzimáticas, una de las cuales (la intermediaria) no disociaría al ligando o lo haría menos favorablemente "secuestrándolo" de la solución y generando una afinidad aparente mayor por la enzima. Entonces, la entrada de cualquier ligando en segundo término estaría favorecida con respecto a la entrada del mismo sobre la enzima sola.

La hipótesis de la existencia de otra forma enzimática producida luego de la unión del FBP y el Mg^{2+} está apoyada por otro hecho: Cuando se ensaya la actividad de la FBPasa en su estado nativo con FBP y Mg^{2+} las curvas de producto vs. tiempo presentan una fase *lag*. La actividad inicial es prácticamente nula y aumenta exponencialmente hasta hacerse constante como se observa en la figura 49-a. Se calculó el tiempo en el cual se rea-

liza este cambio de velocidades y en todos los casos osciló entre 3 y 4 minutos (figura 47-b). Este comportamiento, donde existe una fase *lag*, se ha encontrado en muchas enzimas que presentan interconversiones entre diferentes formas [21,22].

Se ha estudiado que cuando existe interconversión de formas enzimáticas es posible obtener curvas sigmoideas de v vs. $[S]$ aunque la enzima no sea alostérica [23]. La extensión de este concepto conduce a obtener curvas cinéticas con una sigmoidicidad superior a la esperada. Es decir, el n de Hill podría llegar a superar al número de sitios de unión del ligando analizado (Apéndice B). La estructura tetramérica de la enzima justificaría que las curvas de velocidad vs. FBP y Mg^{2+} sean sigmoideas. Sin embargo, los n de Hill obtenidos son altos (2.72 para el FBP, 3.70 para el Mg^{2+}). Debería haber una cooperatividad muy fuerte en la unión a la enzima entre las diversas subunidades, sobre todo para el Mg^{2+} . Parte del comportamiento aparentemente "cooperativo" podría ser explicado por la existencia de otra forma enzimática con características cinéticas distintas.

Un dato interesante es que la FBPasa puede incrementar su actividad específica con la preincubación por tiempos prolongados con altas concentraciones de FBP y Ca^{2+} [34,31 (fig. 4)]. También se pudo lograr resultados similares con la dupla Fru 2,6- P_2 y Mg^{2+} [30]. En estos casos se pudo realizar la preincubación sin hidrólisis pues en el primer caso el Ca^{2+} es inhibidor del paso catalítico y en el segundo lo es la Fru 2,6- P_2 . Estos datos también sugieren que la enzima pueda ser activada por FBP y Mg^{2+} al mismo tiempo que se observa hidrólisis del sustrato según el siguiente esquema:

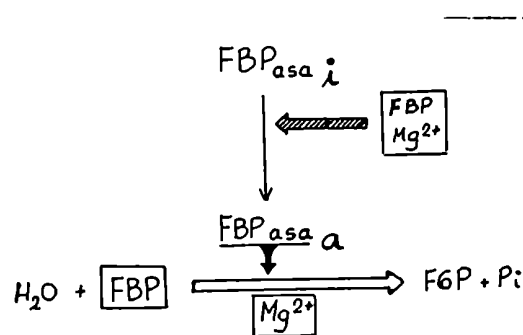


Fig. 43. Acción simultánea del FBP y Mg^{2+} como moduladores ("activadores") y efectores (sustrato y cofactor) de la FBPasa.

Hasta el momento no ha sido probado que sólo FBP y Mg^{2+} puedan activar a la enzima. Se pudo observar que eran activadores pero presencia de altas concentraciones de DTT [111,112]

Se ha visto hasta ahora a la FBPasa nativa (oxidada) como una enzima poco activa porque tendría poca afinidad por el sustrato [113]. Teniendo en cuenta las evidencias mencionadas anteriormente, una hipótesis alternativa quedó latente: La enzima funciona sólo en altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} no porque tenga poca afinidad por ellos para realizar catálisis, sino porque la enzima nativa necesita tales concentraciones para activarse. Luego, esta forma activada es la que tendría mayor actividad específica. Es decir, la enzima no necesitaría las concentraciones altas de FBP y Mg^{2+} para catalizar sino para que se produzca un paso previo de activación.

Si esta hipótesis es válida, la enzima que haya estado catalizando en altas concentraciones del sustrato y cofactor, estaría más capacitada para hacerlo a menores concentraciones que otra enzima control que no lo haya estado. Realizar un experimento de este tipo traería complicaciones técnicas porque sería necesario hacerlo en dos etapas: una incubación previa con altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} y otra posterior en menores concentraciones. Al tomar alícuotas de la primera incubación se arrastraría producto de esta hacia la segunda, siendo sumamente difícil discriminar entre la cantidad de producto formado en esta segunda incubación y el arrastrado de la primera. Los blancos serían muy altos y mínimas variaciones de producto arrastrado serían grandes comparadas con el producto formado en la segunda incubación.

Para salvar los problemas anteriores se introdujo el uso de sustrato radiactivo. Se midió la [^{14}C]Fru 6-P formada a partir de [^{14}C]FBP según lo descrito en procedimientos experimentales. Este método de medición permite realizar preincubaciones de la enzima en condiciones de catálisis con sustrato frío sin que los productos formados (que se arrastrarán con las alícuotas) interfieran con la medida de radiactividad de los que se formarán en la segunda etapa. Así, se puede estudiar la velocidad de catálisis de la enzima en función de su historia previa. El esquema general del experimento sería el que se ilustra en la figura 44.

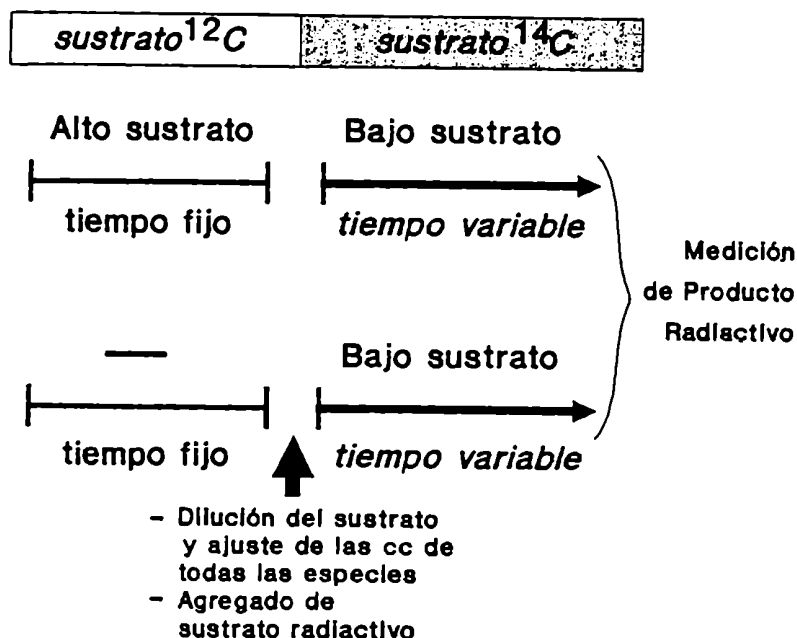


Fig. 44. Esquema general para el estudio de una enzima histerética que es activada por su sustrato a concentraciones altas para luego catalizar a concentraciones menores.

De este modo, se pueden comparar las curvas de producto vs. tiempo de una enzima que estuvo en presencia de altas concentraciones de sustrato respecto de la misma cuando no lo estuvo. Siguiendo este esquema experimental se estudió en la FBPasa el efecto de una preincubación en altas concentraciones de FBP sobre una posterior catálisis a bajas concentraciones del mismo. Para simplificar el análisis se realizó el experimento en condiciones saturantes de Mg^{2+} (20 mM), de tal manera que los resultados observados dependan sólo del sustrato y no del cofactor presente.

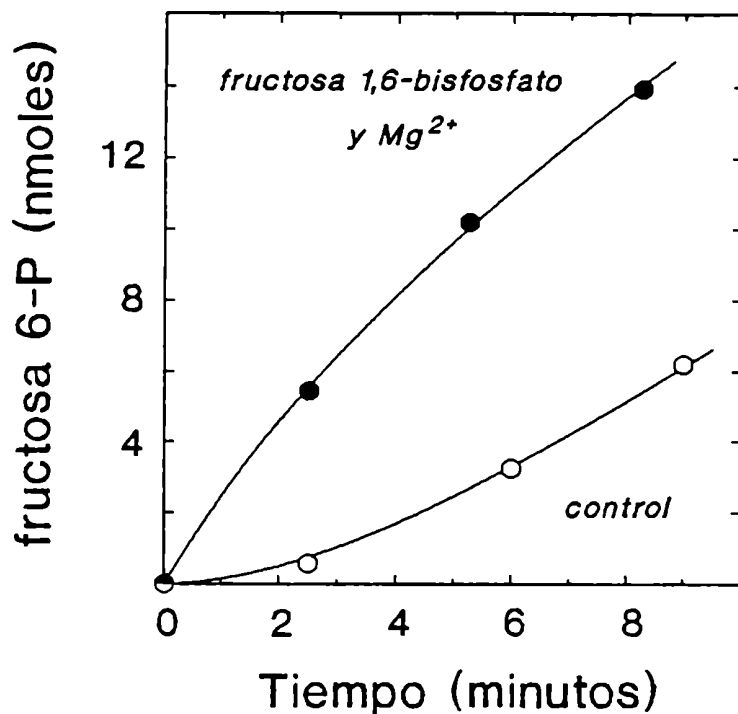


Fig. 45. Efecto de la catálisis previa a altas concentraciones de FBP sobre la actividad de la FBPasa a bajas concentraciones del mismo. *Primera incubación:* la enzima (4 μg) se incubó 3.5 minutos en una solución que contenía 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)/ 0.2 mM EGTA y cuando se indica 7 mM de FBP y 20 mM MgCl_2 (volumen total: 100 μl). *Segunda incubación:* diversas alícuotas de 5 μl de la primera incubación se diluyen con 100 μl de una solución acuosa (A) que contenía 20 mM MgCl_2 / 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)/ 0.2 mM EGTA/ 0.50 mM [¹⁴C]FBP (900 cpm/nmol). Al tiempo indicado se paró la reacción con 25 μl de EDTA 0.2 M y posteriormente se determinó el [¹⁴C]Fru 6-P como se describe en procedimientos experimentales. Debido a que se arrastra algo de FBP, Fru 6-P y Pi de la primera incubación ("catálisis fría"), para equiparar las condiciones en la segunda incubación ("catálisis caliente") entre el experimento y el control, se tomó una alícuota y se valoró el Pi liberado para conocer la cantidad de FBP que fue hidrolizado. Por este motivo, en el control, los 5 μl de la primera incubación fueron diluidos en 100 μl de 0.225 mM Fru 6-P/ 0.125 mM FBP/ 0.225 mM Pi en solución (A). Entonces, tanto en el experimento como en el control, las concentraciones de todas las especies presentes en la incubación de la "catálisis caliente" fueron iguales y estas fueron 0.625 mM [¹⁴C]FBP (720 cpm/nmol)/ 0.225 mM Fru 6-P/ 0.225 mM Pi/ 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)/ 0.2 mM EGTA. Las curvas que unen los datos experimentales responden a la ecuación 1 según los parámetros obtenidos por regresión no lineal de la tabla 5. Todas las incubaciones se realizaron a 23 °C.

