

Tesis de Posgrado

Estudios estructurales y cinéticos de variantes de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos de trigo generadas en *Escherichia coli*

Hagelin, Karin

1996

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:

Hagelin, Karin. (1996). Estudios estructurales y cinéticos de variantes de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos de trigo generadas en *Escherichia coli*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2905_Hagelin.pdf

Cita tipo Chicago:

Hagelin, Karin. "Estudios estructurales y cinéticos de variantes de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos de trigo generadas en *Escherichia coli*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2905_Hagelin.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y CINETICOS DE
VARIANTES DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA DE LOS
CLOROPLASTOS DE TRIGO GENERADAS EN Escherichia coli.

KARIN HAGELIN

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).

1996

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Directivo de la Fundación Campomar por haberme permitido realizar mi trabajo de tesis en el Instituto.

Al Consejo nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado las becas que posibilitaron la continuidad del trabajo.

Al Dr. Ricardo A. Wolosiuk quien me dirigió y enseñó infinidad de secretos de la química y sus maravillas. Siempre con una sonrisa y excelentes consejos, alentó mis ideas en todo momento.

A la Dra. Clara R. Krisman, por ser sabia Consejera de Estudios y muchísimo más. Por brindarme su confianza y abrirme las puertas de su laboratorio...y por su infinita paciencia.

Al Dr. Dyer por cedernos el cDNA de la CFBPasa que originó esta tesis.

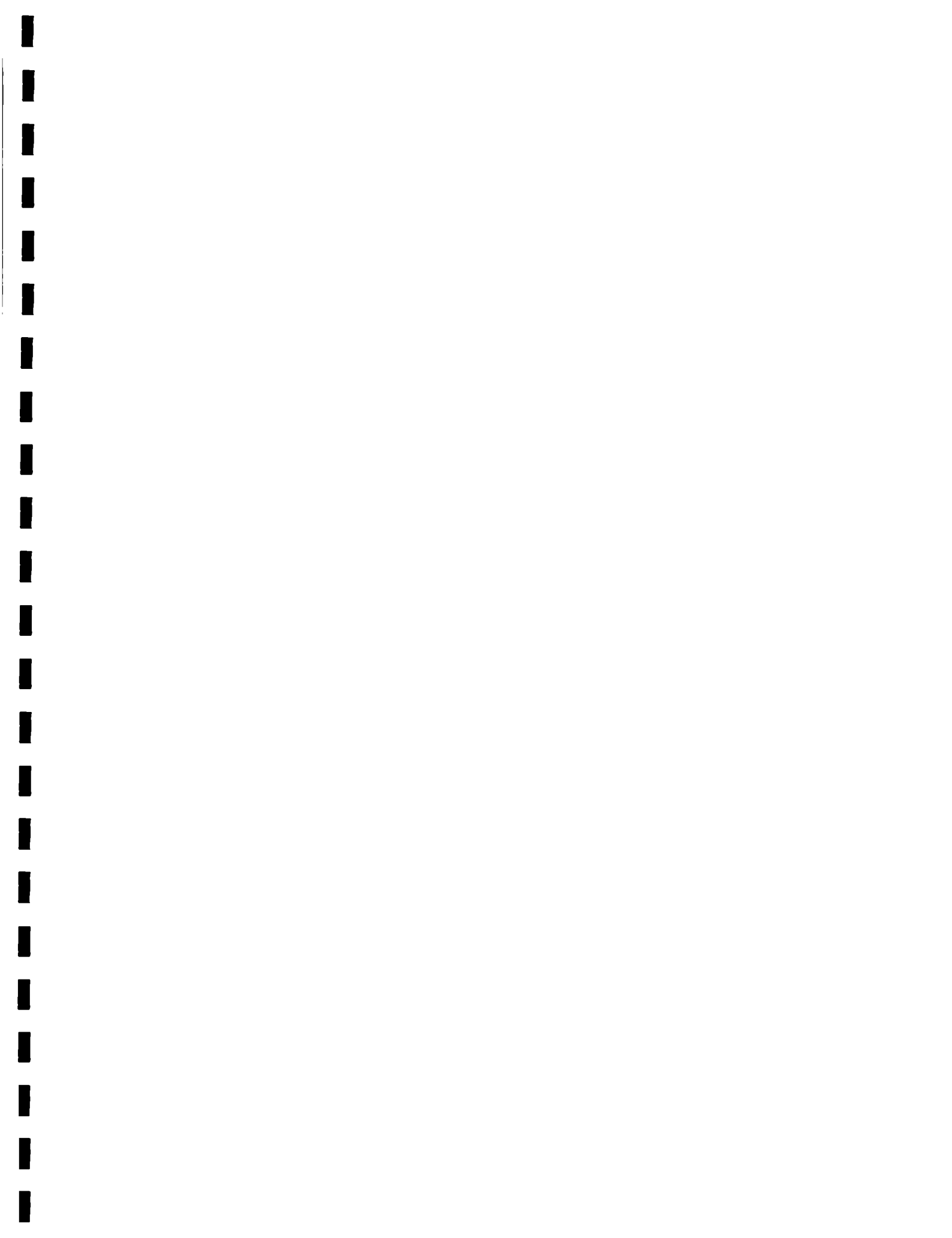
Al Dr. Viale por cedernos los genes de Chaperoninas.

Al Dr. Fossati por su trabajo impecable y nuestros primeros anticuerpos monoclonales.

A Mario Saxon, a Susana Raffo y a Amy Curto por todos los días de apoyo y los valiosos comentarios.

A todos mis compañeros del Instituto, pues quienes más quienes menos, todos han colaborado en esta tesis.

A mis amigos...



ABREVIATURAS

Ab	anticuerpo
ADN/DNA	ácido desoxiribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
Ap	Ampicilina
bp	pares de bases
CBC	Ciclo de Benson-Calvin
cDNA	ADN copia
cFBPasa	Fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplástica
DEAE-	Diethylaminoetil-
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DNasa I	Desoxiribonucleasa I
dNTP	desoxinucléosido trifosfato
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitosina trifosfato
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
dTTP	desoxitimidina trifosfato
DTT	Ditiotreitol
1,3-DPGA	ácido 1,3-difosfoglicerato
EDTA	Etilen diaminotetraacetato
EGTA	Etilenglicol-bis-(β -aminoetil eter)-N,N,N',N', tetraacetato
F6P	Fructosa 6-fosfato
FBP	Fructosa 1,6-bisfosfato
Fd	Ferredoxina
FNR	Ferredonina NADP reductasa
FPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
FTR	Ferredoxina Tiorredoxina Reductasa
FTS	Sistema Ferredoxina-Tiorredoxina
GA3-P	Gliceraldehído 3-fosfato
GSH	Glutation reducido
GST	Glutation S-transferasa
IB	Cuerpos de inclusión
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kbp	kilopares de bases
kDa	kilodalton
NaTCA	Tricloroacetato de sodio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PETS	Sistema fotosintético de transporte de electrones
3-PGA	ácido 3-fosfoglicerato
Pi	Ortofosfato
pKH1	Plásmido pGEX1, conteniendo al gen de la cFBPasa en su sitio EcoRI
PS	Fotosistema
RNasa	Ribonucleasa
R5P	Ribosa 5-fosfato
Rubisco	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
RuBP	Ribulosa 1,5-bisfosfato
Ru5P	Ribulosa 5-fosfato

Abreviaturas

SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del desnaturizante SDS
SBP	Sedoheptulosa 1,7-bisfosfato
S7P	Sedoheptulosa 7-fosfato
Trx	tiorredoxina
U.V	Ultravioleta
Xu5P	Xilulosa 5-fosfato

INTRODUCCION.....	1
FOTOSINTESIS.....	1
EL CLOROPLASTO, UNIDAD FOTOSINTETICA.....	2
TRANSFERENCIA DE ENERGIA.....	2
FOTOSINTESIS EN LAS PLANTAS.....	3
FOTOSISTEMAS.....	4
Fotosistema II.....	4
Complejo citocromo b/f.....	4
Fotosistema I.....	4
SINTESIS DE ATP.....	8
CICLO DE BENSON Y CALVIN. ASIMILACION DE CO ₂	9
REGULACION DE LA ASIMILACION DE CO ₂ EN LA FOTOSINTESIS OXIGENICA.....	11
SISTEMA FERREDOXINA-TIORREDOXINA	12
HISTERESIS ENZIMATICA.....	15
CINETICA DE LAS ENZIMAS CLOROPLASTICAS.....	16
MODULACION DE LA ACTIVIDAD.....	18
MODULACION DE LAS ENZIMAS CLOROPLASTICAS POR MODIFICACION DE INTERACCIONES NO COVALENTES.....	19
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	19
Fructosa-1,6-bisfosfatasa.....	19
MODULACION POR MODIFICACIONES COVALENTES.....	20
Modulación por el Sistema Ferredoxina-tiorredoxina	20
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	20
Fructosa-1,6-bisfosfatasa.....	20
Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa.....	20
Fosforibuloquinasa.....	20
Bases estructurales para la modulación por el Sistema Ferredoxina-Tiorredoxina.....	21
Modulación de la actividad Rubisco.....	22
MODULACION DE LAS ENZIMAS CLOROPLASTICAS POR FACTORES NO FISIOLÓGICOS.....	22
FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATA.....	23
ASPECTOS REGULATORIOS DE LA CFBPASA.....	24

INDICE

ACTIVACION.....	24
ASPECTOS ESTRUCTURALES DE LA CFBPasa.....	31
Estructura del sitio activo.....	33
Cisteínas.....	33
CUERPOS DE INCLUSION (IB).....	34
ESTRUCTURA DE LOS CUERPOS DE INCLUSION.....	35
MECANISMO DE FORMACION DE LOS CUERPOS DE INCLUSION.....	35
INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO. ORIGEN DE LOS IB.....	37
OTRAS VARIABLES QUE AFECTAN LA FORMACION DE IB.....	41
CUERPOS DE INCLUSION Y LA RESPUESTA DE ESTRES.....	42
RECUPERACION DE PROTEINAS BIOLOGICAMENTE ACTIVAS A PARTIR DE IB.....	44
RENATURALIZACION. ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCION DE PROTEINAS SOLUBLES A PARTIR DE LOS IB.....	46
FORMACION DE PUENTES DISULFURO.....	48
MATERIALES Y METODOS.....	51
MAPEO Y CLONADO DEL GEN DE LA CFBPASA DE TRIGO.....	51
CARACTERIZACION DE LAS BACTERIAS RECOMBINANTES.....	51
1) gen de la CFBPasa.....	51
2) Fusión de la CFBPasa de trigo a la GST de <u>S. Japonicum</u>	51
SECUENCIACION PARCIAL DEL GEN QUE CODIFICA A LA CFBPASA FUSIONADA AL GEN DE LA GST DE <u>S. japonicum</u>	
1) purificación del plásmido pKH1.....	52
2) secuenciación.....	53
PREPARACION DE LA PROTEINA DE FUSION.....	54
a) Forma soluble.....	55
b) cuerpos de inclusión.....	55
COEXPRESION DE LOS GENES DE CHAPERONINAS (groESL) DE <u>Chromatium vinosum</u> CON EL GEN DE LA CFBPasa DE LOS CLOROPLASTOS DE TRIGO.....	56
ENSAYO DE PROTEINAS.....	56
REACTIVACION DE LA ACTIVIDAD DE LA CFBPASA CONTENIDA EN LA PROTEINA DE FUSION.....	57
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CFBPASA.....	57

INDICE

ACTIVIDAD FOSFATASA DE LA PROTEINA DE FUSION REACTIVADA.	58
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GST DE LA PROTEINA DE FUSION.....	58
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	58
CLONADO DE LA ENZIMA CFBPASA DE TRIGO EN pET-22b(+)	59
-Desarrollo de la PCR.....	59
INDUCCION DE LA CFBPASA DE TRIGO EN BACTERIAS RECOMBINANTES.....	60
ESTUDIOS ESPECTROFOTOMETRICOS.....	61
ESTUDIOS ESPECTROFLUORIMETRICOS.....	61
EFFECTO DE LA UREA SOBRE LA CFBPasa.....	62
CLONADO Y EXPRESION DE LA PROTEINA DE 35 kDa. OBTENCION DEL FRAGMENTO AMINOACIDICO COMPRENDIDO ENTRE LOS AMINOACIDOS 190 Y 260.....	62
PREPARACION DE ANTICUERPOS POLICLONALES.....	63
PREPARACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	63
INMUNOBLOTS.....	64
RESULTADOS Y DISCUSION. PRIMERA PARTE. ANALISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA CFBPasa DE TRIGO FUSIONADA A LA GST DE <u>S.Japonicum</u>.....	65
MAPEO Y CLONADO DEL GEN DE LA CFBPasa DE TRIGO	66
CARACTERIZACION DE LAS BACTERIAS RECOMBINANTES.....	68
SECUENCIACION PARCIAL DEL EXTREMO 5' DEL GEN QUE CODIFICA A LA CFBPasa FUSIONADO AL GEN DE LA GST.....	71
EXPRESION DE LA PROTEINA DE FUSION GST-CFBPasa.....	73
PURIFICACION DE LA GST-CFBPasa.....	73
EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA GENERACION DE CUERPOS DE INCLUSION.....	80

INDICE

COEXPRESION DE LAS CHAPERONINAS DE <u>Chromatium vinosum</u> CON LA GST-CFBPasa.....	80
REACTIVACION DE LA ACTIVIDAD CFBPasa A PARTIR DE LOS CUERPOS DE INCLUSION.....	86
A) Efecto de diferentes perturbantes proteicos sobre la recuperación de la actividad catalítica de la GST-CFBPasa.....	87
B) Efecto del ditiotreitól sobre la actividad CFBPasa de la proteína de fusión.....	90
C) Características catalíticas de la proteína de fusión.....	92
D) Efecto de otros moduladores sobre la actividad catalítica de la proteína de fusión..	93
OTRAS ESTRATEGIAS PARA RECUPERAR LA ACTIVIDAD CATALITICA DE GST-CFBPasa.....	94
A) Recuperación de la actividad CFBPasa de la proteína quimérica mediante la dilución del perturbante proteico.....	96
A.1) Efecto del DTT, FBP y Ca ²⁺	97
A.2) Efecto de la temperatura.....	99
A.3) Efecto de los anticuerpos.....	100
B) Recuperación de la actividad catalítica por filtración molecular.....	102
DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LA PROTEINA DE FUSION.....	103
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GST DE LA PROTEINA DE FUSION.....	107
EFFECTO DE LA UREA SOBRE LA PROTEINA DE FUSION.....	107
CONCLUSIONES.....	109
RESULTADOS Y DISCUSION. SEGUNDA PARTE. ANALISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA CFBPasa DE TRIGO.....	112
CLONADO DEL GEN DE LA CFBPasa DE TRIGO EN EL VECTOR DE EXPRESION pET-22.....	112
INDUCCION DE LA CFBPasa DE TRIGO EN BACTERIAS RECOMBINANTES DE <u>E. coli</u> BL21.....	113
PURIFICACION DE LA CFBPasa DE TRIGO EXPRESADA EN <u>E.coli</u>	116

INDICE

ACTIVIDAD DE LA CFBPasa DE TRIGO.....	120
EFFECTO DE LOS MODULADORES NO FISIOLÓGICOS SOBRE LA ACTIVIDAD CFBPasa DE LOS CLOROPLASTOS DE TRIGO.....	121
EFFECTO DE LOS MODULADORES FISIOLÓGICOS.....	123
DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA CFBPasa DE TRIGO.....	124
DESNATURALIZACION DE LA CFBPasa DE TRIGO POR EFFECTO DE LA UREA.....	126
— Efecto de la urea sobre la actividad de la CFBPasa.....	127
Efecto de la urea sobre la fluorescencia intrínseca de la CFBPasa.....	131
Efecto de la urea sobre la absorbancia de la CFBPasa al Ultravioleta.....	136
Estados conformacionales de la CFBPasa de trigo.....	139
Estructura cuaternaria de la CFBPasa en presencia de urea	140
RENATURALIZACION DE LA CFBPasa.....	142
CONCLUSIONES.....	145
APENDICE 1.....	148
ANTICUERPOS Y ANALISIS ESTRUCTURAL.....	148
A) REACCION CRUZADA INTERESPECIFICA DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL DIRIGIDO CONTRA LA CFBPasa DE CLOROPLASTOS DE TRIGO.....	148
B) CFBPasa DE ESPINACA: INHIBICION DIFERENCIAL DE LA ACTIVIDAD POR UN ANTICUERPO POLICLONAL HOMOLOGO.....	151
C) PROTEINA DE FUSION DE 35 KDA.....	155
Clonado y expresión de la proteína de fusión de 35 kDa.....	156

ABSTRACT

In higher plants chloroplasts, a homotetrameric enzyme (MW 160000), fructose-1,6-bisphosphatase (CFBPase) catalyzes the cleavage of fructose 1,6-bisphosphate to fructose 6-phosphate and inorganic phosphate.

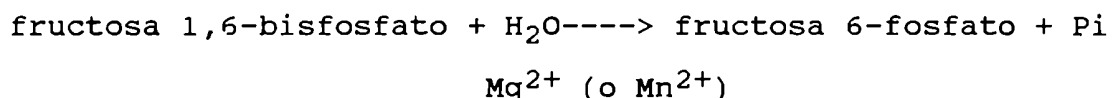
Like other regulatory steps in this organelle, the striking feature of CFBPase is the modulation of activity by the concerted action of stromal metabolites and the light-stimulated Ferredoxin-Thioredoxin System. In vitro, the enzyme activity is activated by physiological (thioredoxin) and non-physiological (cosolvents, chaotropic anions and high pressure) modulators. Hence the modification of intramolecular non-covalent interaction contribute to enhance the reductive activation of CFBPase.

In order to determine the kinetic and structural characteristics of the enzyme, the cDNA encoding wheat CFBPase was cloned in the plasmid pGEX-1. The expressed polipeptide comprised the chloroplast enzyme bound to the C-terminus of the Glutathion-S-transferase was purified by affinity chromatography. Given that most of this novel protein accumulated in the particulate fraction of the lysate in the form of Inclusion Bodies, the recovery of functionality was essayed. After the insoluble material was resuspended under different conditions, the effect of physiological and non-physiological compounds as well as antibodies were analyzed on the recovery of CFBPase and Glutathion-S-transferase catalytic activity. At variance with homotetrameric CFBPases from other sources, the catalytic capacity of the chimeric enzyme resided in a dimer.

In order to evaluate the alterations that the Glutathion-S-transferase moiety introduced on the enzyme activity and the formation of Inclusion Bodies, the cDNA that encodes the CFBPase was inserted in the plasmid pET-22. The homotetrameric, soluble and active enzyme was subsequently characterized. Like counterparts from other sources, wheat CFBPase is activable by reductants (dithiothreitol) and physiological (thioredoxin) and non-physiological (protein perturbants) modulators. Interestingly, the absence of 20 aminoacid residues in the N-terminal region does not influence the catalytic activity.

RESUMEN

La Fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos (CFBPasa) de las plantas superiores es un homotetrámero de peso molecular c.a 160000 que cataliza la siguiente reacción:



La actividad CFBPasa es modulada por la luz, tal como ocurre con otras enzimas regulatorias del cloroplasto. La actividad de la enzima aumenta luego de la transición oscuridad-luz debido a que ocurre (a) un aumento del pH y de la concentración de Mg^{2+} en el estroma del cloroplasto, (b) la modificación de otros metabolitos y iones del cloroplasto y (c) la reducción de grupos -S-S- de la enzima. La influencia de la luz se debe al efecto del Sistema de Transporte de Electrones mediado por el Sistema Ferredoxina-Tiorredoxina. In vitro, la actividad de la CFBPasa es modulada por componentes tanto fisiológicos (tiorredoxina) como no fisiológicos (cosolventes, aniones caotrópicos, alta presión). Los cambios conformacionales inducidos por estos moduladores son los responsables del aumento de su actividad específica.

A fin de analizar las características cinéticas y estructurales de la enzima, el gen de la CFBPasa de los cloroplastos de trigo fue subclonado en el plásmido pGEX-1. La expresión del gen de la proteína de fusión conteniendo a la Glutathion-S-transferasa en su extremo N-terminal y a la CFBPasa de trigo en el C-terminal produjo los cuerpos de inclusión. En consecuencia, la CFBPasa particionó en la fracción insoluble del lisado bacteriano. Con esta suspensión fue analizado el proceso de recuperación de las propiedades funcionales de la CFBPasa mediante técnicas de desnaturalización y resolubilización de proteínas. Además se estudió el efecto de moduladores -fisiológicos y no fisiológicos- y de anticuerpos sobre la reconstitución de las actividades CFBPasa como Glutathion-S-transferasa en la proteína quimérica. En contraste con las CFBPasas homotetraméricas obtenidas de otras fuentes, la capacidad catalítica residía en un dímero.

A fin de caracterizar a la enzima de cloroplastos y comparar su comportamiento con el de la CFBPasa contenida en la proteína de fusión, la secuencia nucleotídica que codifica para la CFBPasa de trigo fue clonada y expresada en otro vector: el plásmido pET-22. Este plásmido condujo a la obtención de la enzima libre del fragmento GST, en la fracción soluble del lisado bacteriano. A partir del mismo, la CFBPasa fue purificada a homogeneidad y caracterizada estructural y cinéticamente. Al igual que las contraparte de

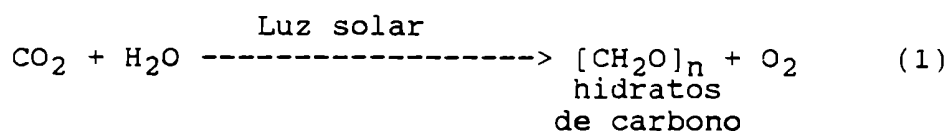
otros orígenes, la CFBPasa de trigo era un homotetrámero activable por reductores (ditiotreitól) y moduladores fisiológicos (tiorredoxina) y no-fisiológicos (perturbantes proteicos). De particular interés en estos estudios fue que la ausencia de 20 aminoácidos de la región N-terminal de la CFBPasa no afectara la capacidad catalítica de la enzima. De manera que una región altamente variable en las FBPasas, cloroplásticas y no cloroplásticas, no tendría participación en el mecanismo catalítico.

PRIMERA PARTE

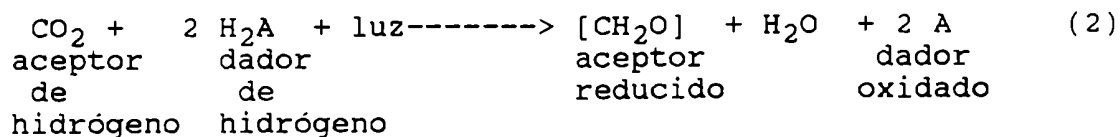
FOTOSINTESIS

La fotosíntesis, el proceso fundamental para las formas vivientes actuales, surgió hace unos tres billones de años después de la aparición de los primeros organismos vivientes. Este proceso recién venido habría tenido características similares a las del Fotosistema I. La atmósfera rica en oxígeno apareció un billón de años después, cuando los organismos estuvieron dotados de Fotosistema II.

La fotosíntesis actual no sólo produce el oxígeno sino que además renueva las reservas de carbono orgánico del planeta. Los principales productos orgánicos de la fotosíntesis son la glucosa y sus polímeros, el almidón y la celulosa. En este proceso la conversión del dióxido de carbono (CO_2) y el agua (H_2O) a hidratos de carbono y oxígeno (O_2) tiene lugar en los cloroplastos o en las membranas de los organismos fotosintéticos. La reacción se puede representar con la siguiente ecuación:



Mediante esta reacción endergónica ($\Delta G^\circ = 2868 \text{ kJ/mol C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) la energía radiante del sol es convertida en energía química. En las plantas verdes y cianobacterias el dador de hidrógenos para la reducción de CO_2 es el H_2O [ecuación (1)], por lo cual la evolución de O_2 es una consecuencia de la oxidación del agua. La comparación de la fotosíntesis vegetal con las bacterias que asimilan CO_2 en presencia de luz sin generar O_2 condujo a la siguiente ecuación general de la fotosíntesis:



EL CLOROPLASTO, UNIDAD FOTOSINTETICA

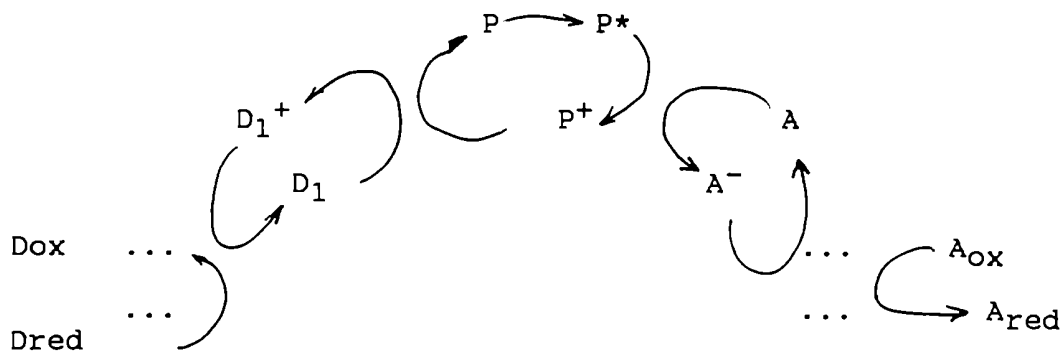
La fotosíntesis es un mecanismo que involucra dos eventos fotoquímicos necesarios para que se lleven a cabo reacciones bioquímicas. En las plantas superiores, tal como quedó demostrado por Arnon y sus colaboradores (Arnon, 1955), el proceso fotosintético ocurre en forma completa en el cloroplasto. Esta organela está rodeada por una membrana externa, separada de la interna por un pequeño espacio. La membrana interna contiene al estroma en el cual se hallan las enzimas solubles -responsables de la fase oscura de la fotosíntesis- y a las membranas tilacoides que contienen la maquinaria transductora de energía -responsable de la fase lumínica de la fotosíntesis.

TRANSFERENCIA DE ENERGIA

Todos los organismos fotosintéticos contienen uno o varios pigmentos capaces de absorber la luz e iniciar las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis. Las principales moléculas fotoreceptoras en los cloroplastos de las plantas verdes son las clorofilas a y b. Otros pigmentos accesorios son los carotenoides, de color amarillo o naranja, cuyo rol principal es complementar a las clorofilas en la captación de luz y la protección de las membranas celulares contra la fotooxidación a altas intensidades de luz.

Al absorber la luz, los pigmentos promueven a uno de sus electrones desde un estado energético basal hasta un estado excitado del cual migra con una eficiencia cercana al 100% a otros pigmentos, hasta alcanzar una clorofila

especializada (P): el centro de reacción. Allí ocurre el evento central de la reacción fotoquímica: el estado excitado de P, el agente reductor más potente de los sistemas biológicos, reduce al aceptor A, generándose la separación de las cargas (P^+A^-). El posterior transporte de los electrones a lo largo de un camino de óxido-reducciones impide el retorno al estado original. El pigmento P oxidado es un oxidante fuerte, que a expensas de un dador adecuado vuelve a reducirse para permitir que el ciclo vuelva a repetirse por una nueva absorción de un fotón.



FOTOSÍNTESIS EN LAS PLANTAS

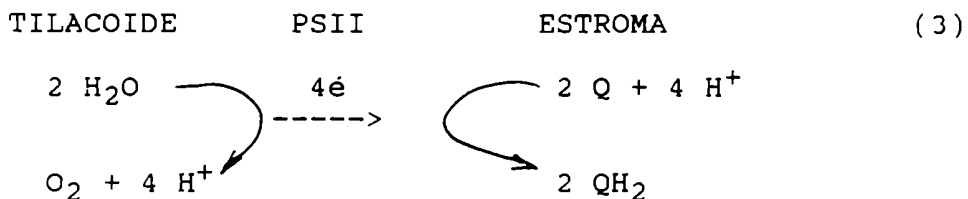
En las bacterias púrpuras y verdes ocurre una única fotoreacción que no libera oxígeno. Para ello los dadores de electrones son compuestos sulfurosos como H_2S o sustancias orgánicas. En plantas, cianobacterias y algas dos eventos fotoquímicos conectados en serie transfieren un electrón a través del Sistema de Transporte de Electrones (Hooper, 1984) para generar un reductor potente utilizado en la asimilación del carbono y la concomitante formación de oxígeno.

FOTOSISTEMAS

La fotosíntesis oxigénica tiene dos tipos de centros de reacción: el P700, asociado al Fotosistema I (PSI) y el P680, asociado al Fotosistema II (PSII). El primero produce un reductor fuerte para la formación de NADPH y el segundo genera un oxidante fuerte que lleva a la producción de oxígeno. La interacción entre ambos fotosistemas establece un gradiente de H^+ entre el estroma y el lumen del tilacoide cuya disipación a través del factor de acoplamiento (CF0-CF1) sintetiza ATP.

Fotosistema II

El estado excitado $P680^*$ es un reductor débil que transfiere un electrón a la feofitina, el cuál a su vez reduce dos plastoquinonas (2Q) con el concurso de H^+ del estroma ($2QH_2$). Para volver al estado basal el catión $P680^+$ recupera electrones a partir del H_2O , generándose O_2 y H^+ . Los H^+ para neutralizar la quinona, captados del estroma del cloroplasto y los H^+ producidos por la oxidación del H_2O en el lumen del tilacoide, originan el primer evento generador de una diferencia de pH entre ambos compartimentos.

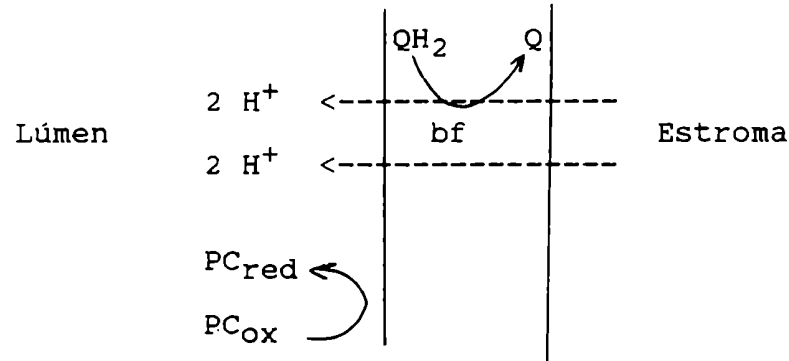


Complejo citocromo b/f

El complejo citocromo b/f cataliza la transferencia de los electrones desde el plastoquinol (QH_2) hasta la plastocianina (PC), una proteína residente en el lado

luminal de la membrana tilacoide. En este proceso los protones liberados y los adicionales bombeados por este complejo son transportados al interior del tilacoide para aumentar la diferencia de pH entre el estroma y el lumen del tilacoide.

(4)

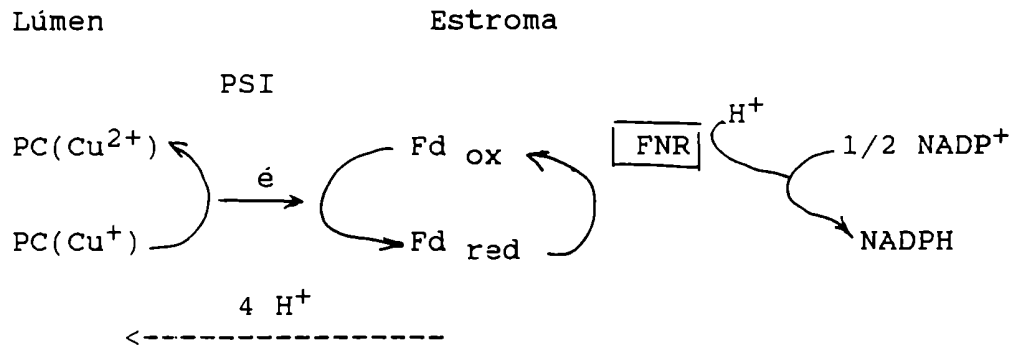


Fotosistema I

El estado excitado P700^* transfiere un electrón a otra clorofila aceptora, generando la biomolécula con mayor poder reductor. Para volver a su estado energético basal, el catión P700^+ recupera un electrón de la PC reducida por el PSII. Por otra parte una cadena de transporte de electrones transfiere el electrón desde el aceptor reducido a una proteína soluble localizada en el lado estromático de la membrana tilacoide: la Ferredoxina (Fd) (12 kDa)

La Fd reducida transfiere electrones al NADP^+ para formar NADPH. Esta reacción es catalizada por la Ferredoxina NADP^+ reductasa (FNR) en el lado estromático de la membrana. La captura de un H^+ en la reducción del NADP^+ también contribuye a incrementar la acidificación del interior del tilacoide y la alcalinización del estroma.

La reacción general catalizada por el PSI es:



En esencia la luz causa el flujo de electrones desde el agua hasta el NADPH y lleva a la generación de una fuerza protón-motriz. Este camino, denominado Esquema Z de la fotosíntesis por R. Hill (Hill and Bendall, 1960; Blankenship and Prince, 1985) se resume en la figura 1.

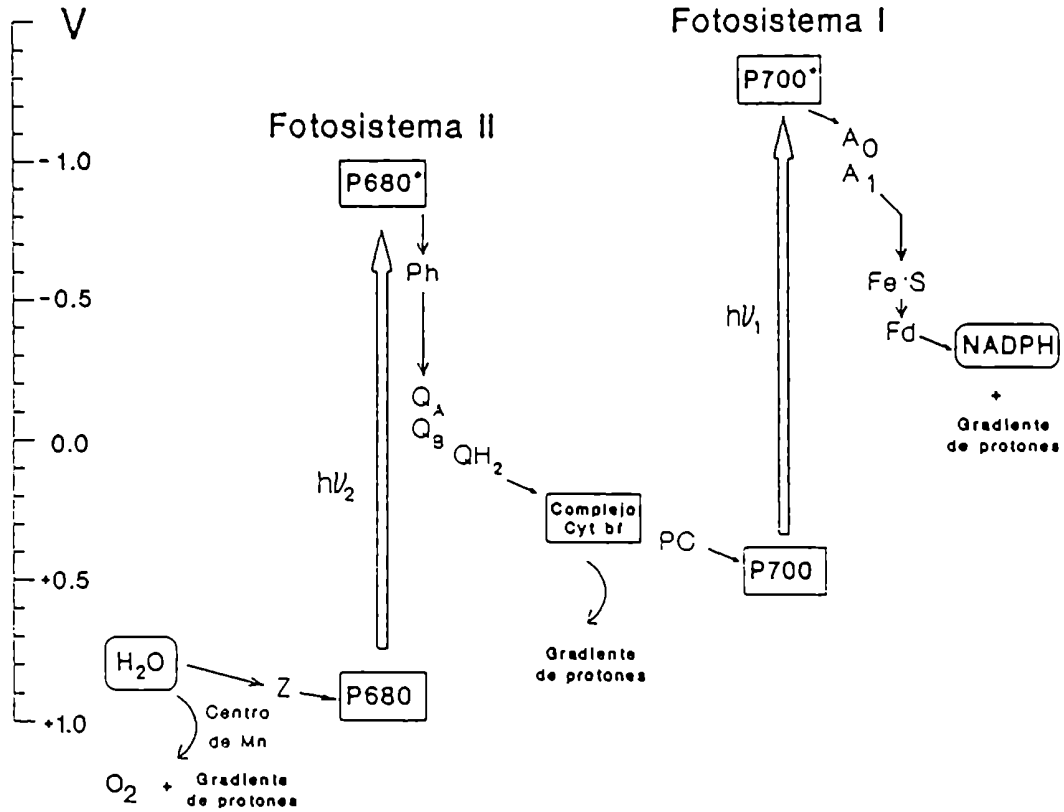
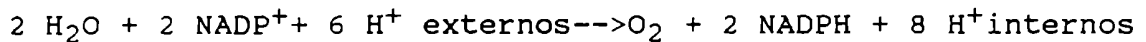


Figura 1. Esquema Z de la fotosíntesis. Este esquema representa el potencial de reducción de los diversos intermediarios en el transporte electrónico en y entre los fotosistemas I y II. P680: Pigmento de absorción a 680 nm. Clorofila del centro de reacción del fotosistema II. P680*: P680 excitado. P700: Pigmento de absorción a 700 nm. Clorofila del centro de reacción del fotosistema I. P700*: P700 excitado. Ph: Feofitina. QA, QB: 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.

En base a lo antedicho la reacción neta entre ambos fotosistemas es:

(5)



SINTESIS DE ATP

En los cloroplastos y las mitocondrias, la fuerza protón-motriz (Δp) está determinada por dos componentes: el gradiente de pH y el potencial de membrana ($\Delta\phi$):

$$\Delta p = \Delta\phi + 0.6 \Delta\text{pH}$$

En los cloroplastos ΔpH es el factor determinante del Δp ya que existe un transporte neto de protones hacia el interior del tilacoide ($\Delta\text{pH} = 3.5$). La H^+ -ATPasa que transporta los H^+ en el sentido inverso aprovecha este proceso para fabricar ATP.

De manera que el ATP y el NADPH constituyen los productos de la fase lumínica de la fotosíntesis cuya utilización en la fase oscura de la fotosíntesis contribuirá con la construcción de los esqueletos carbonados a partir de CO_2 .

CICLO DE BENSON Y CALVIN. ASIMILACION DE CO₂

El ciclo reductivo de las Pentosas Fosfato o CBC es el mecanismo primario de asimilación de CO₂ en las plantas. El punto crucial de este mecanismo es la carboxilación de un aceptor de cinco carbonos, la ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP), para producir dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA) -reacción 1, fig. 2-. Esta reacción, altamente exergónica ($\Delta G^\circ = -12,4$ kcal/mol) y por lo tanto irreversible, es catalizada por la enzima Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco). Los pasos subsiguientes del CBC, conocidos como etapa reductiva, consumen el ATP y el NADPH producidos durante las reacciones lumínicas para reducir el PGA a GA3-P -reacciones 2 y 3, fig. 2-. Una parte del "pool" de GA3-P, mediante una serie de isomerizaciones, condensaciones e hidrólisis genera la Ru5P. La fosforilación de este compuesto restituye al aceptor primario de CO₂, la RuBP y con ello cierra el ciclo para continuar la asimilación de CO₂. El GA3-P excedente constituye el producto neto del ciclo y sirve como precursor para la síntesis de almidón dentro del cloroplasto o es transportado al citoplasma para la síntesis de sacarosa.

De esta manera, el CBC constituye la interfase que une la transducción de la energía luminosa en las membranas tilacoides con la utilización de los metabolitos en otros compartimentos celulares.

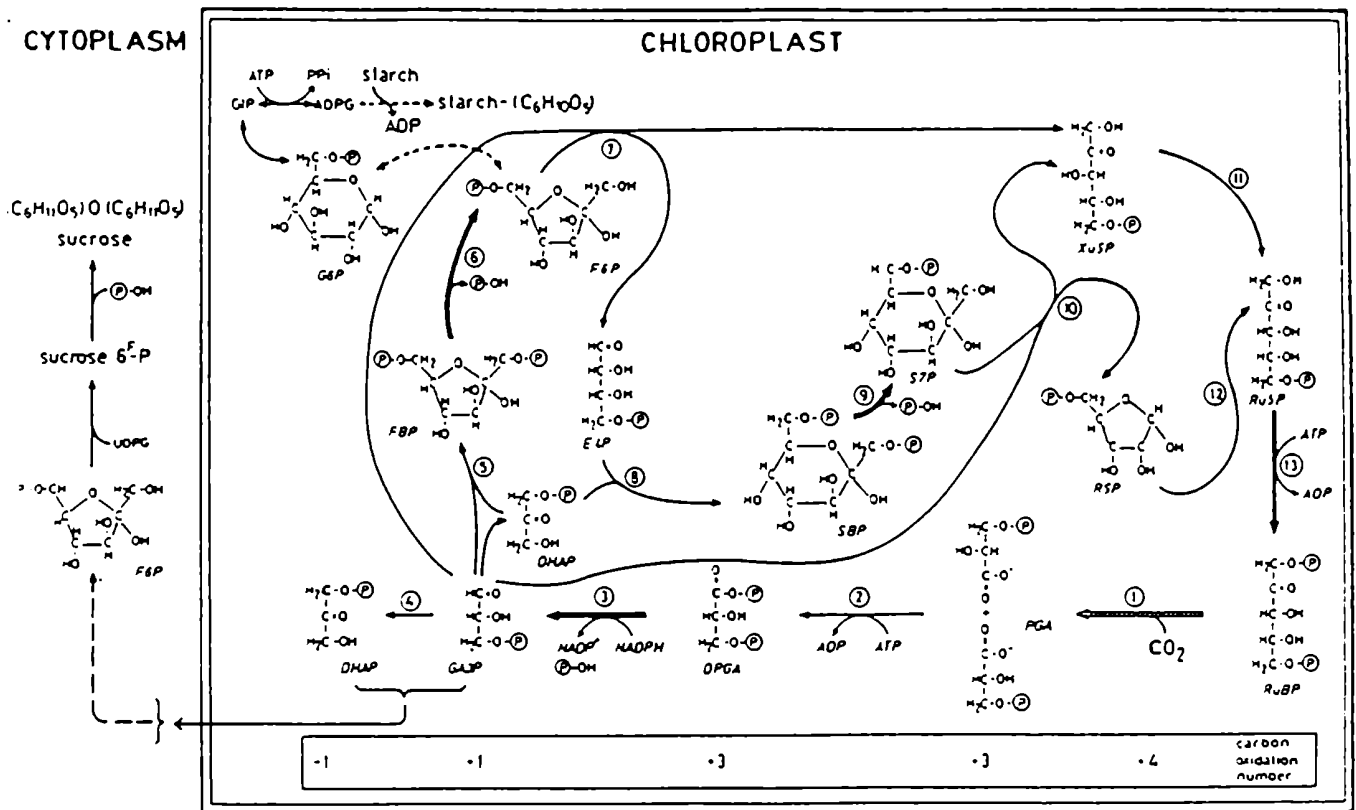


Figura 2. Ciclo reductivo de las Pentosas Fosfato. Utilización del CO₂ atmosférico en la síntesis de compuestos orgánicos. Las cuatro primeras reacciones enzimáticas del ciclo disminuyen el número de oxidación del átomo de carbono originado a partir del CO₂ (en negrita). El carbono se dirige hacia la síntesis de almidón, en el cloroplasto (arriba a la izq.), o de sacarosa en el citoplasma (izq.). Las flechas gruesas señalan los pasos enzimáticos que son regulados por el Sistema Ferredoxina-Tiorredoxina. La flecha rayada representa la reacción controlada por Rubisco Activasa. ADPG: adenosina 5'-difosfo-glucosa; DPGA: 1,3-bisfogligerato ; E4P: eritrosa 4-fosfato; F6P: fructosa 6-fosfato; FBP: fructosa 1,6-bisfosfato; G1P: glucosa 1-fosfato; G6P: glucosa 6-fosfato; GA3-P: gliceraldehído 3-fosfato; PGA: 3-fosfoglicerato; PPI: pirofosfato; P: fosfato orgánico; P-OH: ortofosfato; R5P: ribosa 5-fosfato; Ru5P: ribulosa 5-fosfato; RBP: ribulosa 1,5-bisfosfato; S7P: sedoheptulosa 7-fosfato; SBP: sedoheptulosa 1,7-bisfosfato; UDPG: uridina 5'-difosfo-glucosa; Xu5P: xilulosa 5-fosfato; 1: Rubisco; 2: 3-fosfo glicerato quinasa; 3: NADP-gliceraldehído-3-P deshidrogenasa; 4: triosafosfato isomerasa; 5, 8: aldolasa; 6: fructosa-1,6-bisfosfatasa; 7, 10: transcetolasa; 9: sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa; 11: fosfocetopentosa isomerasa; 12: fosforibosa isomerasa; 13: fosforibuloquinasa

REGULACION DE LA ASIMILACION DE CO₂ EN LA FOTOSINTESIS OXIGENICA.

Es bien sabido que en la fotosíntesis la luz funciona proveyendo el poder asimilatorio, en forma de ATP y NADPH, para las reacciones del CBC, historicamente conocidas como las reacciones "oscuras". Sin embargo, este concepto no refleja la regulación que la luz ejerce sobre las reacciones oscuras, facilitando su funcionamiento más efectivo. En los sistemas fotosintéticos productores de O₂ (cloroplastos y cianobacterias) esta regulación se produce por los cambios en: la alcalinización del pH estromático, el aumento de la concentración de metales bivalentes y de metabolitos y el cambio en los grupos sulfhidrilos de las enzimas. Estas señales "informan" a las enzimas regulatorias del ciclo la presencia de la luz y que por lo tanto su actividad debe modificarse. La alteración de la actividad de estas enzimas dirige a los caminos biosintéticos y degradativos en la dirección correcta. Esto es de fundamental importancia, ya que las enzimas de la degradación de hidratos de carbono (Stitt and Heldt, 1981) coexisten en el cloroplasto con las enzimas biosintéticas. Ciertas enzimas biosintéticas son activadas por la luz (CFBPasa, NADP-GA3PDH, CSBPasa, PRK) en tanto que enzimas degradativas son desactivadas (PFK en la glucólisis), Glu-6-PDH en la Vía oxidativa de las Pentosas Fosfato) (Kelly and Latzko, 1977; Cséke, Nishizawa and Buchanan, 1982). De esta forma el cloroplasto minimiza los ciclos fútiles y maximiza la eficiencia de procesos metabólicos temporalmente dispares. La luz asegura así que la asimilación de CO₂ tenga lugar durante el día y la degradación de hidratos de carbono ocurra primariamente de noche (Buchanan, 1980; Cséke and Buchanan, 1986).

SISTEMA FERREDOXINA-TIORREDOXINA

En los cloroplastos iluminados, la Ferredoxina reducida es utilizada en la generación de NADPH, la reducción de NO_2^- y SO_3^{2-} para la síntesis de grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{SH}$ respectivamente y en la formación de glutamato a partir de glutamina y 2-oxoglutarato. Además interviene en la reducción de puentes disulfuro de las proteínas. Esta modificación altera drásticamente la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas sustrato, por lo cual dicho evento de óxido-reducción constituye el mecanismo que media en la activación de las enzimas por luz (Buchanan, 1980; Cséke and Buchanan, 1986; Buchanan, 1991).