Como se puede ver en la figura 45 la preincubación de la enzima a *concentraciones altas* de sustrato produce una estimulación posterior de la actividad a *concentraciones bajas*. En el caso de la enzima que no estuvo en presencia de altas concentraciones de sustrato, se puede observar que a tiempos cortos la velocidad es casi nula y luego comienza a aumentar hasta llegar a una velocidad en estado estacionario mayor que la inicial. Esto se manifiesta como una fase "Lag". En la curva de la enzima preincubada con altas concentraciones de sustrato, lentamente, la enzima se relaja hacia una velocidad menor. Esta declinación de la actividad enzimática puede explicarse así: Cuando la enzima es preincubada en presencia del sustrato, hay una conversión lenta hacia una forma activa. La proporción final entre las formas activa e inactiva sería función de la concentración del sustrato pues (i) el complejo de la enzima nativa con el FBP y el Mg²⁺ conduce a la conversión hacia la forma activa (*activación*) y (ii) al desprenderse del sustrato por disociación o por catálisis y liberación de producto, la forma activa libre tendería a retornar al estado inicial inactivo o nativo (*desactivación*). La compensación de estas dos reacciones determina la fracción de enzima activa. Al disminuir la concentración de FBP por dilución, sería menor la velocidad de formación de enzima activa a partir del complejo de la enzima inactiva con el FBP. Además la enzima activa al disociarse del sustrato retornaría al estado inactivo. Mientras tanto, la enzima permanece en una mayor proporción de estado activo que es lo que se ve en la primera etapa de la curva. Entonces, la disminución de actividad se produciría al establecerse un nuevo estado estacionario en el cual la proporción de las formas activas es menor.

La existencia de un "lag" o "burst" producido por la interconversión de dos formas enzimáticas implica que las curvas de producto vs. tiempo puedan ser descriptas por la siguiente ecuación [22]:

$$P_{(t)} = v_{\infty} \cdot t + (v_0 - v_{\infty}) \cdot \tau \cdot [1 - e^{-(t/\tau)}] \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde: P : producto formado, t : tiempo, v₀ : velocidad inicial, v_∞ : velocidad en el estado estacionario, τ : tiempo necesario para que se produzca el 63% del cambio total de velocidad. (Vida media)

Según lo expresado anteriormente, la curva en la que la enzima se preincubó con altas concentraciones de FBP frío en la figura 45, se podría describir con esta ecuación. Además, sería lógico que la velocidad final de esta curva sea igual a la de la curva control si es que la concentración del sustrato determina la proporción final de enzima activa y por lo tanto la velocidad que se logra al llegar lentamente al estado estacionario. Para saber si los resultados de la figura 45 se adaptan cuantitativamente al modelo planteado, se realizó un ajuste de los mismos a la ecuación 1 con la restricción de que V_{∞} sea el mismo para los dos conjuntos de datos. También se hizo la restricción de que la vida media de conversión en ambas curvas sea la misma. En la interconversión reversible entre dos formas no importa las concentraciones iniciales de las cuales se parte; el tiempo necesario para lograr la mitad del cambio total a realizar debería ser el mismo (apéndice A). Los parámetros obtenidos se ilustran en la tabla 5 y la ecuación resultante de los mismos está graficada en la figura 45 reflejando el buen ajuste logrado.

Tabla 5. Los resultados de la figura 45 fueron ajustados a la ecuación 1 para obtener los resultados que aquí se detallan. Las V_{∞} y τ se restringieron a que sean iguales en los dos conjuntos de datos.

Parámetro	Preincubación	
	Control	Altas [FBP]
V_0 (nmoles/min)	0.00	2.53
V_{∞} (nmoles/min)	1.04	1.04
τ (min)	3.65	3.65

El buen ajuste logrado a pesar de reducir los grados de libertad forzando a que V_{∞} y τ sean los mismos nos sugiere que el modelo propuesto es factible. La única diferencia significativa entre las dos curvas radica en la velocidad inicial.

Tabla 6. Activación concertada de la FBPasa de cloroplastos por FBP y Mg²⁺. La enzima (4 µg) se preincubó en una solución que contenía 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)/ 0.2 mM EGTA y cuando se indica 5 mM de FBP y/o 20 mM MgCl₂ (volumen total: 100 µl). Luego de 3.5 minutos una alícuota de 5 µl se diluye con 100 µl de una solución que contenía 20 mM MgCl₂/ 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)/ 0.2 mM EGTA/ 0.45 mM [¹⁴C]FBP (900 cpm/nmol) y se incubó por 3 minutos parando la reacción con 25 µl de EDTA 0.2 M. Posteriormente se determinó la [¹⁴C]Fru 6-P en esta segunda incubación como se describe en procedimientos experimentales. Todas las incubaciones se realizaron a una temperatura de 23 °C.

Agregado en la preincubación	Fru 6-P formada (nmoles)
control	0
FBP	0.5
Mg ²⁺	0.1
FBP y Mg ²⁺	4.1

Para la activación observada es necesaria la presencia del FBP junto con el Mg²⁺. En la tabla 6 se observa que el FBP puede activar a la enzima sólo en presencia de Mg²⁺. Tampoco el Mg²⁺ por produce estimulación significativa de la actividad en ausencia del FBP.

El modelo más simple que se puede plantear se ilustra en la figura 46 y está basado en el planteado por Rabin y Frieden para enzimas his-teréticas [22,23].

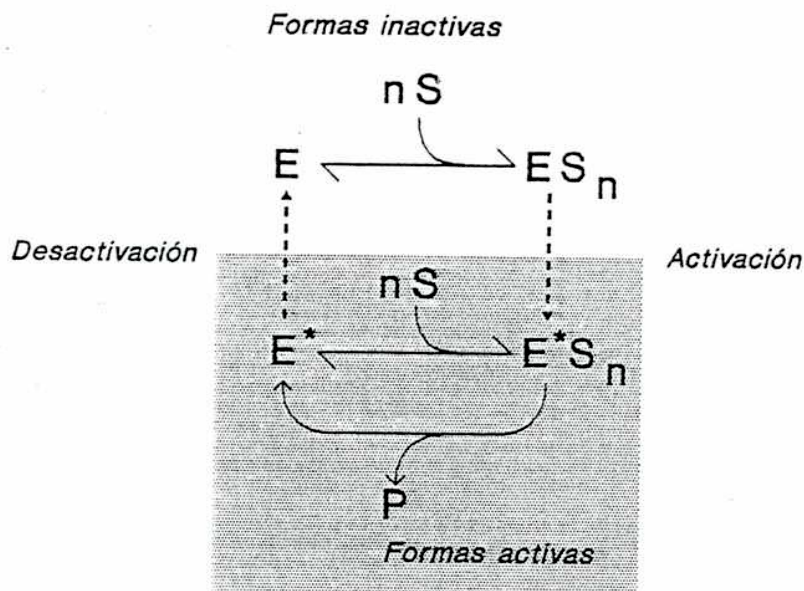


Fig. 46. Modelo de activación de la FBPasa de cloroplastos por su sustrato. En este esquema, E representa a la enzima saturada con Mg^{2+} .

Existen dos formas enzimáticas (E y E^*), una de las cuales (E^*) posee o mayor actividad catalítica o mayor afinidad por el sustrato. Cuando el S se une a E puede ocurrir una transformación o cambio conformacional hacia la obtención de la enzima activa ($ES \rightarrow E^*S$). Esta puede tanto convertir el sustrato en producto como liberarlo sin modificación, para luego volver al estado inicial cerrando el ciclo. En el estado estacionario, estas transformaciones ($ES \rightarrow E^*S$) o ($E^* \rightarrow E$) se convierten en limitantes de la reacción. En este modelo, cuando las concentraciones de sustrato son altas la mayor parte de E se convierte a ES que lentamente (en los 3.5 minutos de preincubación) pasa al estado E^*S y al catalizar, al estado E^* . Es decir, luego de la primera incubación, gran parte de la enzima se encuentra en el estado "activado" (E^* o E^*S). Por este motivo, al principio la velocidad de catálisis es alta. Cuando después de la primera incubación se realiza una dilución y se disminuye la concentración de S, la enzima se disocia de este ($E^*S \rightarrow E^*$, $ES \rightarrow E$) quedando en su mayoría como E y E^* . Entonces aquí la forma E^* comienza a desactivarse lentamente hasta dar E ($E^* \rightarrow E$). En esta situación llegamos a un nuevo estado estacionario en el cual la mayoría de la enzima está en un estado inactivo y es cuando vemos una caída en la velocidad de catálisis.

Por otro lado, en el experimento control, observamos una velocidad inicial nula. Esto es porque la enzima en la primera incubación estuvo en ausencia de sustrato y prácticamente toda se encontraba como E. Al incrementarse la concentración de FBP a 0.5 mM se obtiene una fracción de la especie ES que lentamente durante el ensayo de hidrólisis del sustrato radiactivo comienza a transformarse en E^*S , justificando de esta manera el "lag" observado en la curva de producto en función del tiempo.

Como resumen final podemos decir que la forma nativa puede ser activada por FBP y Mg^{2+} en altas concentraciones. Este hecho de por sí explica que las curvas de velocidad en función de la concentración sean tan sigmoideas y que exista una fase lag en las curvas de tiempo. Al mismo tiempo puede ser posible que intervenga aunque sea en parte en la cooperatividad aparente observada entre el FBP y el Mg^{2+} .

Este fenómeno de activación parece involucrar cambios en la proteína que dependen de azúcares bisfosfato y metales bivalentes pues aunque los tiempos, las concentraciones, y la magnitud de las actividades obtenidas no parecen ser idénticas la FBPasa también pudo ser activada por FBP y Ca^{2+} o Fru 2,6- P_2 y Mg^{2+} .

Fig. 47. Efecto de la concentración de FBP sobre el lag (τ)

A la enzima se le midió actividad con el método acoplado a la reducción de NADP como se describe en procedimientos experimentales. La solución contenía además 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)/ 0.2 mM EGTA y $MgCl_2$ para dar una concentración de Mg^{2+} libre de 20 mM a las concentraciones de FBP indicadas en el gráfico. Se monitoreó la A_{340} y esas curvas fueron ajustadas a la ecuación 1 para calcular el "lag" (τ) en cada una de ellas.

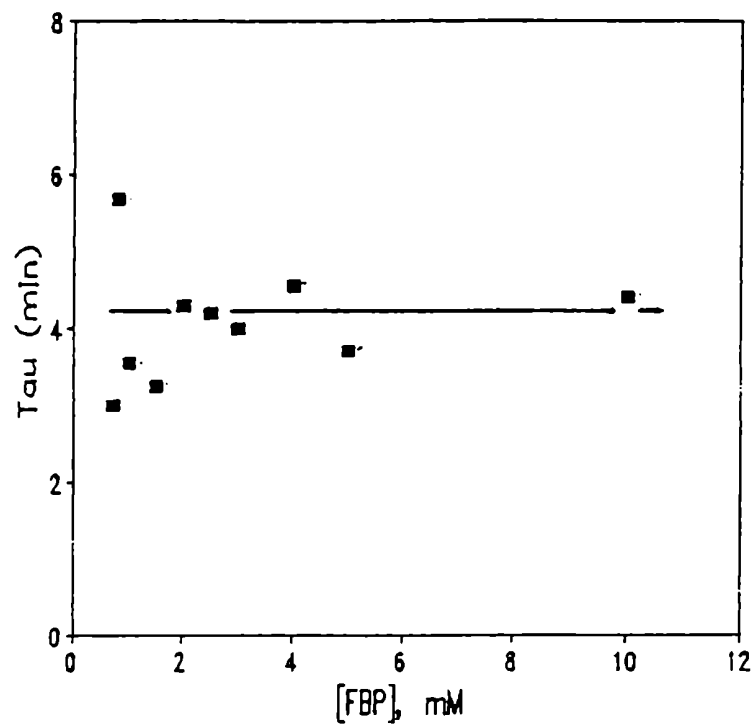


Fig. 48. Efecto del Mg^{2+} sobre la actividad de la FBPasa en función del FBP. La enzima (100 μ g) fue incubada a 23°C durante 30 minutos en 0.5 ml de una solución que contenía 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)/EGTA 0.2 mM y las concentraciones de FBP y de Mg^{2+} que se indican en el gráfico. Las concentraciones de FBP son las totales y las de Mg^{2+} son las del catión libre. Estas fueron obtenidas con $MgCl_2$ como se describe en procedimientos experimentales. Para medir la velocidad de catálisis, luego de la incubación se detuvo la reacción con el reactivo de Chen y se determinó el Pi liberado como se indica en procedimientos experimentales.

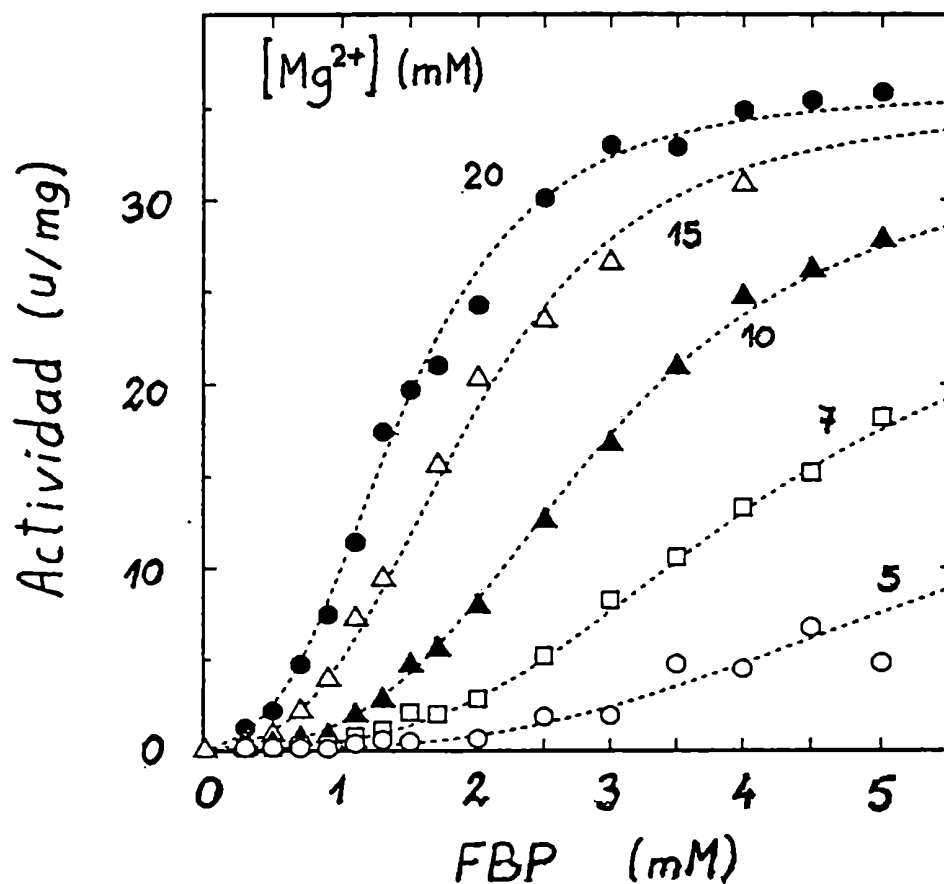
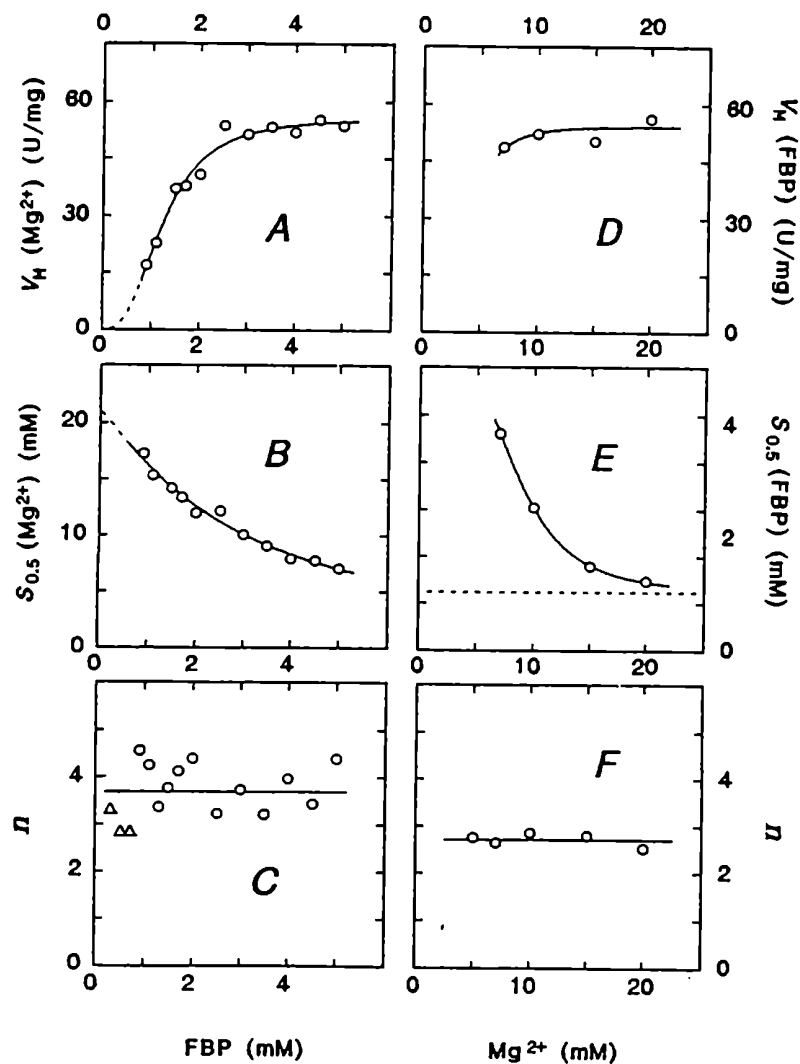


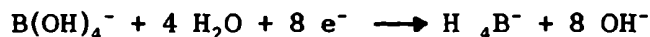
Fig. 49. Efecto del Mg^{2+} y el FBP sobre los parámetros de las curvas de velocidad en función de FBP y Mg^{2+} respectivamente. Los datos de la figura 48 se ajustaron a ecuaciones de Hill, calculando los parámetros que otorgan el mejor ajuste como se describe en procedimientos experimentales. Esto se hizo tanto para las curvas en que se mantiene el Mg^{2+} constante (D,E,F) como para las que se obtienen si se grafica la velocidad en función del Mg^{2+} manteniendo constantes diversas concentraciones de FBP (A,B,C). En los paneles A y D se grafican las velocidades máximas obtenibles. En el panel B y E los $S_{0.5}$ respectivos y los paneles C y F los n de Hill de las curvas mencionadas anteriormente. En el panel E con línea punteada se muestra el valor del $S_{0.5}$ correspondiente al FBP cuando el Mg^{2+} se lleva a concentraciones saturantes (infinitas). Este dato se obtuvo del panel A y corresponde al $S_{0.5}$ de tal curva cuando se grafica la V_M de Mg^{2+} vs. [FBP]. En el panel C los triángulos representan los datos que fueron calculados con la ecuación $V=k.S^n$ en lugar de la ecuación de Hill (ver procedimientos experimentales).



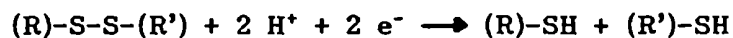
ACTIVACION DE LA FBPASA POR BOROHIDRURO DE SODIO

Como se demostró en estudios previos y en parte de esta tesis, los tioles reducen puentes disulfuro de la FBPasa en acción concertada con otros moduladores [41]. Aunque resultados anteriores apoyaron la visión de que los ditiones (DTT) son más efectivos que los monotiones (glutación, cisteína, 2-mercaptoetanol), otros estudios sobre compuestos que tienen de sulfidrilos en su estructura revelaron que la estimulación también depende de la presencia de sustituyentes en la molécula [57,59]. En todos estos estudios, el sulfidrilo permanece como un grupo funcional que reacciona con la enzima. Sin embargo, otras alternativas para la reducción de puentes disulfuro serían importantes para el conocimiento del mecanismo de activación enzimática. Por lo tanto, se determinó si reductores químicos distintos de tioles eran efectivos en modificar la actividad de la FBPasa de cloroplastos. Los resultados reportados aquí muestran que el NaH_4B ejerció un efecto dual, activación e inactivación y a su vez condicionado por el tratamiento de la enzima con un anión caotrópico. (tricloroacetato).

Estudios previos con compuestos de bajo peso molecular mostraron que el NaH_4B reacciona con disulfuros [114].



$$E_0 = -1.24 \text{ V}$$



$$E_0 = -0.25 \text{ V}$$

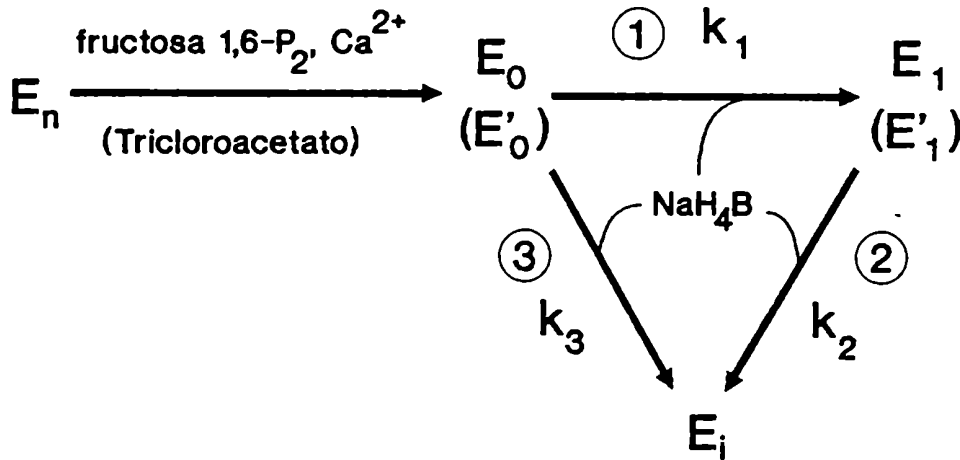
Aunque el potencial redox de este reductor no fisiológico excede tanto a la ferredoxina reducida como al centro de reacción I excitado (la molécula biológica más reductora conocida) [7], el NaH_4B no fue usado en estudios enzimáticos debido a efectos secundarios. Sin embargo la contribución de reacciones colaterales no fue analizada.

Se conoce por estudios previos que la FBPasa es funcional "en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} " luego de una preincubación con un tiol, un azúcar bisfosfato, un catión bivalente y un modulador específico (TRX, cosolvente, anión caotrópico o alta presión). En este contexto, se reemplazó al tiol que usualmente se usa (DTT) con NaH_4B y se usó tricloroacetato como anión caotrópico, debido a que su estructura no es alterada por NaH_4B . Luego de dos minutos en presencia de 1 mM FBP/ 0.1 mM $CaCl_2$ y 0.15 M NaTCA la enzima fue incubada a distintos tiempos con 10 mM NaH_4B y finalmente la actividad fue ensayada a 0.8 mM FBP y 1 mM Mg^{2+} . La fig. 50 muestra que el NaH_4B estimula la actividad de la FBPasa cuando se agregó 0.15 M de NaTCA en la incubación. Aunque la activación mediada por NaH_4B fue solamente el 8% de la que se puede lograr con DTT, representa el primer experimento en el cual la actividad de la FBPasa se incrementó por la acción de un reductor diferente de los tioles.