En la fotosíntesis oxigénica la Ferredoxina, en presencia de Ferredoxina Tiorredoxina Reductasa, reduce a una proteína soluble, la Tiorredoxina (Trx), la cual regula la actividad de las enzimas estromáticas relacionadas con el metabolismo del carbono, nitrógeno y azufre mediante la reducción de los puentes disulfuro. En conjunto estas tres proteínas constituyen el Sistema Ferredoxina-tiorredoxina (FTS) (Wolosiuk and Buchanan, 1976a; Buchanan, Wolosiuk and Schurmann, 1979; Buchanan, 1991) que en las plantas superiores constituye el mecanismo principal para la regulación del CBC por la luz (figura 3).

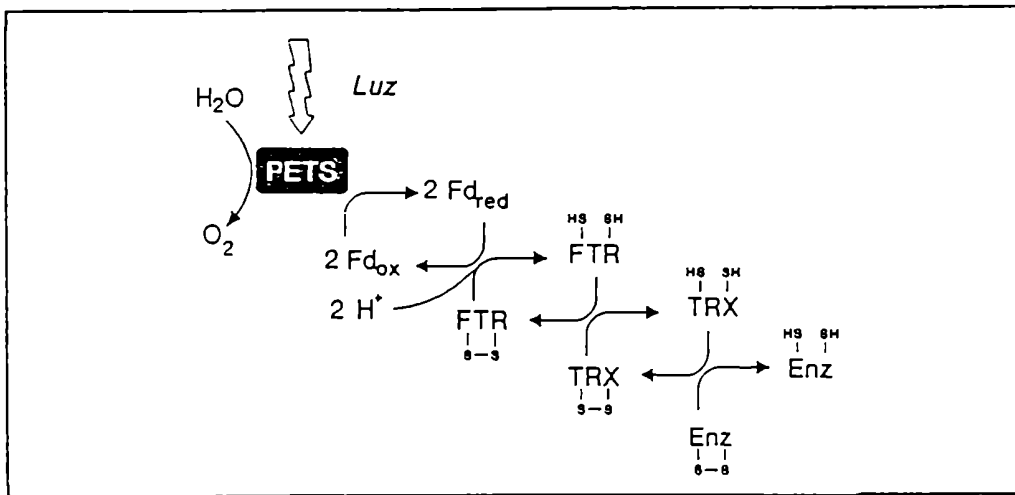
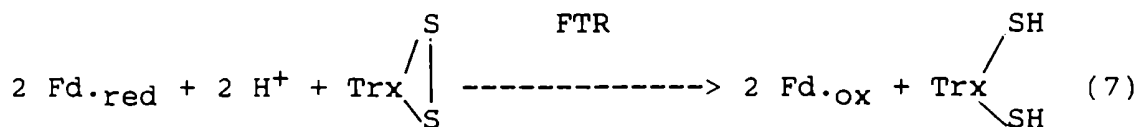


Figura 3. Cadena de oxido-reducción en el Sistema Ferredoxina-Tiorredoxina. En el esquema se detallan las reacciones que unen los eventos disparados por luz en las membranas tilacoides con la regulación de reacciones bioquímicas que ocurren en el estroma. La Ferredoxina (Fd) se reduce en la cara estromática de las membranas tilacoides por la acción del Sistema Fotosintético de Transporte de Electrones (PETS); simultáneamente, el O₂ se libera en el lado luminal. La transferencia de electrones desde la Ferredoxina y la captación de protones del entorno convierten 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 blanco (Enz) es transformado a grupos tioles modificándose así la actividad de la misma.

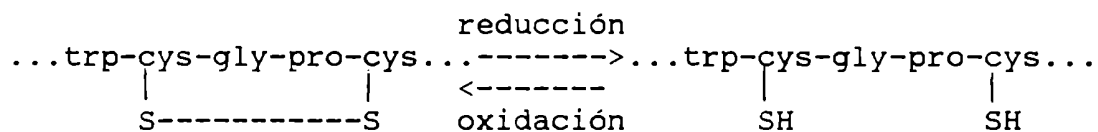
La Ferredoxina es una proteína soluble (12 kDa) que contiene dos átomos de Fe complejados por un lado con dos átomos de azufre y por el otro a la proteína por los grupos -SH de los residuos cisteína. Esta sulfoferroproteína tiene un potencial redox bajo ($E = -0.43V$) y transfiere un electrón por molécula en los procesos de reducción.

En presencia de Ferredoxina reducida, la Ferredoxina-Trx reductasa cataliza la reducción del puente disulfuro que constituye el sitio activo de la Trx.



La Ferredoxina-Trx reductasa es una proteína 4Fe.4S que existe solamente en organismos fotosintéticos oxigénicos. Consiste de dos subunidades, una de 13 kDa, inmunológicamente similar entre todos los organismos estudiados y otra de 17, 15 y 7 kDa en espinaca, maíz y Nostoc muscorum respectivamente (Droux et al., 1987; Szekeres, Droux and Buchanan, 1991).

Las Trxs son proteínas de bajo peso molecular (c.a. 12000) que se encuentran en todas las formas de vida. El centro activo presenta una secuencia aminoacídica invariable con capacidad de reducirse y oxidarse cuando interacciona con otras proteínas (Holmgren, 1985).



Dos Trxs diferentes, la Trx-f y la Trx-m, forman parte del Sistema Ferredoxina-Trx (Wolosiuk et al., 1979; Marcus et al., 1991). En su estado reducido, la Trx-f activa selectivamente a enzimas involucradas con la síntesis de

hidratos de carbono, incluyendo la CFBPasa (de allí "f"), CSBPasa, PRK y NADP-GADPH. La Trx-m activa preferencialmente a la malato-deshidrogenasa (de allí "m") (Buchanan, 1991) y también desactiva a una enzima clave de la vía oxidativa de las Pentosas Fosfato, la G6PDH. En los compartimentos no fotosintéticos de las plantas superiores existe una tercera Trx, la Trx-h (Wolosiuk et al., 1979) cuya reducción requiere del NADPH y de la NADP-Trx reductasa (Reichard, 1968).

El Sistema Ferredoxina-Trx funciona cambiando el estado redox de sus proteínas sustrato. Las enzimas biosintéticas son activadas mediante la luz por la transferencia de hidrógenos [$2H^+ + 2e$] desde la Trx reducida hacia los -S-S- específicos, generándose la Trx oxidada y las enzimas reducidas con capacidad catalítica. La desactivación ocurre mediante el mecanismo inverso: en la oscuridad se oxidan los grupos -SH de la Trx, los cuales por un intercambio tiol/disulfuro oxidan a las enzimas reducidas. Las enzimas de las vías degradativas de hidratos de carbono muestran una respuesta opuesta, i.e. se desactivan mediante reducción y se activan por oxidación.

HISTERESIS ENZIMATICA.

La característica distintiva de las enzimas regulatorias del CBC es la baja capacidad catalítica en la oscuridad que aumenta con la iluminación. In vitro, la formación del producto se inicia con actividad muy baja, que luego incrementa hasta alcanzar un valor constante. La interpretación más simple para este fenómeno es la interconversión entre una forma inactiva y otra activa que ocurre a una velocidad mucho menor que la velocidad con la que los sustratos son transformados en productos (Neet and Ainslie, 1980). Esta característica es típica de las enzimas

denominadas histeréticas. El término Histéresis enzimática fue acuñado hace 20 años por Frieden para las enzimas que presentan "una respuesta lenta a cambios rápidos de concentración del ligando" en un fenómeno que provoca fases lag en los ensayos de actividad (Frieden, 1970). El paso lento en la transición histerética puede ser la isomerización, la asociación-disociación, la modificación covalente de la enzima, o el desplazamiento de ligandos (Neet and Ainslie, 1980).

CINETICA DE LAS ENZIMAS CLOROPLASTICAS

La fase lag que presentan las enzimas cloroplásticas en la formación de productos ha despertado interés porque dicha etapa puede ser modificada por metabolitos cuyas concentraciones in vivo cambian por la luz. Si la actividad de las enzimas regulatorias de los cloroplastos involucra dos procesos con diferentes características, la modulación y la catálisis, es necesario separar la conversión lenta a la forma más activa, de la transformación rápida de sustratos. Con este objetivo en nuestro laboratorio se diseñó un ensayo en dos etapas: primero las enzimas se incuban bajo condiciones específicas (modulación) y luego se determina la conversión de los sustratos a productos (catálisis) (figura 4.).

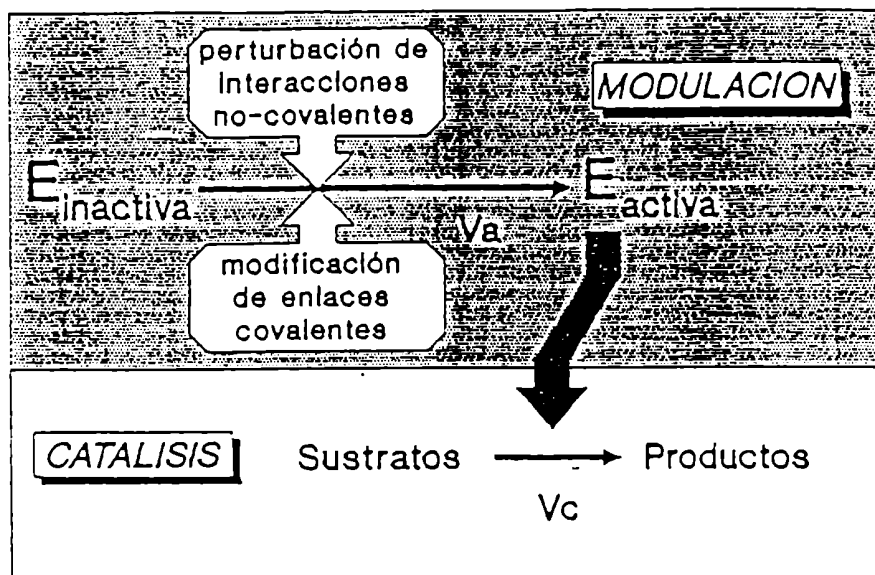


Figura 4. Composición de la actividad de enzimas cloroplásticas histeréticas. Ensayo de la actividad en dos etapas. En el esquema se representan las reacciones requeridas para que se forme producto cuando se analizan enzimas cloroplásticas histeréticas (E). La modificación concertada de interacciones no-covalentes y de enlaces covalentes, convierte a 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 las mismas sólo 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.

Determinados compuestos pueden modificar la distribución de las formas enzimáticas y también afectar el proceso catalítico, eg. favorecer la activación pero inhibir la catálisis. En vista del control diferencial sobre la modulación y la catálisis se definen como MODULADORES a los compuestos que cambian la tasa de activación mientras que se retienen los términos de SUSTRATOS, COFACTORES o EFECTORES para los participantes de la reacción catalítica.

Para caracterizar cuantitativamente el proceso de la modulación enzimática y la regulación de la catálisis se han definido las constantes cinéticas:

- $A_{0.5}$: representa la concentración del modulador a la cual se obtiene la mitad de la máxima actividad específica;

- $S_{0.5}$: indica la concentración de sustrato, cofactor o efector con la que se alcanza la mitad de la máxima velocidad de catálisis.

- $I_{0.5}$: indica la concentración de sustrato, cofactor o efector que inhibe la mitad de la máxima velocidad de catálisis.

Por otra parte la acción concertada de dos metabolitos sobre la fase de modulación se manifiesta cuando la activación por un modulador primario puede ser potenciada por concentraciones no estimuladoras de un modulador secundario. Esto se traduce en la disminución del $A_{0.5}$ del modulador primario por efecto del secundario. Este proceso se denominó histéresis concertada.

MODULACION DE LA ACTIVIDAD

En el CBC la modulación de enzimas se lleva a cabo mediante modificaciones covalentes y el control de iones y metabolitos sobre las interacciones no covalentes.

MODULACION DE LAS ENZIMAS CLOROPLASTICAS POR MODIFICACION DE INTERACCIONES NO COVALENTES.

Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa

Esta enzima cloroplástica, constituida por dos subunidades de 36 kDa y 39 kDa respectivamente (Ferri et al., 1990), presenta en las hojas de espinaca varias formas con distinta especificidad por los piridín-nucleótidos. Una forma de 600 kDa es activa solamente en presencia de NAD pero la incubación con ATP, Pi o NADPH disocia a una forma de 160 kDa que utiliza tanto NAD como NADP (Pupillo and Giuliani-Piccari, 1975). En este contexto el incremento de la actividad asociada a NADP también está mediado por concentraciones no estimuladoras de Pi, NADPH o FBP que disminuyen el $A_{0.5}$ por el modulador primario ATP (o Pi). Ello sugiere que los cambios producidos por luz en la concentración cloroplástica de estos metabolitos modularían in vivo la actividad de la enzima (Wolosiuk and Buchanann, 1976b).

Fructosa-1,6-bisfosfatasa

La actividad de esta enzima es potenciada por el pH alcalino y concentraciones de Mg^{2+} superiores a 10 mM (Preiss, Biggs and Greenberg, 1967). Aparentemente el Mg^{2+} y el FBP, cofactor y sustrato durante la etapa catalítica, participan como moduladores positivos en el proceso de activación. Por otra parte el Ca^{2+} que también potencia dicho proceso, actúa como inhibidor durante la catálisis (Hertig and Wolosiuk, 1983).

MODULACION POR MODIFICACIONES COVALENTES

Modulación por el Sistema Ferredoxina-Tiorredoxina.

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

La Trx aumenta la actividad de la forma enzimática que utiliza NADP, actuando como modulador primario (Wolosiuk and Buchanan, 1978). Sin embargo, es mucho mejor modulador secundario ya que a una concentración 50 veces menor disminuye el $A_{0.5}$ para ATP, Pi y NADPH o glicerato 1,3-bisfosfato (1,3-DPG) (Wolosiuk, Hertig and Busconi, 1986). Estos experimentos in vitro muestran que los reductores generados por la luz en acción concertada con metabolitos cloroplásticos cuya concentración también depende de ella estimulan a la enzima.

Fructosa 1,6-bisfosfatasa

Si bien la Trx-f aumenta la actividad específica de la CFBPasa su acción es potenciada por la presencia de un azúcar bisfosfato y un metal bivalente (Hertig and Wolosiuk, 1980). Esta acción concertada disminuye tanto la concentración de reductor como el tiempo requerido para la máxima actividad (Hertig and Wolosiuk, 1983), según se analizará en detalle más adelante.

Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa

Algunos aspectos cinéticos de la CSBPasa se asemejan a los de la CFBPasa. Su actividad específica aumenta por la acción concertada de Trx-f, azúcar bisfosfato y cationes bivalentes. Además, el Ca^{2+} estimula la modulación pero

inhibe la catálisis (Cadet and Meunier, 1988). A pesar de la gran similitud entre estas dos hidrolasas de la fase regenerativa, la secuencia aminoacídica de la CSBPasa revela la inesperada ausencia de la secuencia aminoacídica que en la CFBPasa sería el sitio de acción de la Trx. Tanto la CFBPasa como la CSBPasa contienen 7 cisteínas. Sin embargo, ninguno de estos residuos coinciden cuando se enfrentan las secuencias primarias de ambas enzimas. Este hecho indicaría que no existe un mecanismo común de reducción. En cambio, 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 CFBPasa como con la CSBPasa de trigo (Raines et. al, 1992). Este último hecho sugiere que estas enzimas comparten sitios activos similares. De hecho, la CFBPasa puede utilizar como sustrato a la SBP.

Fosforibuloquinasa.

La máxima activación de esta enzima requiere solamente la reducción por la Trx del puente disulfuro entre las cisteína 16 y 55. A diferencia de las otras enzimas descritas, otros metabolitos propios del cloroplasto no modifican la activación de PRK por la Trx (Porter, Stringer and Hartman, 1988).

Bases estructurales para la modulación por el Sistema Ferredoxina-Trx

Como se ha descrito, la Trx reducida actúa en forma concertada con moduladores específicos en la activación de la GA3PDH, CFBPasa y CSBPasa, en tanto que es el único requerimiento en la activación de la PRK. Sorprendentemente estas enzimas no comparten una secuencia regulatoria en común. En la PRK la secuencia es parte del sitio activo en tanto que es funcional en el proceso catalítico de la

CFBPasa, CSBPasa y GA3PDH (Porter, Stringer and Hartman, 1988). Esta evidencia estructural, junto con los estudios cinéticos, sugiere la existencia de diferentes mecanismos regulatorios para cada una de las enzimas cloroplásticas, tanto respecto del efecto de los moduladores como de la modificación de los puentes disulfuro.

Modulación de la actividad Rubisco

Tal como las otras enzimas del CBC activables por el Sistema Ferredoxina-Trx, la Rubisco se aísla generalmente en un estado catalíticamente incompetente cuya activación In vitro requiere la modificación covalente mediada por CO_2 y Mg^{2+} (Gutteridge, 1990). In vivo este proceso no parece funcional porque la RuBP se une fuertemente a la enzima previniendo la carbamilación de la Lisina 201, necesaria para la activación (Jordan and Chollet, 1983). Una nueva proteína, Rubisco-Activasa, interacciona con el complejo Rubisco-RuBP y facilita el acceso del CO_2 y el Mg^{2+} para la carbamilación (Portis, 1990); concurrentemente el ATP es hidrolizado. La Rubisco-Activasa, constituida por dos polipéptidos de 41 y 45 kDa, convierte el carácter inhibitorio de la RuBP en modulador positivo (revisado en Wolosiuk et al. 1993).

MODULACION DE LAS ENZIMAS CLOROPLASTICAS POR FACTORES NO FISIOLOGICOS.

La Trx funciona en la regulación de las enzimas cloroplásticas como proteína disulfuro reductasa. Si su rol se restringiera a la reducción de enlaces disulfuro, su reemplazo requeriría el uso de un factor funcional en la transferencia de hidrógenos a las enzimas sustrato. Sin embargo, solventes orgánicos miscibles en agua

(cosolventes), iones de baja densidad electrónica (caotrópicos) o alta presión, reemplazan a la Trx aumentando la actividad específica de la CFBPasa, PRK, y GA3PDH (Stein, Lázaro and Wolosiuk, 1989; Corley and Wolosiuk, 1985; Wolosiuk et al., 1985; Stein and Wolosiuk, 1987; Wolosiuk and Stein, 1990; Prat-Gay et al., 1991). Estos perturbantes proteicos no estimulan a otras enzimas regulatorias de los cloroplastos (Rubisco), ni a las provenientes de organismos heterotróficos (GA3PDH de levaduras, FBPasa de conejo) e inhiben la etapa catalítica. En este aspecto dos perturbantes químicos (cosolventes y aniones caotrópicos) y un factor físico (alta presión), "imitan" a un factor fisiológico (la Trx), en la activación enzimática.

Dado que estos agentes modifican las interacciones hidrofóbicas inter e intramoleculares, el reemplazo de la Trx por los mismos sugiere que el proceso redox sería complementado con la modificación de las interacciones no covalentes. Congruente con esta idea la especificidad de la Trx en la activación de la CFBPasa es modificada tanto por moduladores que no alteran enlaces covalentes como por mutagénesis de la Trx en aminoácidos alejados del centro redox (Schurmann, Roux and Salvi, 1985; Lamotte-Guery et al., 1991).

FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA

En las células foliares existen dos isoformas de la fructosa-1,6-bisfosfatasa que catalizan la hidrólisis del FBP a fructosa 6-fosfato y fosfato inorgánico, con propiedades regulatorias diferentes. Una de ellas es citoplasmática y participa en la regulación de la gluconeogénesis y la biosíntesis de sacarosa (Cséke and Buchanan, 1986). Sus características estructurales y cinéticas son similares a las FBPasas gluconeogénicas de mamíferos y levaduras, ya que: 1) es inhibida por el exceso de sustrato, el AMP y la fructosa 2,6-bisfosfato; 2) es

modulada por Mg^{2+} y Ca^{2+} (Zimmerman, Kelly and Latzko, 1978; Prado, Lázaro and López Gorgé, 1991). La otra isoforma es la CFBPasa (homotetramero, subunidad:ca. 40 kDa) que participa en la regeneración de la RuBP en el CBC y es activable por luz.

ASPECTOS REGULATORIOS DE LA CFBPasa

ACTIVACION

La luz desempeña un rol fundamental en la regulación de la CFBPasa. Cuando los cloroplastos son iluminados aumenta el pH y la concentración de Mg^{2+} del estroma. Dado que la enzima es catalíticamente activa en soluciones alcalinas y a altas concentraciones de Mg^{2+} fue sugerido que los mismos constituyen un mecanismo regulatorio in vivo (Preiss, Biggs and Greenberg, 1967). Por otra parte, el ensayo en dos etapas indica que el FBP y el Mg^{2+} no sólo son sustrato y cofactor respectivamente, sino que también participan como moduladores en su activación (Hertig and Wolosiuk, 1983; Ballicora, Tesis Doctoral). Si bien es difícil una separación clara de las fases de activación y de catálisis cuando se utilizan FBP y Mg^{2+} , por la hidrólisis concomitante del sustrato, otros azúcares bisfosfato y otros metales bivalentes son adecuados para ello. La fructosa 2,6-bisfosfato y el Ca^{2+} estimulan la activación pero impiden la actividad catalítica de la enzima totalmente activada (Soulié et al., 1991). De hecho el Ca^{2+} es requerido para el proceso de activación pero no para la estabilización de la forma activa (Hertig and Wolosiuk, 1983).

In vivo aparece un tercer factor involucrado en la activación de la CFBPasa mediada por luz: la reducción de grupos -S-S- de la enzima por el Sistema Ferredoxina-Trx. El aumento de la actividad enzimática correlaciona con la reducción de un enlace disulfuro en cada subunidad de CFBPasa (Stein, Lázaro and Wolosiuk, 1989). 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 en tanto que la Trx-f disminuye el $A_{0.5}$ del FBP pero no cambia el $A_{0.5}$ del Ca^{2+} (Hertig and Wolosiuk, 1983).

Por otra parte, el reductor DTT estimula lentamente la actividad catalítica de la CFBPasa, en tanto que el FBP, el Ca^{2+} y moduladores no-fisiológicos aceleran este proceso. Experimentos realizados en el laboratorio indicaron que modificaciones conformacionales inducidas en la enzima con NaTCA, previamente a la activación reductiva con DTT, condicionan y aceleran dicha modulación. De hecho, a 2.5 mM DTT el tiempo medio de activación fue de 8 minutos en presencia de FBP, Ca^{2+} y NaTCA y de 2 horas en ausencia del agente caotrópico (Ballicora and Wolosiuk, 1994). La velocidad de activación mediada por la reducción de puentes -S-S- incrementa notoriamente por los cambios conformacionales de la enzima nativa. El enlace disulfuro no es reducido si la conformación de la enzima oxidada no es modificada por moduladores y perturbantes protéicos. Un postulado básico en la modulación por luz de la CFBPasa señala que la reducción de enlaces disulfuros por el Sistema ferredoxina-Trx genera la forma enzimática catalíticamente competente. Si los cambios conformacionales de la CFBPasa contribuyen a acelerar el proceso reductivo, es fácil inferir que la Trx-f cloroplástica acelera la reacción que convierte a la enzima nativa en su forma activa modificando las interacciones intramoleculares no-covalentes. Respecto a esto cabe remarcar que la Trx-f activa preferencialmente a la CFBPasa nativa (E0) (reacción 5, fig. 5) en tanto que la Trx-m y Trxs bacterianas son mucho menos efectivas. Sin embargo estas Trxs no funcionales son indistinguibles de la Trx-f en la estimulación de la actividad catalítica cuando

la estructura terciaria de la enzima es modificada por perturbantes protéicos. La acción concertada del FBP y el Ca^{2+} llevan a la aparición reversible de una nueva forma enzimática (E1) (reacción 1, fig. 5) cuya actividad es potenciada más eficientemente por Trxs bacterianas. En este punto el NaTCA o el 2-propanol llevan a la enzima a otra forma productiva (E2) (reacción 2, fig. 5) cuya activación por Trxs bacterianas es indistinguible de la activación por Trx-f (reacción 3, fig. 5). Asimismo la Trx-m es un modulador funcional sobre la CFBPasa en presencia de FBP y Ca^{2+} (reacción 4, Fig. 5) (Mora García, Ballicora and Wolosiuk, 1996; Schurmann, Roux and Salvi, 1985). Estos resultados sugieren fuertemente que la conformación de la enzima sustrato regula la interconversión tiol/disulfuro por las proteínas disulfuro reductasas con lo que los metabolitos que interactúan no covalentemente con la enzima alteran la especificidad de la Trx.

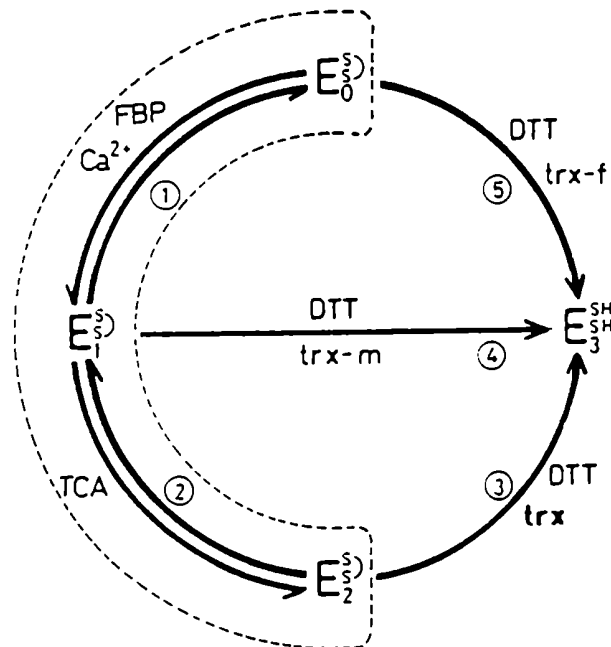


Figura 5. Efecto de los moduladores sobre la Fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos. E: Fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos; DTT: ditionitrotol; FBP: fructosa 1,6-bisfosfato; TCA: tricloroacetato; Trx-m: Tiorredoxina m cloroplástica; Trx-f: Tiorredoxina f cloroplástica; Trx: Tiorredoxinas.

Además de los procesos de activación descritos, dentro del cloroplasto coexisten los mecanismos de desactivación e inhibición de la modulación que contribuyen a una afinada regulación de la actividad fotosintética. En los cloroplastos existe un equilibrio entre las formas oxidada y reducida de las enzimas regulatorias, modulado por la relación entre el reductor (Fd) y el oxidante (O_2). En presencia de luz, la alta concentración de Trx reducida favorece la forma activa de las enzimas del CBC, incluida la CFBPasa (figura 6). En ausencia de luz la formación de Fd reducida disminuye y las enzimas del ciclo retornan a su estado inactivo oxidado (Scheibe, 1990).

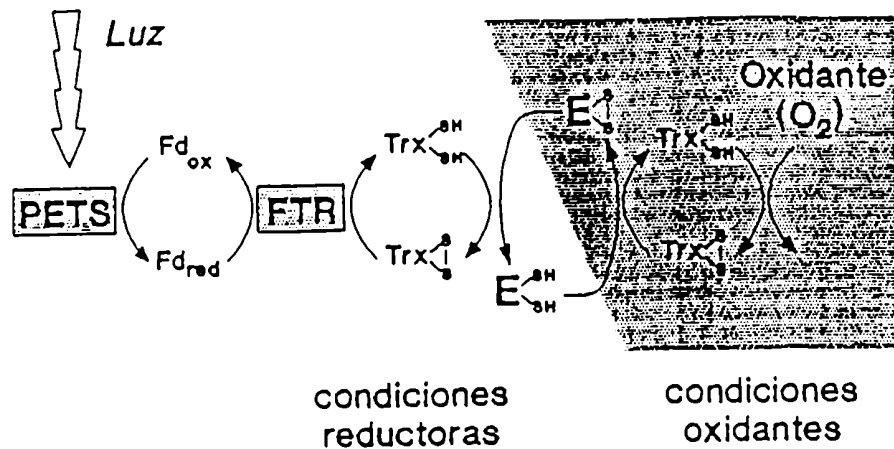


Figura 6. Efecto del estado metabólico sobre la actividad de enzimas regulatorias del Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato. El modelo ilustra el rol de la Tiorredoxina (Trx) en el control de la actividad de las enzimas (E). La excitación por luz del Sistema de Transporte Fotosintético de electrones (PETS) reduce a la Ferredoxina, la cual a través de la Ferredoxina Tiorredoxina reductasa (FTR) convierte a la Trx a su estado reducido. Por otro lado, oxidantes como el O₂, 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.

Son varios los metabolitos que influyen sobre las velocidades de oxidación y reducción de las enzimas regulatorias del CBC, probablemente alterando los potenciales redox de los sulfidrilos regulatorios, de modo tal que la relación de enzima reducida a oxidada se ajusta efectivamente a los cambios de metabolitos específicos (Scheibe, 1990, 1991). Un ejemplo es el efecto positivo de los niveles de FBP sobre la activación de la CFBPasa. En la figura 7 se resume el efecto de varios factores sobre la actividad de la CFBPasa. La acción de los diferentes

moduladores en los procesos de activación y desactivación determinan la concentración de CFBPasa activa que participa en el ciclo. Por otro lado, los efectores modifican la velocidad de hidrólisis controlando la formación del complejo catalíticamente competente entre la enzima, el FBP y el metal.

Aparentemente la regulación de la CFBPasa mediada por el Sistema Ferredoxina-Trx está relacionada con el proceso de activación/desactivación, sin participar directamente en la reacción hidrolítica (Wolosiuk, Ballicora and Hagelin, 1993). Los mecanismos de activación tanto in vivo (el Sistema Ferredoxina-Trx) como in vitro (DTT), involucran la reducción de puentes disulfuro críticos en la enzima. Las CFBPasas cloroplásticas conocidas (Marcus and Harrsch, 1990; Koßmann et al., 1992; Rodríguez Suárez and Wolosiuk, 1993; Carrasco et al., 1994; Raines et al., 1988) presentan, en medio de la cadena polipeptídica y separados del centro activo, una secuencia aminoacídica altamente hidrofóbica de 12 residuos [-R-C-(I/V)-V-N-V-C-Q-]. Esta secuencia está conservada solamente en las enzimas sensibles a Trx y ausente en la contraparte heterotrófica, incluyendo la enzima citoplasmática de las células fotosintéticas (Marcus, Moberly and Latshaw, 1988; Marcus and Harrsch, 1990; Ladrór, Latshaw and Marcus, 1990). Marcus y col (Marcus et al., 1988) y Raines y col. (Raines et al., 1988) propusieron que el puente -S-S- esencial para la regulación por luz está contenido en esta inserción. En todas las CFBPasas el inserto contiene dos cisteínas (172 y 177 según la numeración de la enzima de trigo madura) separadas por 4 residuos, una característica de otras enzimas que contienen cisteínas con actividad redox (Issakidis et al., 1994; Raines et al., 1992).

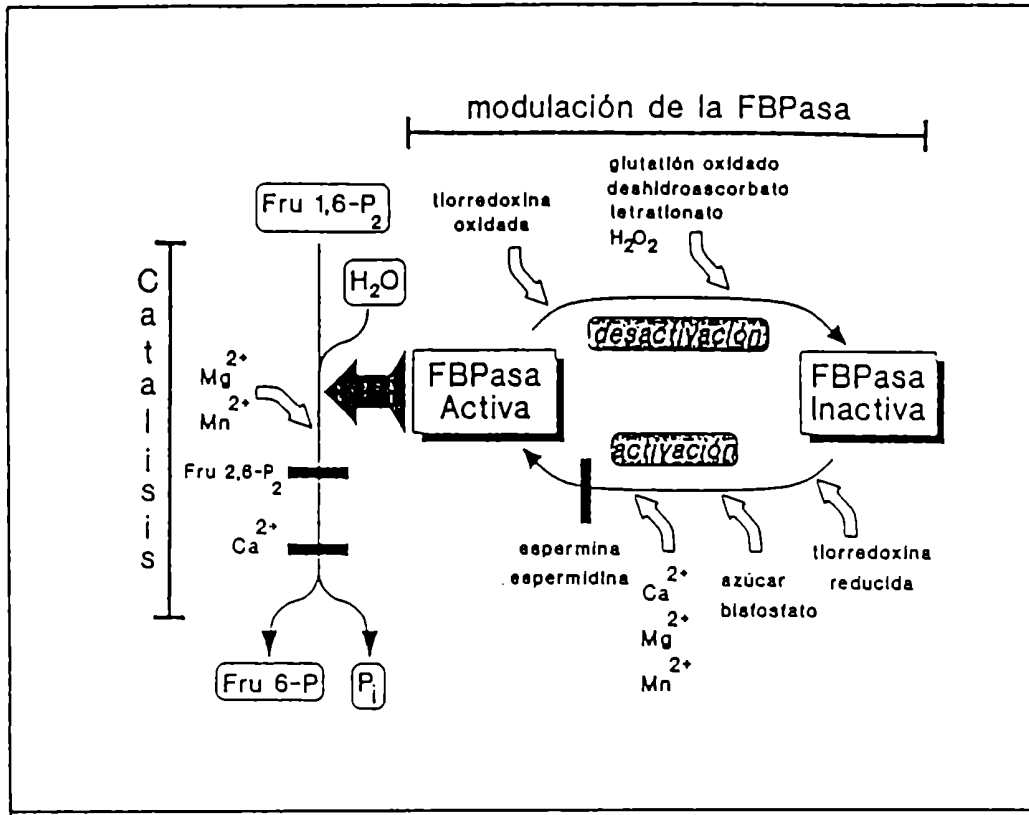


Figura 7. Actividad Fructosa-1,6-bisfosfatasa. Representación esquemática de la modulación y la catálisis de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos (CFBPasa). La conversión de una forma inactiva a otra activa está mediada por la acción concertada de la Trx reducida, un azúcar bifosfato y un 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 CFBPasa cataliza la transformación de FBP (fru 1,6-P₂) a fructosa 6-fosfato (fru 6-P) y ortofosfato (P_i). El paso hidrolítico es inhibido por fructosa 2,6-bisfosfato (fru 2,6-P₂) o Ca²⁺. La forma activa de la CFBPasa vuelve al estado inactivo por la acción de Trx oxidada u oxidantes de bajo peso molecular (glutatlón oxidado, dehidroascorbato, tetratlonato, H₂O₂).

Los experimentos de Jacquot y col. (Jacquot et al., 1995) mostraron que el cambio por serinas de las cisteínas 173 y 178 localizadas en la secuencia putativa de regulación por luz, en la CFBPasa de cloroplastos de arveja, rinde una enzima incapaz de ser activada tanto por Trx reducida por DTT como por luz, mediante el sistema reconstituido de FTS. Estos resultados confirman el rol regulatorio de la secuencia extra característica de las enzimas

cloroplásticas. Experimentos realizados en nuestro laboratorio indican que la cisteína C223 (según la numeración de la preproteína de trigo) (C172 en la enzima madura) estaría directamente involucrada en esta regulación reductiva (Rodríguez Suárez, datos no publicados).

ASPECTOS ESTRUCTURALES DE LA CFBPasa

La estructura primaria de la CFBPasa de los cloroplastos de espinaca presenta una identidad del 40% con las CFBPasas gluconeogénicas de levadura, *E.coli* y mamíferos (Marcus and Harrsch, 1990) y del 52% con su contraparte citosólica (Fonollá et al., 1994). Las enzimas cloroplásticas de trigo y arveja exhiben un 50% de identidad con la enzima citosólica de espinaca (Ladror et al., 1990). Las enzimas cloroplásticas (arveja, papa, trigo, espinaca, colza y *Arabidopsis*) (Carrasco, et al., 1994; Koßmann et al., 1992; Raines et al., 1988; Marcus and Harrsch, 1990; Rodríguez Suárez and Wolosiuk, 1993; Horsnell and Raines, 1991 respectivamente), tienen una identidad cercana al 85%. Estos valores indicarían una clara divergencia entre las enzimas fotosintéticas y las gluconeogénicas apoyando la teoría del origen endosimbionte del cloroplasto (Fonollá et al., 1994) (figura 8). Congruente con ello Fonollá et al. no detectaron reacción cruzada entre los anticuerpos policlonales de las enzimas citosólicas y cloroplásticas de arveja y espinaca, pero las enzimas cloroplásticas eran antígenicamente similares, así como también las citoplasmáticas.

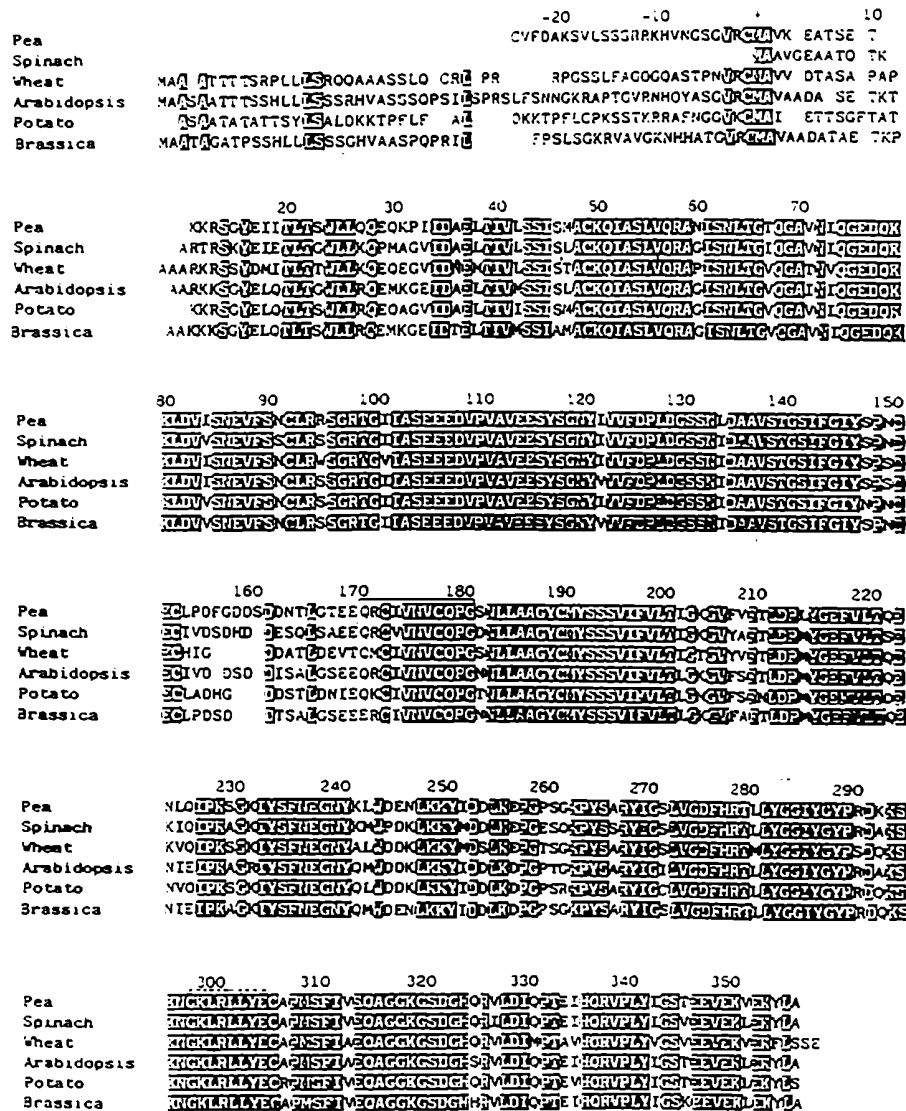


Figura 8. Alineamiento de las seis secuencias aminoacídicas conocidas de las FBPasas. Los residuos idénticos se muestran sobre fondo negro. Las sustituciones conservativas se muestran en letras negras de trazo grueso. La secuencia entre corchetes muestra la zona involucrada en la regulación por luz, en tanto que la línea punteada indica el sitio activo. La flecha señala el probable sitio de corte en la subunidad de CFBPasa.

Estructura del sitio activo de la CFBPasa

El sitio activo de la CFBPasa fue definido por difracción de rayos x en el cristal de los complejos entre la enzima de riñón de cerdo, el sustrato (o análogos) y el ion metálico (Zhang et al., 1993). Este "dominio FBP" se divide en tres regiones: (a) de unión a 6-fosfato, (b) de unión al anillo furanosa y (c) de unión al metal. La mayoría de los residuos que forman este sitio activo en la enzima de cerdo están conservados en las enzimas cloroplásticas de espinaca (aminoácidos 299 a 307), trigo (aminoácidos 311-319) y arveja (amonoácidos 298 a 305) (figura 8) (Marcus, 1990; Raines, 1988; Carrasco, 1994).

Cisteínas.

En las CFBPasas cloroplásticas, además de las cisteínas 223 y 228 (numeración correspondiente a la preproteína de trigo) ya descritas, se encuentran conservadas otras cinco cisteínas (26, 50, 147, 208 y 240 según la numeración de la preproteína de trigo) (Villeret et al., 1995). La cisteína 208 junto con las 223 y 228 se encuentran dentro de la inserción de 12 aminoácidos en una zona de estructura secundaria desorganizada (170'S loop, residuos 150-180 en las proteínas maduras) (figura 9). Este fragmento extra de las enzimas cloroplásticas, que se inserta entre las leu-153 y gln-154 de la enzima de cerdo, podría acomodarse en esta estructura. En el modelo de cerdo dicha zona está expuesta al solvente y no se encuentra involucrada en la interacción entre subunidades (Marcus and Harrsch, 1990).

	β4	LOOP	β5
Pig kidney 132	IGTIFGIYRKNST	----DEPSEKDAL	-----QPGRNLVAAGYALY 167
Sheep liver	IGTIFGIYKKISK	----DDPSEKDAL	-----QPGRNLVAAGYALY
Rat liver	IGTIFGIYRK TSA	----NEPSEKDAL	-----QPGRNLVAAGYALY
<i>S. cerevisiae</i>	VGTIASIFRLLPD	----SSGTINDVL	-----RCGKEMVAACYAMY
<i>S. pombe</i>	VGTIFGIYKLRPG	----SQGDISDVL	-----RPGKEMVAAGYTM
<i>E. coli</i>	VGTIFSIYRRVT	---PVGTPVTEEDFL	-----QPGNKQVAAGYVVY
R sph. I	VGTTFAI WPA	-----APRPNSFL	-----RLGSELIAGYVIY
R sph. II	IGTIFSIFPA	-----AAGPEASFL	-----RPGTEQIAGGYIY
Pea 140	TGSIFGIYSPNDE	CLPDFGDDSDNTLGTEEQ	RCIVNVCPGNSLLAAGYCMY 192
Spinach	TGSIFGIYSPNDE	QIVD-SDHDESQLSAEEQ	RCIVNVCPGDNLLAAGYCMY
Wheat	TGSIFGIYSPSDE	C----HIGDDATLDEVTO	MCIVNVCPGNSLLAAGYCMY
<i>Arabidopsis</i>	TGSIFGIYSPSDE	CIVD--DSDDISALGSEEQ	RCIVNVCPGNNLLAAGYCMY
Potato	TGSIFGIYNPNDE	CLAD--HGDD-STLDNIEQ	KCIVNVCPGTNLLAAGYCMY
<i>Brassica napus</i>	TGSIFGIYSPNDE	CLPD---SDDTSALGSEEER	RCIVNVCPGNNLLAAGYCMY

Figura 9. Comparación de secuencias aminoácidas de las Fructosas-1,6-bisfosfatasa citoplasmáticas y cloroplásticas. La secuencia corresponde a la región que flanquea a los sitios de inserción de las proteínas cloroplásticas. La numeración de los aminoácidos corresponde a la de la enzima madura: C157 (C208), C172 (C223), C177 (C228), C189 (C240) (los números entre paréntesis corresponden a la numeración en la preproteína)

SEGUNDA PARTE

CUERPOS DE INCLUSION

El éxito de la biotecnología moderna tiene sus raíces en los avances de la biología molecular que permite expresar genes "foráneos" o heterólogos en un organismo huésped. Sin embargo la transcripción y traducción de un gen recombinante no siempre genera una proteína soluble, correctamente plegada y por lo tanto biológicamente activa. Una barrera importante en la explotación de la tecnología del ADN recombinante en la producción de proteínas es su tendencia a formar agregados inactivos insolubles llamados Cuerpos de Inclusión (IB). En el interior de la célula estos IB aparecen en las microscopías electrónicas como cuerpos densos de morfología definida y carentes de membranas. Se han observado tanto en células procarióticas como eucarióticas y son muy comunes en bacterias que expresan proteínas de mamíferos (Mitraki and King, 1989; Marston, 1986).

En el organismo de origen las proteínas se expresan a bajos niveles y en tipos celulares especializados. En cambio, para las proteínas recombinantes el ambiente de la célula huésped es muy diferente. Las propiedades químicas (potencial redox, pH intracelular, disponibilidad de agua) y las enzimas que catalizan las modificaciones postraduccionales, guardan muy poca relación con las de la célula original. Además, en la mayoría de los casos, las proteínas recombinantes se preparan especialmente para ser expresadas a niveles muy superiores a los fisiológicos. Esta enorme tasa de acumulación lleva a la célula a modificar su metabolismo respondiendo con un estado de "estrés" generalizado. Por ello los altos niveles de expresión de proteínas homólogas llevan en algunos casos a la formación de IB (Bowden, Paredes and Georgiou, 1991). Este problema se asocia generalmente a proteínas que maduran en el citoplasma

y no con aquellas que son exportadas fuera de la célula (Marston, 1986).

ESTRUCTURA DE LOS CUERPOS DE INCLUSION

Los IB son estructuras intracelulares densas desprovistas de membranas, cuyo diámetro oscila entre 0.2 y 1.5 micrones. Generalmente se forma uno por célula, fácilmente visible al microscopio, llegando bajo algunas condiciones a "deformar" el aspecto de la célula. Dependiendo de la localización subcelular, los IB muestran dramáticas diferencias morfológicas que reflejan las restricciones espaciales en el citoplasma y el espacio periplásmico (Bowden et al., 1991). Tienden a ser monocomponentes extremadamente compactos que presentan características comparables a los cristales de proteína (Thatcher and Hitchcock, 1994).

MECANISMO DE FORMACION DE LOS CUERPOS DE INCLUSION

La proteína sobreexpresada es el constituyente predominante en los IB. Aunque esta característica es una ventaja que permite obtenerla con un alto grado de pureza después de la ruptura celular y la centrifugación diferencial, otros componentes celulares se encuentran asociados a los IB. Se han extraído cantidades importantes de ácidos nucleicos en forma de círculos cerrados rotos de ADN plasmídico y moléculas de ARN ribosomal de 16S y de 23S. El análisis por SDS-PAGE de las proteínas extraídas mostró la presencia de las 4 subunidades de la ARN polimerasa (α, σ, β y β'), los componentes de la membrana externa (OmpC, OmpF y OmpA) (Hartley and Kane, 1988) y proteínas codificadas por el plásmido (proteínas de resistencia a antibióticos). De modo que la transcripción de los plásmidos, la traducción de los ARN mensajeros y la

inmediata agregación de la proteína recién sintetizada, ocurrirían en próxima continuidad. En esta estructura supramolecular la proporción de la proteína recombinante respecto a la total del IB aumenta proporcionalmente con el tiempo de fermentación a causa de la elevada expresión diferencial del gen heterólogo.

La conformación de las proteínas dentro de los IB varía desde estados prácticamente nativos (Tokatlidis et al., 1991), hasta estados completamente desnaturalizados con escasa o nula actividad biológica. En la mayoría de los casos, los IB se forman a partir de los intermediarios de plegamiento en el camino del "folding" de las proteínas y no a partir de los estados nativos o totalmente desplegados de las mismas (Mitraki and King, 1989). Las fuertes condiciones desnaturalizantes necesarias para solubilizar los IB (Marston, 1986) sugieren que las interacciones intercatenarias que determinan las estructuras agregadas no semejan a las implicadas en las proteínas precipitadas por "salting-out".

A pesar de la importancia de la agregación de proteínas en la producción y purificación de polipéptidos biológicamente activos, no existe, hasta el presente, ninguna relación simple y unívoca entre los IB y los factores físico-químicos que llevan a su formación. Estudiando el "folding" y la solubilidad de las proteínas Wilkinson y Harrison (Willkinson and Harrison, 1991) analizaron los parámetros estructurales de 81 proteínas diferentes expresadas en *E. coli*. Encontraron que la carga neta promedio del polipéptido y el número de residuos "formadores de vueltas" (asparagina, prolina, glicina y serina) correlacionan positivamente con la formación de IB. En particular la conversión del enlace X-Pro, de trans a cis y viceversa, sería el paso limitante (Hockney, 1994). A su vez, también correlacionan con dicho fenómeno el número de cisteínas, el tamaño y la hidrofobicidad de la proteína. La

fracción de cisteínas en una proteína de mamíferos expresada en E. coli estima una medida de la dificultad que tendrá este polipéptido para asumir su conformación final adecuada, ya que el citoplasma bacteriano es un ambiente reductor incapaz de formar puentes disulfuro. Sin embargo, bajo diferentes condiciones de fermentación, la misma proteína recombinante puede asociarse a la fracción celular soluble o formar cuerpos de inclusión. De manera que una combinación de factores relacionados con el estado fisiológico de la célula huésped y las propias características físicas de la proteína determinan la formación de los IB.

INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO. ORIGEN DE LOS CUERPOS DE INCLUSION.

La conformación nativa funcional de una proteína queda determinada por su estructura primaria; i.e la cadena polipeptídica no requiere factores extrínsecos ni aportes energéticos para alcanzar su conformación. Este principio, elaborado por Anson (1945) y Anfinsen (Anfinsen, 1973) ha sido confirmado con la reconstitución in vitro de proteínas pequeñas monoméricas y de proteínas grandes oligoméricas partiendo de sus cadenas polipeptídicas totalmente desplegadas (Halenbeck et al., 1989; Vanhove et al., 1995; Sackett et al., 1993; Mitraki et al., 1987; Zettlmeissi et al., 1979).

En el caso de proteínas pequeñas monoméricas se estableció que el plegamiento correcto in vitro ocurre mediante un número definido de estados conformacionales intermediarios. Parte de la estructura secundaria se forma rápidamente durante el "refolding" generando algunos contactos específicos de la estructura terciaria. El nivel de estructura secundaria que conserva la proteína desnaturalizada influye sobre la eficiencia de dicho proceso (Puri and Cardamone, 1992). Los pasos siguientes involucran la reorganización de los contactos terciarios en un proceso

lento limitado por el reordenamiento de los puentes disulfuro (Freedman, 1995) y/o la isomerización de las uniones x-prolina (Kiefhaber et al., 1991). Por otra parte, la reconstitución de las proteínas de mayor tamaño está limitada por el acomodamiento de los distintos dominios y en el caso de proteínas oligoméricas, por la asociación lenta de las subunidades.

In vitro, las interacciones improductivas de los intermediarios de folding generarían la formación de los agregados inactivos, fenómeno que aumenta con el aumento de la concentración de cadenas polipepticas desnaturalizadas (zettlmeissl et al., 1979). En forma similar a lo que ocurre in vitro, se puede inferir que in vivo la agregación de las proteínas recombinantes sobreexpresadas compite con la asociación y el "folding" correcto: la reacción de agregación, cuya cinética es de segundo o mayor orden, compite con las reacciones de primer orden del proceso de "folding". Por lo tanto, al aumentar la concentración de polipéptido desnaturalizado, la velocidad de la reacción de "folding" se mantiene constante, mientras que la velocidad de agregación aumenta. En consecuencia el fenómeno de agregación predomina a altas concentraciones de la proteína desnaturalizada (Kiefhaber et al., 1991). Sobre esta base la alta concentración de polipéptidos nacientes desplegados favorece esta agregación y con ello la formación de IB. Bajo extrema sobreexpresión, las proteínas con una cinética de plegamiento rápida, generarían predominantemente la forma nativa, mientras que aquellas con velocidades significativamente menores formarían cuerpos de inclusión. El grado de agregación estaría determinado por el nivel de expresión y las velocidades de "folding" y agregación. A altos niveles de expresión, la cinética de segundo orden de la agregación predominaría sobre la cinética de primer orden del "folding". De esta manera los polipéptidos desplegados

que no tuvieran tiempo suficiente para plegarse correctamente formarían precipitados inactivos.

Según este modelo los precursores de la agregación serían los intermediarios parcialmente plegados que incrementarían durante el "refolding". In vivo la asociación entre los intermediarios, que involucra interacciones incorrectas entre estas especies y no la agregación de la proteína nativa, sería el origen de los IB.

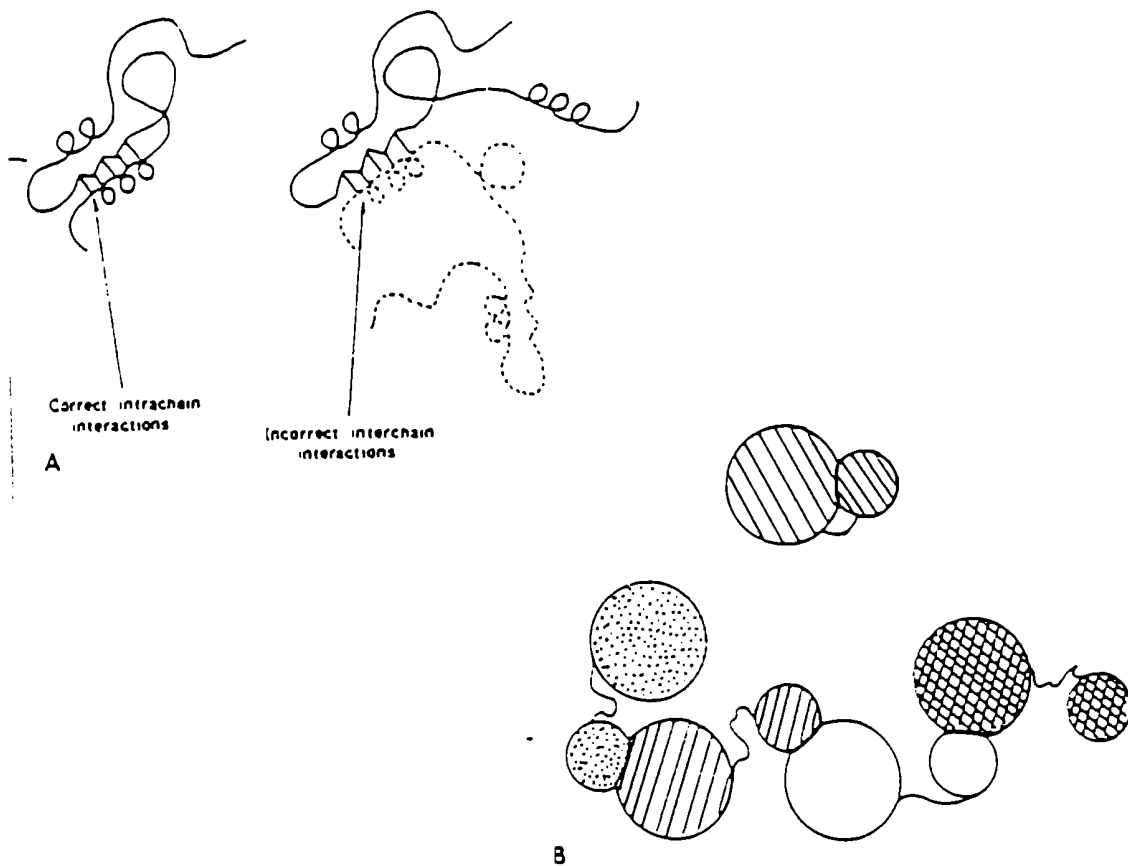


Figura 10. Posibles mecanismos de agregación. (A) La forma nativa resulta de la interacción intracatenaria correcta entre los segmentos de estructura secundaria. Las interacciones intracatenarias incorrectas entre intermediarios parcialmente plegados (uno en línea continua y el otro en línea punteada) llevan a la formación de agregados. (B) La forma nativa resulta del acoplamiento intramoleculare correcto de los dominios de la molécula. La interacción entre los dominios es más débil en los intermediarios, con lo cual la agregación resulta de la interacción entre los dominios de moléculas diferentes.

Los intermediarios en la formación de IB han sido caracterizados in vivo con la endoramnosidasa del fago P22 de Salmonella, un homotrímero termoestable (Haase-Pettingell and King, 1988), resistente al SDS. En el camino normal de "folding" de esta proteína trimérica existe un intermediario monomérico termolábil parcialmente plegado. Al aumentar la temperatura estos intermediarios particionan hacia el camino de la agregación. In vitro, la presencia de un agregado dímérico, que no existe en el camino normal de "folding", sugiere que la agregación de la endoramnosidasa involucra a la asociación de los intermediarios monoméricos pero no involucra a la agregación de la especie trimérica nativa (Speed, Wang and King, 1995).

La enzima fosfoglicerato quinasa (PGK) de músculo de caballo, una proteína monomérica con dos dominios, es capaz de recuperar su actividad inicial luego de ser desnaturalizada con clorhidrato de guanidinio (HCl-Gdm). Sin embargo existe una concentración crítica del desnaturalizante (0.7 ± 0.1 M) a la cual la desnaturalización es irreversible. Además, este efecto es dependiente de la concentración de proteína. Este mínimo en el rendimiento de enzima activa por formación de agregados irrecuperables, se acentúa con el tiempo de incubación en el desnaturalizante. Cuando la recuperación de la actividad enzimática se realiza a 4°C en vez de a 23°C el fenómeno de agregación desaparece y se obtiene enzima activa (Mitraki et al., 1987). Esto sugiere que las interacciones que predominan en la formación de estos agregados serían hidrofóbicas, favorecidas a mayor temperatura. El fenómeno de agregación y generación de IB ocurriría pues a partir de asociaciones incorrectas entre los intermediarios de plegamiento parcialmente desplegados, tanto in vivo como in vitro.

OTRAS VARIABLES QUE AFECTAN LA FORMACION DE CUERPOS DE INCLUSION.

La temperatura de crecimiento bacteriano a la cual se lleva a cabo la sobreexpresión de las proteínas influye notablemente sobre la aparición de IB. Aunque la fermentación de algunas cepas a 37°C lleva a la formación de inclusiones citoplasmáticas, a temperaturas menores pueden generar proteínas solubles y activas (Schein, 1989). Este efecto de la temperatura no estaría relacionado con el estado nativo normal de la proteína ya que los agregados están ausentes cuando aumenta la temperatura de los cultivos que contienen a la proteína soluble (Strandberg and Enfors, 1991). Sobre esta base la temperatura afectaría los mecanismos de "folding" y la distribución de los intermediarios transientes. De hecho las altas temperaturas podrían aumentar las interacciones hidrofóbicas entre zonas que normalmente no se encuentran expuestas. El análisis del camino de "folding" de la endoramosidasa de P22 mencionada en secciones precedentes, indica que el estado final de la proteína no lleva necesariamente a la formación de inclusiones citoplasmáticas (Mitraki and King, 1992); a 30°C prácticamente el 100% de las cadenas polipeptídicas alcanzan el estadio nativo del trímero, en tanto a 39°C, solamente el 30% lo alcanza. Si las proteínas nativas se producen a temperaturas permisivas y se llevan luego a temperatura restrictiva in vivo, mantienen sus características -i.e son resistentes a SDS-, demostrando que su estabilidad intracelular no se ve alterada. De modo que la agregación intracelular no se origina a partir de la desnaturalización del estado nativo sino de la polimerización de algún intermediario termosensible. La existencia de mutantes incapaces de plegarse correctamente a temperaturas no permisivas pero sí a las permisivas (tsf), indica la presencia de aminoácidos alternativos que no contribuyen a

la estabilización y función de la proteína nativa pero sí a la desestabilización de los intermediarios termolábiles. In vitro estas proteínas mutantes, son tan estables como las salvajes, por lo que el intermediario de plegamiento constituiría el precursor de los IB (Mitraki and King, 1992).

Cambios en el pH intracelular parecen influir en los procesos de "folding" y la conformación de las proteínas. Experimentos de Strandberg y Enfors (1991) demostraron que para el caso de la proteína de fusión entre la proteína A de Staphylococcus aureus y la β -galactosidasa de E. coli, la disminución del pH durante el crecimiento de las bacterias recombinantes, correlaciona con el aumento en la formación de cuerpos de inclusión. Este efecto desapareció cuando el cultivo bacteriano se realizó bajo condiciones de pH controlado.

CUERPOS DE INCLUSION Y LA RESPUESTA DE ESTRES.

Las chaperonas moleculares son un conjunto de proteínas altamente conservadas y ampliamente distribuidas en la naturaleza que al prevenir la formación de interacciones no-covalentes intra e intermoleculares inapropiadas en el citoplasma estabilizan temporariamente los dominios desplegados o parcialmente desplegados de sus proteínas sustrato (Gething and Sambrook, 1992). En las células eucarióticas se han descrito 4 clases de chaperones moleculares, Hsp60, Hsp10, Hsp70 y Hsp90 que en E. coli tienen su contraparte en GroEL, su compañera GroES, DnaK y HtpG. La chaperona SecB se une a las preproteínas destinadas a ser secretadas y las mantiene en un estado competente para la traslocación (Georgopoulos, 1992).

En contraste con los chaperones moleculares, el nombre de "foldasas" se aplica a una serie de proteínas accesorias que catalizan las isomerizaciones de uniones covalentes que

limitan la velocidad de plegamiento de ciertas proteínas (Gething and Sambrook, 1992). DsbA, una enzima periplasmática involucrada en la formación de puentes disulfuro, (Freedman, 1994), su oxidoreductasa DsbB (Missiakas, Georgopoulos and Raina, 1993) y la peptidil prolil cis-trans isomerasa (PPIasa), que cataliza la isomerización naturalmente lenta de las uniones peptídicas X-pro, son las más ampliamente descritas en E.coli.

Esta batería de proteínas "ayudadoras" prevendrían las reacciones colaterales improductivas protegiendo a los intermediarios de plegamiento (chaperonas) o acelerando los pasos limitantes de las reacciones de "folding" (foldasas). Solamente cuando la producción de la proteína sobrepasa al efecto protector de las chaperonas y foldasas se hacen visibles los efectos nocivos de la agregación. En células de E. coli que llevan una mutación en el gen Hptr, se produce la agregación extensiva de varias proteínas celulares normalmente solubles. Este gen codifica a la subunidad σ^{32} de la ARN polimerasa responsable del reconocimiento de los promotores de las proteínas de shock térmico (hsps). Si bien en las mutantes el efecto es marcado a 42°C también ocurre a 30°C, lo cual demuestra que la función general de las hsps se lleva a cabo en condiciones de estrés y también normales (Gragerov et al., 1991). Esta acumulación masiva de proteínas homólogas en forma de cuerpos de inclusión demostró que la función de este gen y por lo tanto de las proteínas de estrés, resultan claves en el "folding" de las proteínas nativas de la bacteria. Se ha reportado en la literatura que la formación de inclusiones citoplasmáticas disminuye en ciertos casos si la inducción del cultivo se realiza a 42°C (Strandberg and Enfors, 1991). Las proteínas hsps impedirían la formación de cuerpos de inclusión a partir de intermediarios de plegamiento o proteínas incorrectamente plegadas.

El estrés por altas y bajas temperaturas, el shock osmótico y cambios de pH durante el cultivo inician la respuesta "Heat Shock". Cepas específicas que han sido genéticamente modificadas para producir chaperones moleculares tienen reducida propensión a formar inclusiones citoplasmáticas (Hockney, 1994; Blum et al., 1992). La co-expresión en E. coli de GroES y GroEL (GroESL) con la Rubisco de Anacystis nidulans (Goloubinoff, Gatenby and Lorimer, 1989) aumenta la proporción de la enzima soluble y ensamblada. Por el contrario mutantes defectivas en GroES o GroEL no generan la enzima activa. Los genes GroESL de Chromatium vinosum, una bacteria púrpura sulfurosa, fototrófica y anoxigénica, co-expresados en E. coli junto con los genes de Rubisco de varias bacterias fototróficas facilitaron el ensamblado de dicha enzima oligomérica (Ferreyra, Soncini and Viale, 1993).

RECUPERACION DE PROTEINAS BIOLOGICAMENTE ACTIVAS A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSION

La formación de cuerpos de inclusión genera tanto problemas como oportunidades. Al lisar las células los IB se mantienen particulados y su densidad permite sedimentarlos a baja velocidad para separarlos de los debrís celulares y de las proteínas solubles. Sobre esta base, las estrategias preparativas habituales implican la purificación seguida por el "refolding" in vitro de la proteína inactiva. Para las proteínas que son fácilmente degradadas por proteasas durante su expresión en microorganismos, la producción en forma de IB ofrece la posibilidad de estabilizarlas (Bowden et al., 1991; Marston, 1986). En otros casos las proteínas agregadas son más susceptibles de ser degradadas que las nativas solubles, ya que existen proteasas que atacan proteínas anormales y/o desplegadas (Schein, 1989; Goff and Goldberg, 1985).

El primer paso para la recuperación de las proteínas contenidas en los IB es su solubilización en un solvente que desnaturalice totalmente a la estructura protéica. El evento posterior es el "refolding" in vitro iniciado con la eliminación (dilución) del perturbante proteico. Este esquema implica definir claramente los desnaturalizantes y el "refolding".

La solubilización requiere la interrupción de uniones no covalentes: puentes de hidrógeno, interacciones iónicas e hidrofóbicas. La efectividad de un determinado solvente difiere de una proteína a otra ya que algunos desnaturalizantes modifican irreversiblemente a la proteína. Las características óptimas de un desnaturalizante radican en (i) la cinética de solubilización rápida, (ii) no interferencia con los métodos de separación de los restos celulares, (iii) la independencia de la temperatura, (iv) la inhibición de la degradación proteolítica y (v) la inercia química con los aminoácidos de las proteínas.

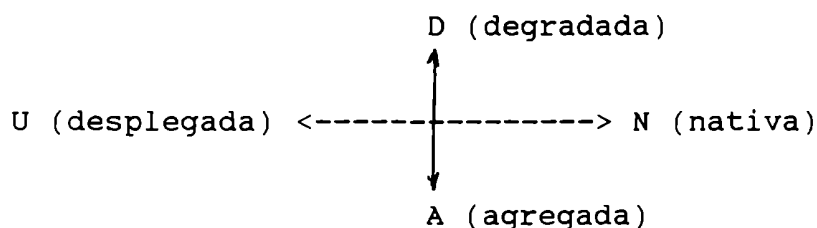
Aunque las soluciones ácidas o alcalinas y la alta presión hidrostática también poseen capacidad desnaturalizante, siendo una alternativa para disolver IB, los compuestos más comunmente usados son los agentes caotrópicos y los detergentes. El uso de estos últimos constituye uno de los métodos más económicos para solubilizar las proteínas contenidas en los IB. Una ventaja importante de los detergentes es su capacidad para disminuir la agregación proteica lo cual facilita la utilización de mayores concentraciones de proteína durante el ensayo de reactivación (Tandon and Horowitz, 1986). Por el contrario, la principal desventaja de los detergentes es su unión a las proteínas con fuerza variable que los hace difíciles de eliminar, por lo que interfieren en los pasos posteriores de purificación. Un detergente aniónico muy usado es el n-lauril sarcosina, un desnaturalizante suave que solubiliza IB selectivamente con respecto a los agregados de proteínas

correspondientes a las membranas externas de E. coli (Frankel, Sohn and Leinward, 1991). La extracción previa de los IB con detergentes remueve actividades proteolíticas asociadas, con lo que mejora la recuperación de la actividad enzimática luego del refolding (Babbit et al., 1990).

Los agentes caotrópicos más utilizados en el procesamiento de los IB son el cloruro de guanidinio (HCl-Gdm) y la urea. La concentración necesaria para la solubilización depende de las propiedades intrínsecas de la proteína y muestra efectos aditivos (Jaenicke and Rudolph, 1989; Tatcher and Hitchcock, 1994).

RENATURALIZACION. ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCION DE PROTEINAS SOLUBLES A PARTIR DE LOS IB

La renaturalización de las proteínas generalmente se realiza en soluciones muy diluídas (Jaenicke and Rudolph, 1989). Esta táctica diluye el producto final y no siempre es eficaz con proteínas oligoméricas ya que no se ensamblan eficientemente. En este último caso la concentración debe mantenerse en un umbral razonable y la agregación no puede evitarse por simple dilución. En el caso de la lactato deshidrogenasa de músculo se ha detectado un intermediario monomérico, parcialmente desplegado, que dependiendo de la concentración proteica, genera tanto el tetrámero nativo como agregados inactivos (zettlmeissl, 1979). En algunos casos, durante la reacción de renaturalización, ocurren eventos de isomerización que llevan a la precipitación de las proteínas. La producción de precipitados insolubles ocurre invariablemente, en mayor o menor grado. Asimismo la contaminación con proteasas puede llevar a la degradación de las especies parcialmente plegadas.



El principal problema en los experimentos de "unfolding/refolding" es la cinética de competencia entre el "folding" y la agregación. Los estudios sobre el mecanismo de plegamiento generalmente implican una etapa de dilución de un solvente a otro. La formación de agregados es un proceso altamente dependiente de la concentración. Algunas proteínas se mantienen a concentraciones entre 10 y 1000 $\mu\text{g/ml}$, de modo que el "refolding" después de la dilución es un proceso viable. Sin embargo, otras son escasamente solubles en su estado total o parcialmente desplegado. Sin embargo, ellas pueden ser renaturalizadas mediante diluciones en dos o más etapas en uno o varios solventes (Thatcher and Hitchcock, 1994). En otros casos se obtienen mejores rendimientos con la diálisis lenta de la proteína desnaturalizada en lugar de la dilución rápida.

El uso de cosolventes en sistemas acuosos ha demostrado un aumento en los rendimientos y la disminución de agregados durante la renaturalización. A concentraciones que van desde 3 a 30 g/l, el polietilenglicol (PEG) aumenta la tasa de renaturalización y previene la agregación de la anhidrasa carbónica bovina. El efecto observado se debe a la interacción del PEG con el primer intermediario del camino de renaturalización, evento que facilita la formación del segundo intermediario y previene su agregación (Cleland and Wang, 1990).

La renaturalización asistida por micelas de detergente ha sido reportada. En el caso de la rodanasa desnaturalizada en presencia de urea, la presencia de micelas del detergente no iónico lauril maltósido facilitan la reactivación

enzimática durante la renaturalización. Aparentemente la unión de la enzima a las micelas sería necesaria para mantenerla desnaturalizada impidiendo su agregación. Posiblemente, una estructura macromolecular como la micela estabilice ciertas zonas desplegadas de la proteína facilitando un cierto grado de renaturalización y evitando interacciones hidrofóbicas indeseadas (Horowitz and Criscimagna, 1986; Zardeneta and Horowitz, 1992).

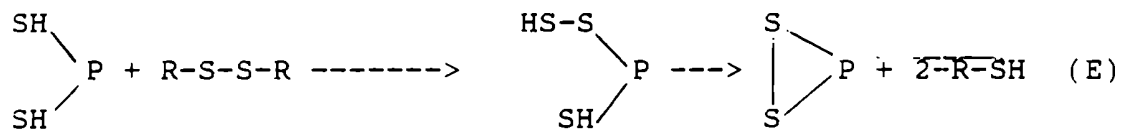
Otra estrategia utilizada en la producción de proteínas solubles radica en la modificación de sus características hidrofóbicas. Sin embargo esta metodología se ve limitada a casos donde la modificación no destruye la función biológica de la proteína blanco. Por ejemplo, la solubilidad y estabilidad de la glicoproteína mayoritaria del virus respiratorio humano (proteína G del RSV) aumenta cuando los residuos de cisteína y fenilalanina son sustituidos por serinas (Murky et al., 1995).

La presencia de compuestos específicos en el "buffer" de renaturalización incrementa el rendimiento de renaturalización de numerosas proteínas. Cofactores, sustratos, o iones específicos pueden desempeñar un rol esencial en la estabilización de la estructura proteica frente a la perturbación térmica o la acción proteolítica. Para muchas enzimas alcanzar su estado funcional depende de la presencia de un ión metálico o de otro componente no proteico. Posiblemente los ligandos afecten el "folding" como efectores o agentes "nucleadores" que influyen sobre el plegamiento, uniéndose a los intermediarios y así acelerando los pasos limitantes de la reconstitución, o estabilizando el producto final de la reacción.

FORMACION DE PUENTES DISULFURO

En ciertos protocolos la solubilización exitosa de los IB requiere junto con los desnaturalizantes del uso de tioles como el DTT o el DTE (ditioeritritol). Dado que el

citoplasma de E. coli se mantiene en un estado reductor (Missiakas, Georgopoulos and Rania, 1993) muchos polipéptidos eucarióticos son insolubles cuando se expresan en esta bacteria ya que en las células de origen son normalmente secretados conteniendo puentes disulfuros. En las células eucariótas la formación de enlaces -S-S- ocurre según un intercambio tiol/disulfuro a medida que la nueva cadena polipeptídica emerge en el lumen del retículo endoplasmático como se describe en la siguiente ecuación :



La enzima capaz de acelerar esta reacción es la Protein disulfuro isomerasa (PDI) (Freedman, 1994, 1995; Creighton, Zapún, and Darby, 1995). Los microorganismos carecen de este compartimento celular oxidante, por lo tanto tomando en cuenta el alto nivel de expresión de los polipéptidos eucarióticos en las bacterias transformadas y el número potencial de enlaces disulfuro, es poco probable que se formen correctamente dentro del citoplasma de E. coli. Por ello es factible que la exposición al aire durante la lisis conduzca a rearrreglos incorrectos. Si los enlaces disulfuros intra e intermoleculares dentro de los IB son incorrectos, su disrupción será necesaria para recuperar la función y por ello los tioles deben ser incluidos en los "buffers" de desnaturalización hasta la etapa de renaturalización. El pH durante estas etapas se transforma en un parámetro crítico ya que el intercambio tiol-disulfuro procede más rápidamente en soluciones alcalinas.

MAPEO Y CLONADO DEL GEN DE LA CFBPasa DE TRIGO.
CARACTERIZACION DE BACTERIAS RECOMBINANTES.

1) Gen de la CFBPasa

El gen de la CFBPasa (1.2 kbp) fue obtenido de un banco de genes preparado del mRNA purificado de hojas de trigo (Raines et al., 1988). Este gen, inserto en un plásmido Bluescript, fue gentilmente cedido por el Dr. Dyer a nuestro laboratorio.

2) Fusión de la CFBPasa de trigo a la GST de S. japonicum

La cepa de E. coli HB101 se transformó utilizando Cl_2Ca según el método convencional, con el plásmido Bluescript que lleva inserto al gen de CFBPasa en su sitio de restricción para EcoRI. Luego de crecer las bacterias a $37^{\circ}C$ por 16 horas, el plásmido se preparó según una modificación del método de minipreparación de Birboim y Doly (Sambrook et al., 1989). Para el mapeo del gen, el ADN plasmídico se trató con las enzimas de restricción EcoRI, XhoI y KpnI en los buffers adecuados y el resultado de las digestiones se analizó en gel de agarosa 1.6 %. El DNA utilizado como estándar de peso molecular fue el DNA del fago , digerido por EcoRI y HindIII y el del fago 174 digerido por HaeIII.

El gen se escindió del plásmido Bluescript mediante digestión con EcoRI durante 1.5 horas a $37^{\circ}C$. Luego de purificado en un gel de agarosa 0.8 % conteniendo membranas de DEAE-celulosa (Sambrook et al., 1989), el fragmento liberado se ligó al plásmido pGEX-1 mediante DNA-ligasa del fago T4, en una relación de inserto a vector de 1:1 y 2:1. Para ello el vector fue linearizado con EcoRI y tratado con fosfatasa alcalina bacteriana para eliminar los fosfatos en

los extremos 5'. Con el producto de la ligación las células competentes de E. coli DH5 α F'IQ fueron transformadas mediante electroporación y las bacterias recombinantes fueron caracterizadas por análisis de restricción y con anticuerpos policlonales contra CFBPasa de espinaca. El primero se llevó a cabo purificando los plásmidos recombinantes y cortandolos sucesivamente con EcoRI y con una combinación de BamHI y XhoI (Vf=20 μ l). El segundo se realizó replicando las bacterias sobre filtros de nitrocelulosa embebidos en IPTG 1 mM e incubandolos a 37°C durante 5 horas. Los filtros fueron tratados sucesivamente con cloroformo, DNAsaI y lisozima y finalmente con (1) el anticuerpo anti-CFBPasa de espinaca y (2) con el anti-IgG de conejo acoplado a la peroxidasa de rabanito en presencia de 4-cloronaftol.

SECUENCIACION PARCIAL DEL GEN QUE CODIFICA A LA CFBPasa FUSIONADA AL GEN DE LA GST DE S. japonicum

1) Purificación del plásmido pKH1

El plásmido pGEX conteniendo a la CFBPasa, plásmido pKH1, fue purificado a partir de la cepa de E. coli recombinante. Para ello 50 ml de un cultivo crecido a 37°C durante toda la noche en LB/ampicilina (100 μ g/ml) fue centrifugado por 10 minutos a 5000 xg. El precipitado de bacterias fue resuspendido en 2.5 ml de Tris HCl 50 mM (pH 8) conteniendo NaCl 50 mM y EDTA 20 mM e incubado a 0°C por 5 minutos. Se agregó primero 5 ml de SDS 1 % conteniendo NaOH 0.2 M y se incubó por 10 minutos, luego se añadió 3.75 ml de acetato de potasio 3 M (pH 5) y se incubó a 0°C durante 15 minutos. La muestra se centrifugó a 30000 xg por 15 minutos y se descartó el precipitado. Al sobrenadante se le agregó un volumen de 2-propanol, se mantuvo por 20 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 30000 xg por 10 minutos. Luego de lavar y disgregar el

precipitado en etanol 70 %, se centrifugó por 5 minutos a 12000 xg. El sobrenadante fue descartado y el precipitado secado fue resuspendido en 0.5 ml de buffer TE (TrisHCl 50 mM (pH 8), EDTA 10 mM). Se incubó en presencia de RNasa (1 mg/ml) durante 60 minutos, a 37°C. Se centrifugó la preparación por 3 minutos a 12000 xg y se sembró en una columna de Sepharose CL-4B (0.5x15 cm) equilibrada en buffer TE. Se recogieron alícuotas de 0.5 ml y las fracciones se analizaron en un gel de agarosa 1 %. Las fracciones conteniendo DNA fueron tratadas con acetato de sodio [0.3 M final (pH 5)], incubadas por 15 minutos en hielo y centrifugadas a 12000 xg por 5 minutos. Al sobrenadante se le agregó un vol. de 2-propanol y la suspensión se dejó a -20°C durante toda la noche. Luego de centrifugar a 12000 xg 10 minutos, el precipitado se lavó con etanol, se secó al vacío y se resuspendió en 40 µl de buffer TE.

2) Secuenciación

El extremo 5' del gen de la CFBPasa clonado en el sitio EcoRI del plásmido pGEX-1 fue secuenciado por el método de Sanger (Sanger, Niklen and Coulson, 1977). Para tal fin se utilizó como primer un oligonucléotido de 18 bases que se extendía desde la base número 609 hasta la 623 de la secuencia de la GST localizadas 63 bp hacia el extremo 5' del sitio BamHI de pGEX-1.

pGEX-Primer

609

623

5'-G.G.C.C.T.T.T.C.C.A.G.G.G.C.T-3'

La secuenciación se llevó a cabo sobre 5 µl (20 µg) de la preparación de plásmido con 70 ng de primer. Para ello al DNA, luego de diluido a 0.1 ml con agua, se le agregó 0.1 volumen de NaOH 2 M conteniendo EDTA 2 mM e incubó por 30

minutos a 37°C. Luego de añadir 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5), el DNA fue precipitado con 4 volúmenes de etanol e incubando por 15 minutos a -70°C. Luego de centrifugar el DNA a 10000 xg durante 20 minutos, el precipitado se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 7 µl de agua. Se agregó 2 µl de buffer de reacción y 1 µl del primer (70 ng). Para facilitar el apareamiento del primer con la secuencia complementaria en el plásmido, la solución se entibió a 37°C por 30 minutos y luego retornó a 0°C. A esta muestra se agregó DTT 6 mM, mezcla de "labeling" (1.5 µM dCTP, 1.5 µM dTTP, 1.5 µM dGTP), 6 µCi de [³⁵S]dATP y 3 unidades de polimerasa Sequenasa (Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit. USB, Cleveland, Ohio) (Vf=16.5 µl). Luego de incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, 4 alícuotas de 3.4 µl de la muestra fueron transferidas a los tubos de terminación conteniendo los dideoxinucleótidos (G, A, T y C) y la incubación continuó por 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con una solución de 95 % formamida, EDTA 20 mM, azul de Bromo fenol 0.05 % y Xilene cianol FF 0.05 %. Las muestras se incubaron a 75°C por 2 minutos y se sembraron en un gel de poliacrilamida 6 %. La electroforesis se realizó a 60 W.

PREPARACION DE LA PROTEINA DE FUSION

La proteína de fusión entre la GST y la CFBPasa se indujo con IPTG 0.1 mM. Para ello, 100 ml de la cepa recombinante en estado estacionario fueron diluidos 10 veces en medio LB conteniendo Ap (100 µg/ml) y cultivadas con agitación a 37°C. Luego de 1 hora ($A_{600}=0.6$) se agregó el IPTG (0.1 mM final) y la incubación continuó a 28°C ó a 37°C, por 4 horas. Luego de centrifugadas (5 minutos a 4000 xg) las bacterias fueron resuspendidas en buffer de lisis, sometidas a ultrasonido y centrifugadas a 10000 xg por 10

minutos. En esta etapa se obtuvo una fracción insoluble y otra soluble.

a) Forma soluble de la CFBPasa

La fracción soluble se filtró por una membrana Millipore (45 μ m poro) y se cromatografió en una columna de glutation-agarosa. La proteína de fusión se eluyó con una solución de GSH 5 mM (Smith and Johnson, 1988). El contenido y la composición proteica se determinaron por A280 y por SDS-PAGE respectivamente.

b) Cuerpos de inclusión

La fracción insoluble correspondiente a 20 ml de cultivo se resuspendió en 3 ml del buffer de lisis, se sometió a ultrasonido y se centrifugó (12000 xg, 10 minutos). Se resuspendió el precipitado en 3 ml de buffer de lisis, conteniendo $MgCl_2$ (8 mM) y DNAsaI (10 μ g/ml) y se incubó a 37°C por 30 minutos. Después de centrifugar (12000 xg, 10 minutos) se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de buffer conteniendo lisozima (0.2 mg/ml), se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y se centrifugó (12000 xg, 10 minutos). El precipitado se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis conteniendo desoxicolato de sodio (2 mg/ml) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó (12000 xg, 10 minutos) y resuspendió el precipitado en 1 ml del buffer conteniendo Tritón X-100 (0.5 %) y EDTA 10 mM. Finalmente el precipitado se lavó y se resuspendió en 1 ml de agua (Bowden, Paredes and Georgiou, 1991). La preparación se guardó a -20°C para su uso posterior.

COEXPRESION DE LOS GENES DE CHAPERONINAS (groESL) DE Chromatium vinosum CON EL GEN DE LA CFBPasa DE LOS CLOROPLASTOS DE TRIGO.

La cepa de E. coli que llevaba el plásmido pKH1 fue transformada por electroporación con el plásmido pACYC184 que contiene al fragmento de DNA (4 kbp) que codifica para las chaperoninas GROES y GROEL de C. vinosum en su sitio SalI (pCRF51) (Ferreyra et al., 1993). Las células que llevaban ambos plásmidos fueron seleccionadas en placas de LB conteniendo ampicilina 100 µg/ml y cloranfenicol 34 µg/ml. Estas células fueron inducidas con 0.1 mM IPTG y se lisaron con ultrasonido (3 veces durante 15 segundos y 2 veces por 20 segundos) en presencia de buffer de lisis. La actividad catalítica CFBPasa se determinó en alícuotas de los lisados, en tanto que la composición proteica se estimó en el lisado celular y las fracciones solubles e insolubles (10000 xg, 10 minutos) por SDS-PAGE.

ENSAYO DE PROTEINAS

La determinación de proteínas se realizó mediante:

1) Procedimiento de Lowry (Lowry et al., 1951). En los casos que las muestras contuvieran compuestos que interfieren con el ensayo, las proteínas fueron precipitadas con una solución de ácido tricloroacético (7.4 %) y desoxicolato (0.13 %) (Bensadoun and Weinstein, 1976). En todos los casos el procedimiento fue calibrado con seroalbúmina bovina.

2) Determinación de absorbancia a 280 nm. Para ello se estimó la relación de absorbancia a 280 nm y 260 nm (F) de la muestra y se consideró

$$\text{mg proteína/ml} = F \times 1/d \times A_{280}$$

donde d es el ancho de la cubeta (cm) y A_{280} es la absorbancia a 280 nm. (Protein Structure. A practical Approach (Creighton T., ed.))

3) BIO RAD Protein Assay. Este ensayo colorimétrico se basa en el método de Bradford (Bradford, M. Anal. Biochem., 72, 248 (1976)).

REACTIVACION DE LA ACTIVIDAD DE LA CFBPasa CONTENIDA EN LA PROTEINA DE FUSION

Se incubaron 0.1 ml de la preparación de cuerpos de inclusión durante 1-2 horas, a 37°C, en presencia de Na_2CO_3 0.4 M (pH 12), DTT 5 mM, EGTA 1 mM y un perturbante proteico (urea 6 M, clorhidrato de guanidina 5 M, n-octil- β -D glucopiranosido 30 mM o desoxicolato de sodio 1 %) en un volumen final de 1.5 ml. El control se incubó en Tris HCl (pH 7.9), DTT 5 mM y EGTA 1 mM. Luego de la incubación, se centrifugó la preparación durante 10 minutos a 10000 xg y el sobrenadante se dializó hasta el equilibrio contra Tris HCl 30 mM (pH 7.9), EGTA 0.02 mM, β -mercaptoetanol 0.04 % y MgCl_2 2 mM.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CFBPasa

La actividad catalítica se determinó agregando la enzima a una solución de ensayo a 23°C conteniendo (a) Tris HCl 50 mM (pH 7.9), DTT 5 mM, FBP 2.5 mM, MgCl_2 10 mM y EGTA 0.05 mM [alto FBP, alto Mg^{++}]; (b) Tris HCl 50 mM (pH 7.9), FBP 1 mM, MgCl_2 1 mM y EGTA 0.05 mM [bajo FBP, bajo Mg^{++}], en un volumen final de 0.2-1 ml. Se incubó durante los tiempos indicados en cada experimento. La reacción se detuvo por agregado del reactivo de Chen (Chen, Toribara and Warner, 1966) para valorar el Pi liberado. En el caso (b) la

enzima fue previamente activada como se explica en cada experimento. 1 U CFBPasa= 1 μ mol/min.

ACTIVIDAD FOSFATASA DE LA PROTEINA DE FUSION REACTIVADA

La especificidad por el sustrato en la catálisis se determinó en presencia de 10 mM Mg^{++} y 2.5 mM de varios compuestos fosforilados (fosfoenol piruvato, glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato, sedoheptulosa 1,7-bisfosfato, ribulosa 1,5-bisfosfato, adenosina difosfato, fructosa 1,6-bisfosfato, ácido fosfoglicérico, ribosa 5-fosfato), utilizando la enzima previamente incubada por una hora con DTT 5 mM.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GLUTATION S-TRANSFERASA DE LA PROTEINA DE FUSION.

Se determinó la velocidad inicial de formación del conjugado entre el sustrato 1-cloro-2,4 dinitrobenceno (0.5 mM) y el GSH (2.5 mM) mediante el cambio de absorbancia a 340 nm. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en presencia de 0.1 M buffer fosfato de sodio y potasio (pH 6.5), por cuanto a este pH la reacción no enzimática es mínima (vf=2 ml) (Habig et al., 1974). 1 U GST= 1 mmol/ min.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se realizaron corridas electroforéticas bajo condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS en geles planos verticales, utilizando métodos ya descriptos (Laemmli, 1970; Schagger and von Jagow, 1987). Los porcentajes de acrilamida:bisacrilamida (30:0.8) se ajustaron según se indica en cada experimento. Las electroforesis no desnaturalizantes se realizaron eliminando el SDS en la preparación de los geles, en presencia o

ausencia de reductores según se especifica en cada experimento.

CLONADO DE LA ENZIMA CFBPasa DE TRIGO EN pET-22b(+)

El gen de la CFBPasa de cloroplastos de trigo fue clonado en el vector de expresión pET-22b(+). Para tal fin, la secuencia nucleotídica correspondiente al gen, incluida en el plásmido pKH1, fue amplificado por PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Estos oligonucleótidos contenían los sitios de corte para las enzimas de restricción NdeI y BamHI.

a) oligonucleótido correspondiente al extremo 5' del gen

	NdeI	
5'-C	CGG GAA <u>CAT ATG</u> TAC GAC ATG ATC AC-3'	
sec.en		283
pKH1		Y---->aminoácido #71 de la enz.

b) oligonucleótido correspondiente al extremo 3' del gen

	BamHI	1298
5'-C	CTA <u>GGA TCC</u> GTT CTA CTC TGA AGA CAA-3'	
		STOP

De esta manera fue posible insertar el fragmento amplificado (1017 bp) direccionado entre los sitios BamHI y NdeI del vector.

-Desarrollo de la PCR

Se utilizó como sustrato al plásmido pKH1 (2 ng), preparado como se indica en la sección Purificación del

plásmido pKH1. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l conteniendo una mezcla de los cuatro dNTPs (25 μ M de cada uno), $MgSO_4$ 3 mM y 500 pM de cada oligonucleótido, en el buffer adecuado. Se utilizó 1 unidad de la polimerasa Vent. Luego se desnaturalizó el DNA por 3 minutos a 94°C. Se efectuaron 5 ciclos [30 segundos a 94°C, 30 segundos a 30°C, 2 minutos a 60°C] y 30 ciclos [30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 80 segundos a 72°C] y finalmente 2 minutos a 72°C.

El fragmento amplificado se extrajo una vez con un volumen de cloroformo y se purificó por Magic DNA clean-up System (Bio-101.Inc.). Luego de digerido con BamHI y NdeI, se repitió su purificación y se insertó en el vector de expresión pET-22b(+) tratado con las mismas endonucleasas. El producto de la ligación fue concentrado por precipitación con acetato de sodio 0.3 M y un volumen de 2-propanol, e incubación por 1 hora a -20°C. Luego de centrifugar (12000 xg) se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 200 μ l de etanol 70 %. El DNA obtenido fue resuspendido en 3 μ l de agua. Con este plásmido recombinante concentrado se transformaron células de E.coli de la cepa DH5 α mediante electroporación. Los plásmidos de las bacterias transformadas fueron purificados por lisis alcalina (Sambrook et al., 1989) y la presencia del fragmento de 1 kbp conteniendo el gen de la CFBPasa fue determinada con enzimas de restricción (BamHI y NdeI). Una vez detectados los plásmidos recombinantes, éstos se utilizaron para electroporar células de E.coli BL21. Mediante el análisis de restricción similar al descrito se seleccionaron tres colonias que contenían el gen de CFBPasa.