Como se ilustra en la figura 50, la capacidad de la enzima tratada con NaTCA para hidrolizar al FBP se elevó progresivamente hasta alcanzar un máximo a los 10 minutos y decreció cuando la incubación se prolongó a partir de ese punto. Por lo tanto, simultáneamente con el incremento de la actividad, el NaH_4B inactiva a la enzima por otros mecanismos. Por el contrario, la FBPasa no tuvo actividad cuando se incubó en presencia de 1 mM FBP/ 0.1 mM $CaCl_2$ (en ausencia de NaTCA), y tratada posteriormente con 10 mM NaH_4B , y finalmente ensayada a 0.8 mM FBP y 1 mM Mg^{2+} .

En el experimento descripto, la actividad de la FBPasa se examinó a "bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} ". Con el objeto de saber si el incremento del azúcar bisfosfato y el catión bivalente en el ensayo de actividad daría una cinética diferente la FBPasa fue (i) preincubada por 2 minutos con 1 mM FBP/ 0.1 mM $CaCl_2$ en la presencia o en la ausencia de 0.15 M NaTCA, (ii) incubada por tiempos variables con 10 mM NaH_4B y (iii) ensayada con 2.8 mM FBP/ 10 mM Mg^{2+} . De acuerdo con estudios previos la figura 51 muestra que la capacidad hidrolítica de la FBPasa a altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} no requiere un reductor en la preincubación [92,115]. En estos experimentos, a diferencia de los mostrados en la fig. 50, la incubación con NaH_4B causó un continuo descenso en la actividad. Además, el proceso de inactivación fue más lento para la enzima preincubada en ausencia de tricloroacetato.

El efecto del NaH_4B ilustra la importancia de dos aspectos en el análisis de la FBPasa de cloroplastos: (i) la acción de un modulador previo al proceso catalítico, (ii) el procedimiento usado para el ensayo de actividad. Para caracterizar la acción concertada de los moduladores en la actividad se aplicó el modelo descrito en el apéndice C a la FBPasa modificada por un gran exceso de NaH_4B (relación molar enzima/perturbante, 1:10⁵).



en el cual, E_0 (o E'_0) es la forma de enzima que proviene de una incubación de la FBPasa nativa con FBP/ Ca^{2+} en la ausencia (o la presencia) de NaTCA. El tratamiento subsecuente de E_0 (o E'_0) con NaH_4B dio lugar a la aparición de E_1 (o E'_1). E_i representa todas las formas inactivas de la FBPasa generadas por la acción aparente del NaH_4B . k_1 fue la constante cinética de la reducción (activación) de la enzima, k_2 y k_3 fueron las constantes cinéticas de la inactivación de E_0 (o E'_0) y E_1 (o E'_1), respectivamente. Es importante recalcar en el esquema anterior que al tratar la enzima nativa con FBP/ Ca^{2+} y también con NaTCA se obtienen formas enzimáticas que fueron estudiadas en la sección *Acción de los aniones caotrópicos sobre la FBPasa*. En este sentido, la forma aquí descrita como E_0 y E'_0 son las formas denominadas E_2 y E_3 en el esquema 36.

Para el modelo cinético del esquema anterior, la actividad de la FBPasa se describe por la ecuación 9 del apéndice C. Para establecer la actividad específica de E_0 (o E'_0) y E_1 (o E'_1) se tomó en cuenta resulta-

dos de experimentos anteriores. Primero, se asumió que la forma reducida de la FBPasa [E_1 o (E'_1)] es activa tanto a altas como a bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} [29]. Segundo, E_o (o E'_o) es activa solo a altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} [92,115,28]. Por lo tanto en, la ecuación 9, $\alpha=0$ a bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} donde $\alpha=\beta$ a altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} . Por otro lado, se asume que $\tau=0$ porque todas las formas de E_i tienden a ser catalíticamente inactivas. Sobre la base de estas consideraciones y el programa mencionado en el apéndice se determinó que $k_1=0.025 \text{ min}^{-1}$, $k_2=0.143 \text{ min}^{-1}$ y $k_3=0.070 \text{ min}^{-1}$, cuando E_o es la FBPasa tratada con NaTCA. Si en cambio el anión caotrópico estuvo ausente k_1 , k_2 y k_3 fueron 0.001 min^{-1} , 0.062 min^{-1} y 0.007 min^{-1} respectivamente. En relación a los últimos cálculos, debe ser mencionado que el bajo valor de k_1 , introduce un gran error en la subsecuente estimación de k_2 .

A partir de estos valores, se obtuvo el tiempo requerido para disminuir a la mitad la concentración de cada forma enzimática en cada reacción individual ($t_{0.5} = \ln 2 / k_i$). Como se indica en la tabla 0, el NaTCA generó una forma de FBPasa que pudo ser activada más rápidamente por el NaH_4B que la enzima tratada sólo con el FBP y el Ca^{2+} ; el $t_{0.5}$ (reacción 1) fue 28 minutos y 680 minutos, respectivamente. El $t_{0.5}$ de las reacciones 2 y 3 fueron 5 y 10 minutos respectivamente, para la FBPasa tratada con NaTCA; por otro lado, en el caso de la enzima incubada en ausencia del anión caotrópico, el $t_{0.5}$ de las reacciones 2 y 3 fueron 11 y 100 minutos respectivamente. En conclusión, la inactivación del proceso mediado por NaH_4B fue más rápido que el paso que conduce a la forma activa. Paradójicamente, la forma enzimática (E'_o) que fue convertida a la especie más activa, fue también la más sensible a la inactivación (reacción 3 en la tabla 0). Esta característica correlaciona con el incremento y posterior inactivación por NaH_4B de la enzima tratada con NaTCA. No se analizó la conversión de la forma nativa de la FBPasa a la forma inicial (E_n o E_o (o E'_o)) debido a que este proceso es más rápido ($t_{0.5} < 1.5$ minutos ver sección NaTCA) que la activación y la inactivación mediadas por NaH_4B . La combinación de ensayos de actividad a diferentes concentraciones de FBP y Mg^{2+} deja en evidencia la existencia de diferentes reacciones en la acción del NaH_4B sobre la FBPasa: La activación hacia una forma de enzima funcional a bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} y un proceso de inactiva-

ción. La estimulación con NaH_4B se observa sólo cuando la enzima fue previamente expuesta a FBP, Ca^{2+} y NaTCA. De la misma manera que la RuBisCo y la GA3PDH de cloroplastos, la presencia de moduladores específicos en una secuencia determinada causa el incremento de la actividad de la FBPasa [116,38]. Aunque diferentes reacciones que compiten entre sí disminuyen la actividad específica final, los experimentos presentes muestran que la FBPasa de cloroplastos es estimulada por la acción concertada de dos compuestos no fisiológicos: un reductor (NaH_4B) y un perturbante de proteínas (tricloroacetato). El tratamiento secuencial claramente demuestra que la conversión a una forma catalíticamente competente requiere un proceso reductivo subsecuente al cambio conformacional mediado por moduladores específicos (azúcares bisfosfato, cationes bivalentes) y no específicos (aniones caotrópicos, cosolventes, alta presión) (ver también fig. 0, sección *Acción de aniones caotrópicos sobre la FBPasa*).

El origen de las posibles reacciones colaterales del NaH_4B sobre las proteínas no ha sido debidamente estudiado. Sin embargo, en el caso particular de la FBPasa una hipótesis plausible es que el NaH_4B actúe sobre los moduladores influyendo indirectamente sobre la enzima. Esta alternativa se ve sustentada porque luego de 5 minutos de incubación, el NaH_4B (10 mM) redujo el 75% del FBP (concentración inicial: 1 mM). Para ello (i) El NaH_4B reaccionó con $[^{14}\text{C}]\text{FBP}$, (ii) los ésteres fosfato se hidrolizaron con fosfatasa alcalina, (iii) la muestra final se sometió a una electroforesis en papel bajo condiciones que separan alditoles de aldosas y cetosas [121]. Solamente el 25% de la radiactividad inicial corrió como fructosa y el resto lo hizo como sorbitol o manitol (no separados por la electroforesis) (tabla 7).

Tabla 7. Efecto del NaH_4B sobre el FBP. El [^{14}C]FBP fue tratado como se detalla en el texto en presencia o no de NaH_4B . Luego la muestra se sometió a una electroforesis de papel para evaluar el % de fructosa y alditoles remanentes. Los porcentajes fueron calculados de acuerdo a las c.p.m. de los respectivos picos.

Tratamiento	Fructosa (%)	Sorbitol o Manitol (%)
Control	100	0
NaH_4B	25	75

En la página 84 hemos mostrado que la ausencia del FBP o el Ca^{2+} conducen a que el tricloroacetato actúe como inactivador de la FBPasa. Estos resultados conjuntamente con los descriptos en esta sección sugieren que el NaH_4B disminuye la concentración de FBP en el medio, y con ello facilite que el tricloroacetato actúe como inactivador de la enzima. Es decir, el NaH_4B actuaría indirectamente sobre la estabilidad de la proteína al modificar al compuesto que estabiliza su estructura terciaria (FBP). Esto justifica el hecho de que las reacciones de inactivación se vean aceleradas por la presencia del anión caotrópico.

La reducción de puentes disulfuro en las proteínas por un tiol involucra la formación inicial de un disulfuro mixto entre el reductor y la proteína, y la subsecuente liberación de la forma oxidada por otra molécula de reductor, dejando finalmente a la proteína reducida [117,118]. En los experimentos descriptos anteriormente, la activación de la FBPasa fue obtenida por un tipo de reacción diferente al clásico intercambio del par redox $-\text{SH}/\text{S}-\text{S}$. El ataque nucleofílico del NaH_4B sobre los puentes disulfuro incrementa la capacidad de la enzima. Aunque, los resultados indican que reductores diferentes de tioles son funcionales en estimular la actividad enzimática, la existencia de procesos paralelos de inactivación ponen una barrera a su uso en estudios cinéticos [119,120]. El presente estudio da bases para futuros usos del NaH_4B en la modulación enzimática; el incremento de la actividad enzimática requiere la estimulación de la reacción 1 y la inhibición de las reacciones 2 y 3.

Fig. 50. Efecto del NaH_4B sobre la FBPasa. Ensayo de actividad a bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} . La enzima (7 μg) fue incubada a 23°C en 0.5 ml de una solución que contenía 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)/ 1 mM FBP/ 0.1 mM CaCl_2 y cuando se indica 150 mM NaTCA. Luego de 2 minutos, una alícuota de 5 μl de una solución 1 M NaH_4B / 0.1 M NaOH se agregó continuándose con la incubación. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de 50 μl y se agregaron a 0.45 ml de una solución que contenía en μmoles Tris-HCl (pH 7.9), 50; FBP 0.4; MgCl_2 , 0.5; y EGTA, 0.01. Luego de 10 minutos a 23°C el fosfato liberado fue valorado de acuerdo al método de Chen [PROC. Exp]. Ambas curvas del gráfico se ajustan a los datos experimentales de acuerdo a la ecuación 9 del apéndice C usando los respectivos parámetros de la tabla 8.