INDUCCION DE LA CFBPasa DE TRIGO EN BACTERIAS RECOMBINANTES

Dos colonias de la cepa BL21 recombinante fueron crecidas a 37°C por tiempos variables en LB con ampicilina

(100 $\mu\text{g/ml}$), en presencia de IPTG 0.1 mM. Luego de centrifugar 1 ml del cultivo, los precipitados bacterianos se resuspendieron en el buffer de lisis y la suspensión fue sometida a ultrasonido 3 veces por 30 segundos. La actividad CFBPasa se determinó sobre alícuotas de cada lisado. Se determinó la concentración de proteínas mediante el BIO-RAD Protein Assay. Fracciones correspondientes a proteínas totales, solubles e insolubles, fueron analizadas por SDS-PAGE 11 %.

ESTUDIOS ESPECTROFOTOMETRICOS

Espectrofotómetro Gilford Response II: Para determinar el espectro UV de las proteínas se utilizaron cubetas de cuarzo cuya capacidad era de 0,5 ml y el paso de la luz de 1 cm. La velocidad de barrido fue 60 nm/min. En todos los casos los datos (intervalo:0.1 nm) fueron transferidos por una salida RS-232 a una computadora IBM-AT para el procesamiento posterior. El programa utilizado para la obtención de las derivadas cuartas fue diseñado en lenguaje de programación Pascal (M. A. Ballicora).

ESTUDIOS ESPECTROFLUOROMETRICOS

La fluorescencia intrínseca de las proteínas fue medida con un espectrofluorómetro JASCO (modelo FB-770) en cubetas de 1.0 x 1.0 cm. La longitud de onda de excitación de la CFBPasa fue 280 nm y si no se indica otra cosa la de emisión fue 334 nm. Ambos "slit" fueron de 10 nm.

EFECTO DE LA UREA SOBRE LA CFBPasa

La proteína de fusión reactivada se incubó durante toda la noche en Tris-HCl 30 mM (pH 7.9), en presencia de DTT 5 mM y concentraciones variables de urea (0-2.8 M) (vf=0.2 ml). Se determinó la actividad GST monitoreando el aumento de la absorbancia a 340 nm según Habig et al. (1974). Se determinó la actividad CFBPasa en un solo paso en presencia de DTT 5 mM y altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} (Vf=1 ml). Todas las determinaciones se hicieron en presencia de urea 0.14 M.

La CFBPasa libre del extremo GST se incubó en Tris-HCl 50 mM (pH 7.9) en presencia de concentraciones variables de urea y el modulador indicado en cada experimento (vf=0.2 ml). La actividad remanente se determinó en altas o bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} según el experimento, en presencia de concentraciones de urea constantes.

CLONADO Y EXPRESION DE LA PROTEINA DE 35 kDa. OBTENCION DEL FRAGMENTO AMINOACIDICO COMPRENDIDO ENTRE LOS AMINOACIDOS 140 Y 240.

La secuencia nucleotídica desde la base 638 hasta la 850 se amplificó por PCR -tal como se indica en las secciones precedentes- sobre el cDNA del gen de la CFBPasa de trigo contenido en el plásmido Bluescript. Para ello se diseñaron los siguientes oligonucléotidos:

638

5' CC GGA TCC GAC GCC GCC GTC TCC ACC 3'

BamHI

850

3' CC CCA CAT GCA CAA GTG CCT TAA GGG 5'

EcoRI

Estos contienen los sitios de corte para BamHI en el extremo correspondiente al 5' de la secuencia y el correspondiente a EcoRI en el 3'. El fragmento amplificado fue digerido con ambas enzimas de restricción en los buffers adecuados e insertado en el vector pGEX-2T tratado con las mismas endonucleasas. La reacción de ligación se realizó como se explica en secciones previas. Con el resultado de la ligación se transformó la cepa DH5 α F'IQ por electroporación. La proteína de fusión se purificó como cuerpos de inclusión como se ha explicado anteriormente.

PREPARACION DE ANTICUERPOS POLICLONALES

La proteína de fusión GST-CFBPasa purificada por cromatografía de afinidad se usó como inmunógeno. La proteína, disuelta en adyuvante de Freund incompleto, se inyectó en conejos. Se repitieron las inyecciones a los 8 días y a los 38 días. La producción de anticuerpos específicos se siguió por Dot Blot y Western Blot y los sueros se recolectaron a los 45 días. Se procedió de manera similar con la proteína GST y con la proteína de 35 kDa (ver más adelante).

PREPARACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Con un intervalo de 10 días, cinco ratones Balb/c fueron inoculados intraperitonealmente con cuerpos de inclusión (50 μ g) disueltos en 20 mM buffer fosfato de sodio (pH 7.4) conteniendo NaCl 150 mM y emulsionado con un volumen igual de adyuvante de Freund completo. Después de la inyección de refuerzo se inyectó la misma dosis de antígeno en presencia de adyuvante incompleto a los 60, 90 y 120 días. Tres días antes de la hibridización celular, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 20 μ g

de antígeno disuelto en 30 mM buffer Tris-HCl (pH 7.9) o 30 mM buffer acetato de sodio (pH 5.5).

Los anticuerpos monoclonales derivaron de híbridos entre células de mieloma NSO con las células de los bazo obtenidos a partir de ratones que mostraron una alta respuesta inmunológica contra la proteína de fusión (Galfr and Milstein, 1981). Una vez que los sobrenadantes de los hibridomas fueron analizados por Dot Blot y Western Blot en busca de anticuerpos específicos, las células positivas se clonaron mediante el método de la dilución límite (Oi and Herzenberg, 1980).

Los anticuerpos dirigidos contra la GST-CFBPasa o la GST fueron detectados en sueros de ratones inmunizados y en los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas por el método de ELISA con inmunoglobulinas de conejo anti-ratón conjugadas a la peroxidasa de rabanito (dilución 1:1000).

INMUNOBLOTS

Las fracciones proteicas fueron separadas en SDS-PAGE y transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa en presencia de buffer de transferencia (Trizma base 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20 %) a 200 V durante 2 horas. Las membranas se lavaron y los sitios inespecíficos se bloquearon durante una hora con buffer TBS (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM) conteniendo 2 % glicina y 3 % leche descremada. Las membranas así tratadas se incubaron durante 1,5 a 16 horas con los sueros correspondientes diluïdos en el mismo buffer (1:500-1:1000 según el experimento). Luego de exhaustivos lavados con TBS los anticuerpos unidos a la membrana fueron visualizados con un segundo anticuerpo, preparado en cabra contra IgG de ratón o de conejo, acoplados (1) a la peroxidasa de rabanito, (2) a la fosfatasa alcalina. El ensayo de actividad peroxidasa se realizó en presencia de 4-

cloronaftol 2.8 mM y H_2O_2 0.1 % en TBS conteniendo 16 % metanol. La determinación de fosfatasa alcalina se realizó en presencia de 5-bromo-6-cloro-3-indolil fosfato 0.15 mg/ml y nitro blue tetrazolium 0.3 mg/ml en Tris-HCL 0.1 M pH 9.5, conteniendo NaCl 0,1 M y $MgCl_2$ 50 mM.

PRIMERA PARTE. ANALISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA CFBPasa DE TRIGO FUSIONADA A LA GST DE S. japonicum

La obtención de grandes cantidades de proteínas en sistemas bacterianos ha facilitado el estudio de las características moleculares, funcionales y estructurales de numerosas proteínas virales, animales y vegetales. Si bien es aceptado que la estructura primaria contiene la información para la estructura funcional, los procesos de plegamiento pueden conducir también a formas aberrantes. Además, otros aspectos deben ser contemplados. Primero, la expresión de genes foráneos puede provocar la degradación de las proteínas heterólogas por las proteasas del organismo huésped. Segundo, la mayoría de las actividades catalíticas residen en una estructura cuaternaria compuesta por polipéptidos idénticos o diferentes. Tercero, una gran variedad de enzimas requieren una modificación post-traducciona l o un proceso de activación para manifestar su actividad.

La generación de proteínas de fusión mediante vectores de expresión representa una estrategia ampliamente utilizada ya que facilita el procedimiento de purificación. En estos casos una función residente en un polipéptido codificado por el vector provee el mecanismo que permite la purificación mediante el uso de cromatografía de afinidad. La ventaja de estos sistemas de expresión es evidente aunque a menudo

1) se generen complejos proteicos altamente insolubles, conocidos como Cuerpos de Inclusión, que dificultan la recuperación de la estructura y actividad biológica,

2) la presencia de un polipéptido relativamente grande puede conferir a la proteína objeto del estudio propiedades diferentes a las observadas con la forma nativa.

Las proteínas de fusión son compuestos novedosos que no solo permiten el análisis de problemas bioquímicos sino que también pueden ser utilizados con fines biotecnológicos. En general, han sido preparadas con polipéptidos cuya función reside en la estructura monomérica y se desconoce su efecto sobre las proteínas que se ensamblan en estructuras de mayor grado de polimerización.

Las CFBpasas son homotetrámeros cuya actividad es estimulada por el intercambio tiol/disulfuro -mediado por la Trx- y la modificación de las interacciones no covalentes promovida por moduladores. La multiplicidad de procedimientos para obtener su activación in vitro la convierten en un modelo adecuado para el análisis de los requerimientos que conducen a su forma activa. En este contexto, fue abordada la preparación y caracterización de la CFBPasa de trigo fusionada por su extremo N-terminal a la GST del helminto Schistosoma japonicum.

MAPEO Y CLONADO DEL GEN DE LA CFBPasa DE TRIGO

Con el fin de expresar la CFBPasa de trigo en bacterias, el cDNA correspondiente fue caracterizado con endonucleasas de restricción y clonado en el vector de expresión pGEX-1. El vector pGEX contiene (i) el promotor Tac, seguido por la secuencia completa de la GST en la que el codón de terminación normal ha sido reemplazado por un "polilinker" que contiene los sitios de restricción para las enzimas BamHI, SmaI y EcoRI, seguido por un codón de terminación, (ii) el gen que codifica para la β -lactamasa (ApR), (iii) el alelo lacIQ del represor del operón Lac, (iv) parte del gen LacZ. Este vector dirige la síntesis de polipéptidos foráneos fusionados con la GST (SJ26) del helminto Schistosoma japonicum. Las proteínas quiméricas generadas pueden ser purificadas por cromatografía de

afinidad utilizando glutation inmovilizado sobre agarosa (Smith and Johnson, 1988).

En general las CFBPasas (peso molecular c.a 160000) son enzimas constituidas por cuatro subunidades idénticas. El cDNA, que codifica a la enzima de trigo, sintetizado a partir del ARN mensajero de hojas (Raines et al., 1988), contiene un marco de lectura abierto de 1230 bp que codifica para una proteína de 409 aminoácidos (figura 11). La secuencia aminoacídica está constituida por el péptido tránsito (51 residuos) y la proteína madura (358 aminoácidos). La masa molecular estimada de la subunidad madura es de 39,778 Da.

El patrón de bandas de restricción obtenido a partir del plásmido Bluescript que incluye al gen de la CFBPasa se muestra en la figura 12a. Las enzimas de restricción utilizadas fueron seleccionadas sobre la secuencia nucleotídica del cDNA mediante el programa de computación DNASIS. La digestión parcial del cDNA generó un fragmento EcoRI-EcoRI de aproximadamente 1.2 kbp mientras que la digestión con EcoRI/XhoI produjo dos bandas de 0.5 y 0.6 kbp (figura 12a). La incorporación de la enzima de restricción KpnI a esta última reacción removió el fragmento de 0.6 kbp, generando en su lugar dos bandas nuevas de movilidad cercana a 0.3 kbp. La aparición de estas dos últimas bandas de menor tamaño permitió elaborar el mapa de la figura 12b, e indica que el fragmento XhoI-EcoRI que incluye al sitio KpnI en este clon está completo (0.6 kbp). En cambio el fragmento EcoRI-XhoI correspondiente al extremo 5' del clon está incompleto ya que no posee 796 bp indicadas por la secuencia nucleotídica de la figura 11. De estos resultados se desprende que el clon carece de una parte de la secuencia 5' del gen que incluye al péptido tránsito y a un fragmento N-terminal de la proteína madura. El fragmento EcoRI-EcoRI de 1200 bp correspondiente al cDNA del gen de la CFBPasa de

trigo fue insertado en el sitio EcoRI del vector pGEX-1 generándose un nuevo plásmido: el pKH1.

CARACTERIZACION DE LAS BACTERIAS RECOMBINANTES

La cepa de *E. coli* DH5 α F'IQ fue transformada por electroporación con el producto de la ligación entre el vector pGEX-1 y el gen de la CFBPasa. Las bacterias recombinantes fueron caracterizadas por mapeo de restricción a fin de seleccionar las que contenían al gen en la orientación adecuada para su expresión como fusión con la GST. Según el mapa de la figura 12b, la digestión con BamHI y XhoI del plásmido recombinante conteniendo al inserto en la dirección 5'-->3', generaría un fragmento de 560 pb. Si la inserción fuese 3'-->5' generaría uno de 610 pb. Estos fragmentos son fácilmente identificables en un gel de agarosa 1.6 % tal como se ve en la figura 13. Solamente el fragmento de 1.2 kb insertado en la orientación 5'-->3' fusiona su extremo N-terminal con la GST. Los clones positivos analizados por restricción, presentaron el fragmento BamHI-XhoI de 560 pb. Congruente con estos resultados, los mismos clones fueron inmunoreactivos con los anticuerpos policlonales contra la CFBPasa de espinaca.

```

10          30          50          70          90          110
GGGCCACCAACCGGTGCGGGCCAGACAGGCAGGGGAGAGAAATTCGTCAAATCCGCAGCACCAAGCAATGGCCGCGCGGACCAACCAACCGTCCCGCGCGGTTCTGCTGTCCCGCA
M A A A T T T T S R P L L L S R Q

120          150          170          190          210          230
GCAGGGCGGGGTAGCTCCCTCCAAATCCCGCCCTCCCGAGGAGGCCCGAAGCAGCCCTCTTTCGCGGCCAGGGCCAGGCGTGGACTCGAAATGTCGGGTGCATGCGAGTCGTGGACACGGC
Q A A A S S L Q C R L P R R P G S S L F A G Q G Q A S T P H Y R C H A Y Y D T A

250          270          290          310          330          350
CTCGGGCGCGCGCGCGGGCTAGGAAAGAGGAGCAGCTACGACATGATCACGCTGACGACGTGGCTGTAAGCAGGAGCAGGAGGGGTCATCGACAAAGGAGATGACCAATCGTGGT
S A P A P A A A R K R S S Y O H I T L T T V L L X Q E Q E G Y I D Y E M T I Y L

370          390          410          430          450          470
GTCCAGCATATCCAGCGGCTGCAAGCAGATCGCCCTGGTTGGTGCAGCGCGGGCCCAATCTCCAACCTCACCGCGCTCCAGGGCGCCACCAACCGTGCAGGGCGSAGGACCAGAAGAACCTGGA
S S I S T A C K Q I A S L Y Q R A P I S M L T G Y Q G A T N Y Q G E D Q K X L D

490          510          530          550          570          590
CGTCATCTCCAACGAGGTGTCTCGAACCTGCGTGAAGTGGAGTGGCCCGACCGGGCTGATGSCATCGGAGGAGGAGGACGTCCCGTGGCGGTGGAGGAGAGCTACTCGGGCAAC TACAT
Y I S H E Y F S H C L R M S G R T G Y I A S E E E O Y P Y A Y E E S Y S G M Y I

610          630          650          670          690          710
CGTGGTGTTCGACCCGCTCGACGCGCTCCCAACATCGACGCGCGCTCTCCACCGGCTCCAATCTCGGCACTCACAGCCCATCCGACGAGTGCACATGCGGACGACGCAACCCCTTGA
Y Y F D P L D G S S N I D A A Y S T G S I F G I Y S P S O E C H I S D D A T L D

730          750          770          790          810          830
CGAAGTGACGAGATGTGCATAGTGAACGTGTGCCAGCCAGGAGCAACCTGCCTCGCGCGCGCTACTGCAATGTAATCGAGCTGGTCACTCTCGTGCACCAATCGGCAACCGGGGTGTA
E Y T D M C I Y H Y C Q P G S M L L A A G Y C H I S S S I I F Y L T I G T S Y T

850          870          890          910          930          950
CGTGTTCACCGTGGACCCGATGTACGGCGAGTTCGTGCTGACCGAGGAGAAGTGCAGATCCCAAGTCGGGCAAGATCTACTCCTTCAACGAGGGCAAC TACGGGCTCTGCGACGACAA
Y F T L D P M Y G E F Y L T Q E X Y Q I P X S G K I Y S F H E G H T A L Y D D C

970          990          1010          1030          1050          1070
GC TCAAGAAGTACATGGACAGCC TCAAGGAGCGCGGCACTCCGCGCAAGCCCTACTCCGCGCGCTACATCGGCAGCC TCGTEGGCGACTTCCAGCGCAACATGCTTACGGCGGCACTTA
L K K Y M D S L X E P G T S G K P Y S A R Y I G S L Y G D F H R T M L Y G G I T

1090          1110          1130          1150          1170          1190
CGGGTACCCAGCGACAGAAAGAGCAAGAACGGCAAGCTGCGGCTGCTACGAGTGGCGGCCCATGAGCTTCAATCGCGGAGCAGGCGCGGCAAGGC TCCGACGGCCACCAAGGGT
S Y P S D Q K S K M G K L R L L Y E C A P M S F I A E Q A G G K S S D G M D R I

1210          1230          1250          1270          1290          1310
ACTCGACATCAATGCCCAAGCGGTCCTAATAGAGAGTGCCTGTGACGTCGCGAGCGTGGAGGAGTGGAGGAGTGGAGAAATTCITGCTTCTAGAGTAGAACAAGAACGAGGGAGGAT
L D I M P T A Y H Q R Y P L Y Y G S Y E E Y E X Y E K F L S S E

1320          1350          1370          1390
ACACAGGCTGTTCCTCCAGAAATTAATGTAACTAAATAATAATGTAGCCCTTTCCTGTGATGCGGAAAAATAATAATT

```

Figura 11. Secuencia nucleotídica del gen de la CFBPasa de trigo. La secuencia aminoacídica se dedujo a partir dicho gen. La numeración corresponde a los nucléotidos (Raines et al., 1988).

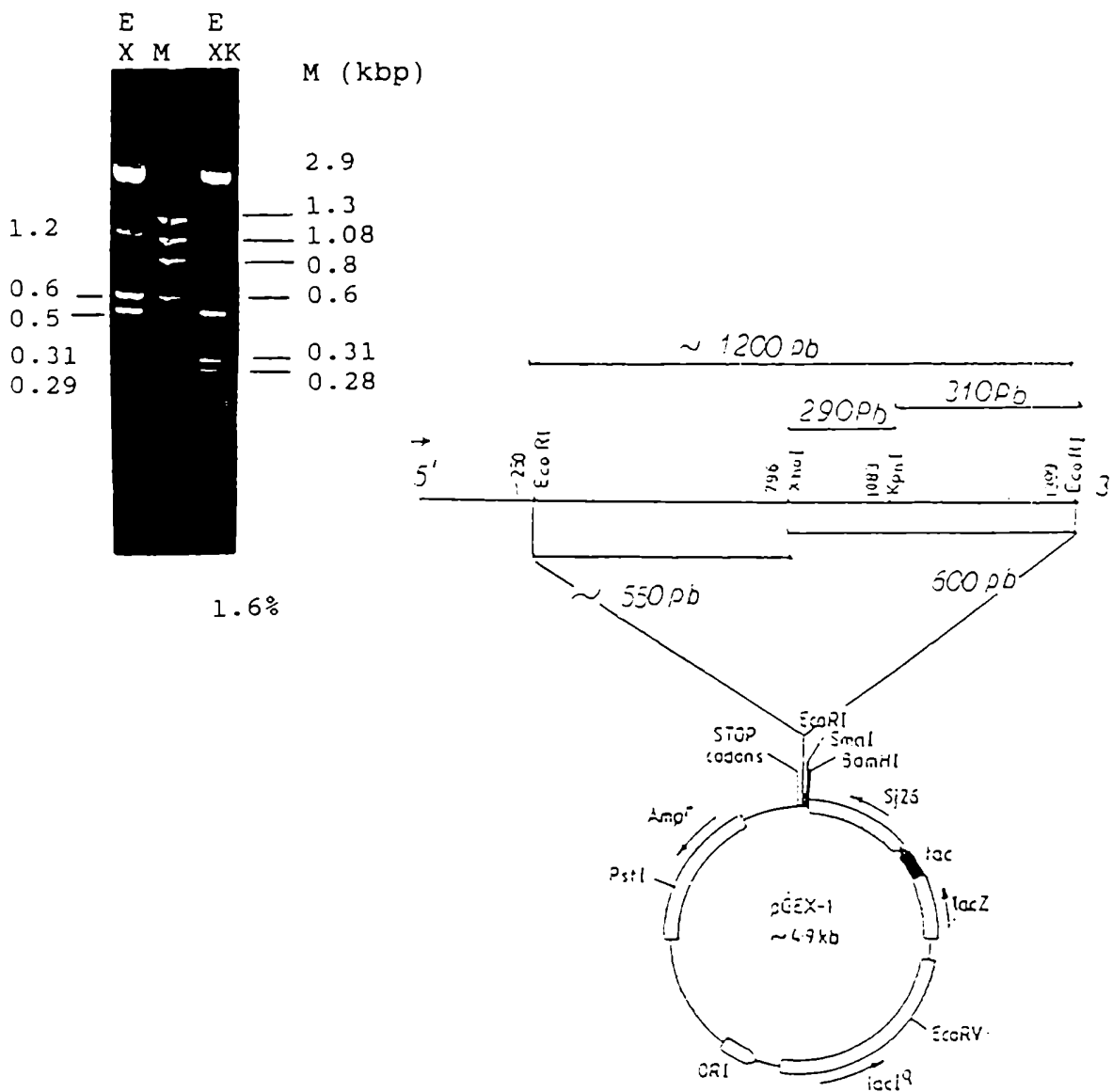


Figura 12. (A) Electroforesis en gel de agarosa 1.6% de los productos de digestión enzimática del plásmido Bluescript (2.9 kbp) que contiene al cDNA de la CFBPasa de trigo (1.2 kbp). E: EcoRI, X: XhoI, K: KpnI. M: PM estándar. (B) Mapa del plásmido pGEX-1. Se muestran los sitios únicos de restricción para EcoRI y KpnI.

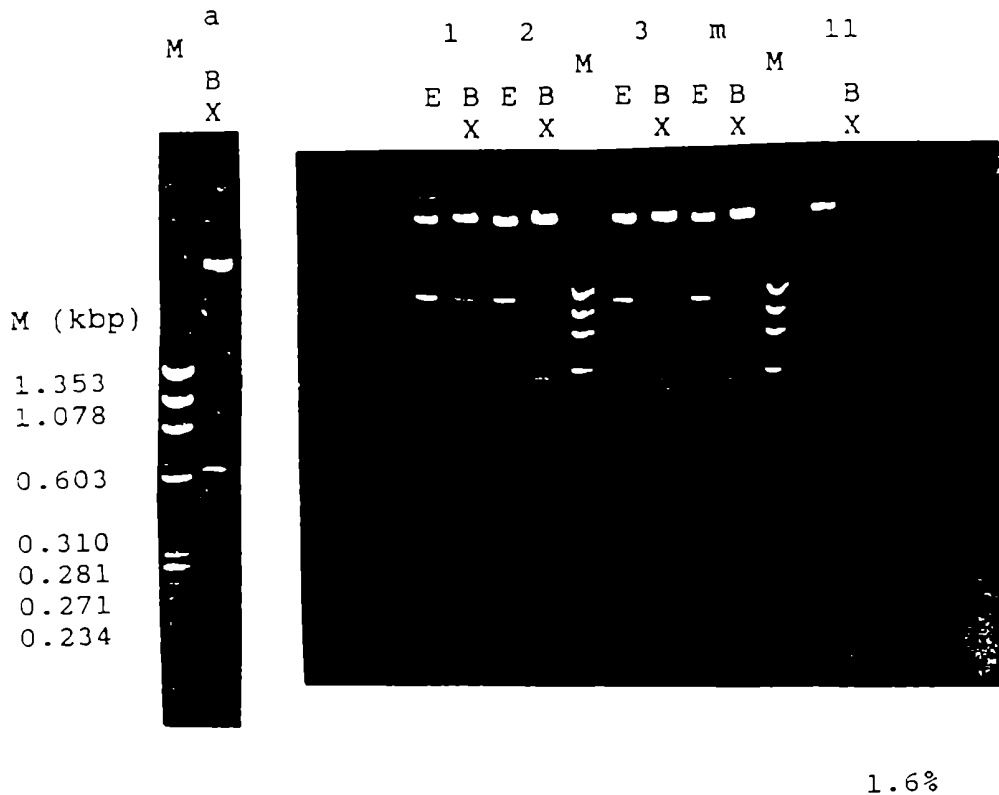


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1.6% de los productos de digestión enzimática del plásmido pKH1 conteniendo al gen de la CFBPasa en ambas orientaciones posibles. E: EcoRI, B: BamHI, X: XhoI. a, 1, 2, 3, m, 11: colonias recombinantes.

SECUENCIACION PARCIAL DEL EXTREMO 5' DEL GEN QUE CODIFICA A LA CFBPasa FUSIONADO AL GEN DE LA GST.

El análisis por restricción del cDNA de la CFBPasa reveló la ausencia de una parte de la secuencia del extremo 5' del gen. Con la finalidad de conocer con exactitud el número de bases faltantes y por lo tanto la identidad de los aminoácidos ausentes, se procedió a secuenciar parte del gen de la enzima cloroplástica fusionado al gen de la GST.

El plásmido pKH1 fue purificado a partir de las bacterias *E. coli* transformadas. El extremo 5' del gen de la CFBPasa clonado en la orientación 5'-->3' en el plásmido pGEX-1, fue secuenciado por el método de Sanger utilizando como "primer" un oligonucléotido que se extiende desde la base 609 hasta la base 623 de la secuencia de la GST codificada por el vector. La secuencia obtenida (Figura 14) indica que el gen de la CFBPasa de trigo clonado en pGEX-1 carece de la totalidad del péptido señal y de las 60 bp que corresponden a los 20 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína madura. La proteína codificada tiene 340 aminoácidos (PM 38 kDa), extendiéndose desde el número 71 hasta el 409 (ver figura 11) según la numeración correspondiente a la proteína que incluye al péptido señal.

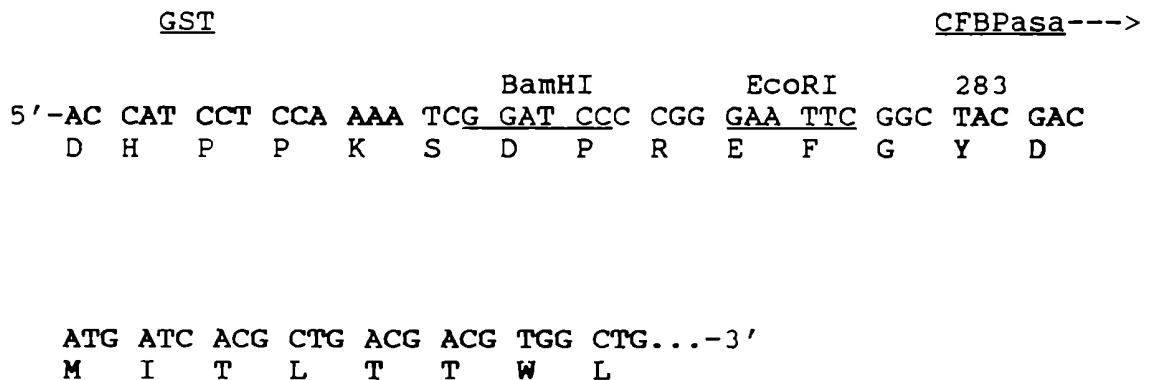


Figura 14. Secuencia nucleotídica parcial del extremo 5' del gen de la CFBPasa contenida en el sitio EcoRI del plásmido pKH1. La secuencia de la CFBPasa comienza en el aminoácido #71 del precursor [tirosina (Y)] que es codificado por el codón que comienza en la base #283.

EXPRESION DE LA PROTEINA DE FUSION GST-CFBPasa

Frecuentemente las proteínas eucarióticas producidas en microorganismos (Marston, 1986; Bowden, Paredes and Georgiou, 1991; Mitraki and King, 1989) generan cuerpos de inclusión, en los que la estructura de la proteína varía desde estados nativos hasta estados totalmente desnaturalizados (Marston, 1986; Mitraki and King, 1989; Hartley and Kane, 1988; Schein, 1989; Friguet, Djavadi-Chaniance and Goldberg, 1989). Favorece esta situación la formación incorrecta de los puentes disulfuro que interfieren con la conformación final nativa y estable (Schein, 1989; Creighton, 1977). La expresión del polipéptido compuesto por la GST y la CFBPasa (65 kDa) se indujo en las bacterias recombinantes con 0.1 mM IPTG. Su sobreexpresión generó cuerpos de inclusión en el interior de la célula bacteriana visibles al microscopio óptico como corpúsculos oscuros localizados en ambos polos de la célula (figura 15).

PURIFICACION DE LA GST-CFBPasa

Las bacterias fueron lisadas por sonicación o con una French Press y el contenido proteico de las fracciones solubles (sobrenadante) e insolubles (pellet) fue analizado por SDS-PAGE. De acuerdo con la observación microscópica la proteína de fusión particionó mayoritariamente en forma insoluble (ca 90%), como cuerpos de inclusión y en menor grado como proteína soluble (ca 10%) (figura 16). A su vez la proteína de fusión soluble representó un 8-10% de las proteínas solubles de E. coli (Figura 17).

El tratamiento de los cuerpos de inclusión con detergentes o agentes caotrópicos ha permitido en varias ocasiones la solubilización del contenido proteico (Bowden, Paredes and Georgiou, 1991). Por ello, los cuerpos de inclusión conteniendo a la GST-CFBPasa fueron incubados

sucesivamente con lisozima, desoxicolato de sodio y Tritón X-100 según el esquema de la figura 18a. Dado que la mayor parte de la proteína de fusión GST-CFBPasa aún permanecía en la fracción particulada, los cuerpos de inclusión fueron resuspendidos a pH 12 en una solución de urea 6 M y DTT 5 mM. Al remover el exceso de urea y llevar el pH a 7.9, la fracción soluble contenía la mayor parte de la proteína de fusión (cf. figura 26). Si bien una fracción de esta forma solubilizada interaccionó con columnas de glutation-agarosa y eluyó específicamente con glutation reducido, la mayor proporción no fue retenida por la columna.

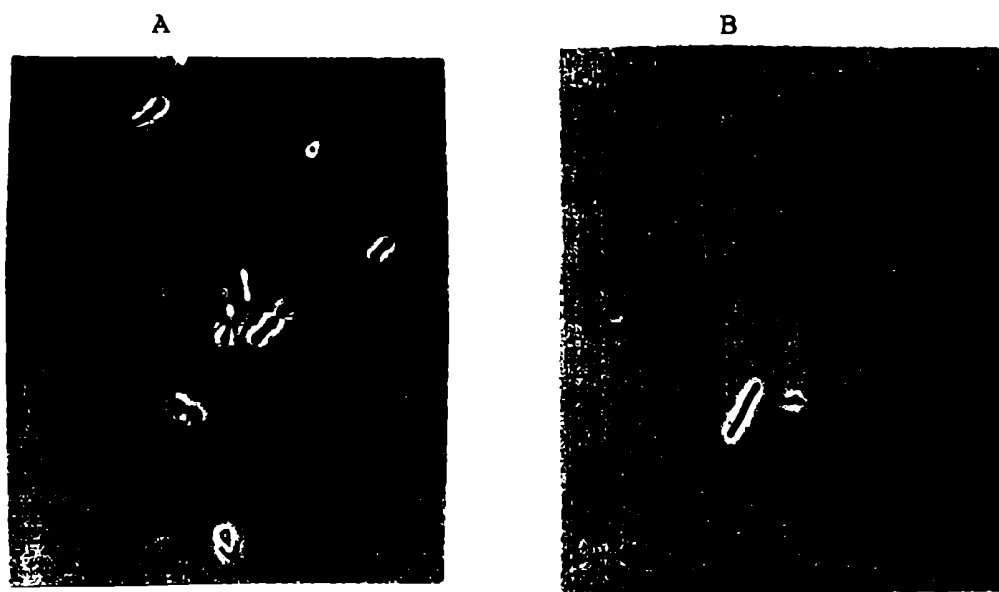


Figura 15. Formación de cuerpos de inclusión en células de E. coli transformadas con pKH1.
a) Células inducidas con IPTG.
b) Células control.

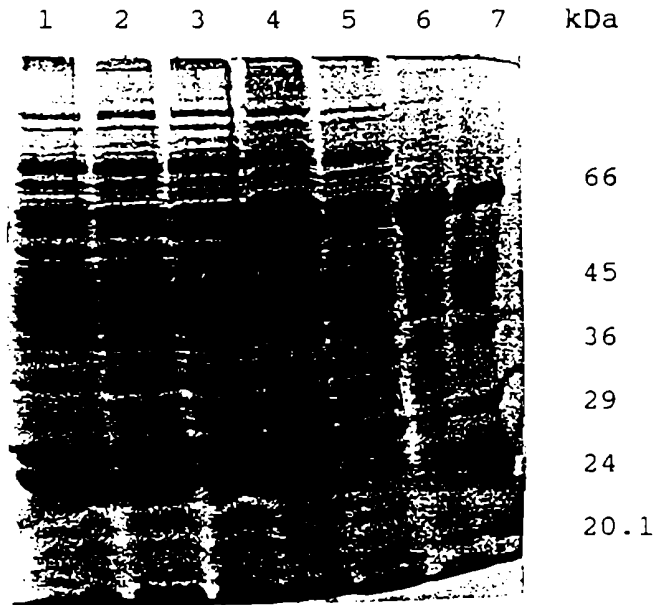


Figura 16. SDS-PAGE (11%). Proteínas, extraídas por sonicación, de un cultivo de *E. coli* inducido con IPTG.

- 1) Proteínas solubles del cultivo transformado con pGEX-1.
- 2) Proteínas totales del cultivo transformado con pGEX-1.
- 3) Control sin inducir. Proteínas totales del cultivo transformado con pGEX-1.
- 4) Proteínas totales del cultivo transformado con pKH1.
- 5) Proteínas solubles del cultivo transformado con pKH1.
- 6) Cuerpos de inclusión del cultivo transformado con pKH1.
- 7) M: Std. PM.

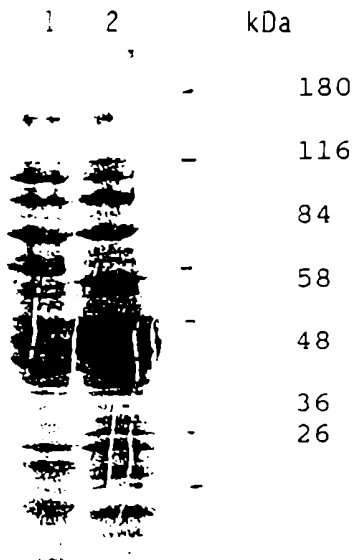
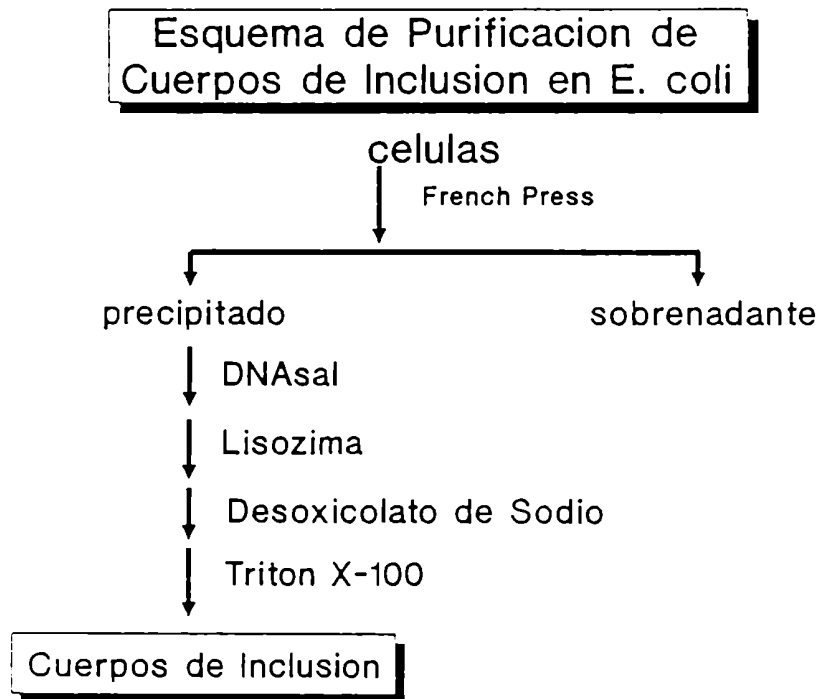


Figura 17. SDS-PAGE (11%). Proteínas solubles del cultivo transformado con pKH1, extraídas por sonicación.

- (1) 4 horas de inducción con IPTG.
- (2) Sin inducir.

18 (A)



18 (B)

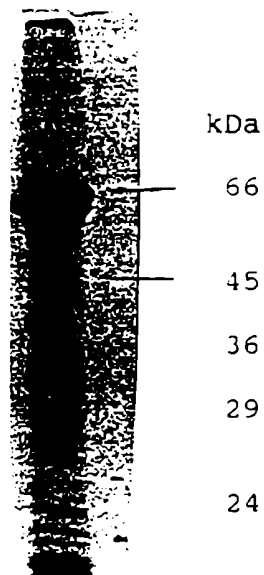


Figura 18.
 A) Esquema de purificación de Cuerpos de Inclusion.
 B) SDS-PAGE (11%) de la proteína de fusión purificada como Cuerpo de Inclusion.

Por otra parte, la proteína de fusión presente en los sobrenadantes de los extractos bacterianos fue purificada mediante cromatografía de afinidad en una columna de glutation-agarosa (Simmons and Vander Jagt, 1977; Smith et al., 1986; Smith and Johnson, 1988), obteniéndose 1,5-2 mg de proteína pura por litro de cultivo (figura 19). La gran afinidad por el glutation inmovilizado de la enzima inicialmente soluble respecto a la resolubilizada sugiere que el drástico desplegamiento y replegamiento de la GST-CFBPasa altera la conformación del dominio GST modificando su afinidad por el sustrato inmovilizado.

Los anticuerpos policlonales preparados contra la enzima de hojas de espinaca fueron utilizados para detectar los clones positivos de la genoteca de cDNA de hojas de trigo (Raines et al., 1988). Por ello la proteína de fusión fue identificada con dicho anticuerpo, tanto en las diferentes fracciones crudas (figura 20a) como en las fracciones purificadas (figura 20b). En este contexto, las bandas positivas de menor tamaño corresponderían a los productos de degradación que contienen la porción CFBPasa.

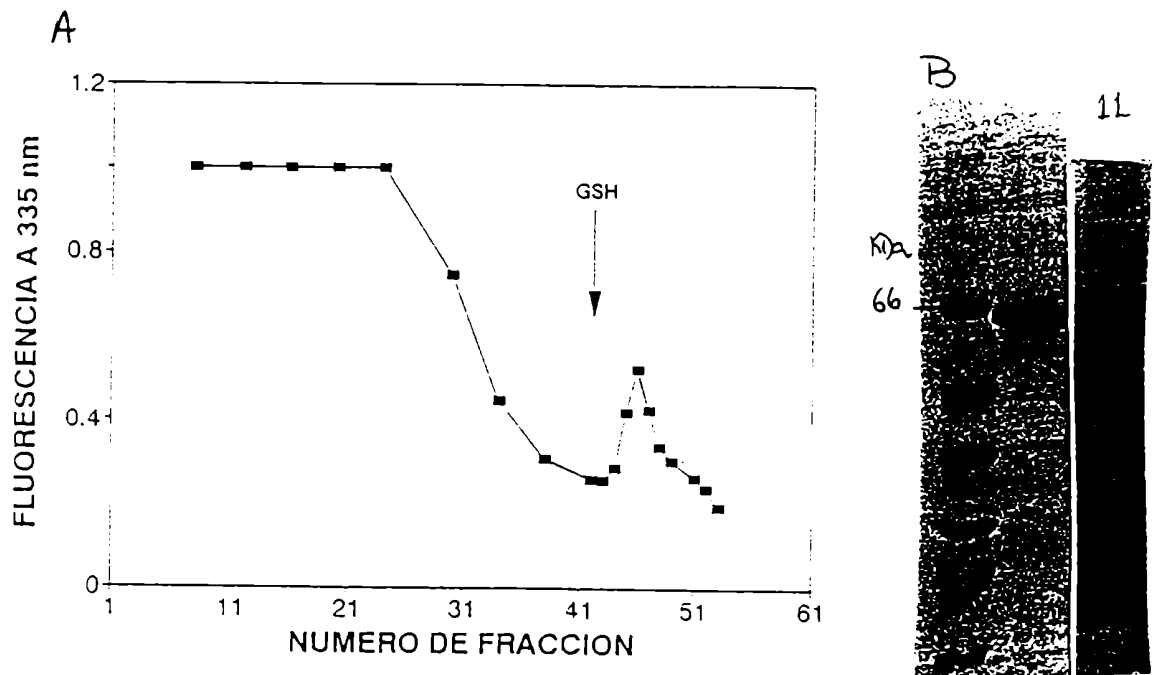


Figura 19. (A) Cromatografía en columna de glutation-agarosa de la fracción soluble que contiene la GST-CFBPase. La fracción soluble del lisado bacteriano (40 mg) fue cromatografiada en una columna de glutation-agarosa (1 x 5 cm) según se describe en Materiales y Métodos y la presencia de proteína fue estimada por fluorescencia (excitación 280 nm). GSH: Glutation reducido. (B) SDS-PAGE (11%) de la GST-CFBPase purificada por afinidad. Una alícuota de la fracción que eluyó específicamente con glutation reducido 5 mM (15 μ g de proteína) y otra de la fracción número 11 fueron sometidas a SDS-PAGE.

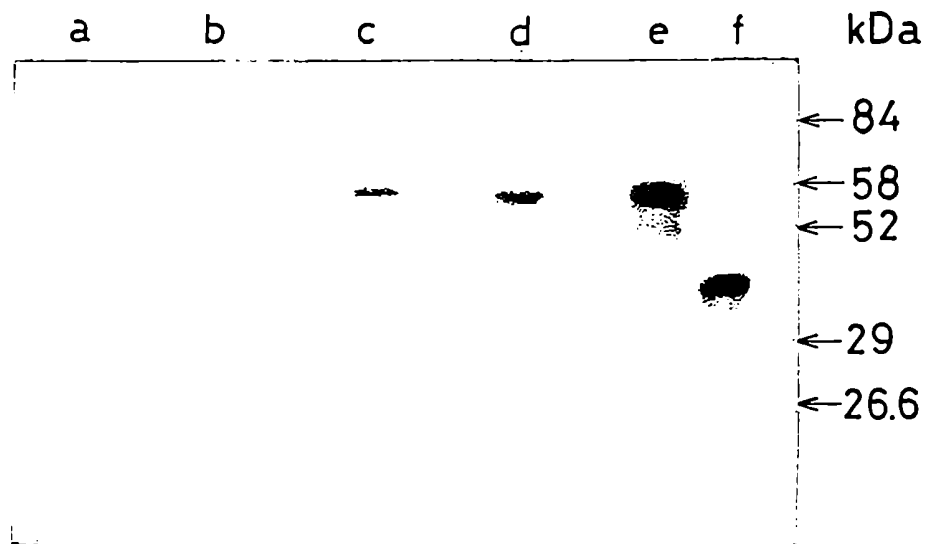


Figura 20a. Análisis por Inmunoblot de las proteínas de *E. coli*. Las proteínas (2 μ g) fueron sometidas a SDS-PAGE. Para la detección en el Western Blot, la dilución del Ab (anti-CFBPasa de espinaca) fue 1/600 en tanto que el segundo Ab fue IgG de cabra anticonejo unido a peroxidasa. Carriles a, b: extractos totales de células no inducidas, transformadas con pGEX-1 y pKHI respectivamente. Carriles c, d y e: proteínas solubles, totales e insolubles respectivamente, de células transformadas con pKHI e inducidas con IPTG. Carril f: preparación homogénea de CFBPasa de espinaca.

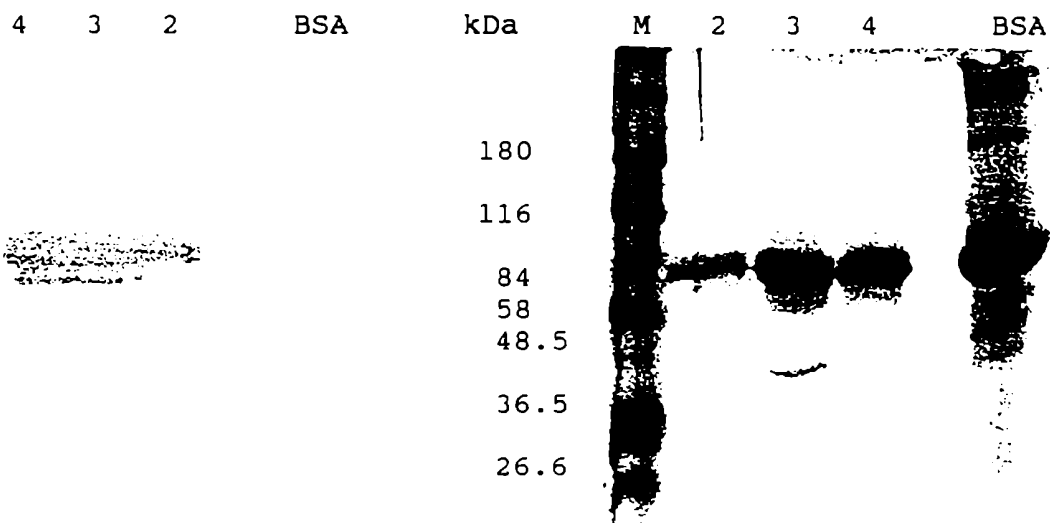


Figura 20b. Western Blot de la GST-CFBPasa purificada por cromatografía de afinidad en glutation-agarosa tal como en la fig. 19a. Se utilizó un Ab policlonal anti-CFBPasa de espinaca en una dilución 1/300. 2-4: Número de fracción.

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA GENERACION DE CUERPOS DE INCLUSION

La temperatura es uno de los factores físicos que influyen sobre la formación de inclusiones citoplasmáticas dentro de la célula (Schein, 1989). Para estudiar si este factor altera la distribución de la GST-CFBPasa entre los cuerpos de inclusión y la fracción soluble, las proteínas provenientes de los cultivos inducidos a 28°C y a 37°C se analizaron por SDS-PAGE. En ambos casos la mayor proporción de la GST-CFBPasa se encontró como inclusiones insolubles (figura 21 (líneas 3 y 6)). Aparentemente, la temperatura no perturba la formación de los cuerpos de inclusión que contienen la GST-CFBPasa.

COEXPRESION DE LAS CHAPERONINAS DE Chromatium vinosum CON LA GST-CFBPasa

La familia de proteínas conocidas como chaperoninas, presente en las eubacterias y en las organelas eucarióticas, promueve el ensamblado correcto de las estructuras celulares macromoleculares (Ellis, 1990; Zeilstra-Ryalls and Georopoulos, 1991). Los genes groE forman parte del regulón de proteínas de estrés (Heat Shock) en todas las eubacterias analizadas y su sobreexpresión disminuye la propensión a formar cuerpos de inclusión (Hockney, 1994; Blum et al 1992). En particular, la sobreexpresión en E. coli de los genes groES y groEL de Chromatium vinosum facilitó el ensamblado de los productos génicos correspondientes a la Rubisco de bacterias fototróficas (Ferreyra et al., 1993). Sobre la base de estos resultados analizamos si la sobreexpresión de los genes groE de C. vinosum modificaba el estado de la proteína de fusión expresada en E. coli.

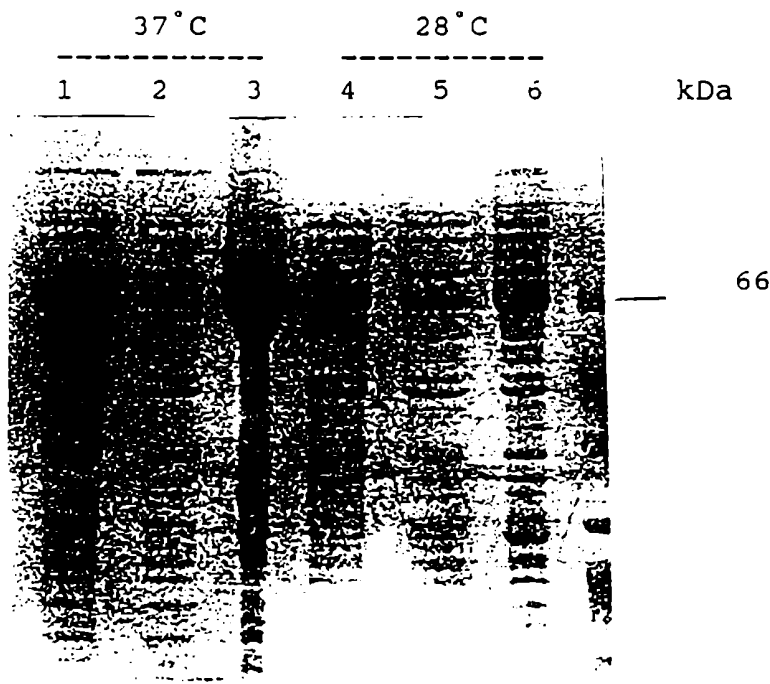


Figura 21. Análisis de las proteínas de *E. coli* transformadas con pKH1. Las bacterias fueron cultivadas a 37°C hasta alcanzar $A_{650}=0.6$. Luego, la inducción con IPTG fue realizada a 28°C y a 37°C. Alícuotas comparables de los lisados (100 μ l) fueron analizadas por SDS-PAGE (11%). Carriles 1 y 4: proteínas totales, Carriles 2 y 5: proteínas solubles, Carriles 3 y 6: proteínas insolubles (4 μ l) (cuerpos de inclusión).

La cepa de *E. coli* que contenía el plásmido pKH1 fue transformada por electroporación con el plásmido pACYC184, en el cual un fragmento de 4 kbp en el sitio SalI (pCRF51) contenía los genes codificantes para groES y groEL de *Chromatium vinosum*. Luego de seleccionar las bacterias que llevaban ambos plásmidos por su resistencia a cloranfenicol y ampicilina (figura 22), las proteínas inducidas con 0.1 mM

IPTG fueron analizadas mediante SDS-PAGE. En la figura 23a se observa que la proteína inducible con IPTG (cf líneas 1 y 2) apareció en la fracción proteica insoluble (línea 5). En la cepa de E. coli que contenía ambos plásmidos (fig.23b), la banda de 59 kDa evidenció la presencia de la proteína GROEL (cf líneas 1-6). Esta proteína era "constitutiva" y soluble (cf líneas 3 y 5). Además el análisis en geles de SDS-PAGE (Tricina), que resuelven mejor las proteínas de bajo PM, reveló la presencia de GROES (10 kDa) (figura 24b; cf líneas 1-4 con 5 y 6).

A pesar de la sobreexpresión de las chaperoninas la GST-CFBPasa estuvo asociada a los cuerpos de inclusión. Consistente con este resultado, la presencia o ausencia de las chaperoninas no modificó la actividad CFBPasa de los lisados de E. coli (figura 25). Los genes groE de C. vinosum presentan niveles de homología remarcables con la contraparte de varias eubacterias y organelas eucarióticas (Ferreyra et al., 1993). Si bien sus productos participan en el ensamblado de la Rubisco de diversas bacterias fototróficas, no fueron efectivos en aumentar la proporción de la GST-CFBPasa en la fase soluble.

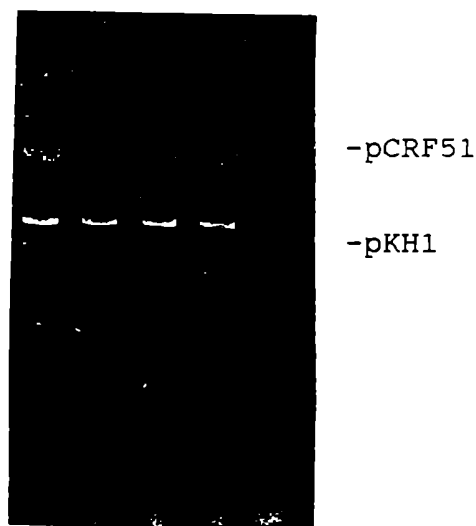


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa 0.7% del DNA plasmídico de E. coli transformadas con pKH1 (6.1 kbp) y pCRF51 (8.2 kbp). Estas doble transformantes fueron resistentes a ampicilina y a cloranfenicol.

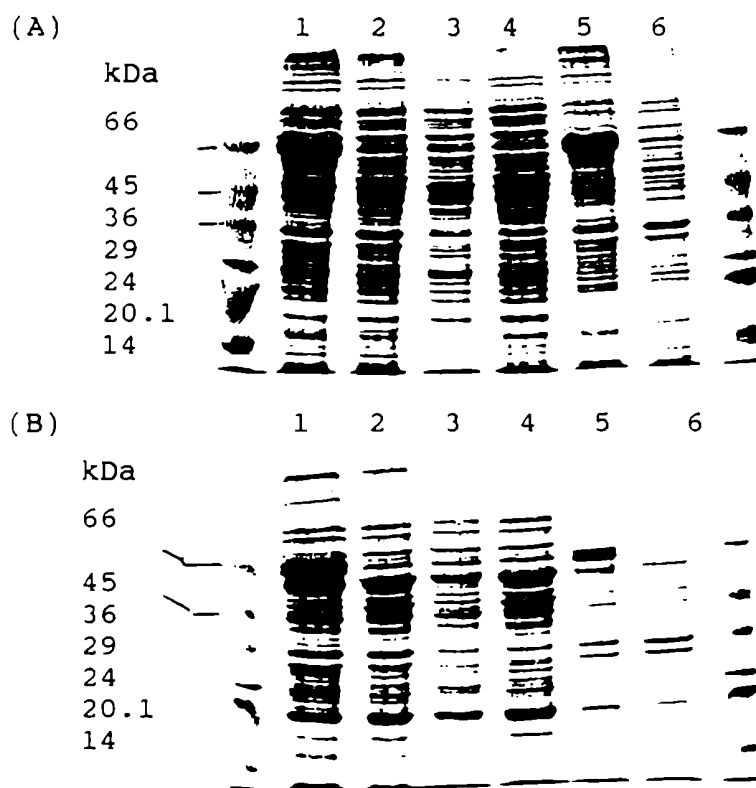


Figura 23. Análisis por SDS-PAGE (11%) de las proteínas de *E. coli* transformadas con (A) pKH1 y (B) pKH1 y pCRF51. Carriles: 1: proteínas totales, inducidas con IPTG. 2: proteínas totales sin inducir. 3: proteínas solubles, inducidas con IPTG. 4: proteínas solubles sin inducir. 5: proteínas insolubles, inducidas con IPTG. 6: proteínas insolubles sin inducir.

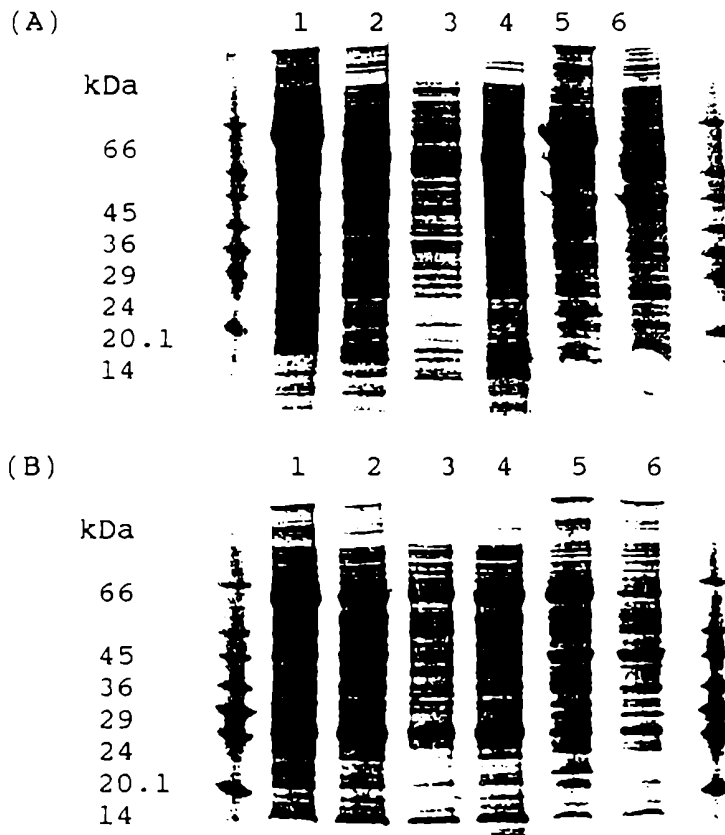


Figura 24. Análisis por SDS-PAGE (Tricina) (11%) de las proteínas de *E. coli* transformadas con (A) pKH1 y (B) pKH1 y pCRF51. Carriles: 1: proteínas totales, inducidas con IPTG. 2: proteínas totales sin inducir. 3: proteínas solubles, inducidas con IPTG. 4: proteínas solubles sin inducir. 5: proteínas insolubles, inducidas con IPTG. 6: proteínas insolubles sin inducir.

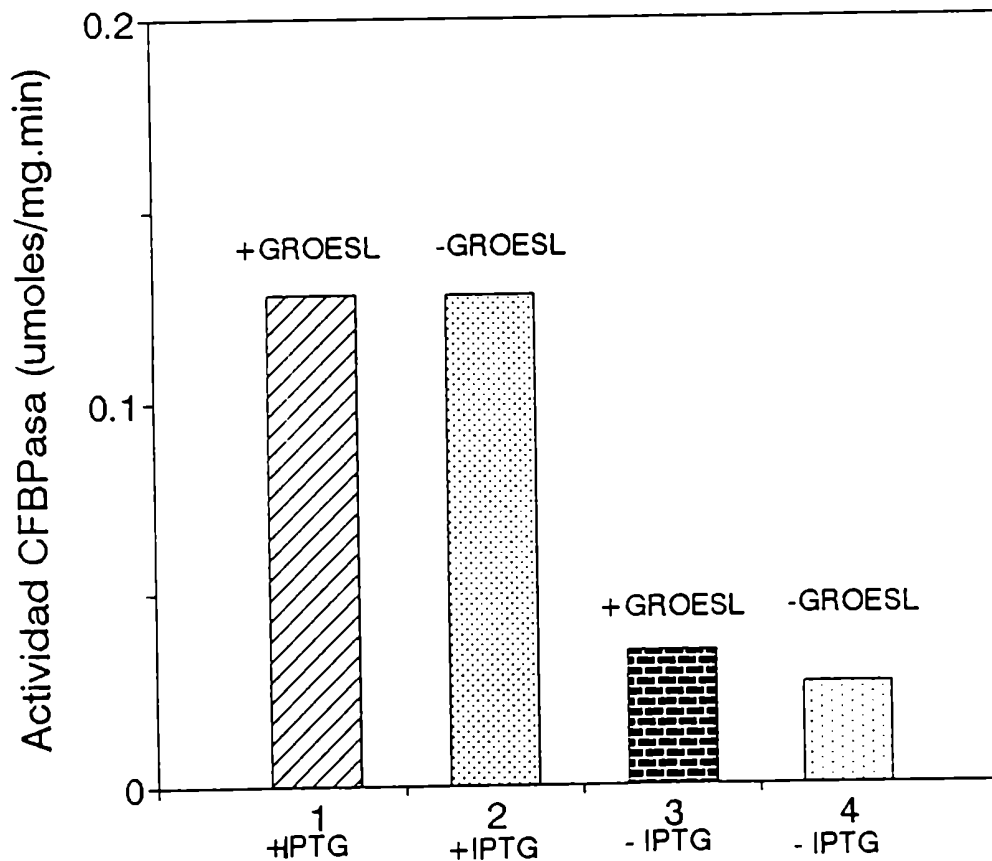


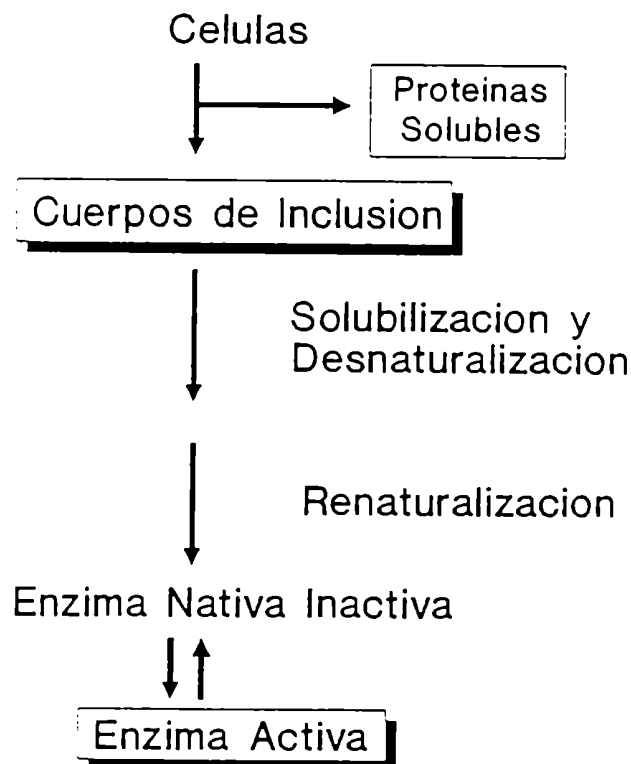
Figura 25. Actividad CFBPasa de los lisados de *E. coli* transformadas con (a) pKH1 (GST-CFBPasa), (b) pKH1 (GST-CFBPasa) y pCRF51 (*groE*). Los cultivos bacterianos fueron crecidos a 37°C hasta $A_{650}=0.6$. Luego se indujo la expresión de la GST-CFBPasa con IPTG, durante 3 horas. La expresión de GroES (59 kDa) y GroEL (10 kDa) fue constitutiva.

La actividad CFBPasa se determinó sobre alícuotas de los lisados en presencia de DTT 5 mM y altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} , según se especifica en Materiales y Métodos. Lisados bacterianos sin inducir, con uno u ambos plásmidos fueron incluidos como control en todas las determinaciones.

REACTIVACION DE LA ACTIVIDAD CFBPasa A PARTIR DE LOS CUERPOS DE INCLUSION

Un método usual para convertir las proteínas de los cuerpos de inclusión a su forma funcional es la solubilización con desnaturalizantes fuertes (cloruro de guanidina, urea) y la posterior eliminación del perturbante. El pH, la temperatura, el entorno iónico y la concentración de proteínas son importantes factores en la elaboración del protocolo de renaturalización para obtener actividad biológica (Esquema I) (Marston, 1986; Jaenicke and Rudolph, 1989).

ESQUEMA I



A) Efecto de diferentes perturbantes proteicos sobre la recuperación de la actividad catalítica de la GST-CFBPasa.

Con la intención de solubilizar la GST-CFBPasa, los cuerpos de inclusión fueron resuspendidos por una hora a pH 12 y a 37°C en presencia de diferentes desnaturalizantes y luego dializados a pH 7.9 para remover los perturbantes proteicos. La urea y el cloruro de guanidina fueron funcionales en el proceso de solubilización, en tanto que el octil-glucósido y el desoxicolato de sodio fueron inefectivos (figura 26). Paralelamente la actividad CFBPasa de la proteína solubilizada fue analizada a altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} en presencia de DTT 10 mM (tabla I). Nuevamente, la urea y el cloruro de guanidina fueron más efectivos en la recuperación de la actividad enzimática de la proteína de fusión contenida en los cuerpos de inclusión. Experimentos preliminares mostraron que este proceso requiere estrictamente DTT durante la solubilización y la activación de la enzima. Por ello en los experimentos posteriores se incluyó 5-10 mM DTT durante ambos procesos. Además, se agregó glicerol 10% para estabilizar la actividad catalítica durante el almacenamiento de GST-CFBPasa .

La actividad CFBPasa de los cuerpos de inclusión (0,07 U/mg) fue 30 veces inferior a la actividad CFBPasa de la enzima renaturalizada (1.5-2.5 U/mg. prot.). Este último valor fue similar a la actividad CFBPasa de la GST-CFBPasa soluble purificada por columnas de Glutation-agarosa (1.5 U/mg.prot.), pero fue inferior a las actividades específicas observadas con las contrapartes purificadas de hojas de espinaca y colza (40-50 U/mg. prot.). Si bien las enzimas nativas de hojas son 30 veces más activa, debe tenerse en cuenta que la enzima recombinante es una proteína de fusión cuya estructura primaria difiere de la contraparte foliar.

A fin de caracterizar y descartar la presencia de ácidos nucleicos contaminantes, la GST-CFBPasa

renaturalizada fue analizada espectrofotométricamente. La figura 27 muestra el espectro de absorción de la enzima solubilizada por urea 6 M, y la cuarta derivada correspondiente. El espectro de absorbancia de la enzima solubilizada con urea 6 M posee un máximo ca. 280 nm cuya relación respecto a 260 nm ($A_{280}/A_{260}=1.48$) indica un contenido de ácidos nucleicos menor del 0.5%. Además, los picos a 284 nm y a 292 nm en la cuarta derivada del espectro, característicos de los residuos tirosina y triptofanos, evidencian una alta proporción proteica.

TABLA 1
DESNATURALIZACION Y RENATURALIZACION DE LA CFBPasa

AGENTE DESNATURALIZANTE	ACTIVIDAD RELATIVA (%)	
UREA 6M	83	
Na ₂ CO ₃ 0,5M	HCl de GUANIDINA 5M	100
DTT 5mM	N-OCTIL-B-D-GLUCO-PIRANOSIDO 30 mM	1,6
EGTA 1mM	DESOXICOLATO de SODIO 1%	6
pH 12	-	2
TRIS-HCl 30mM		
DTT 5mM	-	11
EGTA 1mM		
pH 8		

Los Cuerpos de Inclusión fueron (a) incubados durante 1.5 horas a 37°C en 0.4 M Na₂CO₃ (pH 12) conteniendo 5 mM DTT, 1 mM EDTA y el perturbante indicado, (b) dializados dos veces durante 16 horas contra buffer Tris-HCl 30 mM (pH 7.9), 0.02 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 0.04% (v/v) 2-mercaptoetanol y (c) centrifugados durante 10 minutos a 10000xg. La actividad CFBPasa se determinó como se explica en Materiales y Métodos. Control: 1.8 U/mg. prot.

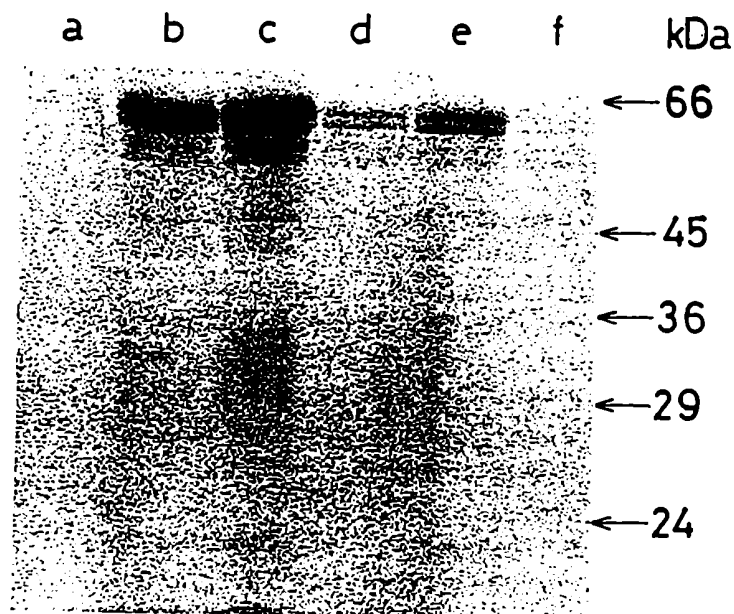


Figura 26. Efecto de los perturbantes sobre la fracción insoluble de los lisados de *E. coli*. Los Cuerpos de Inclusión fueron tratados como se explica en la leyenda de la TABLA 1. El sobrenadante clarificado se sometió a SDS-PAGE. Durante el proceso de desnaturalización ("unfolding") la GST-CFBPasa fue incubada a a pH8 (carril f) o a pH 12 sin agregados (carril a), o en presencia de: urea 6 M (carril b), cloruro de guanidina (carril c), 30 mM octil- β -D-glucosido (carril d) o 1% (p/v) desoxicolato de sodio (carril e).

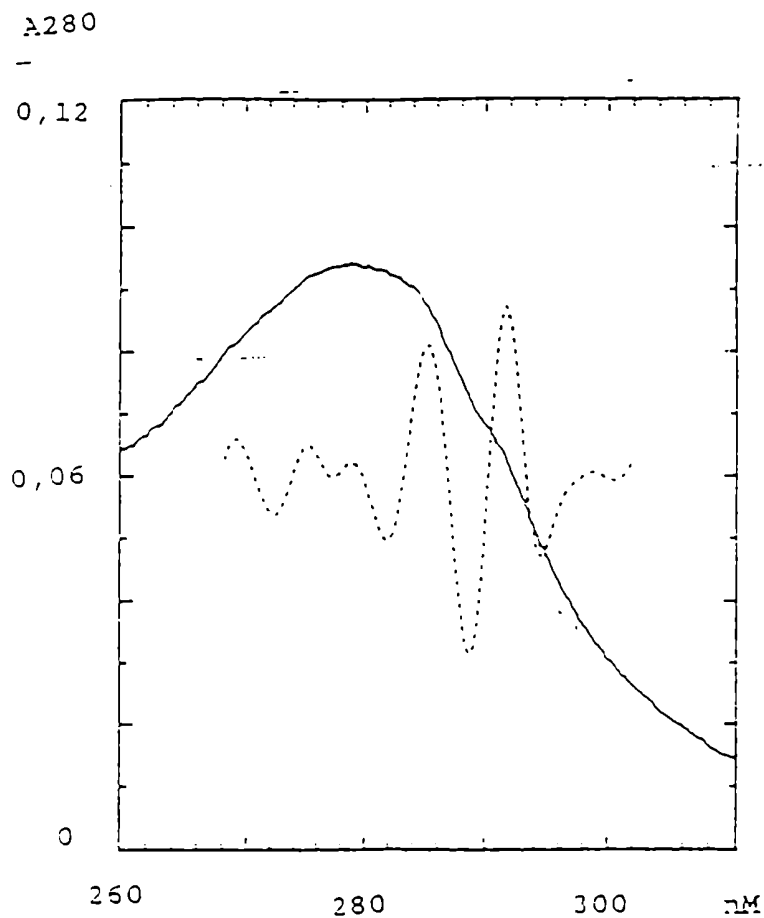


Figura 27. Espectro de Absorción de la GST-CFBPasa solubilizada en urea 6M (-) y su cuarta derivada (...).

B) Efecto del ditioneitol sobre la actividad CFBPasa de la GST-CFBPasa.

Si bien altas concentraciones de DTT (10 mM) en incubaciones prolongadas (24 horas) estimulan la actividad

de la CFBPasa de espinaca, menores concentraciones son requeridas en presencia de un azúcar bisfosfato, un catión bivalente y la Trx-f (Zimmermann et al., 1976; Hertig and Wolosiuk, 1983; Schurmann and Wolosiuk, 1978). Otros ditiolos (glicol dimercaptoacetato, glicol dimercaptopropionato, 2,3-dimercaptopropanol) también estimulan la actividad enzimática en tanto los monotioles son menos efectivos (Corley and Wolosiuk, 1985). Estos resultados condujeron a ensayar la acción de los tioles sobre la proteína quimérica. Luego de solubilizar la GST-CFBPasa, la incubación en presencia de DTT (5 mM) incrementó la actividad catalítica cuatro veces (figura 28). Además, la enzima que fuera inactivada por oxidación al aire recuperó su actividad original luego de incubarla con 5 mM DTT durante 2 horas. En cambio a una concentración de 20 mM, los monotioles (dietilaminoetanetiolo, tioglicolato, β -mercaptoetanol) no superaron el 20% de la activación obtenida con DTT. Los estudios paralelos realizados en el laboratorio mostraron que (1) la acción concertada del Ca^{2+} y del FBP aumentó 20% la activación mediada por DTT y (2) extractos de cloroplastos de espinaca enriquecidos en tiorredoxina estimularon la activación de la CFBPasa de trigo contenida en la proteína de fusión.

Estos resultados indican que los factores implicados en el proceso de activación de las formas nativas de la CFBPasa contribuyen a la recuperación de la actividad catalítica en la proteínas de fusión (Hertig and Wolosiuk, 1980, 1983; Corley and Wolosiuk, 1985; Stein and Wolosiuk, 1987; Prat Gay et al., 1991).

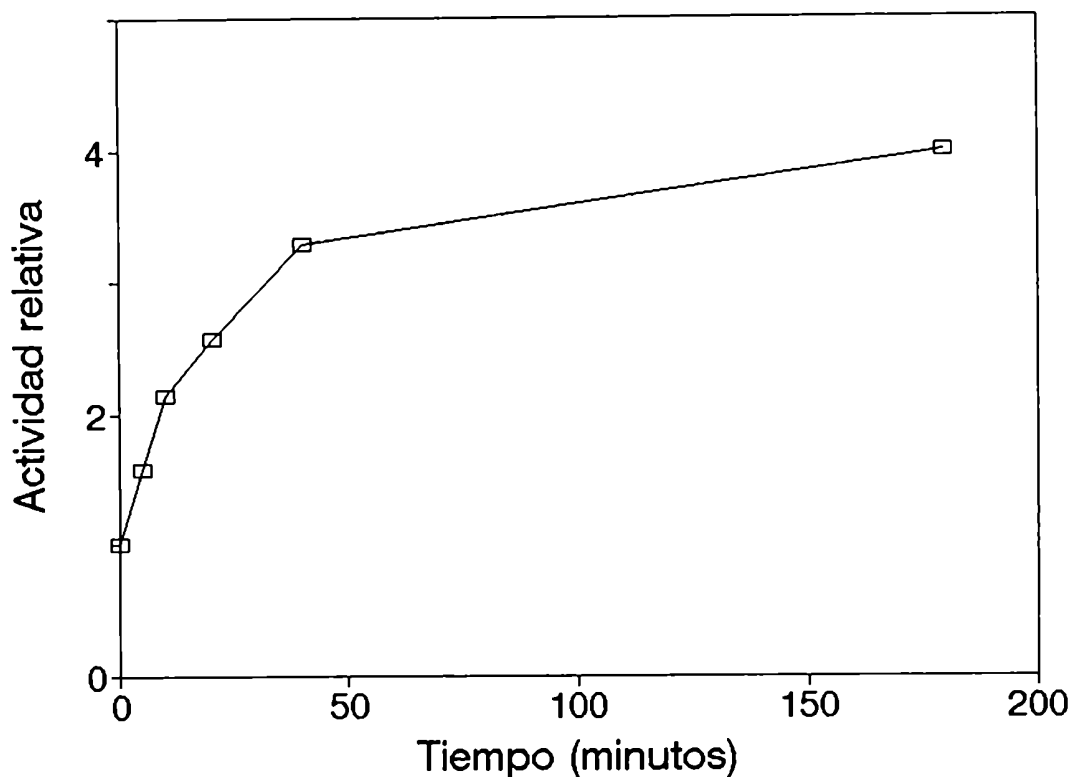


Figura 28. Efecto del DTT sobre la actividad CFBPasa. La GST-CFBPasa renaturalizada (100 $\mu\text{g/ml}$) fue preincubada con Tris-HCl 30 mM pH 7.9, en presencia de 5 mM DTT (23°C). Alícuotas (2 μg) fueron extraídas a los tiempos indicados y la actividad enzimática se midió a altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} en presencia de 5 mM DTT durante 20 minutos ($V=0.2$ ml). El DTT que acompañó a la enzima en la inyección (500 μM), no ejerció un efecto activador sobre la catálisis.

C) Características catalíticas de la proteína de fusión

La GST-CFBPasa solubilizada a pH 7.9 con urea 6 M y DTT 5 mM, fue dializada contra 30 mM Tris-HCl pH 7.9 e incubada durante una hora con DTT 5 mM. A fin de caracterizar la

especificidad catalítica y descartar fosfatasas inespecíficas, la catálisis se ensayó en presencia de DTT 5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, EGTA 0.05 mM y diferentes compuestos fosforilados (2.5 mM), (fosfoenol piruvato, glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato, sedoheptulosa 1,7-bisfosfato, ribulosa 1,5-bisfosfato, adenosina difosfato, fructosa 1,6-bisfosfato, ácido fosfoglicérico, ribosa 5-fosfato). Tomando la actividad en presencia de fructosa 1,6-bisfosfato como 100% solamente la hidrólisis de sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa alcanzó 23%, en tanto que los demás compuestos fosforilados ensayados no fueron sustratos alternativos para la enzima reactivada. Por otra parte, $22\mu M$ de Ca^{2+} y $32\mu M$ Ca^{2+} inhibió un 50% la actividad catalítica en presencia de bajas y altas concentraciones de Mg^{2+} , respectivamente. Cualitativamente estos resultados son similares a los observados con la actividad catalítica de la CFBPasa de espinaca (Hertig and Wolosiuk, 1983).

D) Efecto de otros moduladores sobre la actividad catalítica de la proteína de fusión

Estudios previos mostraron que los cosolventes y los aniones caotrópicos reemplazan a la tiorredoxina en la estimulación de la activación enzimática (Stein and Wolosiuk, 1987). Para establecer si estos perturbantes proteicos ejercían un efecto similar sobre la proteína de fusión, la enzima solubilizada se incubó en presencia de DTT (5 mM), FBP (2.5 mM), Ca^{2+} (0.4 mM) y 2-propanol 15% y luego se midió su actividad. A diferencia de la CFBPasa de espinaca (Corley and Wolosiuk, 1985), el 2-propanol inactiva a la GST-CFBPasa (figura 29). Una concentración de 3.5% de 2-propanol durante la fase de activación inhibió el 50% de la actividad enzimática. Congruente con la separación experimental de las fases de activación y catálisis, una concentración menor de 2-propanol (1.5%) durante el ensayo

de actividad produjo una inhibición similar (datos no mostrados). La inhibición fue total cuando además de 2-propanol durante la activación (15%), se midió la catálisis en presencia del cosolvente (1.5%) (cf. figura 29).

Por otra parte, 0.15 M NaTCA no modificó la actividad CFBPasa de la proteína quimérica (figura 30). A la concentración que potencia 10 veces la actividad de la enzima de espinaca (Stein and Wolosiuk, 1987), el anión caotrópico fue inefectivo y pasados los 30 minutos de incubación comenzó su efecto desnaturalizante. En este aspecto la GST-CFBPasa contrasta con la CFBPasa de trigo (cf. fig. 44) cuya actividad es estimulada por el NaTCA.

OTRAS ESTRATEGIAS PARA RECUPERAR LA ACTIVIDAD CATALITICA DE GST-CFBPasa

En los estudios descritos, la GST-CFBPasa recuperó la actividad catalítica luego de remover por diálisis los perturbantes proteicos. Con el objetivo de disponer otras alternativas para el análisis de la recuperación de la actividad enzimática se ensayaron otras estrategias (Esquema II). Los cuerpos de inclusión fueron tratados con urea 6 M en presencia de DTT 5 mM, y luego sometidos a dilución o a filtración molecular para disminuir la concentración de los perturbantes.

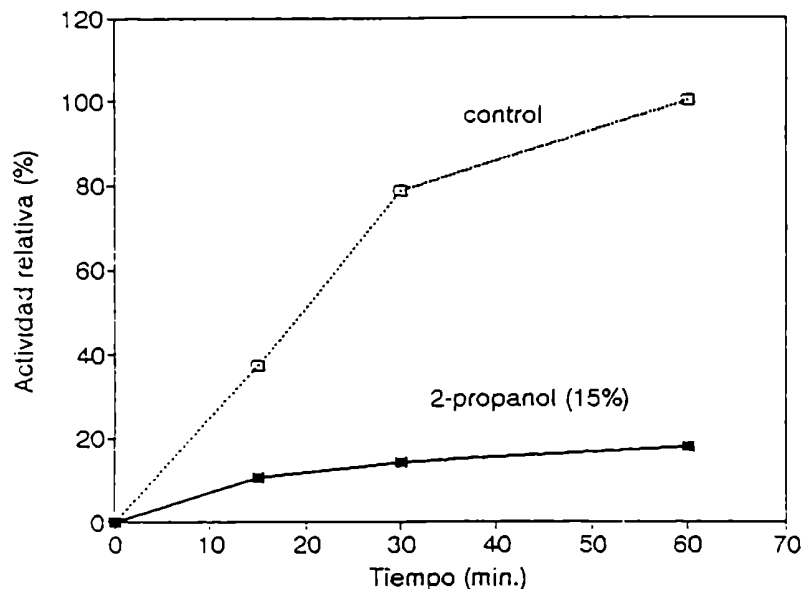


Figura 29. Efecto del 2-Propanol sobre la GST-CFBPasa. La proteína de fusión GST-CFBPasa renaturalizada (6 μ g) fue incubada durante los tiempos indicados, en 50 mM Tris-HCl (pH 7.9) conteniendo 5 mM DTT, 2:5 mM FBP, 0.2 mM CaCl_2 y 2-propanol 15% (v/v) ($V=0.1$ ml). La actividad CFBPasa de las alícuotas (1.2 μ g) fue ensayada durante 30 minutos a 23°C en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} (1 mM de cada uno) ($V=0.2$ ml). Actividad máxima= 1.8 U/mg prot.

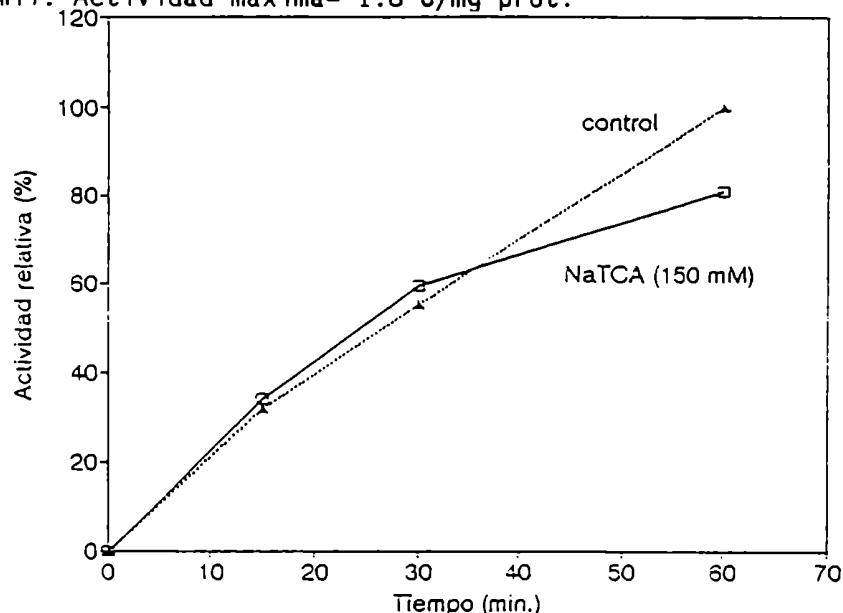
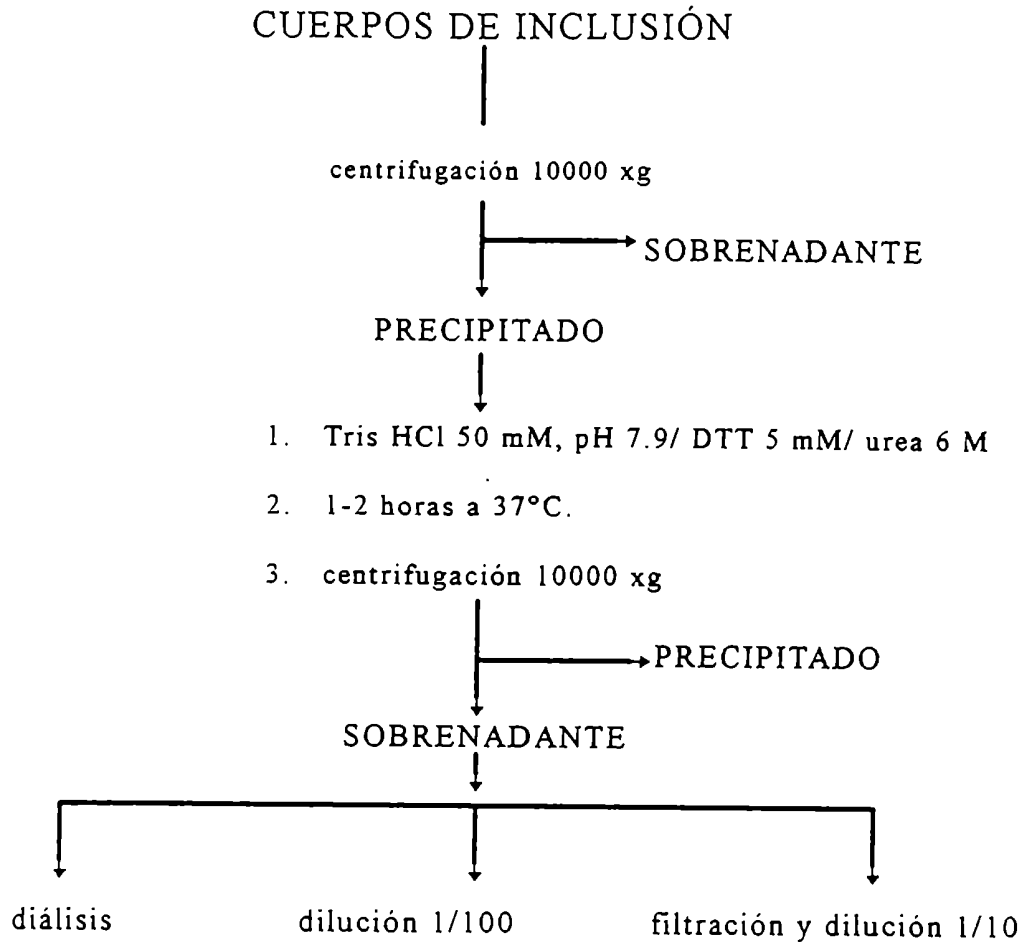


Figura 30. Efecto del NaTCA sobre la GST-CFBPasa. La proteína de fusión renaturalizada (7 μ g) fue incubada durante los tiempos indicados, en 50 mM Tris-HCl (pH 7.9) conteniendo 5 mM DTT, 2.5 mM FBP, 0.4 mM CaCl_2 y 0.15 M NaTCA ($V=0.1$ ml). La actividad catalítica de las alícuotas (1.4 μ g) fue ensayada a 23°C durante 20 minutos, en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} (1 mM de cada uno) y NaTCA 15 mM ($V=0.2$ ml). Actividad máxima=2 U/mg prot.

ESQUEMA II



A) Recuperación de la actividad CFBPasa de la proteína quimérica mediante la dilución del perturbante proteico.

La dilución es una estrategia que presenta ventajas respecto de la diálisis en el estudio de los cambios conformacionales ocurridos en la proteína durante el fenómeno de renaturalización. Permite usar determinados moduladores, efectores y anticuerpos en las soluciones de dilución para evidenciar los cambios estructurales que ocurren durante la renaturalización y recuperación de la

actividad enzimática. Simultáneamente facilita el empleo de técnicas espectrométricas para estudiar la cinética del fenómeno.

A.1) Efecto del DTT, FBP y Ca^{2+} .

Los cuerpos de inclusión fueron (1) resuspendidos en urea 6 M y DTT 5 mM, (2) incubados durante 1 hora a 37°C y (3) centrifugados. El sobrenadante fue diluido 100 veces en Tris HCl 30 mM (pH 7.9) a 0°C, y al cabo de 20 horas se ensayó la actividad CFBPasa en presencia y ausencia de DTT. La figura 31 muestra que la actividad GST-CFBPasa no superó las 0.3 U/mg. prot. y se detectó únicamente en presencia del reductor. Sobre esta base, y teniendo en cuenta los resultados previos que indicaban actividades específicas superiores obtenidos en los experimentos de diálisis (1.5-2 U/mg), los ensayos de renaturalización y las determinaciones de actividad posteriores se realizaron en presencia de DTT 5-10 mM.

Experimentos realizados en el laboratorio con la CFBPasa de cloroplastos de espinaca mostraron que el FBP y el Ca^{2+} modulan positivamente la actividad de la enzima de espinaca (Hertig and Wolosiuk, 1983) e impiden la pérdida de actividad originada por la alteración de las interacciones no covalentes (Ballicora and Wolosiuk, 1994). Con el fin de determinar el efecto de los moduladores [el Ca^{2+} , el FBP y el DTT] (Hertig and Wolosiuk, 1980, 1983) sobre la funcionalidad de la GST-CFBPasa, la preparación tratada con urea y DTT, fue diluida en soluciones conteniendo: a) DTT; b) FBP y Ca^{2+} ; y c) FBP, Ca^{2+} y DTT (figura 32). La presencia constante del reductor durante el ensayo de renaturalización (dilución) aumentó la actividad enzimática. Por otra parte, el FBP y el Ca^{2+} ejercieron inicialmente efecto potenciador pero decayó luego de 6 horas post-dilución. Como la ausencia del reductor también presenta un perfil similar es posible que ciertos grupos -SH esenciales

para la actividad catalítica fueran oxidados en las 6 horas post-dilución. En cambio la combinación de los tres moduladores favorece sinérgicamente la recuperación de la funcionalidad y estabilidad de la enzima. Estos resultados confirman la importancia del DTT y del efecto positivo que los azúcares bisfosfato y metales bivalentes ejercen sobre la estabilidad funcional de las CFBPasas cloroplásticas.

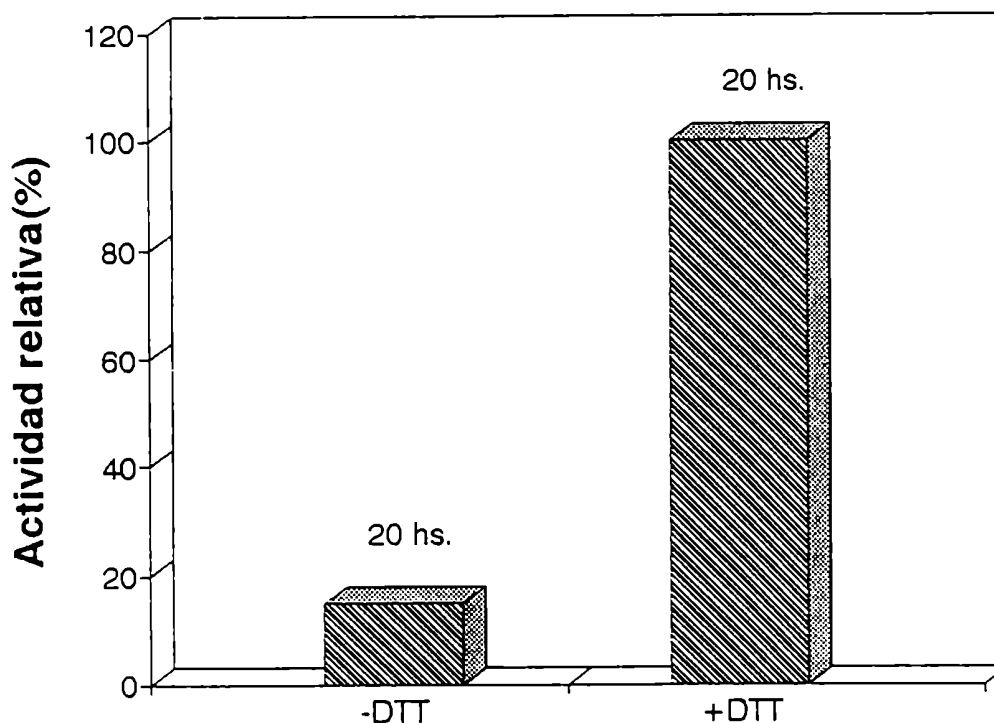


Figura 31. Recuperación de la actividad CFBPasa por dilución de la proteína de fusión desnaturalizada. La preparación de cuerpos de inclusión se resuspendió en Tris-HCl 30 mM, pH 7.9, en presencia de urea 6 M y DTT 5 mM. Luego de 1 hora de incubación a 37°C con agitación suave, se centrifugó y el sobrenadante se diluyó 100 veces en Tris-HCl 30 mM, pH 7.9 a 0°C. Al cabo de 20 horas se determinó la actividad CFBPasa en Tris-HCl 30 mM, pH 7.9 y altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} (2.5 mM y 10 mM respectivamente), en presencia o ausencia de DTT 5 mM ($V=0.2$ ml). Actividad máxima= 0.3 U/mg. prot.