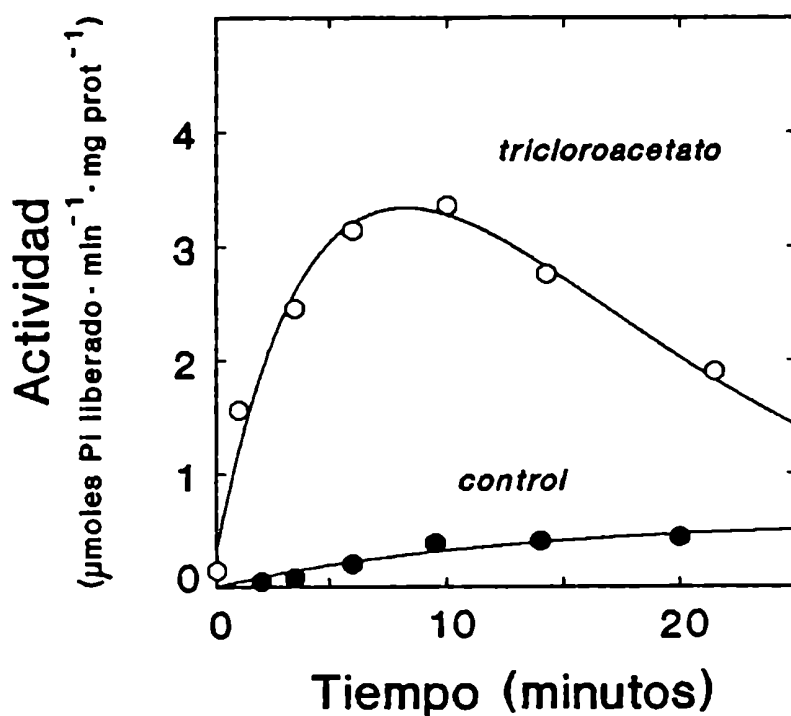


Fig. 51. Efecto del NaH_4B sobre la FBPasa. Ensayo de actividad en altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} . La enzima (7 μg) fue incubada a 23°C en 0.5 ml de una solución que contenía 100 mM Tris-HCl (pH 7.9)/ 1 mM FBP/ 0.1 mM CaCl_2 y cuando se indica 150 mM NaTCA. Luego de 2 minutos, una alícuota de 5 μl de una solución 1 M NaH_4B / 0.1 M NaOH se agregó continuándose con la incubación. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de 50 μl y se agregaron a 0.45 ml de una solución que contenía en μmoles Tris-HCl (pH 7.9), 50; FBP 1.4; MgCl_2 , 5; y EGTA, 0.01. Luego de 10 minutos a 23°C el fosfato liberado fue valorado de acuerdo al método de Chen [PROC. Exp]. Ambas curvas del gráfico se ajustan a los datos experimentales de acuerdo a la ecuación 9 del apéndice C usando los respectivos parámetros de la tabla 0.

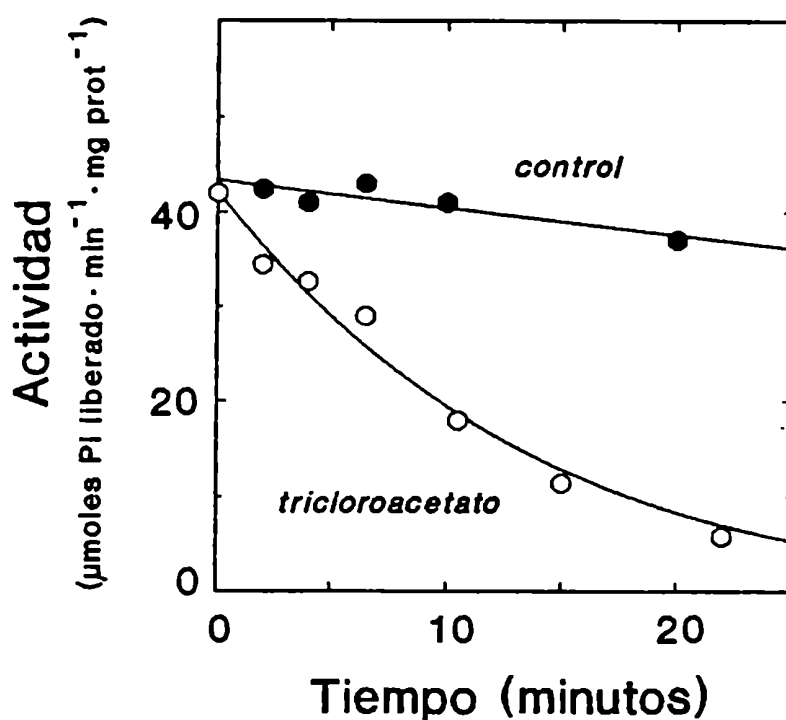


Tabla 8 Tiempos medios de las reacciones del modelo de activación de la FBPasa mediado por NaH_4B .

$t_{0.5}$ de las reacciones (min)

Reacción	tricloroacetato en la preincubación	
	presente	ausente
①	28	680
②	5	11
③	10	100

Conclusiones

CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral se estudiaron diversos aspectos de los procesos de modulación y catálisis en la fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos de espinaca (FBPasa). Tanto la modulación (activación) como la catálisis son necesarias para la actividad de la enzima. La existencia de dos procesos implica que un metabolito dado puede tener distintos efectos en cada uno de ellos. Para poder demostrar eso, es necesario separar experimentalmente las reacciones en dos etapas: una en la cual la enzima cambie sus características cinéticas y otra en la cual la enzima activa realice la transformación de sustratos a productos. En esta tesis se separaron estos procesos mediante *a)* el uso de sustratos radiactivos y *b)* generando dos procesos independientes aprovechando la característica de algunos moduladores de ser activadores en el primer proceso pero inhibidores del segundo (Ca^{2+}). En la primera aproximación la enzima nativa fue incubada con altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} y luego se utilizó un sustrato radiactivo en la segunda etapa (catálisis). Como resultado de esos experimentos, se demostró que altas concentraciones de FBP (3-5 mM) y Mg^{2+} (10-20 mM) no sólo intervienen en el proceso catalítico sino que también *activan en forma concertada* a la FBPasa. Este hecho justifica tanto los *Lags* observados en la formación de producto vs. tiempo, como la alta sigmoidicidad de las curvas de actividad vs. concentración de efector (FBP o Mg^{2+}). Con estos datos y junto a los obtenidos por Hertig, Chardot y Col. y Soulié y Col. [31,34,30] se puede concluir que *el FBP y el Mg^{2+} juegan un importante rol como moduladores (activadores) de la enzima nativa además de ser sustrato y cofactor respectivamente.*

La importancia de los azúcares bisfosfato y metales bivalentes sobre la enzima también se puso de manifiesto en numerosos experimentos de esta tesis. Se demostró que *el FBP y un metal bivalente estabilizan la estructura terciaria de la enzima* protegiéndola frente a diferentes perturbantes. El FBP y el Ca^{2+} disminuyeron la exposición de aminoácidos que se encontraban inmersos en la estructura de la proteína cuando la enzima fue tratada con urea o con altas temperaturas. Es decir, el FBP y el Ca^{2+} obs-

taculizaron el proceso de desnaturalización de la FBPasa. Resultados análogos surgieron cuando se analizó la acción del pH sobre la enzima. Se verificó que el FBP en forma concertada con el Ca^{2+} (no se usó Mg^{2+} para no tener hidrólisis simultánea de sustrato) evitan la rápida pérdida de actividad generada por el aumento de pH por encima de 8.5. Teniendo en cuenta que en el cloroplasto iluminado existe un aumento de pH de una unidad, estos experimentos adquieren una gran importancia fisiológica. Es la primera vez que se muestran experimentos *in vitro* que justifican la alta actividad de la FBPasa observada en el estroma alcalino sin que se inactive. Como en el estroma de los cloroplastos iluminados las concentraciones de FBP y Mg^{2+} se elevan considerablemente se postula que: *el FBP y el Mg^{2+} pueden contribuir a mantener la estructura de la FBPasa en el medio alcalino del estroma de los cloroplastos iluminados.* Por otro lado se comprobó que la pérdida de actividad de la enzima no es producto la disociación de la enzima sino que por el contrario *la disociación sucede a una forma enzimática inestable e inactiva.*

Otros perturbantes usados sobre la FBPasa fueron el NaTCA y el 2-propanol como modelos de anión caotrópico y solvente orgánico respectivamente. También en estos casos el FBP y el metal bivalente protegieron a la enzima de la inactivación. Tanto el NaTCA como el 2-propanol inactivan rápidamente a la enzima pero en presencia de FBP y Ca^{2+} la FBPasa retiene por mucho tiempo la capacidad de hidrolizar el sustrato. Paradójicamente cuando la enzima está unida al FBP y al Ca^{2+} estos perturbantes no sólo no inactivan a la enzima sino que por el contrario inducen un cambio conformacional que posibilita la aceleración del proceso de activación por diversos reductores. Estos reductores pueden ser tanto tioles (ditiotreitól) como no tioles (NaH_4B). Es destacable que, estos perturbantes reemplazan a la TRX en la activación de la FBPasa. Este aspecto unido al hecho que el NaTCA y 2-propanol no interfieren en estudios espectroscópicos hizo que se eligieran para analizar los cambios conformacionales. Mediante estudios espectrofluorométricos y espectrofotométricos se verificó la existencia de diferentes formas enzimáticas que correlacionaron con diferentes propiedades cinéticas. El FBP y el Ca^{2+} conduce a la enzima a un estado conformacional que se comporta de diferente manera frente al agregado de NaTCA o 2-propanol, obteniéndose espectros de diferentes características: en ausencia del azúcar bisfosfato o el metal bivalente existió una gran ex-

posición de tirosinas hacia el solvente mientras que en presencia de los mismos (ambos juntos) tal cambio fue de mucha menor magnitud lo cual induce a pensar en una acción "controlada" del NaTCA o 2-propanol. Se pudo verificar por lo tanto que uno de los factores más importantes en el mecanismo de activación de la FBPasa mediada por caotrópicos o solventes orgánicos es el orden de agregado de los moduladores. Esto implica la necesidad de un camino específico de activación. En esta tesis tal camino fue caracterizado y el modelo propuesto está ilustrado en la figura 36. Se destaca allí la presencia de un intermediario que es sensible a la activación por reductores de puentes disulfuro (E_3). Probablemente, este intermediario tenga más accesible al solvente que la enzima nativa los puentes disulfuro que se creen intervienen en la activación. Estos se encuentran en una zona muy hidrofóbica de la molécula. Teniendo en cuenta que los solventes orgánicos y los aniones caotrópicos tienden a exponer dominios hidrofóbicos en las proteínas, es lógico pensar que el mecanismo de activación radique en incrementar la proporción del conformero E_3 respecto del E_2 . Una posibilidad cierta es que antes del agregado del NaTCA ya exista una dada proporción de conformero E_3 y el perturbante sólo desplace el equilibrio. Teniendo en cuenta que estos perturbantes reemplazan a la TRX (que es el modulador fisiológico) se puede pensar que ésta además de su función como disulfuro reductasa pueda interaccionar sobre la FBPasa induciendo cambios conformacionales; Entre ellos, la formación de algún intermediario como E_3 . Esta hipótesis se ve sustentada por el hecho de que los intermediarios obtenidos en el camino de activación por NaTCA correlacionan con la pérdida de especificidad por distintas TRX ensayadas.

Intermediario	Agregado	TRX Competente
E_0		f (1)
E_2	FBP, Ca^{2+}	f, m (2)
E_3	FBP, Ca^{2+} y NaTCA	f, m y Ecoll (3)

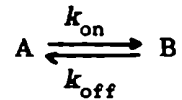
- (1) Wolosiuk y Buchanan [16]
- (2) Schurmann [39]
- (3) Mora García (datos no publicados).

En experimentos no mostrados en esta tesis la enzima activada con NaTCA tiene mayor capacidad de adsorción con las placas plásticas usadas para la determinación mediante ELISA, lo cual demuestra que en ese estado la enzima tiene características superficiales distintas. Además, la FBPasa tiene capacidad para interactuar con distintos soportes artificiales en presencia de los moduladores (micelas etc ref tesis gonzalo). Entonces, con estos resultados y los presentados en la presente tesis, se puede pensar que cambios en la concentración de los moduladores en el estroma del cloroplasto iluminado inducen cambios conformacionales que *(i)* estabilizan a la enzima y *(ii)* permiten la activación reductiva de la FBPasa. Al mismo tiempo la existencia de diversas conformaciones de la enzima permitiría a la misma *(iii)* interactuar con distintos componentes estructurales del cloroplasto u otras proteínas. Este último punto todavía no ha sido demostrado; por lo tanto, experimentos en este sentido podrían contribuir en gran medida a la comprensión de la regulación de la FBPasa.



APENDICE A

Dada una transformación entre dos especies



La velocidad de desaparición de A:

$$\begin{aligned} -d[A]/dt &= k_{on} [A] - k_{off} [B] = k_{on} [A] - k_{off} (T-[A]) = \\ &= [A] (k_{on}+k_{off}) - k_{off} T \end{aligned}$$

Entonces integrando:

$$\begin{aligned} \int_{[A]_0}^{[A]_t} \frac{dA}{[A] (k_{on}+k_{off}) - k_{off} T} &= \int_0^t dt \\ \frac{[A] (k_{on}+k_{off}) - k_{off} T}{[A]_0 (k_{on}+k_{off}) - k_{off} T} &= e^{-[(k_{on}+k_{off}) t]} \end{aligned}$$

Donde:

$$T = [A] + [B] \quad (1)$$

$$K_{eq} = k_{on}/k_{off} \quad (2)$$

$$[A]_{eq} = T/(K_{eq}+1) \quad (3)$$

reordenando y reemplazando con ecuaciones 1, 2 y 3:

$$\frac{[A] - [A]_{eq}}{[A]_0 - [A]_{eq}} = e^{-[(k_{on}+k_{off}) t]}$$

Donde el tiempo que lleva realizar la mitad del cambio total desde el estado inicial al del equilibrio es:

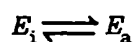
$$\frac{([A]_o - [A]_{eq})/2}{[A]_o - [A]_{eq}} = 0.5 = e^{-[(k_{on} + k_{off}) t]}$$
$$\frac{\ln(2)}{(k_{on} + k_{off})} = t_{0.5}$$

Se observa que este tiempo es independiente de la concentración inicial de A, B y del total y por lo tanto de la relación inicial entre la concentración de esas dos especies.

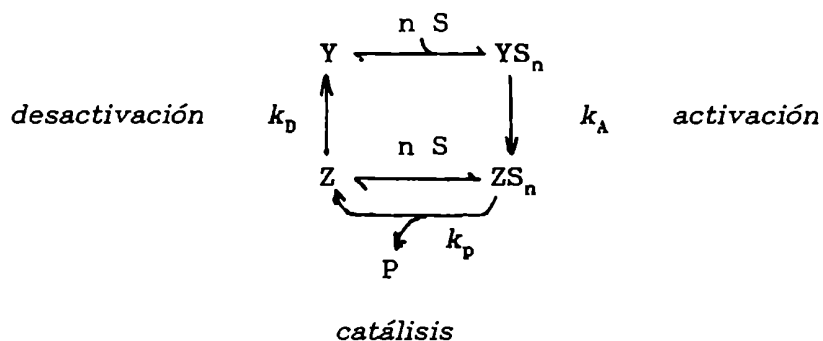
APENDICE B

ORDEN DE REACCION PARA UNA ENZIMA CON DOS FORMAS INTERCONVERTIBLES

Se presenta el caso de una enzima que durante el transcurso de la reacción puede interconvertirse entre una forma inactiva y una activa:



donde la transformación (o modulación) de E_i a E_a (activación) procede en presencia del sustrato (aquí modulador) y la transformación de E_a a E_i (desactivación) procede en ausencia del mismo. El esquema general de la reacción sería:



Donde se representa a Y como la forma enzimática inactiva, a Z como la forma enzimática activa (que puede conducir a la formación de producto P), y a S como el sustrato. De esta manera la concentración de la forma inactiva (Y_t), de la forma activa (Z_t) y la concentración total (T) son respectivamente:

$$Y_t = [Y] + [YS_n] \quad (1)$$

$$Z_t = [Z] + [ZS_n] \quad (2)$$

$$T = Z_t + Y_t \quad (3)$$

Asumiendo que la unión del sustrato se pueda describir con una ecuación de Hill con exponentes n para la enzima inactiva y la enzima activa pueden definirse las siguientes ecuaciones:

$$\alpha = \frac{[YS_n]}{Y_t} = \frac{[S]^n}{K_1^n + [S]^n} \quad (4)$$

$$\beta = \frac{[ZS_n]}{Z_t} = \frac{[S]^n}{K_2^n + [S]^n} \quad (5)$$

$$(1-\beta) = \frac{[Z]}{Z_t} = \frac{K_2^n}{K_2^n + [S]^n} \quad (6)$$

Donde α es la fracción de la enzima inactiva (Y) que unida al sustrato es capaz de transformarse en Z. Por otro lado, β es la fracción de la enzima activa que unida al sustrato es capaz de realizar catálisis y $(1-\beta)$ es la fracción de la enzima activa que puede transformarse a Y al no estar unida al sustrato. K_1 y K_2 son respectivamente la cantidad de sustrato para lograr la semisaturación de las formas Y y Z. Asumiendo que la interconversión entre las diversas formas enzimáticas son los pasos más lentos de la reacción y que la unión del sustrato a la enzima es rápida, se puede considerar que las formas Y entre sí se encuentran en equilibrio rápido al igual que las formas Z. Entonces, aún en el estado estacionario, se cumplen las ecuaciones anteriores.

Por definición, al alcanzar el estado estacionario, la concentración de cada una de las especies enzimáticas se mantiene constante. Por lo tanto, la suma de las formas Z se mantiene constante debido a que la velocidad de formación es igual a la de desaparición.

$$k_A [YS_n] = k_D [Z]$$

reemplazando con las ecuaciones 4 y 6 se obtiene la relación en el estado estacionario de las formas activas e inactivas.

$$\alpha k_A Y_t = (1-\beta) k_D Z_t$$

$$\frac{k_A a}{k_D (1-\beta)} = \frac{Zt}{Yt}$$

reemplazando en la ecuación 3 y reordenando se obtiene finalmente la proporción de enzima activa respecto del total (Φ)

$$\Phi = \frac{Zt}{T} = \frac{Zt}{Yt + Zt} = \frac{k_A a}{k_D (1-\beta) + k_A a} \quad (7)$$

Por otro lado, La velocidad de catálisis (v) y la velocidad máxima (V_M) están dadas por:

$$v = k_p [ZS] \qquad V_M = k_p T$$

Dividiendo miembro a miembro las dos ecuaciones anteriores da:

$$v/V_M = [ZS]/T$$

reemplazando con ecuaciones 5 y 7

$$v/V_M = \Phi \beta$$

o también:

$$v/V_M = \frac{k_A a}{k_D (1-\beta) + k_A a} \cdot \beta$$

Dividiendo en numerador y el denominador con k_A y luego reemplazando con ecuaciones 4, 5 y 6 resulta una ecuación que relaciona la fracción de velocidad en función de la concentración del sustrato:

$$v/V_M = \frac{\frac{[S]^n}{K_1^n + [S]^n} \cdot \frac{[S]^n}{K_2^n + [S]^n}}{k_D/k_A \cdot \frac{K_2^n}{K_2^n + [S]^n} + \frac{[S]^n}{K_1^n + [S]^n}}$$

Sacando denominador común en el denominador:

$$v/V_M = \frac{[S]^n [S]^n}{(K_1^n + [S]^n) (K_2^n + [S]^n)} \cdot \frac{[S]^n (K_2^n + [S]^n) + K_2^n (k_A/k_D) (K_1^n + [S]^n)}{(K_2^n + [S]^n) (K_1^n + [S]^n)}$$

Simplificando queda:

$$v/V_M = \frac{[S]^n [S]^n}{[S]^n K_2^n + [S]^n [S]^n + (k_D/k_A) K_2^n K_1^n + (k_D/k_A) K_2^n} [S]^n$$

Reordenando resulta en:

$$v/V_M = \frac{[S]^{2n}}{[S]^{2n} + [S]^n K_2^n (1 + k_D/k_A) + K_2^n K_1^n k_D/k_A}$$

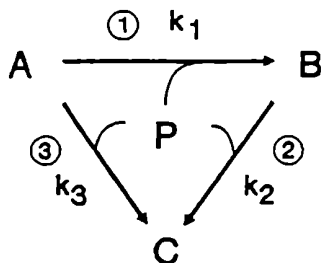
o también:

$$v/V_M = \frac{1}{1 + \frac{K_2^n (1+k_D/k_A)}{[S]^n} + \frac{K_2^n K_1^n k_D/k_A}{[S]^{2n}}}$$

Donde se obtiene una ecuación que es una división de polinomios de grado $2n$. En este caso se obtendrían curvas de $v f([S])$ cuyos n de Hill aparentes estarían comprendidos entre n y $2n$ dependiendo de las otras constantes. Es decir, en estos casos, *el exponente de Hill que se mida en la reacción general, puede superar al de los dos pasos individuales.*

APENDICE C

Para una transformación inducida por un perturbante de una especie (A) a un único producto (C) a través de dos caminos irreversibles, el esquema general de reacción es:



En el cual las formas B y P representan un estado intermedio y el perturbante, respectivamente. Se usó el subíndice "0" para referirse al tiempo 0 y para el análisis de este modelo la siguiente terminología:

t: tiempo de reacción

A: concentración de A ; k_1 : constante cinética del paso A B

B: concentración de B ; k_2 : constante cinética del paso B C

C: concentración de C ; k_3 : constante cinética del paso A C

Si se comienza la reacción con el compuesto A y sobre la base del balance de masa, la distribución de las diferentes especies es:

$$a \quad t = 0 \quad A = A_0; \quad B = 0; \quad C = 0$$

$$a \quad t = t \quad A_0 = A + B + C \quad \text{ec. 1}$$

$$a \quad t = \infty \quad A = 0; \quad B = 0; \quad C = A_0$$

Por otro lado si la concentración de P es mucho más grande que A_0 , la concentración del mismo es considerada constante.