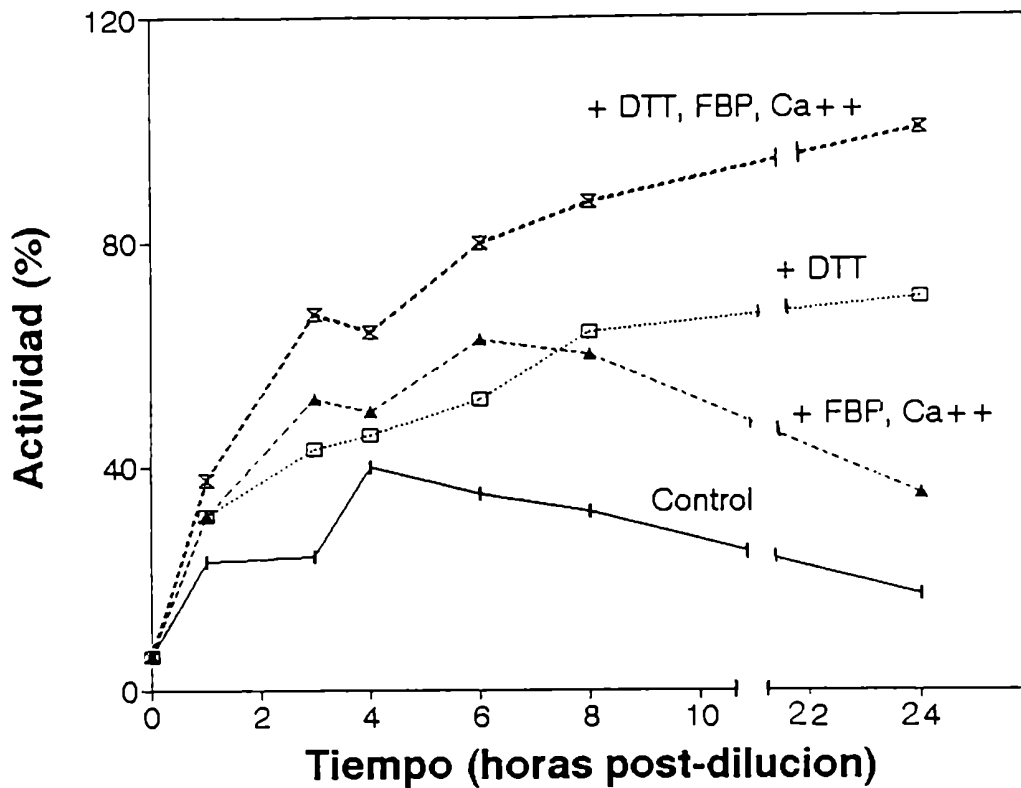


Figura 32. Efecto de DTT, FBP y Ca^{2+} en la reactivación de la CFBPasa. La preparación de cuerpos de inclusión se resuspendió en Tris-HCl 30 mM, pH 7.9, en presencia de urea 6 M y DTT 5 mM. Luego de 1 hora de incubación a 37 °C con agitación suave, se centrifugó y el sobrenadante se diluyó 70 veces en buffer Tris-HCl 30 mM (pH 7.9) conteniendo, cuando se especifica, DTT 5 mM, FBP 1 mM y CaCl_2 0.1 mM. Se determinó la actividad CFBPasa a los tiempos indicados, sobre alícuotas de la preparación (6 μg) en Tris-HCl 30 mM, pH 7.9, altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} (2.5 mM y 10 mM respectivamente) y DTT 5 mM ($V=0.2$ ml). Actividad a las 24 hs en presencia de DTT, FBP y Ca^{2+} = 1.8 U/mg. prot. = 100%.

A.2) Efecto de la temperatura.

Ante la posibilidad de que la temperatura pudiera ser un factor importante en la cinética de la recuperación, la muestra fue diluida a 0 °C y a 24 °C en Tris-HCl 30 mM (pH 7.9) y DTT 5 mM y luego la actividad enzimática fue ensayada

según se describe en Materiales y Métodos (figura 33). La recuperación de la capacidad funcional a 24°C no sólo fue 25 % mayor que la obtenida a 0°C sino también más rápida, ya que los $t_{0.5}$ fueron 2.5 horas y 4 horas, respectivamente.

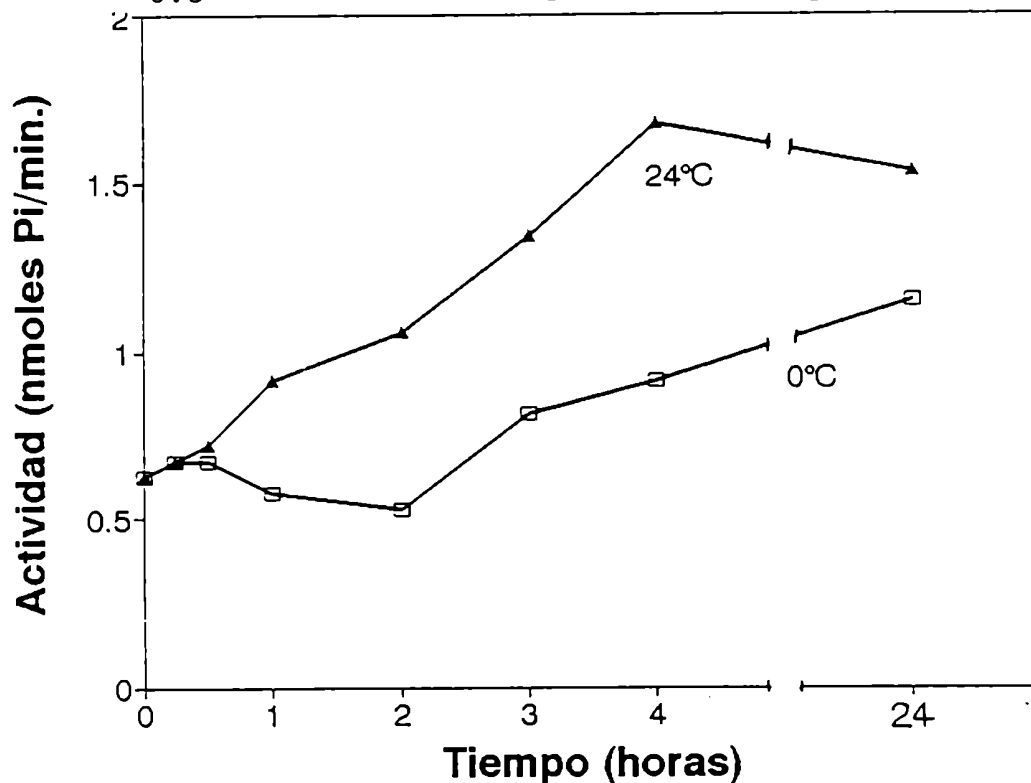


Figura 33. Efecto de la temperatura en la recuperación de la actividad CFBPasa. La preparación de cuerpos de inclusión tratada como se indica en la figura 32, se diluyó 100 veces en Tris-HCl 30 mM, pH 7.9 conteniendo 5 mM DTT, a 0°C y a 24°C. A los tiempos indicados se determinó la actividad CFBPasa en Tris-HCl 30 mM, pH 7.9, altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} (2.5 mM y 10 mM respectivamente) y DTT 5 mM ($V=0.2$ ml).

A.3) Efecto de los anticuerpos.

Durante el fenómeno de replegamiento o "refolding" de las proteínas ocurren, en los distintos dominios de la molécula, plegamientos locales con diferentes cinéticas que desplazan el equilibrio hacia las formas correctamente plegadas o estabilizan conformaciones incorrectas. La característica fundamental de los anticuerpos radica en su estructura tridimensional que reconoce específicamente al

antígeno. Para analizar el efecto de los anticuerpos policlonales preparados contra la proteína de fusión (Ab-GST-CFBPasa) y contra la GST (Ab-GST), los cuerpos de inclusión solubilizados fueron diluidos en presencia del reductor y (a) Ab-GST, (b) Ab-GST-CFBPasa, o (c) un suero normal. La figura 34 muestra que el Abdirigido al dominio GST de la proteína quimérica aumentó 15 % la fracción de enzima activa. Si bien el incremento fue bajo, su persistencia sugiere que la estabilización del dominio GST lleva a una mayor recuperación de la estructura funcional activa de la CFBPasa.

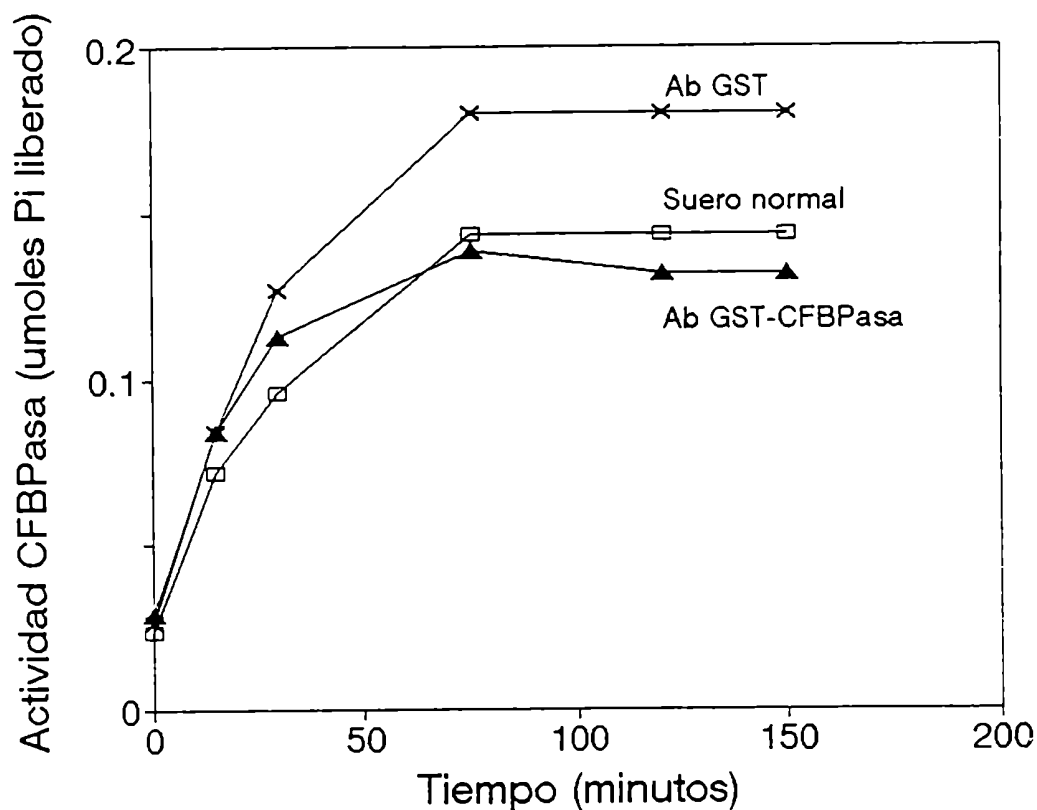


Figura 34. Efecto de los anticuerpos sobre la recuperación de la CFBPasa. La GST-CFBPasa fue incubada en buffer Tris-HCl 30 mM, pH 7.9, en presencia de 6 M urea, 5 mM DTT y 0.2 mM EGTA, durante 1.5 horas a 37°C. Luego, alícuotas idénticas fueron diluidas 70 veces en Tris-HCl 30 mM, pH 7.9, DTT 5 mM y (a) Ab-GST; (b) Ab-GST-CFBPasa y (c) suero normal [dilución de Ab 1/170]. Se determinó la actividad CFBPasa a tiempos variables después de la dilución, en altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} y DTT 5 mM.

B) Recuperación de la actividad catalítica por filtración molecular

A fin de optimizar la renaturalización de la CFBPasa, se ensayó la eliminación de la urea mediante filtración en una columna de Sephadex G-25. Las fracciones eluidas fueron diluidas 10 veces en Tris HCl 30 mM (pH 7.9)/ 5 mM DTT previo al ensayo de actividad. La actividad aumentó 1.4 veces luego de 24 horas post-dilución. En este experimento preliminar, la enzima fue ensayada por 50 minutos en presencia de altas concentraciones de FBP, Mg^{2+} y DTT. Estas condiciones pueden favorecer la activación de la enzima por el sustrato y el cofactor. La tabla II muestra que este es el caso. La actividad a las 20 horas post-dilución permaneció relativamente constante pero la correspondiente al momento de la dilución aumentó dos veces con el tiempo de ensayo. Claramente, la actividad enzimática debe ser medida en tiempos cortos para minimizar la activación por el reductor, el sustrato y el cofactor durante el proceso catalítico.

Tiempo post-dilución (horas)	Actividad CFBPasa (nmol/min)		
	Tiempo de ensayo		
	14 min	30 min.	50 min.
0	1,03	1,6	2,16
2	3,4	3,5	3,12
actividad relativa	3,3	2,18	1,44

TABLA II. Renaturalización de la proteína de fusión GST-CFBPasa mediante la remoción de la urea por filtración molecular. La preparación de cuerpos de inclusión tratada como se explica en la figura 34, se sembró en una columna de filtración molecular Sephadex G-25 (1 x 5 cm). Luego de recuperar las fracciones conteniendo la proteína, se las diluyó 10 veces en Tris-HCl 30 mM, pH 7.9, y 5 mM DTT. La actividad CFBPasa se determinó después de 0 y 120 minutos de la dilución, según se indica en la figura 34.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LA PROTEINA DE FUSION.

La estructura cuaternaria de las CFBPasas de espinaca, arveja y colza son similares; i.e. un tetrámero constituido por subunidades idénticas (c.a. 40 kDa). Para determinar el peso molecular (PM) de la forma activa, la GST-CFBPasa fue sometida a filtración molecular (Ultrogel-ACA 34), estimándose la enzima por ensayos de actividad y por fluorescencia. El patrón de elución de la actividad CFBPasa (figura 35a) correspondió a una proteína cuya masa molecular (ca. 140 kDa) era coherente con una especie formada por dos polipéptidos GST-CFBPasa (figura 35b). De manera que, en contraste con los homotetrámeros de las CFBPasas nativas, la forma activa de la proteína de fusión se ensambló como un dímero. El perfil de elución analizado por fluorescencia también mostró la presencia de componentes de alto y bajo peso molecular (figura 35, a) desprovistos de actividad catalítica. Como la muestra sembrada en la columna está constituida por monómeros cuya masa molecular es ca. 65 kDa (cf. figura 26), es posible inferir que los primeros constituyen agregados proteicos y los segundos los monómeros de la misma especie, ambos catalíticamente inactivos.

En la mayoría de los organismos estudiados las Glutation S-transferasas constituyen una familia de proteínas diméricas (homo y hetero dímeros c.a 50 kDa) (Simons and Jagt, 1977; Mannervick et al., 1985; Trottein et al., 1992; Tomarev et al., 1993; Ahmad et al., 1993; Smith et al., 1986). Ello sugiere que la estructura cuaternaria de la forma activa de la GST-CFBPasa estaría determinada por la interacción entre los "dominios" de GST de cada monómero de proteína de fusión. Para corroborar esta suposición la GST de S. japonicum fue expresada en E. coli y purificada mediante cromatografía en Glutation-agarosa. El perfil de la purificación se ve en la figura 36. Los análisis de la GST por SDS-PAGE y filtración molecular indican que la proteína

expresada en la bacteria también es un dímero y que la interacción entre las dos subunidades esta basada en interacciones no covalentes (figuras 37a y b). Estos resultados y las evidencias de que los puentes disulfuro en la CFBPasa de espinaca son intrasubunitarios (Villeret et al., 1995), sugieren que la reducción de puentes disulfuro, necesaria para la actividad de la CFBPasa de la proteína de fusión, ocurre en las subunidades de la enzima dimérica. Además, los resultados muestran que dos polipéptidos fusionados -uno con tendencia a la dimerización y el otro proclive a la formación de tetrámeros- determinan una estructura cuaternaria que semeja a uno de ellos.

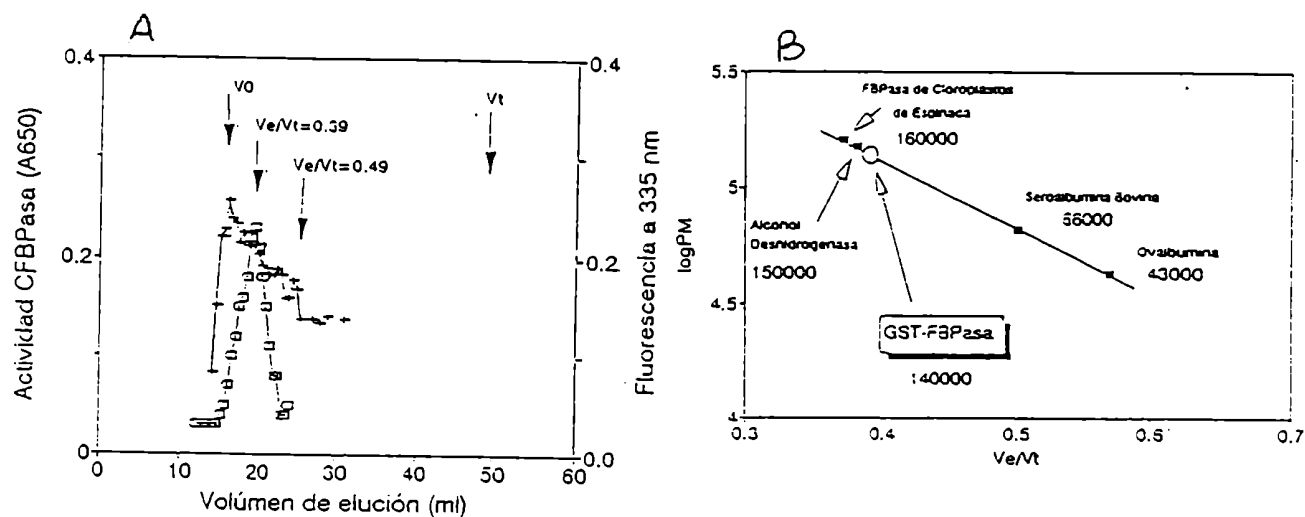


Figura 35. Determinación del peso molecular de la GST-CFBPasa. (A) Cromatografía en Ultrogel ACA 34 de la proteína de fusión renaturalizada. La proteína (500 μ g) fue sembrada en una columna (1 x 67 cm), en presencia de Tris-HCl 30 mM, pH 7.9 eluida con un flujo de 5 ml/h. El perfil de elución se analizó mediante la emisión de fluorescencia a 335 nm (excitación: 280 nm). La actividad CFBPasa fue determinada a altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} y en presencia de DTT 10 mM. V_0 representa el volúmen de elución del azul dextrano y V_t el volúmen de elución del Pi (7 μ moles) que acompaña a la muestra cuando se siembra, determinado por el método de Chen (Chen et al., 1966). V_e = volúmen de elución.

(B) Determinación gráfica del Peso Molecular por comparación con proteínas estándares que se sometieron a filtración en geles Ultrogel ACA 34.

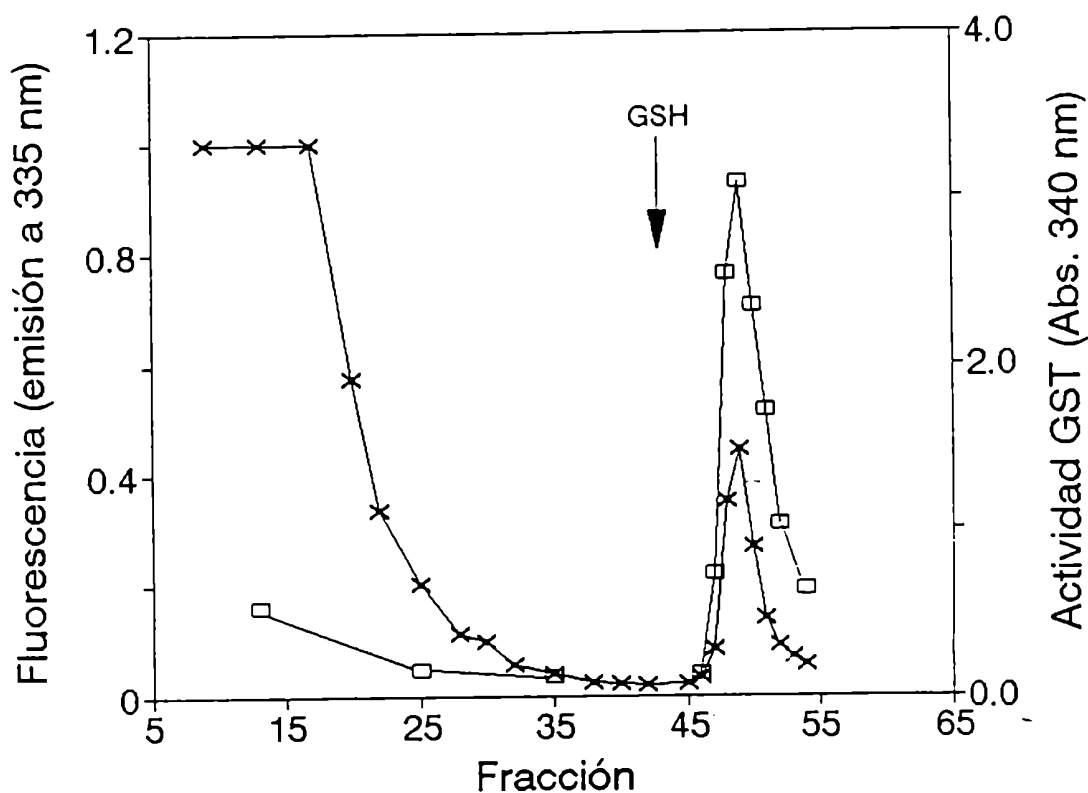


Figura 36. Cromatografía en columna de glutation agarosa de la fracción soluble de *E. coli* expresando la GST de *S. japonicum*. La fracción soluble del lisado bacteriano (10 ml) fue dializada contra Tris-HCl 30 mM, pH 7.9 y filtrada a través de membranas de Millipore (0.6 μ m). Luego, 7.5 ml (3.8 mg/ml) fueron sembradas en una columna de glutation-agarosa (1 x 5 cm). La columna fue lavada con 10 ml de Tris-HCl 30 mM, pH 7.9 y la proteína adsorbida eluida con 10 ml del mismo buffer conteniendo 10% de glicerol y 5 mM GSH. Se determinó la fluorescencia a 335 nm y la actividad GST como se explica en Materiales y Métodos.

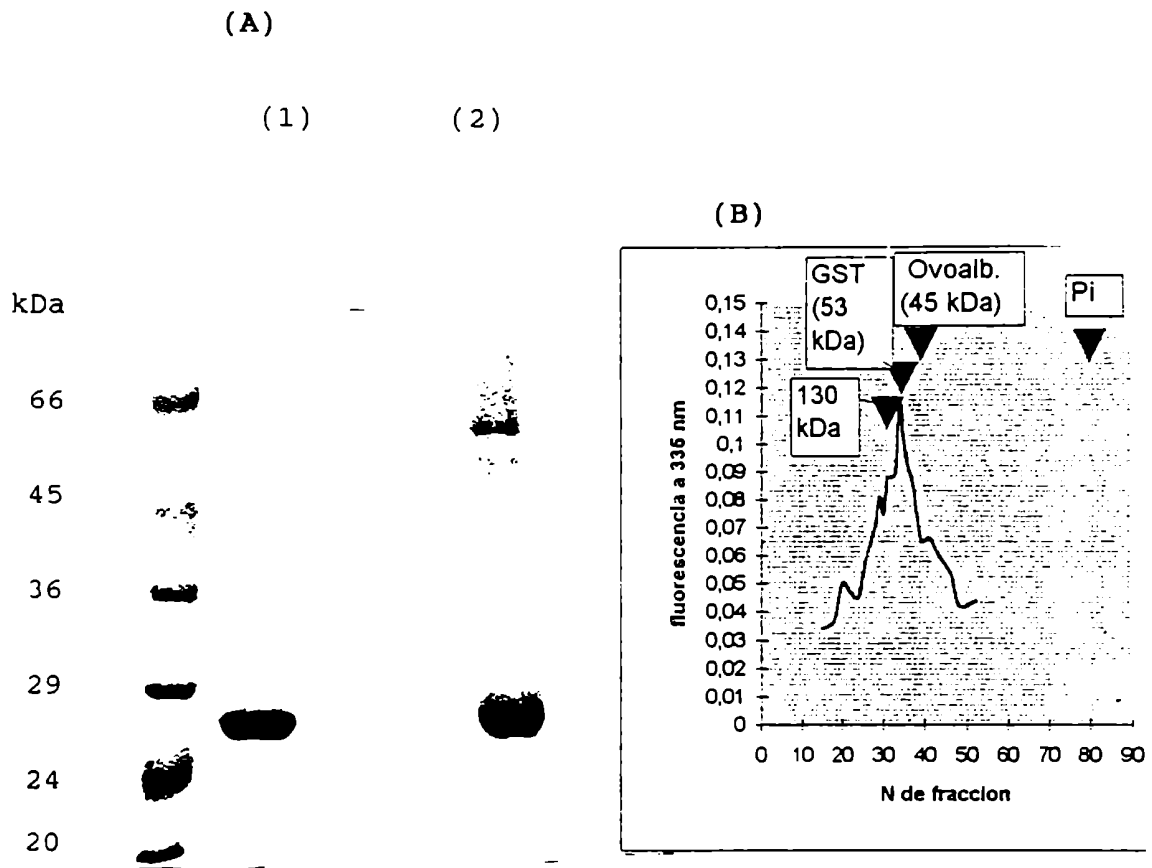


Figura 37. Caracterización de la GST (A) SDS-PAGE (11%) de la GST purificada a partir de *E. coli* transformadas con pGEX-1 e inducidas con IPTG, en presencia (1) o ausencia (2) de reductor. (B) Cromatografía en Ultrogel ACA 34 de la GST expresada en *E. coli*. La proteína (700 μ g) fue sembrada en una columna de Ultrogel ACA 34 (1 x 67 cm), en presencia de Tris-HCl 30 mM, pH 7.9 y y eluida con Tris-HCl 30 mM, pH 7.9 con un flujo de 5 ml/h. El perfil de elución se analizó mediante la emisión de fluorescencia a 335 nm (excitación: 280 nm). El Peso Molecular de la GST se determinó por comparación con el de proteínas estándares.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GST DE LA PROTEINA DE FUSION.

Las GST son enzimas diméricas, no alostéricas, cuyas subunidades individuales contienen un sitio activo completo, que cinética y estructuralmente es independiente de la subunidad vecina (Danielson and Mannervick, 1985). Establecida la actividad CFBPasa restaba conocer si la proteína de fusión poseía actividad GST. Para ello la actividad GST se determinó usando como sustratos 0.5 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno y 2.5 mM de glutation reducido. La actividad específica de la proteína de fusión (0.5 U/mg. prot.) fue el 25 % de la contraparte GST expresada en E. coli y purificada por cromatografía de afinidad (2 U/mg. prot.). Si consideramos que la porción GST representa un 40 % de la masa de la proteína de fusión, entonces la GST quimérica poseía un 60 % de la actividad observada en la GST recombinante.

TABLA III

	U/mg	U/mol GST
GST	2	53.2
GST-CFBPasa	0.5	32.5

EFECTO DE LA UREA SOBRE LA PROTEINA DE FUSION

La GST-CFBPasa presentó dos dominios bien definidos GST y CFBPasa dotados con la respectiva actividad enzimática. El dominio GST aportaría la capacidad dimerizante generando con ello la forma estructural que presenta actividad CFBPasa.

Si un desnaturizante afecta sensiblemente un dominio mientras no modifica el otro, entonces la respuesta de las actividades catalíticas al perturbante mostraría diferentes perfiles. Por ello la proteína de fusión renaturalizada mediante la técnica de diálisis se incubó por 16 horas a temperatura ambiente, en presencia de DTT y concentraciones variables de urea y luego se midieron las actividades CFBPasa y GST. Como se muestra en la figura 38, la actividad GST fue mucho más resistente a la desnaturización que la actividad CFBPasa. Esta última decayó rápidamente ($I_{0.5}=0.4$ M), en tanto que la primera permaneció constante hasta concentraciones de urea superiores a 2 M. La acción diferencial de la urea indicó claramente que las actividades catalíticas de la GST-CFBPasa residen en dos dominios con características estructurales independientes.

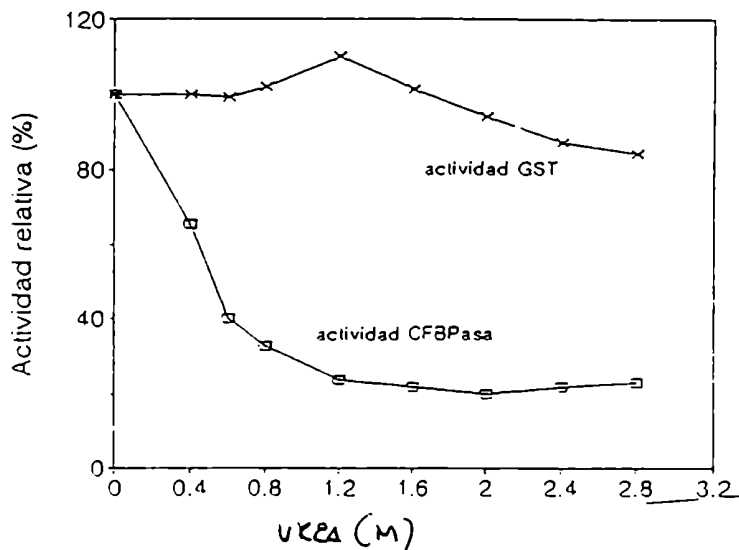


Figura 38. Efecto de la urea sobre las actividades catalíticas de la GST-CFBPasa. La proteína de fusión renaturalizada fue incubada durante 16 horas a 23 °C, en Tris-HCl 30 mM (pH 7.9), 5 mM DTT y concentraciones variables de urea (0-2.8 M). Las actividades GST y CFBPasa fueron determinadas en presencia de urea 140 mM según se especifica en Materiales y Métodos. (-x--x-) actividad GST, (-□--□-) actividad CFBPasa.

CONCLUSIONES

La agregación de proteínas heterólogas sobreexpresadas en sistemas bacterianos implica un problema conformacional. La conformación de las proteínas en los cuerpos de inclusión varía desde los estados prácticamente nativos, hasta los estados totalmente desnaturalizados. En esta última forma los polipéptidos "desarmados" se encuentran unidos covalentemente por puentes disulfuro o interaccionando no-covalentemente en ensamblados incorrectos. Recuperar la actividad biológica de las proteínas a partir de estos cuerpos de inclusión implica encontrar las condiciones óptimas para que la proteína adquiera en el espacio una estructura tridimensional similar a la nativa. En las proteínas eucariotas expresadas en sistemas procariotas este proceso es de sumo interés por ser requerido para la obtención de proteínas recombinantes de importancia económica, farmacológica o clínica. Para ello es necesaria la disrupción de los cuerpos de inclusión y la posterior resolubilización de sus proteínas constituyentes. Una vez solubles y desplegadas, las cadenas polipeptídicas deben recuperar su estado plegado nativo a fin de ser funcionalmente activas. Experimentalmente es posible llevar a cabo con relativa facilidad el desplegamiento de las proteínas pero es extremadamente dificultosa la reacción de plegamiento. Las condiciones óptimas para estos procesos (i.e pH, fuerza iónica, polaridad del solvente, poder reductor, etc) son particulares para cada proteína y deben ser determinadas empíricamente. Las proteínas oligoméricas imponen una restricción adicional al fenómeno de plegamiento *in vitro* ya que la asociación de subunidades se convierte en un paso crítico.

En la presente tesis el gen de la forma madura de la CFBPasa de trigo, en el que falta la secuencia que codifica los 20 aminoácidos del extremo N-terminal, fue clonado en un vector de expresión a continuación del gen de la GST. La expresión de este gen produjo en *E. coli* una proteína que fue recuperada en forma soluble y activa, con un rendimiento de 1-2 mg por litro de cultivo. Sin embargo, más del 90 % de la proteína quimérica particionó en los cuerpos de inclusión insolubles que presentaban muy baja actividad enzimática. Esta proteína quimérica insoluble recuperó su capacidad catalítica, tanto CFBPasa como GST, por la solubilización de los cuerpos de inclusión en presencia de urea 6M y DTT 5-10 mM. En este aspecto las tres estrategias ensayadas (la diálisis, la dilución y la filtración molecular) han sido efectivas para eliminar la urea y permitir la renaturalización de la proteína de fusión. Resulta interesante que la ausencia de los 20 aminoácidos de la región N-terminal de la CFBPasa de trigo no afecte la capacidad catalítica. Como se verá en la segunda parte de esta tesis, este hecho fue corroborado con la especie desprovista de la porción GST. De manera que una región altamente variable en las FBPasa, tanto cloroplásticas como no-cloroplásticas, no tendría participación en el mecanismo catalítico.

Simultáneamente aspectos estructurales y cinéticos de la GST-CFBPasa reconstituída fueron caracterizados. La actividad CFBPasa es activable por DTT y por Trx, en un proceso que es estimulado por FBP y Ca^{2+} . Si bien en estos aspectos la proteína de fusión semeja a la enzima de los cloroplastos de espinaca, la activación por moduladores no fisiológicos como NaTCA y 2-propanol no fue observada. Más bien la desaparición de la actividad catalítica indicó que estos perturbantes proteicos ejercieron solamente su conocido efecto desnaturalizante.

Por otra parte fue determinado que la estructura cuaternaria de la proteína de fusión con actividad CFBPasa

es un homodímero (peso molecular 140000). Este aspecto constituyó un resultado novedoso en el contexto de las CFBPasas. Las formas catalíticamente activas de las CFBPasas purificadas fueron homotetrámeros cuya subunidad tiene masa cercana a 40 kDa. Más aún la porción CFBPasa de la proteína de fusión utilizada en la segunda parte de esta tesis también se ensambló como un tetrámero funcional. Aunque la capacidad catalítica está reducida 10 veces, la proteína de fusión reveló que la forma tetramérica no es un requisito indispensable para la actividad CFBPasa. Aparentemente, la porción GST induce a la proteína de fusión a integrarse como un dímero, ya que las GST, tanto recombinantes como purificadas de diversos organismos, poseen una estructura dimérica.

Si bien la porción GST determina que el ensamblado de la GST-CFBPasa produzca un dímero, ambos dominios fueron funcionalmente independientes. Los ensayos de sensibilidad a la urea mostraron que la actividad catalítica de la GST no es alterada cuando la capacidad funcional de la CFBPasa fue anulada por modificaciones conformacionales.

RESULTADOS Y DISCUSION

SEGUNDA PARTE. ANALISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA CFBPasa DE TRIGO

La expresión de la CFBPasa de trigo fusionada al extremo GST generó en la fracción insoluble del lisado bacteriano una proteína quimérica con ambas actividades enzimáticas. Sin embargo, es esperable que la estructura y la función de la enzima cloroplástica esté afectada por la presencia del polipéptido adicional. Por ello, con la intención de obtener solamente la CFBPasa de trigo encaramos el clonado y la expresión del gen en un nuevo vector de expresión: el plásmido pET-22. Luego abordamos el estudio de las características cinéticas y estructurales de la proteína recombinante, obtenida en forma homogénea y funcional a partir de un cultivo de células de E. coli.

CLONADO DEL GEN DE LA CFBPasa DE TRIGO EN EL VECTOR DE EXPRESION pET-22.

El cdna que codifica para la CFBPasa de trigo, contenido en el plásmido pKH1, fue amplificado por PCR. Con este fin el oligonucléotido correspondiente al extremo 5' del gen contenía un sitio de restricción para la endonucleasa NdeI, en tanto que el correspondiente al extremo 3' poseía una secuencia específica para la endonucleasa BamHI:

a) oligonucléotido correspondiente al extremo 5' del gen

```

                NdeI
5'-C CGG GAA CAT ATG TAC GAC ATG ATC AC-3'
    sec.en                283----->
    pKH1                   Y  D  M  I
                          aa #71
  
```

RESULTADOS Y DISCUSION

b) oligonucleótido correspondiente al extremo 3' del gen

```

          BamHI      1298
5'-C CTA GGA TCC GTT CTA CTC TGA AGA CAA-3' (hebra complem.)
          STOP <-----
                E   S   S   L
          aa #409

```

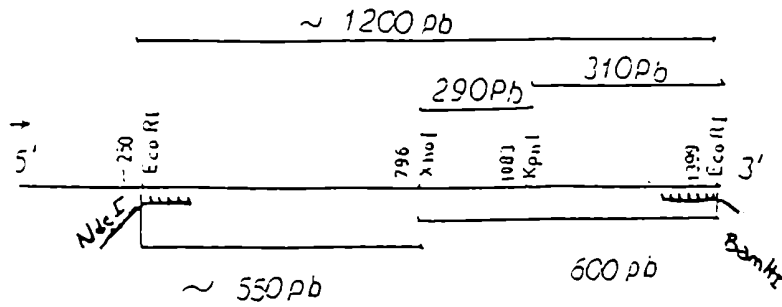
La metodología utilizada y los pasos realizados durante la reacción de amplificación están detallados en la sección de Materiales y Métodos. El fragmento obtenido (1 kbp), fue purificado, tratado con las enzimas de restricción NdeI y BamHI e insertado en los sitios respectivos del vector de expresión pET-22 (figura 39). Las bacterias recombinantes se caracterizaron por análisis de restricción utilizando las mismas endonucleasas a fin de determinar cuales eran los clones portadores del plásmido con el gen recombinante (pKH2).

INDUCCION DE LA CFBPasa DE TRIGO EN BACTERIAS RECOMBINANTES DE E. coli BL21.

La figura 40 muestra las proteínas presentes en los lisados de E. coli luego que la expresión del gen de la CFBPasa de trigo (38 kDa) fuese inducida con IPTG. Paralelamente a este evento la actividad CFBPasa en los lisados bacterianos aumentó con el tiempo de inducción (figura 41). Al cabo de 2 horas, la proteína inducida representó aproximadamente el 40% de las proteínas celulares totales encontrándose la mayor parte en la fracción soluble, en tanto una proporción minoritaria residía en el pellet insoluble. Dado que estos resultados sugerían que la proteína recombinante era la CFBPasa, se efectuó su purificación.

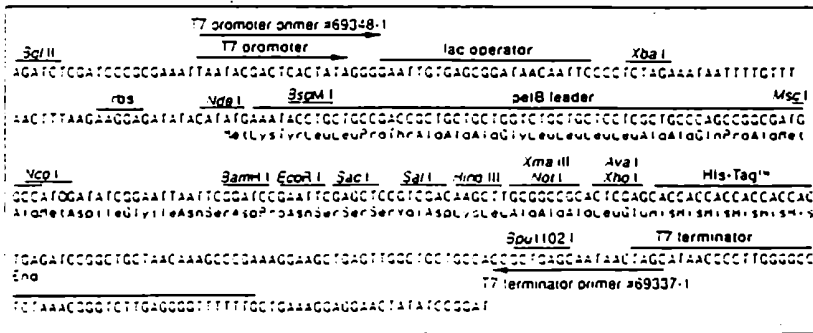
RESULTADOS Y DISCUSION

Gen de la CFBPasa

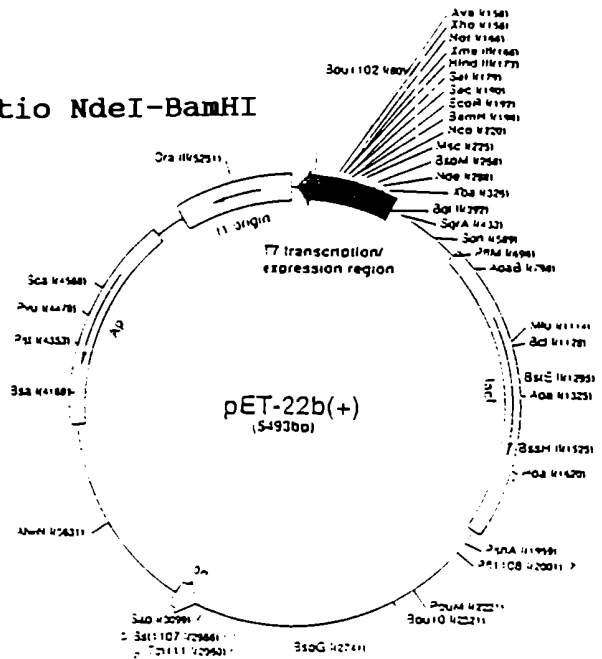


PCR

Ligación en el sitio NdeI-BamHI



pET-22b Cloning/Expression Region



Transformación *E. coli* DH5α y BL21

Análisis de restricción

Inducción con IPTG

Figura 39. Amplificación del gen de la CFBPasa. Clonado en el vector pET-22b(+). El gen de la CFBPasa (1.2 kbp), contenido en el plásmido pKH1, fue amplificado por PCR. El fragmento de DNA fue purificado y ligado en los sitios NdeI y BamHI del vector pET-22b(+). Luego de amplificar el plásmido obtenido (pKH2) en células de *E. coli* DH5α, fue transferido a *E. coli* BL21 y la expresión de la CFBPasa fue inducida en estas bacterias con 0.1 mM IPTG.

RESULTADOS Y DISCUSION

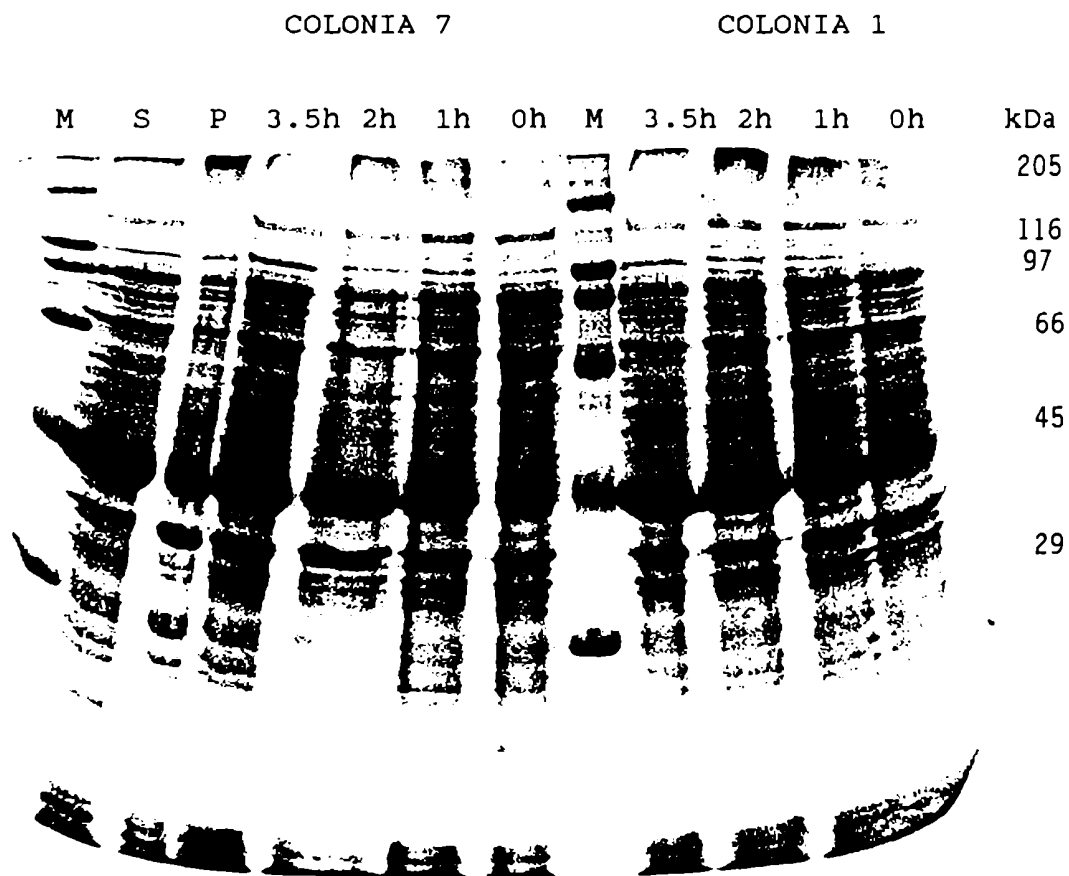


Figura 40. Análisis por SDS-PAGE de las proteínas de *E. coli* transformadas con pKH2. Luego de transformadas con pKH2 e inducidas por tiempos variables con IPTG, las células de *E. coli* fueron homogenizadas como se indica en Materiales y Métodos. Alícuotas de los lisados (30 μ g) (inducidos durante 1, 2 y 3.5 hs.) fueron analizadas por SDS-PAGE. S: Fracción correspondiente a las proteínas solubles después de 3.5 horas de inducción. P: fracción correspondiente a las proteínas insolubles después de 3.5 horas de inducción.