A todo momento la dependencia de la concentración de las especies respecto del tiempo de reacción está dada por:

$$dA/dt = -k_1A - k_3A$$

$$\text{Por lo tanto: } A = A_0 \cdot \exp[-(k_1 + k_3)t] \quad \text{ec.2}$$

$$dB/dt = k_1A - k_2B$$

$$\text{Por lo tanto: } B = A_0k_1 \cdot (k_2 - k_1 - k_3)^{-1} \cdot [\exp[-(k_1 + k_3)t] - \exp(-k_2t)] \quad \text{ec.3}$$

$$\text{A partir de la ec.1, } C = A_0 - B - A$$

Luego

$$C = A_0 - A_0k_1 \cdot (k_2 - k_1 - k_3)^{-1} \cdot [\exp[-(k_1 + k_3)t] - \exp(-k_2t)] - A_0 \cdot \exp[-(k_1 + k_3)t] \quad \text{ec.4}$$

Para obtener ecuaciones que sean independientes de la concentración inicial del reactante (A_0), las ecuaciones 2, 3 y 4 se normalizaron:

$$a = A/A_0 = \exp[-(k_1 + k_3)t] \quad \text{ec.5}$$

$$b = B/A_0 = k_1 \cdot (k_2 - k_1 - k_3)^{-1} \cdot [\exp[-(k_1 + k_3)t] - \exp(-k_2t)] \quad \text{ec.6}$$

$$c = C/A_0 = 1 - [k_1(k_2 - k_1 - k_3)^{-1} + 1] \cdot \exp[-(k_1 + k_3)t] + k_1(k_2 - k_1 - k_3)^{-1} \cdot \exp(-k_2t) \quad \text{ec.7}$$

Para el caso particular de una enzima, se definió α , β y τ como la actividad específica de las formas A, B y C, respectivamente. Así, la actividad específica total (θ), al tiempo t, es:

$$\theta = \alpha a + \beta b + \tau c \quad \text{ec.8}$$

Sustituyendo en la ec. 8 los términos desarrollados en las ecuaciones 5, 6 y 7 la actividad específica de la enzima está descripta por:

$$\theta = \tau + [(\alpha - \tau) + (\beta - \tau) \cdot k_1 \cdot (k_2 - k_1 - k_3)^{-1}] \cdot \exp[-(k_1 + k_3)t] + k_1 \cdot (k_2 - k_1 - k_3)^{-1} \cdot (\tau - \beta) \cdot \exp(-k_2t) \quad \text{ec.9}$$

Para usar la ecuación 9 en la determinación de las constantes (k_1 , k_2 , k_3) se requiere el conocimiento de la actividad correspondiente a cada forma de enzima (α, β, τ), o si no, la relación entre ellas. Un programa fue desarrollado para el ajuste de curvas que minimiza la diferencia entre los valores generados por la ecuación 9 y los datos experimentales, proveyendo las constantes cinéticas correspondientes. Tal programa de computadora facilita el análisis de ecuaciones que poseen hasta dos variables independientes usando el método de regresión no lineal de Gauss-Newton (ver proc. exp).

REFERENCIAS

1. Smeaton W.A. (1992) Carl Wilhelm Scheele (1742-1786) provincial swedish pharmacist and world-famous chemist. *Endeavour*. 16, 128-131
2. Priestley (1772) en referencia 2 (página 17)
3. Hooper J. K. (1984) en: *Chloroplast* (Cellular Organelles, Editor P. Siekevitz), Plenum Press, New York and London
4. Arnon D.I. (1955). The chloroplast as a complete photosynthetic unit. *Science* 122, 9-16
5. Franck J. y Gaffron H. (1941) Photosynthesis, facts and interpretations *Adv. Enzymol.* 1, 199-262
6. Van Niel C.B. (1941) The bacterial photosyntheses and their importance for the general problem of photosynthesis. *Adv. Enzymol.* 1, 263-328
7. Blankenship R.E y Prince R.C. (1985) Excited-state redox potentials and the Z scheme of Photosynthesis. *Trends in Biochem. Sci.* 10, 382-383
8. Hill y Bendall (1960) *Nature* 186, 136
9. Mitchell P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148
10. Ellis, R. J. (1979) The most abundant protein in the world *Trends in Biochem. Sci.* 4, 241-244
11. Wolosiuk, R.A., and Buchanan, B.B. (1976) Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature* (London) 266, 565-567
12. Buchanan, B.B. (1991) Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: The ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 1-9
13. Droux, M., Jacquot, J.P., Miginiac-Maslow, M., Gadal, P., Huet, J.C., Crawford, N.A., Yee, B.C., and Buchanan, B.B. (1987) Ferredoxin-thioredoxin reductase, an iron-sulfur enzyme linking light to enzyme regulation in oxygenic photosynthesis: Purification and properties of the enzyme from C3, C4, and cyanobacterial species. *Arch. Biochem. Biophys.* 252, 426-439
14. Szekeres, M., Droux, M., and Buchanan, B.B. (1991) The ferredoxin-thioredoxin reductase variable subunit gene from *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* 173, 1821-1823
15. Holmgren, A. (1985) Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 237-271

16. Wolosiuk, R.A., Crawford, N.A., Yee, B.C., and Buchanan, B.B. (1979) Isolation of three thioredoxins from spinach leaves. *J. Biol. Chem.* 254, 1627-1632
17. Marcus, F., Chamberlain, S.H., Chu, C., Masiarz, F.R., Shin, S., Yee, B.C., and Buchanan, B.B. (1991) Plant thioredoxin h: an animal-like thioredoxin occurring in multiple cell compartments. *Arch. Biochem. Biophys.* 287, 195-198.
18. Reichard, P. (1968) The biosynthesis of deoxyribonucleotides. *Eur. J. Biochem.* 3, 259-266
19. Spector, A., Huang, R-R.C., Yan, G-Z., and Wang, R-R. (1988) Thioredoxin fragment 31-36 is reduced by dihydrolipoamide and reduces oxidized protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 156-162
20. Wolosiuk, R.A., and Hertig, C.M. (1983) Regulation of stromal fructose-1,6-bisphosphatase by thioredoxin-f and chloroplast metabolites. In: Thioredoxins, Structure and Functions (Gadal, P. ed.), pp.167-173, Editions du CNRS, Paris.
21. Neet K.E., Ainslie G.R. Jr. (1980) Hysteretic enzymes. *Meth. Enzymol.* 64, 192-226.
22. Frieden, C. (1970) Kinetic aspects of regulation of metabolic processes. The hysteretic enzyme concept. *J. Biol. Chem.* 245, 5788-5799
23. Rabin B. R. (1967) Co-operative effects in enzyme catalysis: A possible Kinetic model based on substrate-induced conformational isomerization *Biochem J.* 102, 22c-23c
24. Ainslie G.R. Jr., Shill J.P., Neet K.E. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 7088
25. Ferri, G., Stoppini, M., Meloni, M.L., Zapponi, M.C., and Iadarola, P. (1990) Chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP): amino acid sequence of the subunits from isoenzyme I and structural relationship with isoenzyme II. *Biochim. Biophys. Acta* 1041, 36-42
26. Pupillo, P., and Giuliani-Piccari, G. (1975) The reversible depolymerization of spinach chloroplast glyceraldehyde-3-P dehydrogenase. Interaction with nucleotides and dithiothreitol. *Eur. J. Biochem.* 51, 475-482
27. Wolosiuk, R.A., and Buchanan, B.B. (1976) Studies on the regulation of chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 251, 6456-6461
28. Preiss, J., Biggs, M.L., and Greenberg, E. (1967) The effect of magnesium ion concentration on the pH optimum of the spinach leaf alkaline fructose diphosphatase. *J. Biol. Chem.* 242, 2292-2294
29. Hertig, C.M., and Wolosiuk, R.A. (1983) Studies on the hysteretic properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 258, 984-989

30. Soulie, J.M., Riviere, M., Baldet, P., and Ricard, J. (1991) Kinetics of the conformational transition of the spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase induced by fructose 2,6-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* 195, 671-678
31. Hertig, C.M. (1985) Regulación de enzimas del ciclo de asimilación fotosintética de CO₂. *Tesis Doctoral*, F.C.E.N., Universidad de Buenos Aires
32. Cseke, C., and Buchanan, B.B. (1986) Regulation of the formation and utilization of photosynthate in leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 853, 43-63
33. Smeekens, S., Macdonald, F.D., and Buchanan, B.B. (1989) Studies on the entry of fructose 2,6-bisphosphate into chloroplasts. *Plant Physiol.* 89, 1270-1274
34. Chardot, T., Meunier, J.C. (1990) Fructose-1,6-bisphosphate and calcium activate oxidized spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Science*, 70, 1-9
35. Woodrow, I.E., Murphy, D.J., and Lutzko, E. (1984) Regulation of stromal sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity by pH and Mg²⁺ concentration. *J. Biol. Chem.* 259, 3791-3795
36. Wolosiuk, R.A., Hertig, C.M., Nishizawa, A.N., and Buchanan, B.B. (1982) Enzyme regulation in C₄ photosynthesis. Role of Ca²⁺ in thioredoxin-linked activation of sedoheptulose bisphosphatase from corn leaves. *FEBS Lett.* 140, 31-35
37. Wolosiuk, R.A., and Buchanan, B.B. (1978) Activation of chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the ferredoxin/thioredoxin system. *Plant Physiol.* 61, 669-671
38. Wolosiuk, R.A., Hertig, C.M. and Busconi, L. (1986) Activation of spinach chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by concerted hysteresis. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 1-8
39. Schurmann, P., Roux, J., and Salvi, L. (1985) Modification of thioredoxin specificity of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by substrate and Ca²⁺. *Physiol. Veg.* 23, 813-818
40. Droux, M., Crawford, N.A., and Buchanan, B.B. (1988) Mechanism of thioredoxin-linked activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 305, 335-342
41. Stein, M., Lazaro, J.J., and Wolosiuk, R.A. (1989) Concerted action of cosolvents, chaotropic anions and thioredoxin on chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. Reactivity to iodoacetamide. *Eur. J. Biochem.* 185, 425-431
42. Scheibe, R. (1990) Light/Dark modulation: Regulation of chloroplast metabolism in a new light. *Bot. Acta* 103, 327-334
43. Corley, E., Wolosiuk, R.A., and Hertig, C.M. (1983) Regulation of the activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase: Inhibition by spermidine and spermine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 707-714

44. Cadet, F., and Meunier, J.C. (1988) Spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase. Activation and deactivation, and immunological relationship to fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochem. J.* 253, 243-248
45. Raines, C.A., Lloyd, J.C., Willingham, N.M., Potts, S., and Dyer, T.A. (1992) cDNA and gene sequences of wheat chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase reveal homology with fructose-1,6-bisphosphatases. *Eur. J. Biochem.* 205, 1053-1059
46. Ke, H., Thorpe, C.M., Seaton, B.A., Lipscomb, W.N., and Marcus, F. (1989) Structure refinement of fructose-1,6-bisphosphatase and its fructose 2,6-bisphosphate complex at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 212, 513-539
47. Porter, M.A., Stringer, C.D., and Hartman, F.C. (1988) Characterization of the regulatory thioredoxin site of phosphoribulokinase. *J. Biol. Chem.* 263, 123-129
48. Gibson, J.L., Chen, J-H., Tower, P.A., and Tabita, F.R. (1990) The form II fructose-1,6-bisphosphatase and phosphoribulokinase genes form part of a large operon in *Rhodobacter sphaeroides*: primary structure and insertional mutagenesis analysis. *Biochemistry* 29, 8085-8093
49. Porter M.A., Stringer C.D. y Hartman F.C. (1988) Characterization of the regulatory thioredoxin site of Phosphoribulokinase. *J. Biol. Chem.* 263, 123-129
50. Gutteridge, S. (1990) Limitations of the primary events of CO₂ fixation in photosynthetic organisms: the structure and mechanism of rubisco. *Biochim. Biophys. Acta* 1015, 1-14
51. Andrews, T.J., and Lorimer, G.H. (1987) Rubisco: structure, mechanisms and prospects for improvement. In: *The biochemistry of plants*, vol. 10 (Hatch, M.D. and Boardman, N.K., eds.), pp. 131-218, Academic Press, New York.
52. Jordan, J.B., and Chollet, R. (1983) Inhibition of ribulose biphosphate carboxylase by substrate ribulose 1,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 258, 13752-13758
53. Werneke, J.M., Chatfield, J.M., and Ogren, W.L. (1989) Alternative mRNA splicing generates the two ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1, 815-825
54. Portis Jr., A.R. (1990) Rubisco activase. *Biochim. Biophys. Acta* 1015, 15-28
55. Lan, Y., Mott, K., and Woodrow, I. (1992) Light-dependent activation of Rubisco-Activase. *Plant Physiol.* 99, Suppl. 1, 104
56. Servaites, J.C. (1990) Inhibition of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by 2-carboxyarabinitol 1-phosphate. *Plant Physiol.* 92, 867-870
57. Corley, E., and Wolosiuk, R.A. (1985) The effect of organic solvents on the activation and the activity of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 260, 3978-3983