RESULTADOS Y DISCUSION

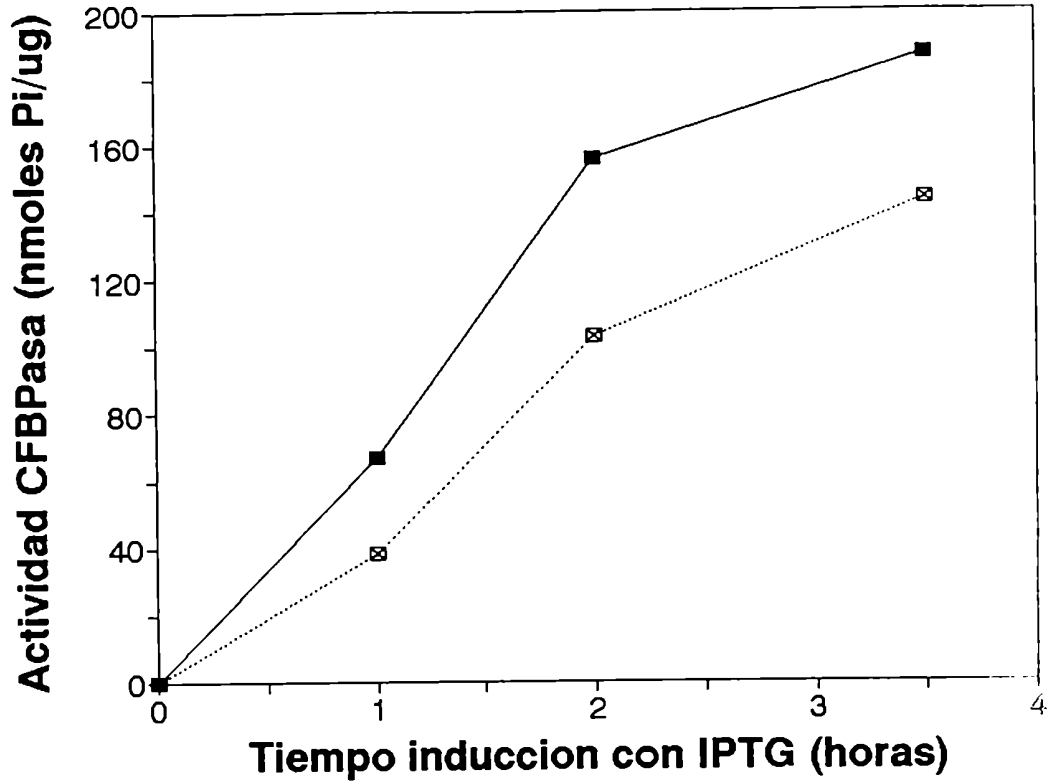


Figura 41. Actividad CFBPasa en los lisados de *E. coli* transformadas con pKH2.

La actividad CFBPasa se determinó sobre alícuotas (5 μ l) de los lisados de *E. coli* transformadas con pKH2 e inducidas durante tiempos variables con IPTG, según se explica en Materiales y Métodos.

- Colonia 1
- ◻ Colonia 7

PURIFICACION DE LA CFBPasa DE TRIGO EXPRESADA EN *E.coli*.

Las bacterias BL21 recombinantes inducidas con IPTG fueron centrifugadas y el precipitado resultante fue resuspendido en buffer TE (TrisHCl 50 mM (pH 8), EDTA 10

RESULTADOS Y DISCUSION

mM). Luego de congelar y descongelar la suspensión bacteriana, su disrupción se llevo a cabo mediante dos pasajes por French Press y posterior ultrasonicación (4 veces, 30 segundos). El lisado (38 ml) fue fraccionado con sulfato de amonio sólido entre 20% y 90% de saturación. El precipitado final fue resuspendido en 20 ml de acetato de sodio 30 mM (pH 5.5) conteniendo EDTA 0.2 mM y dializado dos veces contra el mismo buffer. La muestra (25 ml) se sembró en una columna de DEAE-celulosa previamente equilibrada con buffer acetato de sodio 30 mM (pH 5.5) conteniendo NaCl 20 mM. La columna se lavó con 3 volúmenes del buffer de equilibrio y la enzima se eluyó con 10 vol. de un gradiente lineal de NaCl [0.02 a 0.5 M] en el mismo buffer (figura 42). Similar a lo observado con otras CFBPasas, las fracciones conteniendo la mayor proporción de la actividad CFBPasa eluyeron a NaCl 0.25 M. Luego de juntar las fracciones (volumen de elución 350 ml-450 ml: pool 1; volumen de elución 450 ml-500 ml: pool 2), se concentraron por ultrafiltración utilizando una membrana Diaflo PM-10 (MW cut-off: 10 kDa), hasta 0.25 del volumen original. La fracción con actividad enzimática que eluyó antes de la aplicación del gradiente fue descartada porque contenía el grueso de la proteína y representaba sólo una pequeña fracción de la actividad enzimática total. Las dos fracciones con alta actividad fueron dializadas durante toda la noche en buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5.5).

Alícuotas correspondientes al homogenato total, al lavado de la columna y a las dos fracciones eluidas fueron analizadas por SDS-PAGE (figura 43a). Dado que el SDS-PAGE reveló la presencia de varias proteínas en las fracciones correspondientes al "pool 1", esta preparación enzimática fue purificada mediante cromatografía en una columna de MONO-Q. Para ello la fracción enzimática fue inyectada en la columna preequilibrada con buffer acetato de sodio 30 mM (pH 5.5), y la elución efectuada con un gradiente lineal de NaCl [0-600 mM] (1 ml/min). En forma continua fue estimada la

RESULTADOS Y DISCUSION

absorbancia a 280 nm. Las fracciones con actividad, que eluyeron aproximadamente a NaCl 0.35 M fueron dializadas contra buffer acetato de sodio 30 mM (pH 5.5). La preparación se conservó a -20°C en alícuotas de 0.2 ml para su uso posterior. La proteína recombinante purificada se obtuvo con un rendimiento de 18 mg de enzima por litro de cultivo y un grado de pureza superior al 95% (figura 43b).

Dado el alto rendimiento y grado de purificación logrado con el "pool 1" de la columna de DEAE-celulosa, la purificación de la CFBPasa de trigo a partir del "pool 2" no fue encarada en nuestros estudios.

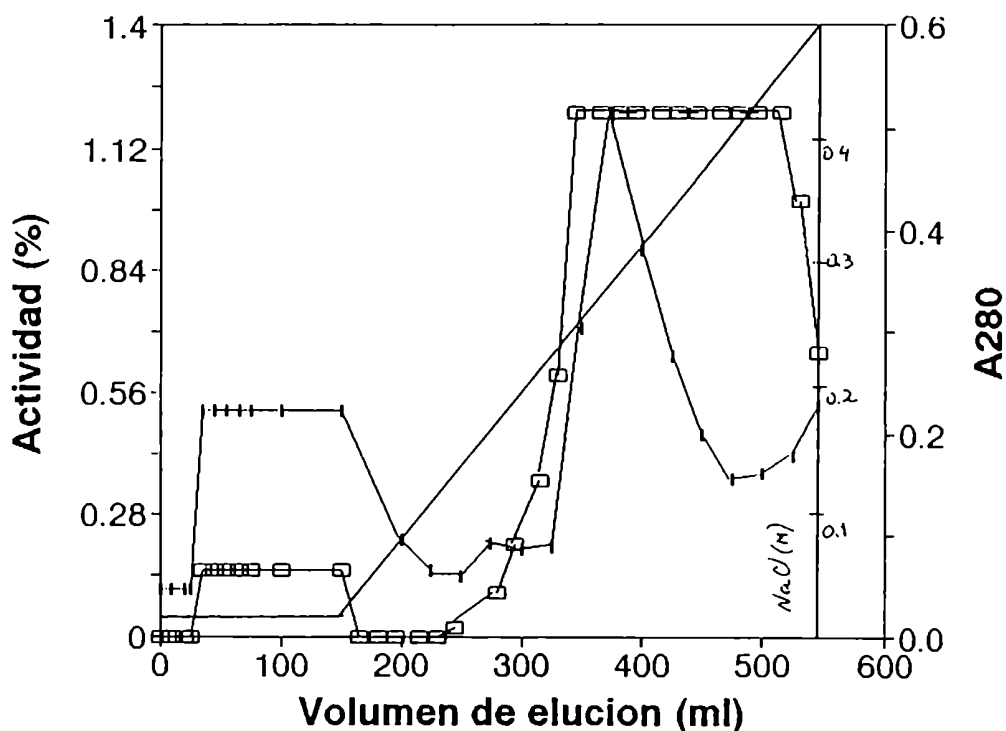


Figura 42. Cromatografía en DEAE-celulosa de la CFBPasa. La muestra fue sembrada en una columna (2 x 13.5 cm) equilibrada con buffer acetato de sodio 30 mM (pH 5.5) conteniendo NaCl 0.02 M. Luego de lavar la columna con 125 ml de este buffer, la elución se efectuó con 400 ml de un gradiente lineal de NaCl [0.02 a 0.5 M] en acetato de sodio 30 mM (pH 5.5). Volumen de la fracción: 5 ml.

Se determinó la actividad enzimática como se explica en Materiales y Métodos. Las proteínas fueron dosadas por absorbancia a 280 nm (A_{280}). - -□- Actividad, - -△- A_{280} , — NaCl (M).

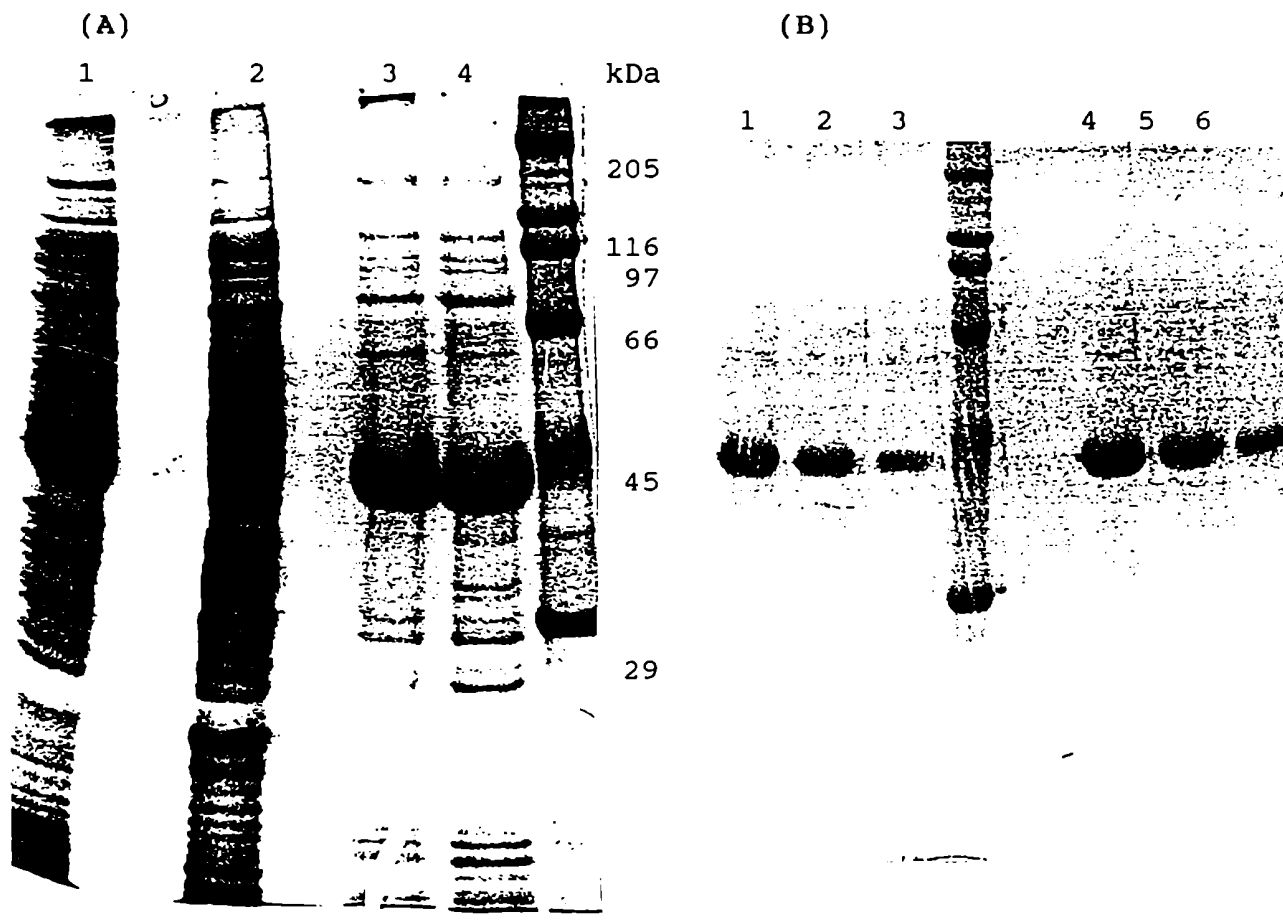


Figura 43. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la purificación de la CFBPasa recombinante.

(A) Alícuotas (30 μ g de proteína) correspondientes a:

1) extracto crudo celular

2) lavado de la DEAE-celulosa

3) eluido de la DEAE-celulosa (NaCl 0.3 M) conteniendo la CFBPasa (pool 1).

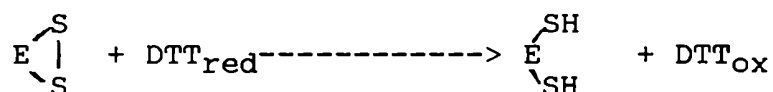
4) eluido de la DEAE-celulosa conteniendo la CFBPasa (pool 2).

(B) Análisis de las fracciones correspondientes al eluido de la MONO-Q (NaCl 0.35 M). En los carriles 1-4, 2-5 y 3-6 se sembraron 4, 2.5 y 1 μ g respectivamente, de las proteínas correspondientes al "pool 1" que contiene a la CFBPasa.

RESULTADOS Y DISCUSION

ACTIVIDAD DE LA CFBPasa DE TRIGO

En general, las CFBPasas son funcionales cuando el ensayo de actividad se efectua a pH superiores a 7.8 y en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} . Sin embargo, los ditiolos estimulan la capacidad hidrolítica de la CFBPasa en presencia de bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} (Scheibe, 1991; Buchannan, 1991). La importancia de los agentes reductores en estimular la actividad CFBPasa radica en que posibilitan la conversión de uniones disulfuro intramoleculares a grupos sulfhidrilo:



Dado que la actividad de la CFBPasa involucra dos procesos con diferentes características como la activación y la catálisis, éstos pueden analizarse por separado. La estrategia experimental requiere dos etapas: luego de incubar la enzima bajo condiciones específicas (modulación) se ensaya la conversión de sustratos a productos (catálisis). De esta manera la lenta conversión de una forma enzimática inactiva a otra activa puede estudiarse en forma independiente de la transformación de sustratos. Si la actividad fuese medida en un solo paso la formación de productos mostraría una fase lag. Extendiendo el tiempo de modulación en el ensayo en dos etapas desaparece la forma transiente.

La actividad catalítica de la CFBPasa de trigo se determinó en un sólo paso con altas concentraciones de FBP (2.5 mM) y Mg^{2+} (10 mM) y en presencia o ausencia de un ditiol. Los resultados obtenidos mostraron que el DTT

RESULTADOS Y DISCUSION

estimuló diez veces la actividad (7.6 U/mg.prot vs. 0.8 U/mg.prot.).

Para el ensayo en dos etapas, la CFBPasa de trigo fue preincubada durante 50 minutos con DTT (5 mM), FBP (3 mM) y Ca^{2+} (0,1 mM) y luego su actividad catalítica ensayada con Mg^{2+} 1 mM y FBP 1 mM. Los resultados indicaron que la generación de una enzima catalíticamente activa en este ensayo requiere estrictamente la presencia de los tres moduladores durante la fase de activación (2.5 U/mg.prot.).

EFEECTO DE LOS MODULADORES NO FISIOLÓGICOS SOBRE LA ACTIVIDAD CFBPasa DE LOS CLOROPLASTOS DE TRIGO.

Los aniones caotrópicos generalmente son desnaturizantes proteicos que en el caso particular de las enzimas llevan a una pérdida de la actividad (Yvon, Chabanet and Pelissier, 1989). Este efecto tiene su origen en la alteración de la estructura del agua la cual favorece la transferencia de las regiones apolares alojadas en el interior de las proteínas hacia la fase acuosa (Von Hippel and Wong, 1964; Hanstein et al., 1971). Experimentos realizados en el laboratorio (Ballicora and Wolosiuk, 1994; Stein, 1987), mostraron que la CFBPasa de espinaca no es una excepción a la regla, ya que la incubación con NaTCA 0,15 M anuló en forma irreversible el 90% de su actividad. Más aún, en la primera parte de esta tesis hemos mostrado que el NaTCA tiende a modificar la actividad CFBPasa de la proteína quimérica (cf. fig. 30).

Sin embargo, los cambios conformacionales mediados por el anión caotrópico pueden conducir a conformaciones intermedias cuyas propiedades cinéticas son diferentes respecto al estado nativo. Estas formas, que escapan al proceso de desnaturización, pueden ser catalíticamente activas dependiendo de las condiciones en que se realiza el ensayo. Estudios previos mostraron que DTT, FBP, Ca^{2+} y Trx convierten a la enzima nativa en una forma catalíticamente

RESULTADOS Y DISCUSION

activa con bajas concentraciones de FBP (0,8 mM) y Mg^{2+} (1 mM) (Hertig and Wolosiuk, 1983). En estos experimentos, los aniones caotrópicos reemplazan a la Trx (Stein and Wolosiuk, 1987; Corley and Wolosiuk, 1985; Prat-Gay et al., 1991). Más aún, el efecto activador del NaTCA sobre la CFBPasa de espinaca mediaría un cambio conformacional que acelera la activación reductiva de la enzima (Ballicora and Wolosiuk, 1994)..

Sobre esta base, se ensayó el efecto del NaTCA sobre la CFBPasa recombinante de trigo. La enzima fue preincubada durante 30 minutos con DTT 5 mM, FBP 1 mM, Ca^{2+} 0.05 mM y concentraciones variables de NaTCA y luego la actividad catalítica fue estimada a bajas concentraciones de Mg^{2+} y FBP. La figura 44 muestra que el NaTCA estimuló la actividad de la CFBPasa de trigo. La enzima recombinante alcanzó su máxima actividad (25.5 U/mg) con una concentración de NaTCA (0.225 M) mayor que la correspondiente para la enzima de espinaca (0.15 M). Las concentraciones superiores al óptimo mostraron el conocido efecto desnaturalizante del NaTCA. Por el contrario, concentraciones crecientes de NaTCA en la etapa de catálisis disminuyeron la actividad ($I_{0.5}=0.11$ M). Sobre estos resultados es posible concluir que, tal como la contraparte de hojas de espinaca (Stein and Wolosiuk, 1987), la CFBPasa puede ser estimulada por aniones caotrópicos en su fase de modulación e inhibida en su fase catalítica.

Una estimulación similar (30 U/mg) fue obtenida luego de preincubar la CFBPasa con DTT 5 mM, FBP 1mM y Ca^{2+} 0.05 mM, en presencia de 2-propanol 15% (datos no mostrados).

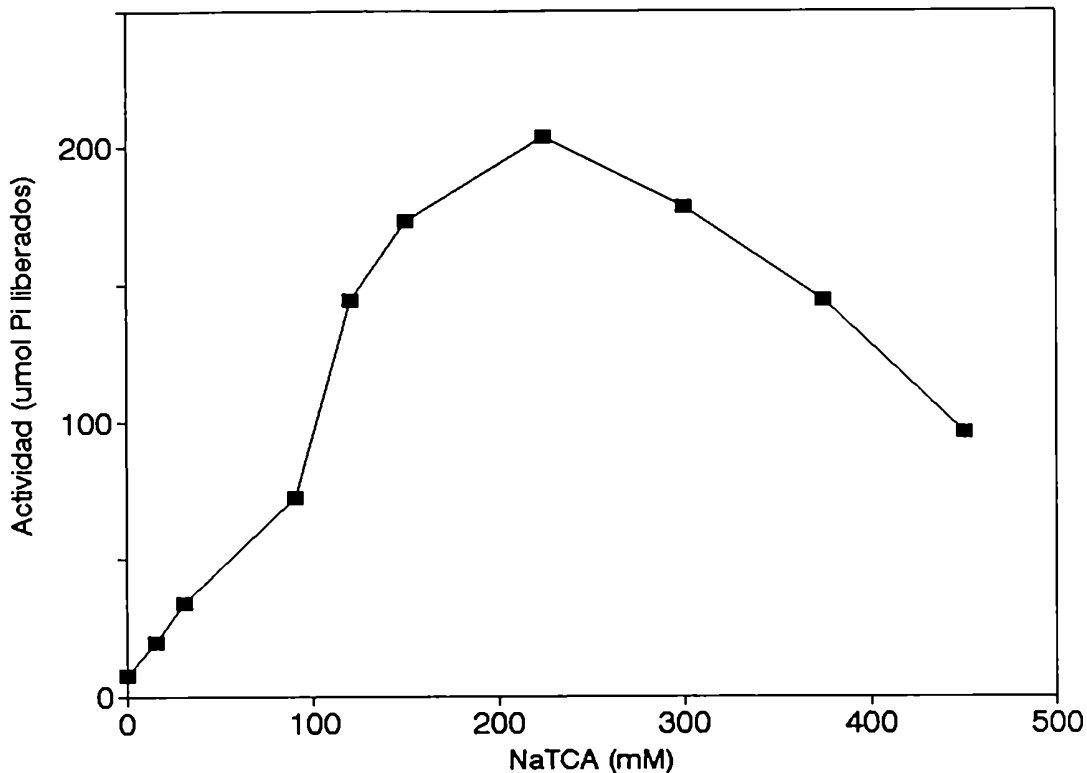


Figura 44. Efecto del NaTCA sobre la activación de la CFBPasa. La enzima (1 μ g) se preincubó durante 30 minutos a 23 °C en presencia de Tris-HCl 30 mM (pH 7.9), DTT 5 mM, FBP 1 mM, CaCl_2 50 μ M y NaTCA. Se determinó la actividad catalítica durante 10 minutos a 0.8 μ g de enzima activada, en presencia de NaTCA 18 mM, FBP 1 mM, MgCl_2 1 mM, DTT 5 mM y EGTA 50 μ M (V=1 ml).

EFFECTO DE LOS MODULADORES FISIOLÓGICOS

La Trx de *E. coli*, clonada y purificada en el laboratorio (Mora García, Hagelin and Wolosiuk, 1995), activó la CFBPasa de espinaca en presencia de FBP, Ca^{2+} , NaTCA y DTT (Mora García, Ballicora and Wolosiuk, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSION

Comportamientos similares fueron observados con las enzimas originadas de hojas de espinaca y una forma recombinante de colza. Como muestra la TABLA IV, esta Trx promovió la activación de la CFBPasa de trigo (cf.figura 58). El mismo grado de activación fue observado cuando la enzima de trigo fue incubada con la Trx-f de espinaca (cf. figura 59). De manera que en presencia de FBP y Ca^{2+} , tanto la Trx-f cloroplástica como la Trx de E. coli fueron efectivas en la estimulación de la CFBPasa recombinante de trigo.

TABLA IV

Efecto de las Trxs sobre la CFBPasa de trigo

Preincubación	Actividad CFBPasa (U/mg prot.).
control	---
plus Trx	3
plus Trx-f	12.9

DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA CFBPasa DE TRIGO.

Para estudiar la estructura cuaternaria de la CFBPasa recombinante de trigo su movilidad fue analizada en columnas de filtración por geles. Según muestra la figura 45, el perfil de elución en Superosa 12 correspondió a un peso molecular aparente de 160.000. Dado que en SDS-PAGE el monómero era un polipéptido de 40 kDa (teórico: 37.578 kDa), estos resultados implicaban que la forma funcional de la CFBPasa de trigo era un homotetrámero. De manera que las características cinéticas, la estructura primaria y la cuaternaria de la enzima recombinante de trigo fueron similares a las observadas con las enzimas preparadas a

RESULTADOS Y DISCUSION

partir de hojas de espinaca, arveja y colza, así como también a la recombinante de esta última (Rodríguez Suárez and Wolosiuk, 1995). Dos aspectos hacen particularmente notable el ensamblado de la forma recombinante como un tetramero catalíticamente activo. Primero los polipéptidos constituyentes carecían de los primeros 20 aminoácidos correspondientes al extremo amino-terminal. Segundo, la agregación funcional de la enzima fue llevada a cabo en el citosol de *E. coli*.

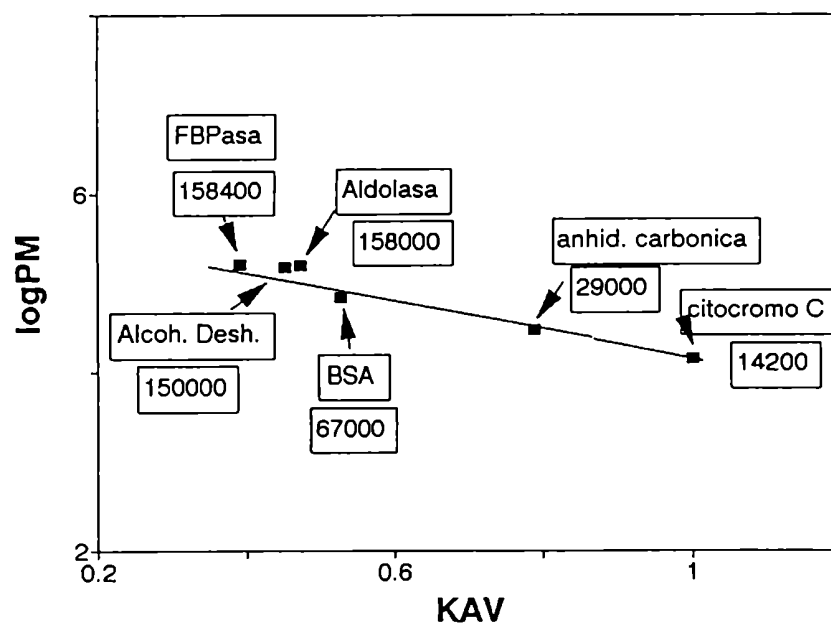


Figura 45. Determinación del peso molecular de la CFBPasa recombinante de trigo. La muestra (0.5 ml, 250 μ g), disuelta en acetato de sodio 30 mM (pH 5.5)/NaCl 100 mM, fue sembrada en una columna de Superosa 12 (1 x 25) y la elución se llevó a cabo con el mismo buffer. En las fracciones (0.5 ml) la actividad enzimática fue determinada a altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} y DTT 10 mM. Los estándares de peso molecular se describen en la figura.

RESULTADOS Y DISCUSION

DESNATURALIZACION DE LA CFBPasa DE TRIGO POR EFECTO DE LA UREA.

Las proteínas adquieren su estructura tridimensional en forma autónoma, basada en el orden específico y secuencial de los aminoácidos de la cadena polipeptídica. Una manera de desentrañar los pasos individuales del plegamiento in vivo es el análisis de los procesos de plegamiento in vitro. Las propiedades de una proteína cambian cuando se desnatura. Existen, por lo tanto, distintas técnicas que permiten analizar el cambio de una dada conformación a otra y el retorno a la forma original (Pace, 1986; Jaenicke and Rudolph, 1989). Básicamente, las técnicas utilizadas para el análisis in vitro de los procesos de desnaturalización y renaturalización de las proteínas radican en introducir una perturbación química o física y luego en establecer los cambios en

(a) Las funciones biológicas. En el caso de las enzimas la extrema sensibilidad de la actividad catalítica a las perturbaciones hace de esta medición uno de los procedimientos que mejor estiman el plegamiento correcto de las proteínas.

(b) Las características conformacionales. Este enfoque recurre al análisis de las propiedades espectrales de las proteínas mediante fluorescencia, espectroscopía de absorbancia, NMR. Estas técnicas permiten caracterizar no solo los estados nativos y desnaturalizados sino también los intermediarios de vida media suficientemente larga (Pappa and Cass, 1993; Mitraki et al., 1987).

Altas concentraciones de urea desestabilizan las interacciones intramoleculares que contribuyen al plegamiento correcto de los distintos dominios y con ello la proteína adquiere una estructura totalmente desenrollada. La

RESULTADOS Y DISCUSION

posterior remoción del perturbante conduce a la proteína a una estructura más compacta cuya conformación puede coincidir, o no, con el estado inicial. En este contexto, la conformación inicial de las proteínas condiciona la respuesta al perturbante, i.e, el perfil de desnaturalización será diferente cuando las estructuras terciarias sean distintas. Numerosos estudios mostraron que el FBP, el Ca^{2+} , la Trx y los moduladores no-fisiológicos inducen cambios estructurales y funcionales en las CFBPasas (Ballicora, M.A. 1994). Con el fin de corroborar la existencia de dichas conformaciones, la acción de los perturbantes químicos fue analizada sobre la CFBPasa de trigo.

Efecto de la urea sobre la actividad de la CFBPasa.

Para caracterizar el efecto de la urea sobre el "unfolding" de la CFBPasa de trigo se determinó la actividad catalítica remanente de la enzima luego de su incubación por tiempos variables con concentraciones crecientes de urea y DTT 10 mM. Como se ve en la figura 49, la actividad catalítica disminuyó marcadamente no solo en función de la concentración de urea sino también del tiempo de incubación. En cambio al realizar la incubación con urea en presencia de FBP y Ca^{2+} la disminución de la actividad catalítica fue similar después de 1.5 horas o de 24 horas de incubación con el desnaturalizante (figura 47). La comparación de las concentraciones de urea necesarias para disminuir al 50 % la actividad original ilustra sobre un estado conformacional estabilizado por los moduladores (tabla V). Claramente, la desnaturalización de la enzima incubada con FBP y Ca^{2+} requiere una concentración de urea (2.2 M) mayor que la enzima nativa (0.35 M). En este contexto la incorporación de NaTCA durante la preincubación con urea produjo un efecto desestabilizador sobre la enzima, ya que los valores de $I_{0.5}$

RESULTADOS Y DISCUSION

caen de 2.2 M a 1.1 M. Sin embargo, la presencia de FBP y Ca^{2+} restringió las variaciones temporales observadas con la forma tratada únicamente con DTT.

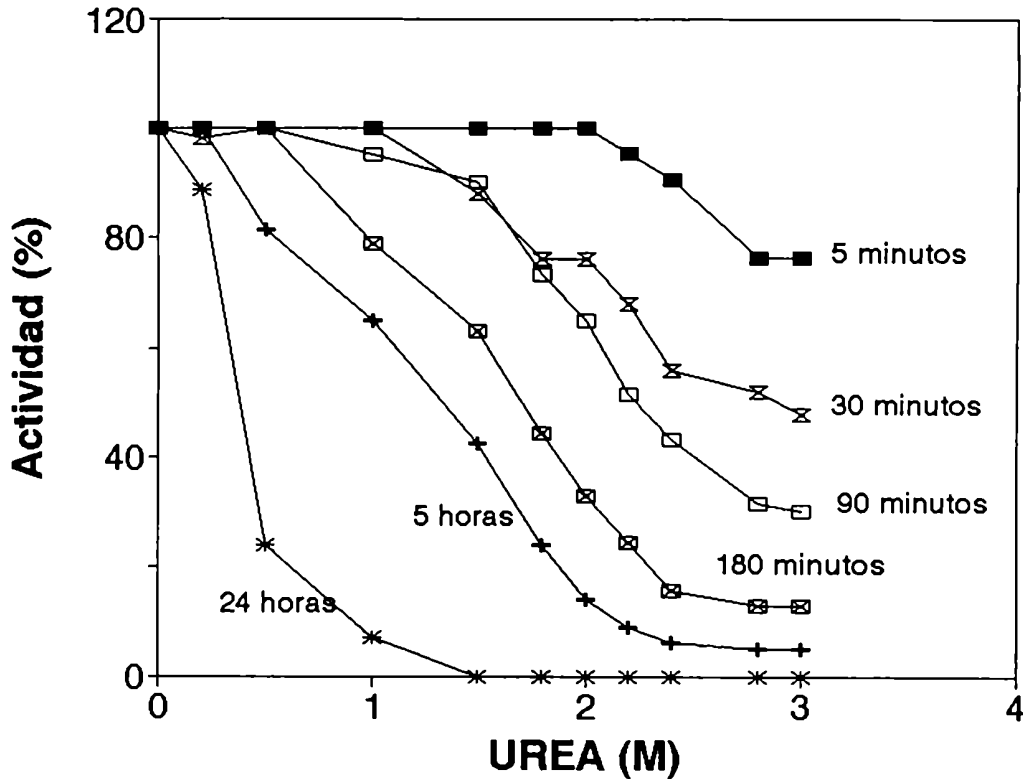


Figura 46. Efecto de la urea sobre la CBF Pasa. La enzima ($10 \mu\text{g}$) fue incubada por los tiempos indicados a 23°C , en presencia de Tris-HCl 50 mM (pH 7.9) y DTT 10 mM conteniendo concentraciones crecientes de urea ($V=0.2 \text{ ml}$). La actividad catalítica se determinó sobre alícuotas ($1 \mu\text{g}$). Al diluir dicha alícuota la solución para el ensayo de la actividad descrito en Materiales y Métodos [alto FBP, alto Mg^{2+}] contenía además urea 80 mM ($V=1 \text{ ml}$). Actividad control (incubación por 24 hs. sin urea): 81 μmmoles de Pi liberados. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

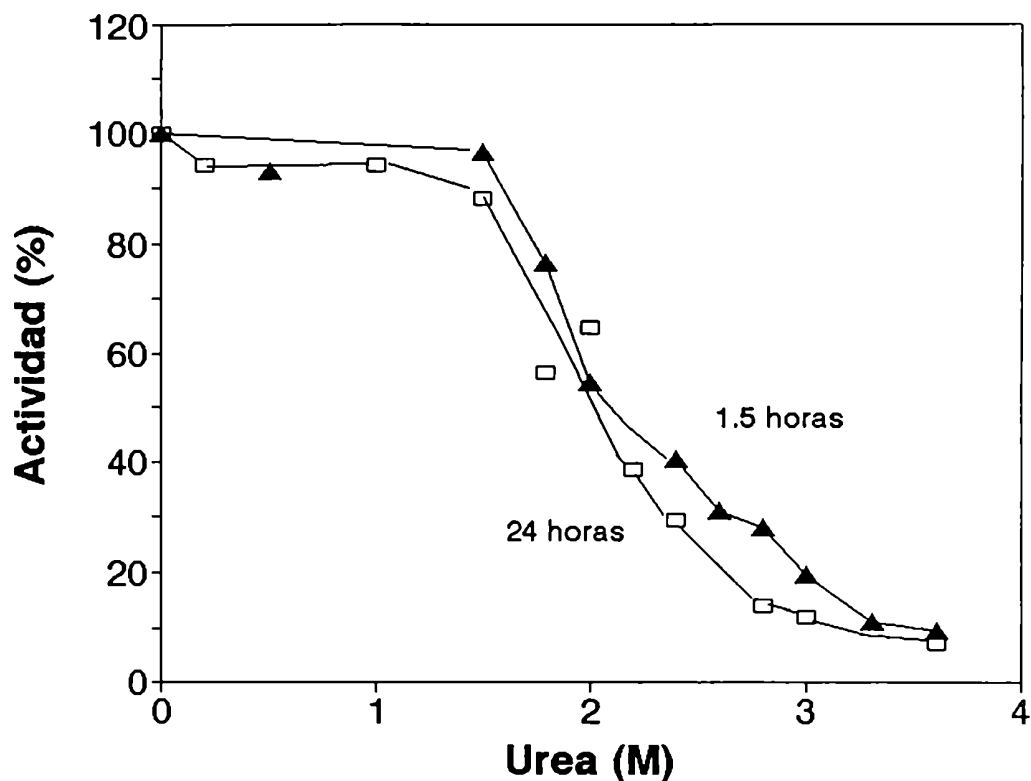


Figura 47. Efecto de la urea sobre la CFBPasa en presencia de Ca^{2+} y FBP.

La enzima ($3 \mu\text{g}$) fue incubada por los tiempos indicados a 23°C , en Tris-HCl 50 mM (pH 7.9), DTT 10 mM , FBP 1.5 mM y CaCl_2 0.15 mM , conteniendo concentraciones crecientes de urea ($V=0.2 \text{ ml}$). La actividad catalítica se determinó sobre una alícuota ($0.6 \mu\text{g}$) en presencia de DTT 5 mM , alta concentración de FBP y Mg^{2+} (2.5 mM y 10 mM respectivamente) y urea 80 mM ($V=1 \text{ ml}$). Actividad control (incubación por 24 hs . sin urea): $85 \mu\text{moles}$ de Pi liberados. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Preincubación		I _{0.5} (M)	
		Tiempo (horas)	
		1.5	24
U r e a	DTT	2	0.35
	DTT/FBP/Ca ⁺⁺	2.2	2.2
	DTT/FBP/Ca ⁺⁺ /NaTCA	1.25	1.1

Tabla V. Acción de los moduladores sobre la estabilidad de la CFBPasa. La enzima fue preincubada durante tiempos variables en presencia de concentraciones crecientes de urea y según se indica DTT 10 mM, FBP 1.5 mM, Ca²⁺ 0.15 mM y NaTCA 0.18 M. La actividad se determinó sobre alícuotas tal como en las figuras 46 y 47. Los valores de I_{0.5} representan la concentración de urea a la cual se obtiene el 50% de la inhibición de la actividad enzimática.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto de la urea sobre la fluorescencia intrínseca de la CFBPasa.

Las características conformacionales de la enzima durante los experimentos de desnaturalización y renaturalización fueron analizadas a través de los cambios en la fluorescencia intrínseca de la CFBPasa.

La forma madura de la CFBPasa de trigo posee tres triptofános y 18 tirosinas. En la enzima nativa, el máximo de emisión a 334 nm sugiere un entorno no acuoso rodeando a estos cromóforos (figura 48). En presencia de urea 8 M el espectro de emisión mostró un máximo a 343.5 nm. Este desplazamiento hacia el rojo es característico de la pérdida de la estructura terciaria de las proteínas que conlleva a la exposición al solvente de los residuos triptofano por cuanto el máximo de emisión del triptofano en agua es 350 nm. La concentración de urea condicionó la velocidad con que varía el entorno de rodea los cromóforos intrínsecos. En urea 8 M, la desnaturalización de la CFBPasa fue prácticamente instantánea: el máximo de emisión del espectro fue 342.5 nm y 343.5 para el espectro medido de inmediato y a los 40 minutos respectivamente. En cambio, los máximos de emisión fueron 339 nm y 342.5 nm después de 10 y 30 minutos de incubación, respectivamente en presencia de 6 M urea.

Como los moduladores podrían estabilizar determinadas regiones contrarrestando el efecto desnaturalizante de la urea monitoreamos su efecto sobre el máximo de emisión. La incubación a 23°C durante 16 horas en presencia de DTT, produjo un máximo de emisión a 337 nm, el cual se desplazó hacia el rojo por el agregado de concentraciones crecientes de desnaturalizante. El cambio significativo ocurrió a 6 M urea, alcanzando valores de 344 nm. Para provocar estos cambios en la fluorescencia fue necesaria una concentración de desnaturalizante 10 veces mayor que la utilizada para la inactivación de la enzima. A modo comparativo las figuras 49

RESULTADOS Y DISCUSION

y 50 incluyen los resultados obtenidos en los experimentos de actividad: la actividad enzimática y la fluorescencia intrínseca alcanzaron la mitad del valor inicial a 0.35 M y 4 M urea, respectivamente (figura 49). El valor de $\lambda_{0.5}$ indica la concentración de urea a la cual se obtiene el 50 % del desplazamiento del máximo de emisión de fluorescencia intrínseca. En presencia de FBP y Ca^{2+} 50 % de inactivación ocurrió a 2.2 M urea, en tanto que un cambio similar en la fluorescencia fue obtenido con 6 M urea. Los valores condensados en la la tabla VI muestran que el FBP y el Ca^{2+} aumentaron la concentración de urea necesaria para lograr tanto la inactivación como el cambio en la fluorescencia intrínseca. En conclusión ambos moduladores contribuyen a estabilizar la estructura terciaria de la CFBPasa. Estos resultados mostraron además que la pérdida de actividad enzimática precede a los cambios conformacionales, por lo que habría una mayor flexibilidad conformacional en el sitio activo de la enzima que en la molécula como un todo (Tsou, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSION

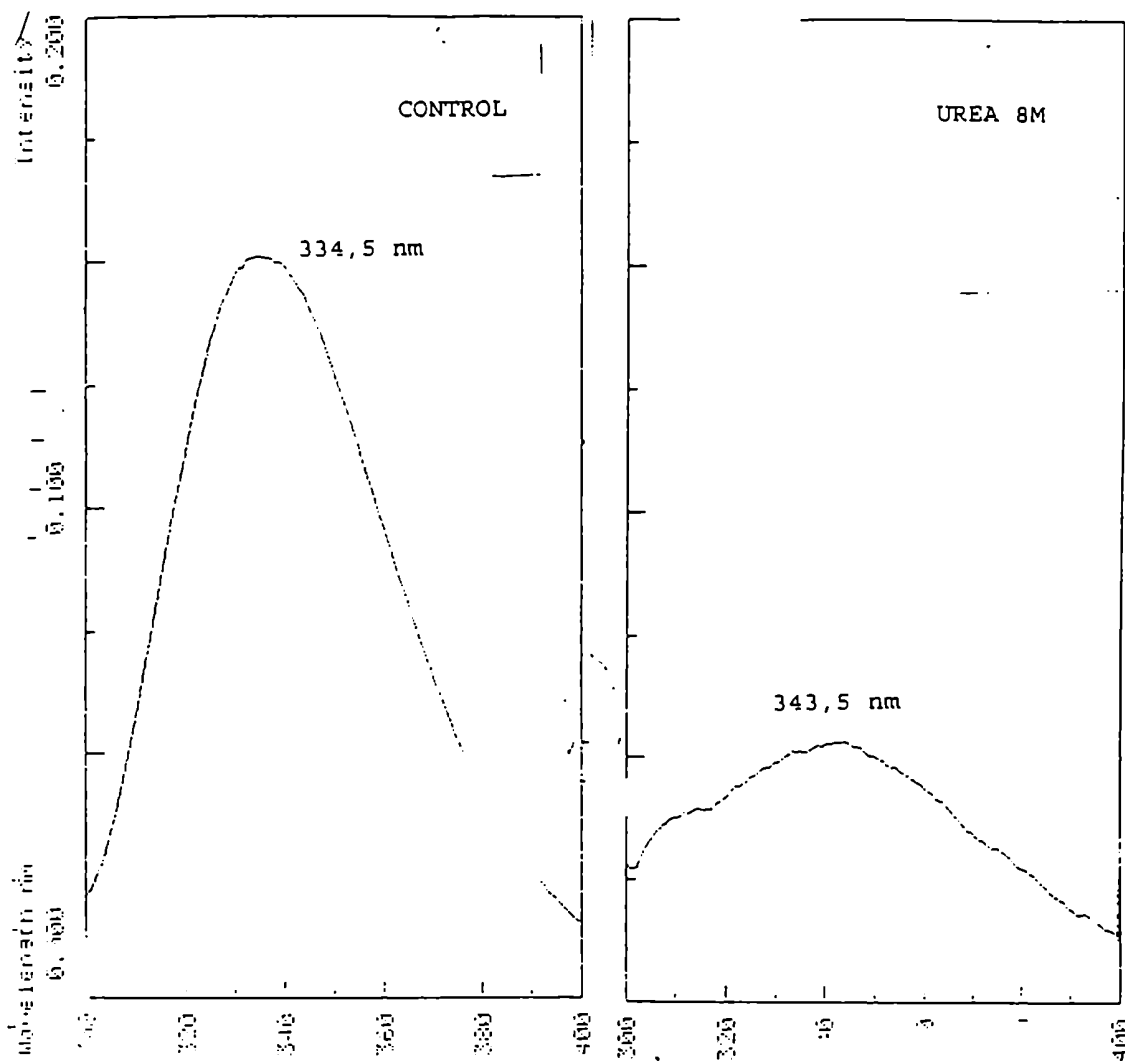


Figura 48. Espectro de emisión de la CFBPasa nativa y desnaturada. La enzima ($5 \mu\text{g}$) fue agregada a una solución que contenía Tris-HCl 30 mM (pH 7.9) y cuando se indica 8 M urea. Volumen final: 3 ml. Luego se realizó el espectro de emisión de fluorescencia excitando a 280 nm. El espectro de la enzima en urea 8 M representa el de la enzima desnaturada. Todos los espectros fueron corregidos sustrayendo un espectro de la solución que contenía los agregados exceptuando la enzima.