58. Wolosiuk, R.A., Corley, E., Crawford, N.A., and Buchanan, B.B. (1985) Dual effects of organic solvents on chloroplast phosphoribulokinase and glyceraldehyde-3-P dehydrogenase. *FEBS Lett.* 189, 212-216
59. Stein, M., and Wolosiuk, R.A. (1987) The effect of chaotropic anions on the activation and the activity of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 262, 16171-16179
60. Wolosiuk, R.A., and Stein, M. (1990) Modulation of spinach chloroplast NADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by chaotropic anions. *Arch. Biochem. Biophys.* 279, 70-77
61. Prat-Gay, G., Paladini Jr., A., Stein, M., and Wolosiuk, R.A. (1991) The effect of high hydrostatic pressure on the modulation of regulatory enzymes from spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 266, 20913-20921
62. Prat-Gay G. y Wolosiuk R.A. (1989) Differential reactivity of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase to Woodward's reagent and K and diethylpyrocarbonate. *Biochim. Biophys. Acta* 973, 457
63. Lamotte-Guery, F., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Stein, M., Minard, P., and Jacquot, J.P. (1991) Mutation of a negatively charged amino acid in thioredoxin modifies its reactivity with chloroplastic enzymes. *Eur. J. Biochem.* 196, 287-294
64. Anderson, L.E., and Ben-Bassat, D. (1981) Membrane-bound metabolism enzymes in pea leaf chloroplasts. In: *Photosynthesis IV. Regulation of carbon metabolism* (Akoyunoglou, G., ed.), pp. 373-378, Balaban International Science Services, Philadelphia.
65. Hermoso, R., Fonollá, J., de Felipe, M.R., Vivo, A., Chueca, A., Lazaro, J.J., and Lopez Gorge, J. (1992) Double immunogold localization of thioredoxin f and photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase in spinach leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 30, 39-46
66. Ford, D.M., Jablonski, P.J., Mohamed, A., and Anderson, L.E. (1987) Protein modulase appears to be a complex of ferredoxin, ferredoxin/thioredoxin reductase, and thioredoxin. *Plant Physiol.* 83, 628-632
67. Pla, A., and Lopez Gorge, J. (1981) Thioredoxin/fructose-1,6-bisphosphatase affinity in the enzyme activation by the ferredoxin-thioredoxin system. *Biochim. Biophys. Acta* 636, 113-118
68. Tanaka, K., Ono, C., Sugimoto, T., and Kondo, N. (1990) Light-dependent release of carbon metabolism enzymes from chloroplast thylakoids has no relation to light-activation of the enzymes. *Agric. Biol. Chem.* 54, 2149-2151
69. Gontero, B., Cardenas, M.L., and Ricard, J. (1988) A functional five-enzyme complex of chloroplasts involved in the Calvin cycle. *Eur. J. Biochem.* 173, 437-443
70. Anderson, L.E. (1987) Ribose-5-phosphate isomerase and ribulose-5-phosphate kinase show apparent specificity for a specific ribulose 5-phosphate species. *FEBS Lett.* 212, 45-48

71. Ovadi, J. (1988) Old pathway-new concept: control of glycolysis by metabolite-modulated dynamic enzyme associations. *Trends Biochem. Sci.* 13, 486-490
72. Meunier J.C., Buc J., Navarro A. y Ricard J. (1974) Regulatory behavior of monomeric enzymes. A wheat germ hexokinase as a mnemonical enzyme. *Eur. J. Biochem.* 49, 209-223
73. Storer & Cornish-Bowden (1977) *Biochem. J.* 165, 61
74. Ovadi, J. (1988) Old pathway-new concept: control of glycolysis by metabolite-modulated dynamic enzyme associations. *Trends Biochem. Sci.* 13, 486-490
75. Marcus F., Harrsch P.B., Moberly L., Edelstein I. y Latshaw S.P. (1987) Spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase: identification of the subtilisin-sensitive region and of conserved histidines. *Biochemistry* 26,7029-7035
*
76. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
77. Bensadoun A. y Weinstein D. (1976) *Anal. Biochem.* 70, 241
78. Chen, P.S., Toribara, T.Y. and Warner, H. (1966) Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 28, 1756-1758
79. Bangham J.A. (1988) Data-sieving hidrophobicity Plots. *Anal. Biochem.* 174, 142-145
80. Kyte J. y Doolittle R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132
81. Paladini A.C. y Leloir L.F. (1952) Studies on uridine-diphosphate glucose *Biochem J.* 51, 426-430
82. Hermoso, R., Chueca, A., Lazaro, J.J. y Lopez-Gorge. J. (1987). An immunological method for quantitative determination of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase in leaf crude extracts. *Photosynth. Res.* 14, 269-278.
83. Butler, W.L. (1979) Fourth derivative spectra. *Meth. Enzym.* 56, 501-515.
84. Savitsky y Golay () *Anal. Chemistry.*
85. Herskovits T.T. (1967) Difference spectroscopy. *Meth. Enzym.* 11, 748-775
86. Fraser, R.D.B. and Suzuki, E. (1973) The use of least squares in data analysis. in *Physical Principles and Techniques in Protein Chemistry (Leach, S.J., ed.), Part C.*, pp.301-355, Academic Press, N.Y.
87. McGilvery, R.W. (1965) Fructose-1,6-bisphosphate. Acidic dissociation constants, chelation with magnesium, and optical rotatory dispersion. *Biochemistry.* 10, 1924-1930

88. Lazaro, J.J., Chueca, A., Lopez-Gorge, J. y Mayor, F. (1975) Fructose-1,6-diphosphatase from spinach leaf chloroplast: molecular weight transitions of the purified enzyme. *Plant. Sci. Lett.* 5, 49-55.
89. Buchanan, B.B. Schurmann, P. y Wolosiuk, R.A. (1976). Appearance of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity on conversion of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from dimer to monomer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 970-978.
90. Heldt H.W., Werdan K., Milovancev, M. y Geller G. (1973) Alkalinization of the chloroplast stroma caused by light dependent proton flux into the thylakoid space. *Biochim. Biophys. Acta* 314, 224-241
91. Buc, J., Pradel, J., Meunier, J-C., Soulie, J.M. y Ricard, J. (1980). The pH induced dissociation of fructose-1,6-bisphosphatase of spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* 113, 285-288.
92. Zimmermann, G., Kelly, G.J., and Latzko, E. (1976) Efficient purification and molecular properties of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 70, 361-367
93. Collins, K.D., and Washabaugh, M.W. (1985). The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. *Q. Rev. Biophys.* 18, 323-422
94. Kobza, J. y Edwards, G.E. (1986) Factors influencing the inactivation of chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase. *Aust. J. Plant. Physiol.* 13, 627-636.
95. Hamilton, W.D.O., Harrison, D.A. y Dyer, T.A. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 8707
96. Marcus, F., Edelstein, I., Reardon, I. y Henrikson, R.L. (1982) Complete aminoacid sequence of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7161-7165
97. Teale, F.W.J. (1960) *Biochem. J.* 76, 381-388.
98. Marcus, F., and Harrsch, P.B. (1990) Amino acid sequence of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 279, 151-157
99. Turner, D.C., and Brand, L. (1968) *Biochemistry* 7, 3381-3390
100. Frankewich, R.P., Thimmaiah, K.N., and Hinze, W.L. (1991) *Anal. Chem.* 63, 2924-2933
101. Padros, E., Morros, A., Mañosa, J., and Duñach, M. (1982) The state of tyrosine and phenylalanine residues in proteins analyzed by fourth-derivative spectrophotometry. *Eur. J. Biochem.* 127, 117-122
102. Duñach, M., Sabes, M., and Padros, E. (1983) Fourth-derivative spectrophotometry analysis of triptophan environment in proteins *Eur. J. Biochem.* 134, 123-128
103. Scheibe, R. (1991) *Plant Physiol.* 96, 1-3
104. Damodaran, S. (1989) *Int. J. Biol. Macromol.* 11, 2-8

105. Kamoun P.K. (1988) Denaturation of globular proteins by urea: breakdown of hydrogen or hydrophobic bonds? *Trends in Biochim. Sci.* 13, 424-425
106. Pace C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Meth. Enzym.* 131, 266-280
107. Lehrer G.M. y Barker R. (1971) Conformational changes in rabbit muscle aldolase. Ultraviolet spectroscopic studies. *Biochemistry* 10, 1705-1714
108. Padros, E., Duñach, M., Morros, A., Sabes, M. y Mañosa, J. (1984) Fourth-derivative spectrophotometry of proteins *Trends. Biochem. Sci.* 9, 508-510.
109. Buchanan, B.B., Wolosiuk, R.A., and Schurmann, P. (1979) Thioredoxin and enzyme regulation. *Trends in Biochem. Sci.* 4, 93-96
110. Segel I. (1975) Enzyme Kinetics. *John Wiley and Sons, Inc., New York.*
111. Rosa L. y Whatley F.R. (1984) Conditions required for the rapid activation in vitro of the chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Physiol.* 75, 131-137
112. Rosa L. (1981) The rapid activation in vitro of the chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase followed using a new assay procedure. *FEBS Lett.* 134, 151-154
113. Clancey C.J. y Gilbert H.F. (1987) Thiol/Disulfide exchange in the thioredoxin-catalyzed reductive activation of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase *J. Biol. Chem.* 262, 13545-13549
114. Stahl, C.R. and Siggia, S. (1957) Determination of organic disulfides by reduction with sodium borohydride. *Anal. Chem.* 29, 154-155
115. Racker, E. and Schroeder. E.A.R. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 326-344
116. Lorimer, G.H., Badger, M.R. and Andrews, T.J. (1976) *Anal. Biochem.* 78, 66-75
117. Creighton, T.E. (1984) Disulfide formation in proteins. *Meth. Enzym.* 107, 305-329
118. Gilbert, H.F. (1984) Redox control of enzyme activities. *Meth. Enzym.* 107, 330-351
119. Light, A., Hardwick, B.C., Hatfield, L.M. and Sondack, D.L. (1969) Modification of a single disulfide bond in trypsinogen and the activation of the carboxymethyl derivative. *J. Biol. Chem.* 244, 6289-6296
120. Crestfield, A.M., Moore, S. and Stein, W.H. (1963) The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboximethylated proteins. *J. Biol. Chem.* 238, 622-627
121. Bourne (1961) Complexes between molybdate and acyclic polyhydroxy-compounds. *J. Chem. Soc. Part I*, 622-627

24