RESULTADOS Y DISCUSION

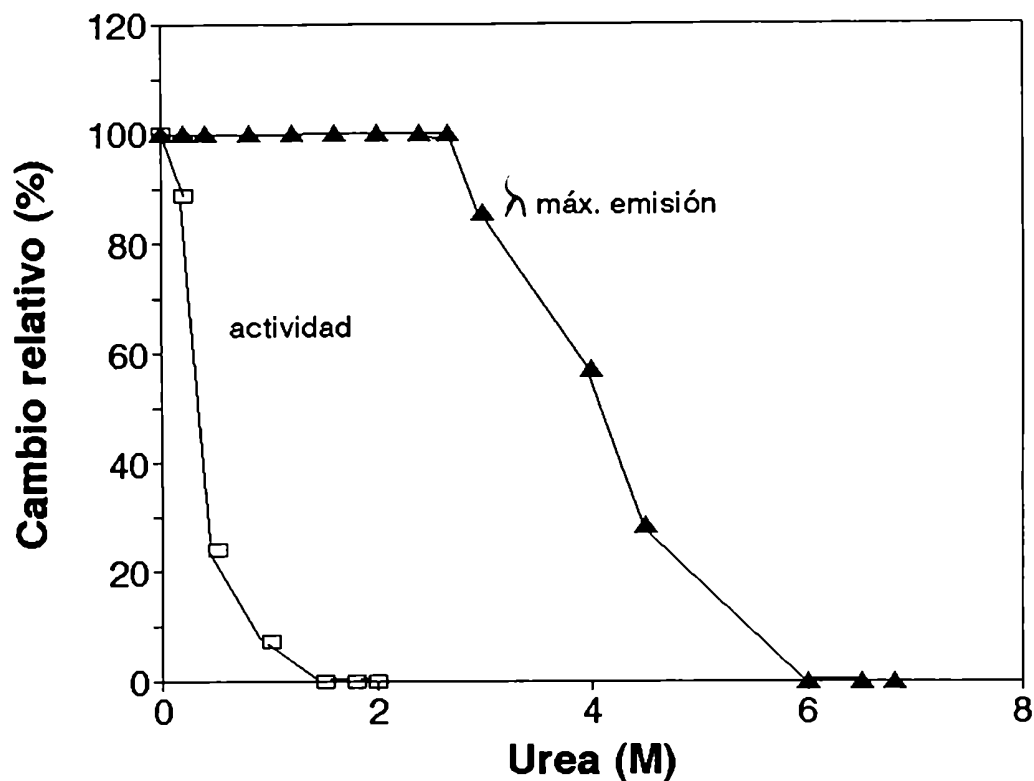


Figura 49. Efecto diferencial de la urea sobre la CFBPasa. La desnaturalización se analizó mediante cambios en la actividad enzimática (-□-□-) y el desplazamiento del $\lambda_{\text{máx}}$ de fluorescencia intrínseca (-▲-▲-). La enzima ($3 \mu\text{g/ml}$) se incubó en presencia de Tris-HCl 50 mM (pH 7.9), DTT 5 mM y concentraciones variables de urea, durante 24 horas a 23°C . Luego se determinó su espectro de fluorescencia intrínseca (- - -), excitando la muestra a 280 nm ($V=3 \text{ ml}$). Todos los espectros fueron corregidos sustrayendo un espectro blanco en el cuál se hicieron los mismos agregados exceptuando la enzima. Para la determinación de la actividad enzimática se procedió como en la figura 46.

RESULTADOS Y DISCUSION

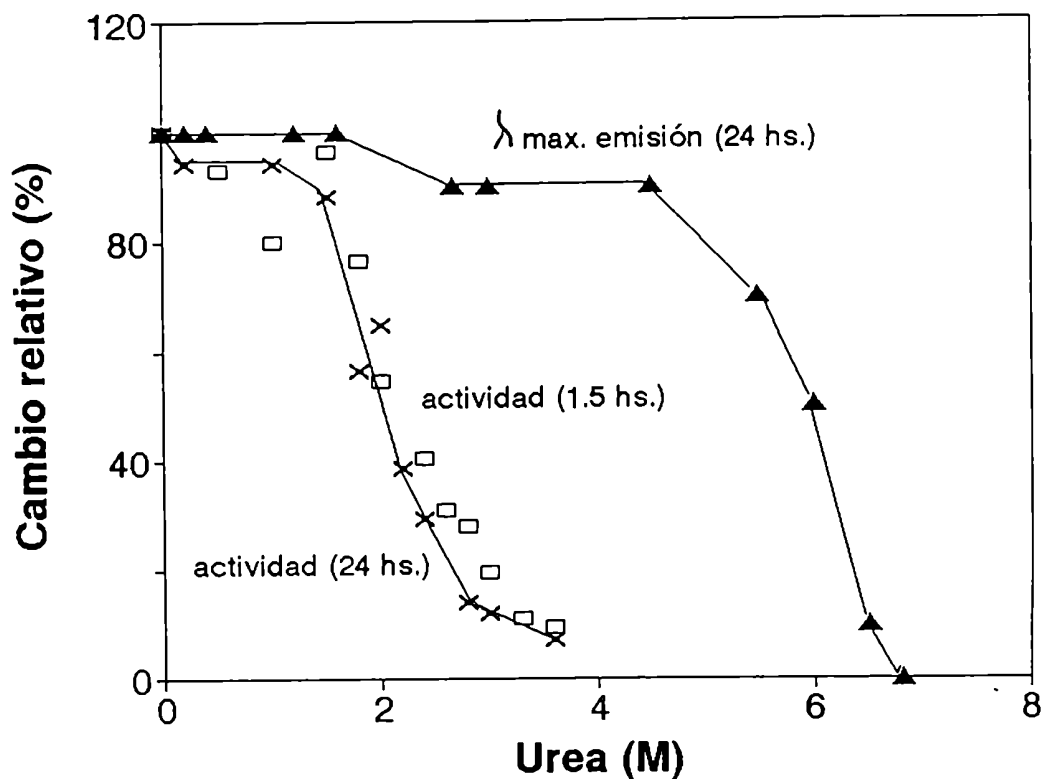


Figura 50. Efecto del FBP y el Ca^{2+} sobre la desnaturalización de la CFBPasa mediada por urea. La enzima ($3 \mu\text{g}/\text{ml}$) fue incubada en presencia de Tris-HCl 50 mM (pH 7.9), DTT 5 mM, FBP 1.5 mM, CaCl_2 0.15 mM y concentraciones variables de urea, durante 24 horas a 23°C . Luego se determinó el espectro de fluorescencia intrínseca (-Δ-Δ-), excitando a 280 nm ($V=3$ ml). Todos los espectros fueron corregidos sustrayendo un espectro blanco en el cual se hicieron los mismos agregados exceptuando la enzima. Para la determinación de la actividad enzimática, $3 \mu\text{g}$ de enzima se incubaron en las mismas condiciones durante 1.5 y 24 horas, a 23°C ($V=0.2$ ml) y la actividad remanente fue medida como se explica en la figura 47 (-□-□-).

RESULTADOS Y DISCUSION

		$I_{0.5}$ (M)	$\lambda_{0.5}$ (M)
Preincubación		24 horas	
u r e a	DTT	0.35	4
	DTT/FBP/Ca ⁺⁺	2.2	6

Tabla VI. Efecto de la urea sobre la actividad y fluorescencia intrínseca de la CFBPasa.

El cambio relativo en el desplazamiento del máximo de emisión se analizó a partir de los espectros de emisión de fluorescencia excitando a 280 nm. El valor de $\lambda_{0.5}$ indica la concentración de urea a la cual se obtiene el 50% del desplazamiento del máximo de emisión de fluorescencia intrínseca. Se consideró 100% de cambio relativo al máximo de emisión de la enzima en ausencia de urea. Los datos corresponden a los experimentos descritos en las figuras 49 y 50. El valor de $I_{0.5}$ representa la concentración de urea a la cual se obtiene el 50% de la actividad enzimática inicial.

Efecto de la urea sobre la absorbancia de la CFBPasa al Ultravioleta.

Otra alternativa para caracterizar los cambios conformacionales de la CFBPasa de trigo producidos por la urea fue el análisis de los espectros de absorbancia en el ultravioleta. La absorción de las proteínas en el rango de 230-300 nm está determinada por las cadenas laterales de los

RESULTADOS Y DISCUSION

aminoácidos aromáticos tirosina, triptofano y fenilalanina. Los espectros de absorción de los estados nativo y desnaturalizado aportan pequeñas diferencias que son demasiado complejas para establecer la contribución individual de cada aminoácido. Sin embargo, estos espectros son sumamente útiles para detectar los cambios conformacionales de las proteínas.

El espectro de absorción de la CFBPasa fue determinado en presencia de los moduladores (FBP 1.5 mM, Ca^{2+} 0.15 mM) y de urea (6 M) y los datos transferidos a una computadora. La cuarta derivada de los mismos fue obtenida mediante un programa en lenguaje Pascal, desarrollado en el laboratorio (M.A. Ballicora). La enzima nativa presentó dos picos mayoritarios (290 nm y 279 nm) y un pico pequeño (286 nm) (figura 51). El agregado de FBP y Ca^{2+} desplazó uno de los máximos hacia el azul: de 279 nm hasta 277.8 nm. El espectro de la CFBPasa en presencia de urea 6 M presentó 3 máximos bien definidos, uno a 291.2 nm, otro a 277 nm y el tercero, de gran intensidad, a 284.5 nm. Mientras el primero se desplazó levemente hacia el azul (290 nm), los dos restantes permanecieron invariables por la presencia de FBP y Ca^{2+} . Congruente con los estudios previos, los resultados obtenidos con este protocolo alternativo corroboran que los moduladores y los perturbantes proteicos median en la formación de diferentes estados conformacionales.

RESULTADOS Y DISCUSION

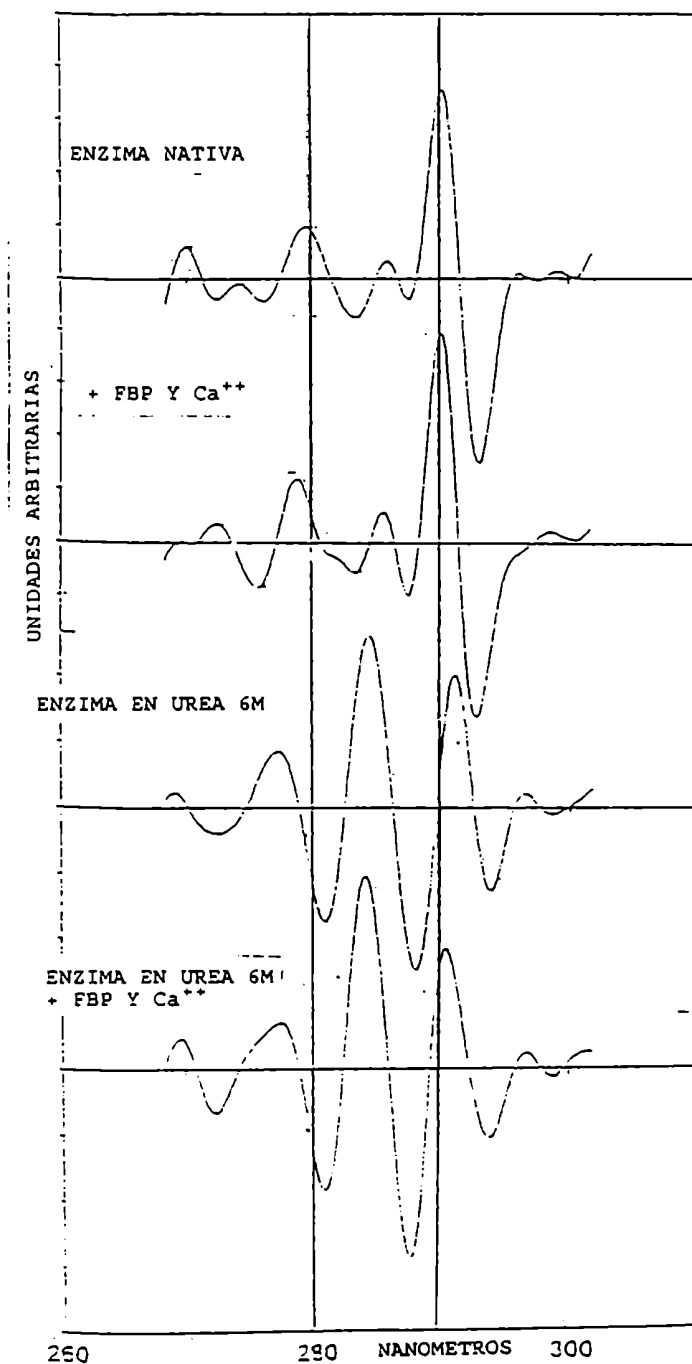
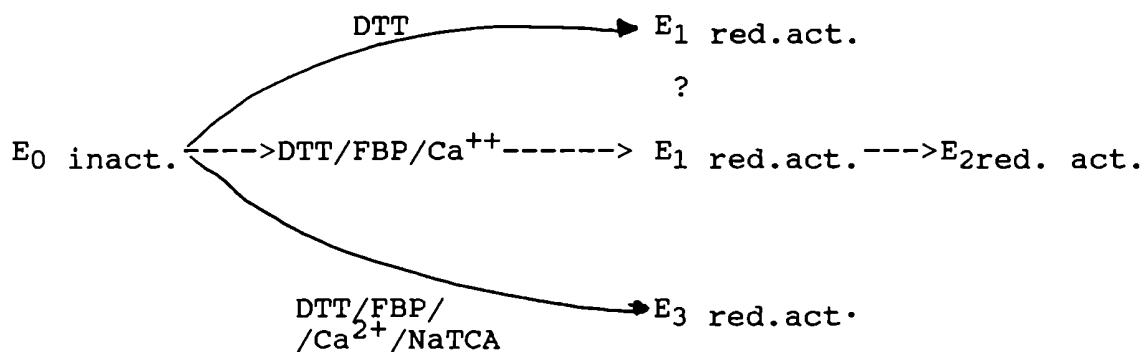


Figura 51. Análisis de la cuarta derivada del espectro de la CFBPasa en el ultravioleta. La enzima (100 μ g) fue incubada durante 5 minutos en una solución que contenía Tris-HCl 30 mM (pH 7.9) y según se indica urea 6 M, FBP 1.5 mM y CaCl₂ 0.15 mM (V=0.4 ml). Cada espectro se registró tres veces, los datos se transfirieron a una computadora y la cuarta derivada fue calculada a partir del promedio de los tres espectros.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estados conformacionales de la CFBPASA de trigo

El análisis del fenómeno de desnaturalización de la CFBPasa de trigo mediado por urea, ha permitido la caracterización de cuatro posibles estados conformacionales de la enzima, dependientes de la presencia de FBP y Ca^{2+} : E_0 , E_1 , E_2 y E_3 .



donde E_x representa un posible estado conformacional de la enzima.

La diferente susceptibilidad a la urea que presentaron estas formas reducidas activas E_1 , E_2 y E_3 indica claramente la existencia de estructuras tridimensionales distintas. En ellas los estados E_2 y E_3 representarían las conformaciones estabilizadas por los moduladores.

Es destacable que los análisis cinéticos y estructurales realizados con la CFBPasa de espinaca (Ballicora, M.A and Wolosiuk, R.A. (1994)) indicaron la existencia de tres formas enzimáticas oxidadas diferentes, la enzima nativa inactiva (E'_0), susceptible de ser desnaturalizada irreversiblemente por NaTCA; la enzima E'_1 originada por la incubación de la forma E'_0 con FBP y Ca^{2+} y la forma E'_2 cuyas características estructurales se originan

RESULTADOS Y DISCUSION

por incubación de E'_1 con NaTCA (o cosolventes). Estas tres formas enzimáticas oxidadas fueron sustrato para la reducción por DTT, lo cual generó con diferentes velocidades una forma reducida catalíticamente activa, E'_3 . Esta forma reducida E'_3 representaría uno o varios estados reducidos activos de la CFBPasa. Más aún, experimentos posteriores (Mora García, S. and Wolosiuk, R.A. (1996)) demostraron que en presencia de DTT, la Trx-f activa preferencialmente a la forma E'_0 , en tanto la acción concertada del FBP y el Ca^{2+} lleva a la aparición reversible de la forma E'_1 , cuya actividad es estimulada con mayor eficiencia por la Trx-m y Trxs bacterianas. En este punto, el NaTCA o el 2-propanol llevan a la CFBPasa a una conformación productiva E'_2 , en lugar de desnaturalizarla, de modo que la activación de la enzima por Trxs bacterianas es indistinguible de la activación por Trx-f.

Las formas catalíticamente activas que se originaron por reducción mediada por DTT y Trx (E'_3) podrían ser una o varias especies diferentes. En apoyo de esta última hipótesis, los experimentos de desnaturalización mediada por urea indicarían la existencia de tres especies reducidas y activas E_1 , E_2 y E_3 representantes de tres formas conformacionales diferentes .

Estructura cuaternaria de la CFBPasa en presencia de urea

A fin de establecer la estructura cuaternaria en presencia de urea y DTT, la enzima fue primero incubada durante 4 horas a temperatura ambiente en Tris HCl 50 mM (pH 7.9), DTT 5 mM, EGTA 0.05 mM y 4 M urea y luego analizada mediante filtración molecular. El perfil de elución en Superosa 12 mostró solamente la presencia de la forma monómerica (figura 52). Según la fig.46, dicha concentración de urea inactiva a la enzima después de 3 horas de incubación. Este resultado indica que la

RESULTADOS Y DISCUSION

inactivación mediada por la urea se debería a la disociación en las respectivas subunidades. Tomados en conjunto, los resultados indican que los cambios en la fluorescencia intrínseca evidencian la desnaturalización de la CFBPasa. Sin embargo, concentraciones mucho menores del perturbante provocan la pérdida de la actividad catalítica. Sobre estas bases, la alteración del dominio implicado en la catálisis precede a la modificación de la estructura total. Este hecho refleja claramente la flexibilidad diferente de los dominios que componen la CFBPasa (Tsou, 1993).

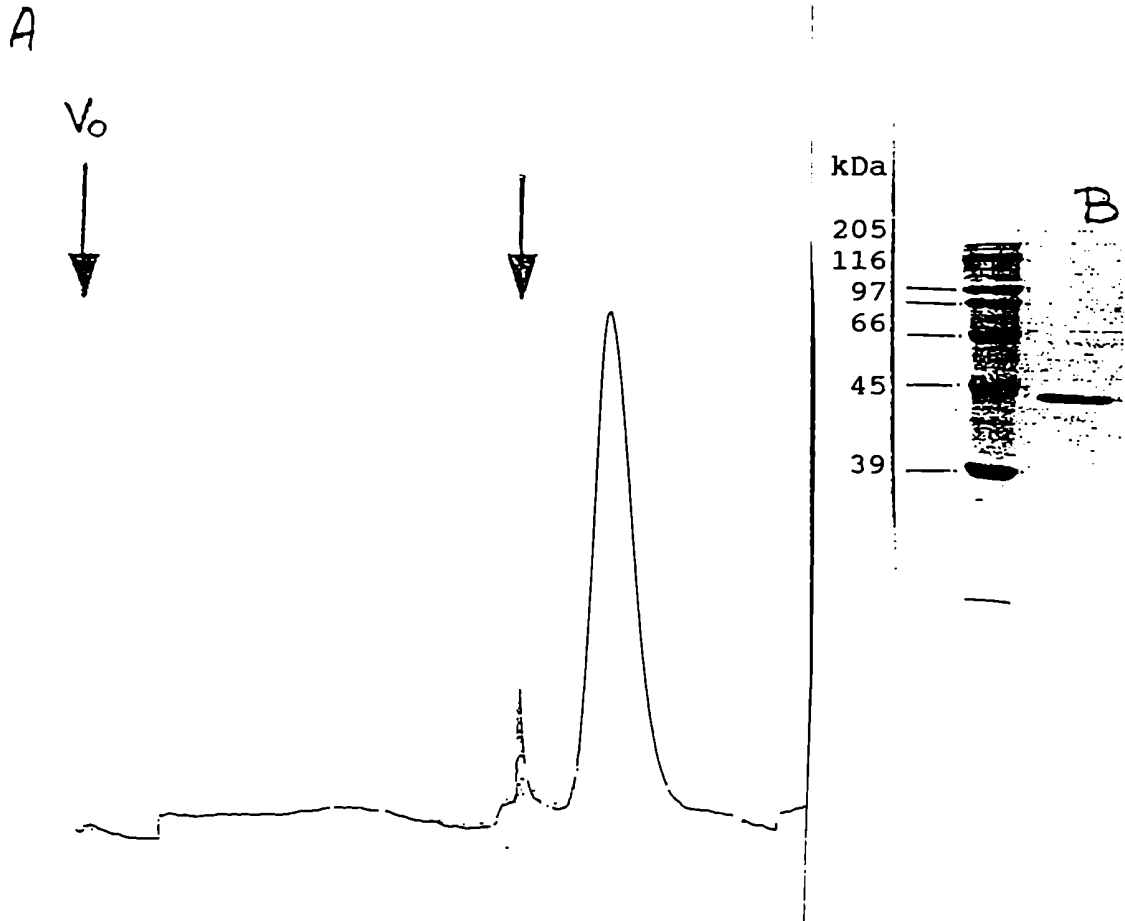


Figura 52. Análisis del peso molecular de la CFBPasa en presencia de urea 4 M.

(A) La CFBPasa fue incubada en Tris-HCl 50 mM (pH 7.9) conteniendo DTT 5 mM, EGTA 50 μ M y urea 4 M, durante 4 horas a 23 °C y sembrada en una columna de Superosa 12. La flecha indica la posición de BSA (66 kDa).
 (B) Alícuotas de las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE (11%).

RESULTADOS Y DISCUSION

RENATURALIZACION DE LA CFBPasa

La actividad enzimática depende de la integridad conformacional de la enzima y por ello es un parámetro inequívoco de la obtención del estado funcional. La recuperación de las funciones biológicas es un indicador de la reversibilidad del plegamiento. Por ello el fenómeno de renaturalización de la CFBPasa fue estudiado siguiendo la actividad catalítica luego de la remoción del desnaturalizante. A altas concentraciones de urea este proceso implica el ensamblado de los monómeros inactivos (E) en el tetrámero con actividad catalítica (E₄)



Del variado número de factores capaces de afectar la reestructuración de una proteína, estudiamos el efecto del pH y los moduladores sobre el plegamiento de la CFBPasa. La enzima, incubada en presencia de urea 6 M y DTT 10 mM, durante 140 minutos a 37°C fue diluída 25 veces, en soluciones de Tris-HCl 30 mM (pH 7.9) o Acetato de sodio 30 mM (pH 5.5) ambas conteniendo el reductor. La actividad enzimática fue analizada a altas concentraciones de FBP y Mg²⁺. La figura 53 muestra que la CFBPasa alcanzó la máxima actividad específica (38.4 U/mg) 30 minutos después de la dilución a pH 5.5 y la mantuvo durante las siguientes 3 horas. Por el contrario, a pH 7.9 la actividad catalítica no superó el 20-25% de la actividad máxima. Sin embargo, la posterior acidificación de esta solución indujo un aumento brusco en la actividad catalítica evidenciando un efecto positivo de la concentración de protones sobre la formación del estado funcional.

RESULTADOS Y DISCUSION

Teniendo en cuenta el efecto estabilizador del FBP y el Ca^{2+} sobre la estructura de la CFBPasa, se efectuaron los experimentos de renaturalización en presencia de estos moduladores. Siguiendo el esquema del experimento anterior la enzima desnaturalizada en urea fue diluída en Tris-HCl (pH 7.9) conteniendo FBP 1.5 mM y Ca^{2+} 0.15 mM. Notablemente ambos metabolitos a pH 7.9 produjeron un efecto similar al obtenido a pH 5.5 (actividad específica: 34 U/mg) con una cinética prácticamente idéntica (figura 54).

El ensamblado de los monómeros de la CFBPasa en la forma tetramérica funcional fue logrado por dos caminos que, aparentemente, implican mecanismos diferentes. En el primero la protonación de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos causó la agregación de la enzima. En el segundo, dos moduladores mediaron la modificación de las interacciones no-covalentes que contribuyeron a la estabilización de la enzima. Aunque es evidente que, removido el perturbante, la recuperación de la actividad catalítica siguió dos caminos diferentes, es desconocido si las conformaciones activas que se obtienen son similares.

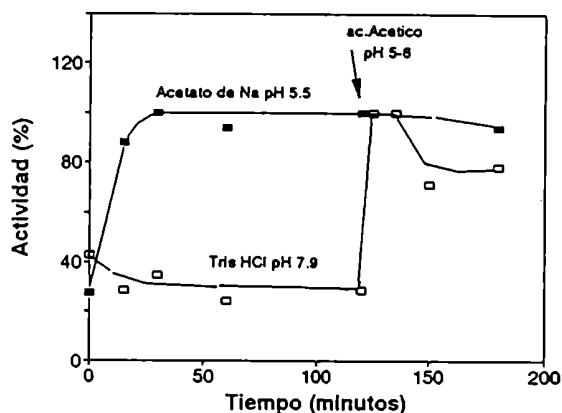


Figura 53. Efecto del pH sobre el "refolding" o renaturalización de la CFBPasa. La enzima se incubó a 37°C durante 140 minutos en presencia de Tris-HCl 30 mM (pH 7.9), DTT 10 mM, EGTA 0.4 mM y urea 6 M. Alícuotas (25 µg) fueron diluídas 25 veces a 24°C, en (i) Tris-HCl 30 mM (pH 7.9), DTT 5 mM; (ii) acetato de sodio 30 mM (pH 5.5), DTT 5 mM. Cuando se indica se agregó ácido acético hasta pH 5-6. Luego de la dilución (tiempo cero) se midió la actividad catalítica sobre alícuotas, en presencia de DTT 5 mM y altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} ($V=0.2$ ml).

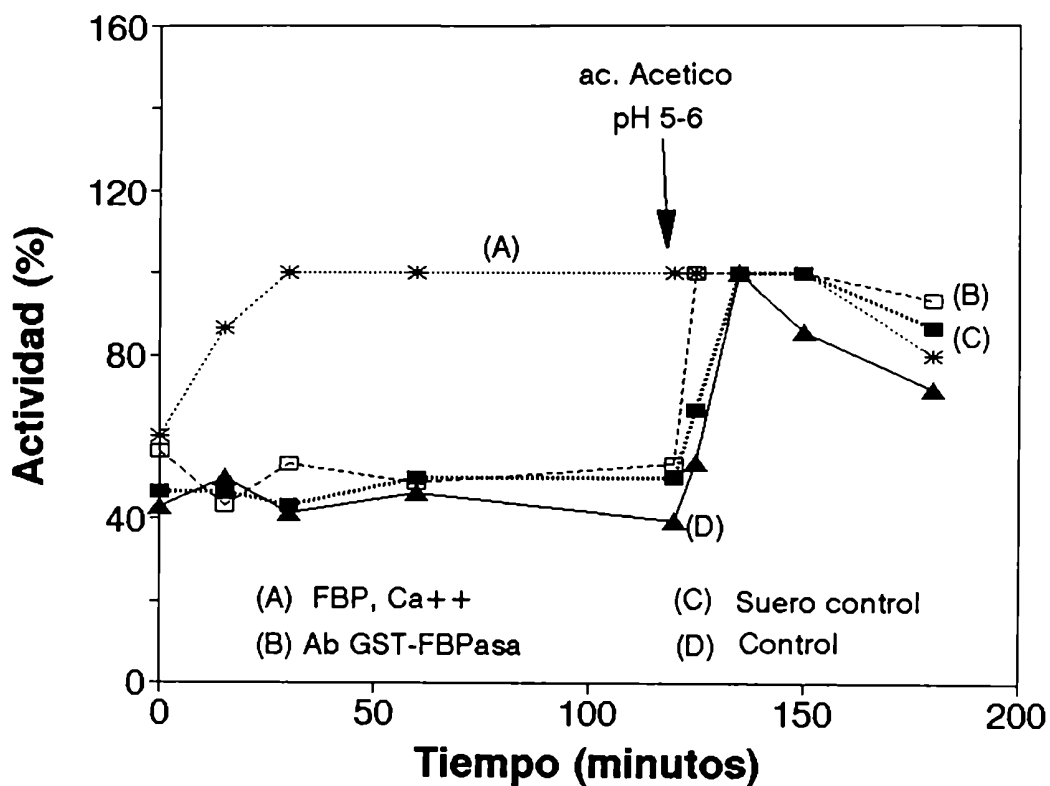


Figura 54. Efecto de moduladores y anticuerpos sobre el "refolding" de la CFBPasa. La enzima se incubó a 37 °C durante 2 horas en presencia de Tris-HCl 30 mM (pH 7.9), DTT 10 mM, EGTA 0.4 mM y urea 6 M. Aliquotas (20 µg) fueron diluidas 25 veces, a 23 °C, en Tris-HCl 30 mM (pH 7.9), DTT 5 mM conteniendo (i) FBP 1.5 mM y Ca²⁺ 0.15 mM; (ii) Ab-GST-CFBPasa (1/180); (iii) suero control. Cuando se indica se agregó ácido acético hasta pH 5-6. Luego de la dilución (tiempo cero) la actividad catalítica se midió a altas concentraciones de FBP y Mg²⁺ en presencia de DTT 5 mM (V=0.2 ml).

CONCLUSIONES

El conocimiento actual sobre las CFBPasas cloroplásticas se basa principalmente en los estudios realizados con las enzimas purificadas a partir de hojas de colza, espinaca y arveja. La ausencia de modificaciones postraduccionales en las enzimas cloroplásticas permite que los sistemas procarióticos de sobreexpresión representen una alternativa adecuada para la obtención de grandes cantidades de proteínas. Durante la segunda parte de la tesis, hemos sobreexpresado a la CFBPasa de trigo, en forma soluble y libre del extremo GST, mediante la utilización de un nuevo vector de expresión: el plásmido pET-22. Este sistema permite clonar los genes de interés bajo el control inducible de las señales fuertes de transcripción y traducción del bacteriófago T7. La proteína clonada puede alcanzar, en pocas horas de inducción, hasta el 50 % de la proteína celular total. De esta manera hemos recuperado de los lisados de E. coli, grandes cantidades de la proteína soluble constituida por la secuencia aminoacídica de la CFBPasa de trigo en la cual faltan los 20 aminoácidos del extremo amino terminal de su forma madura. La producción de esta proteína recombinante superó las limitaciones causadas por la formación de cuerpos de inclusión no solo por particionar en la fracción soluble sino también por poseer una actividad catalítica similar a las obtenidas con arveja, espinaca y colza.

La enzima purificada se comportó como un homotetrámero de peso molecular c.a 160000, tal como las enzimas cloroplásticas purificadas de hojas. La actividad catalítica fue potenciada por un agente reductor como el DTT en presencia de altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} , en tanto que a bajas concentraciones de estos metabolitos fue necesaria la presencia previa de los moduladores DTT, FBP y Ca^{2+} . Es importante destacar que la Trx de E. coli y la Trxf

CONCLUSIONES

de espinaca activan a la enzima de trigo durante los ensayos en dos etapas. Aún más, agentes no fisiológicos como el NaTCA y el 2-propanol potenciaron esta activación ya que a $\text{FBP } 1 \text{ mM}$, $\text{Ca}^{2+} 0.05 \text{ mM}$ y en presencia de DTT, se obtuvieron los máximos valores de actividad enzimática.

Cabe destacar que, aunque la enzima carece de los 20 aminoácidos del extremo N-terminal, las propiedades estructurales y catalíticas de la CFBPasa de trigo fue semejante a las observadas con las contrapartes de arveja, colza y espinaca. Sobre esta base diseñamos los experimentos con la forma truncada de la proteína madura a fin de analizar la importancia de esta región de la proteína sobre las características cinéticas y estructurales de la CFBPasa. Estos resultados permiten concluir que el aporte del extremo amino-terminal a la estructura tridimensional funcional y por lo tanto a la actividad catalítica es mínimo o nulo. Sin embargo podría extenderse a otras CFBPasas porque la comparación de las estructuras primarias reveló que el extremo N-terminal es la región donde difieren notablemente tanto las cloroplásticas como las no-cloroplásticas.

En las secciones precedentes se ha analizado el efecto estabilizador de los moduladores FBP y Ca^{2+} sobre la estructura de la CFBPasa y por lo tanto su relación con el fenómeno de activación que estos metabolitos ejercen in vitro. Con el objetivo de detectar diferentes estados conformacionales de la enzima en presencia de dichos moduladores, se utilizaron las propiedades desnaturizantes de la urea para el estudio del plegamiento de la CFBPasa. El comportamiento diferencial que los moduladores provocan en la respuesta de la CFBPasa a la desnaturización por urea indica la existencia de estados conformacionales diferentes. En base a las propiedades cinéticas y espectrales se han discriminado cuatro estados conformacionales de características distintas: 1) un estado nativo inactivo (E_i) susceptible de ser activado; 2) un estado reducido activo (E_0) de corta vida media debido

posiblemente a la reoxidación al aire favorecida por el pH alcalino; 3) un estado reducido activo, estabilizado por la presencia de moduladores fisiológicos como el FBP y el Ca^{2+} (E_1) y 4) un estado reducido activo (E_2), estabilizado por el FBP y el Ca^{2+} , que en presencia del modulador no fisiológico NaTCA mostró mayor susceptibilidad a la urea (E_3). Es importante remarcar que la inactivación causada por el tratamiento de la enzima por 4 horas con urea 4 M correlaciona con la pérdida de su estructura cuaternaria. En estas condiciones la CFBPasa es un monómero sin función catalítica. Sin embargo, después de 24 horas en presencia de concentraciones de urea menores de 2 M la enzima fue inactivada aunque la estructura cuaternaria, caracterizada por ensayos de fluorescencia, no sufriera modificaciones. En conjunto los resultados obtenidos son congruentes con una mayor flexibilidad, y por lo tanto mayor inestabilidad, del sitio activo con respecto al resto de la molécula (Tsou, 1993).

ANTICUERPOS Y ANALISIS ESTRUCTURAL

Las interacciones proteína-proteína representan una alternativa experimental para el estudio de la estructura y la conformación de las proteínas. En este sentido, la reacción de los anticuerpos con los epitopes expuestos del antígeno constituye una herramienta adecuada para el análisis de los cambios conformacionales de las enzimas. Si bien las enzimas pueden ser inhibidas por sus correspondientes anticuerpos, es posible generar anticuerpos que interactúen con los dominios que no participan del centro activo y en consecuencia no modifican la actividad. En el curso de esta tesis fueron preparados varios anticuerpos con las CFBPasas purificadas a homogeneidad cuya especificidad fue determinada en los ensayos de Western Blot. Sin embargo, la efectividad para influir sobre la actividad de la CFBPasa fue altamente variable.

A) REACCION CRUZADA INTERESPECIFICA DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL DIRIGIDO CONTRA LA CFBPasa DE CLOROPLASTOS DE TRIGO

Las estructuras primarias deducidas a partir de cDNA (Carrasco, et al., 1994; Horsnell and Raines, 1991; Koßmann et al., 1992; Raines et al., 1988; Rodríguez Suárez and Wolosiuk, 1993) y la única establecida mediante la degradación de Edman (Marcus and Harsch, 1990) revelaron que las CFBPasas son proteínas homólogas, relacionadas en tamaño. En contraste con la variedad de secuencias aminoacídicas, los datos concernientes a las propiedades cinéticas y estructurales se circunscriben a las enzimas aisladas de espinaca (Wolosiuk et al., 1993), arveja (Carrasco, 1994) y colza (Rodríguez suarez and Wolosiuk, 1995).

A pesar de que los anticuerpos generados contra la CFBPasa de espinaca inmunoreaccionan con sus contrapartes de arveja (Fonollá et al., 1994), trigo (Raines et al., 1988) y colza (Rodríguez Suárez and Wolosiuk, 1993), los anticuerpos policlonales no son idóneos para establecer epitopes comunes, ya que reconocen varios sitios antigénicos. Los anticuerpos monoclonales preparados por Hermoso y colaboradores (1990) reaccionan en forma cruzada con la enzima de espinaca y la de arveja, pero faltan datos con respecto a las CFBPasas de otros orígenes. En función de estos datos fue de interés establecer regiones específicas y precisas con anticuerpos monoespecíficos. La proteína de fusión entre la GST y la CFBPasa de cloroplastos de trigo, obtenida durante la presente tesis, fue utilizada en la preparación de un anticuerpo monoclonal inmunoreactivo con la porción CFBPasa de la proteína quimérica, la CFBPasa de trigo y la CFBPasa de otras hojas.

La inmunización de ratones que se llevó a cabo con dicha proteína de fusión, generó varios hibridomas fuertemente positivos, de los cuales se seleccionó uno al que se denominó F10. Este clon fue seleccionado por su alta reactividad con la GST-CFBPasa pero absoluta inefectividad en el reconocimiento de la GST (figura 55). A partir de un ensayo de doble inmunodifusión (Outcherlony) llevado a cabo con inmunoglobulinas específicas (dato no mostrado) se concluyó que el isotipo del anticuerpo monoclonal F10 era IgG1. Aparentemente este anticuerpo reconoció específicamente a la porción CFBPasa de la proteína de fusión porque la reacción positiva obtenida con preparaciones homogéneas de CFBPasa de espinaca y colza coincidió en análisis de Western Blot con la posición de la subunidad de la enzima (c.a 40 kDa) (figura 55). Además, en apoyo de esta observación, también fueron detectadas proteínas de 42 kDa en preparaciones crudas de hojas de otras variedades de trigo (Triticum spelta, T. durum, T. aestivum) (datos no mostrados). Estos resultados indican

claramente la existencia de un epitope común no solo en las CFBPasas de arveja y espinaca (Hermoso et al., 1990) sino también en otras CFBPasas de origen filogenético diferente - Poaceae (trigo), Chenopodiaceae (espinaca) y Brassicaceae (colza)-. En conjunto con las estructuras primarias y el tamaño de las subunidades, estos datos indican que las CFBPasas son enzimas estructuralmente relacionanadas.

A pesar de reconocer específicamente a las CFBPasas cloroplásticas en ensayos de Western Blot, el anticuerpo monoclonal no inhibió la actividad enzimática de la CFBPasa de trigo (datos no mostrados).

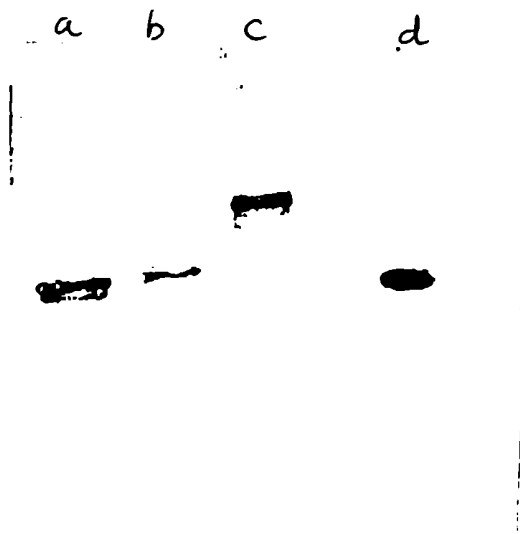


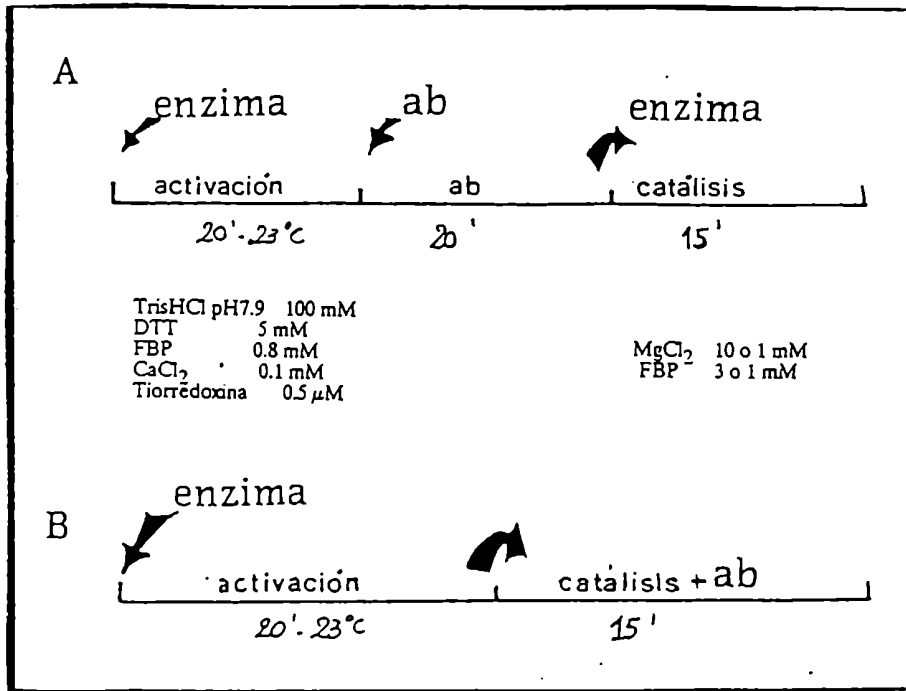
Figura 55. Análisis por Inmunoblot de la CFBPasa. Después del SDS-PAGE de 1 μ g de la CFBPasa purificada, se realizó el ensayo de Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal F10 y un segundo anticuerpo, IgG anti-ratón biotinilado. La reacción se reveló con estreptoavidina unida a fosfatasa alcalina. carril a: CFBPasa de espinaca, carril b: CFBPasa de colza, carril c: GST-CFBPasa, carril d: CFBPasa de trigo.

B) CFBPasa DE ESPINACA: INHIBICION DIFERENCIAL DE LA ACTIVIDAD POR UN ANTICUERPO POLICLONAL HOMOLOGO.

Los estados conformacionales de la CFBPasa generados durante la activación por los moduladores (FBP, Ca^{2+} , DTT, NaTCA, Trx) serían los responsables del aumento de la actividad enzimática. Con ello variaría la afinidad de anticuerpos específicos y en consecuencia la modificación de la actividad seguiría perfiles diferentes.

El anticuerpo policlonal preparado en conejos contra la CFBPasa de espinaca, fue ensayado con la enzima de espinaca nativa y con la enzima previamente incubada con DTT, FBP, Ca^{2+} y Trx. La inhibición que ejerce el anticuerpo sobre la actividad de la enzima depende de su estado de activación (figura 56 y tabla VII, columnas 1 y 3) y de la concentración de FBP y Mg^{2+} utilizados durante la catálisis (figura 56 y tabla VII, columnas 1 y 2) ya que los valores de $I_{0.5}$ son diferentes cuando la enzima ha sido activada y cuando se mide su actividad catalítica en altas o bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} . Esto sugiere que la interacción proteína-proteína es diferente si la enzima fue activada y si la catálisis se mide en presencia de concentraciones diferentes de Mg^{2+} y FBP. El efecto es similar tanto si la enzima se preincuba con el anticuerpo previamente a la catálisis (esquema III, A) como si se adiciona durante la catálisis (esquema III, B). Estos resultados indican que la capacidad de interacción entre la CFBPasa de espinaca y su anticuerpo homólogo, dependería de cambios conformacionales causados por la acción de sus moduladores que se traducirían en la exposición al solvente de superficies diferentes sobre la enzima.

Esquema III



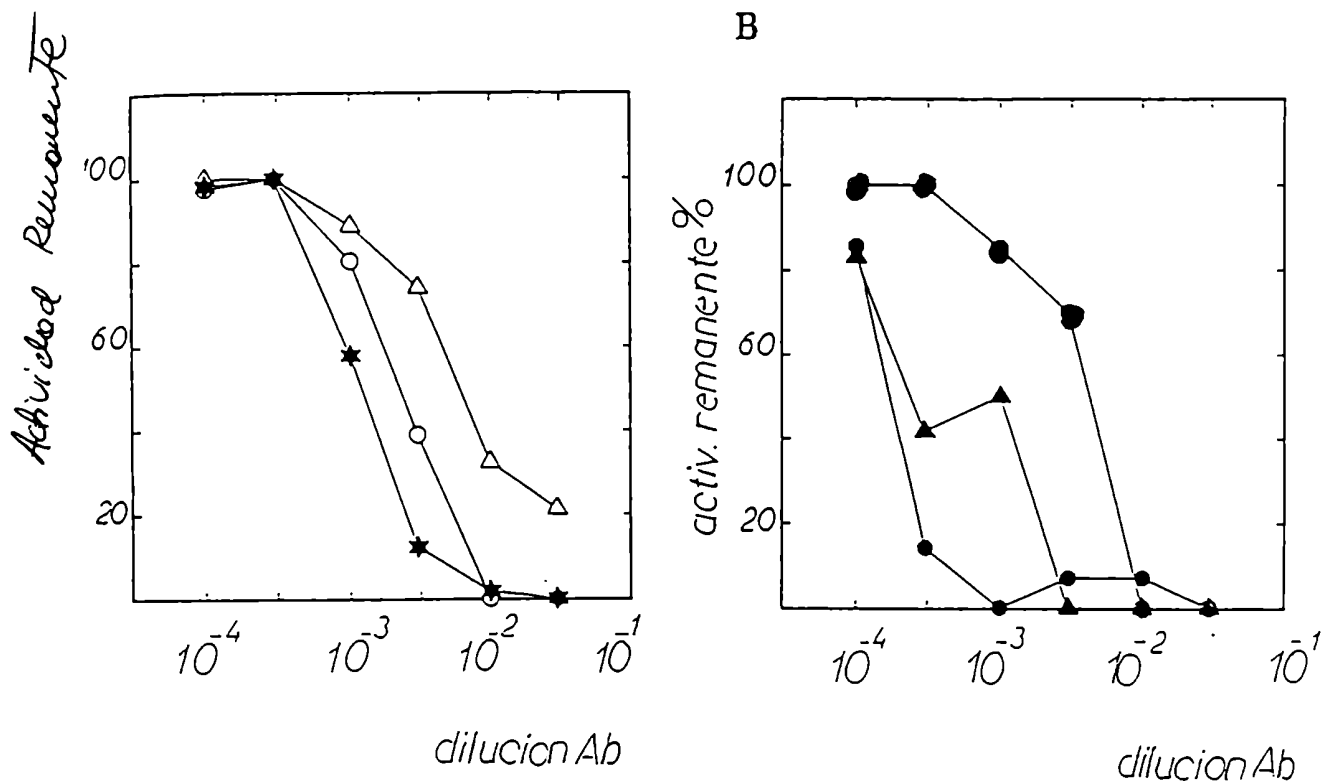


Figura 56. El efecto inhibitorio de anticuerpos policlonales se determinó sobre la CFBPasa purificada a homogeneidad a partir de hojas de espinaca, según el Esquema III. En el caso (A) la enzima se preincubó con el anticuerpo antes de medir su actividad catalítica y en el caso (B) se determinó dicha actividad catalítica directamente en presencia del anticuerpo. El desarrollo de la catálisis se analizó tanto a bajas como a altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} . La actividad catalítica de la enzima nativa se determinó a altas concentraciones de dichos moduladores.

CFBPasa activada - Δ - Δ - catálisis a altas concentraciones de
 \odot - \odot - FBP (3 mM) y Mg^{2+} (10 mM)
 \circ - \circ - catálisis a bajas concentraciones de
 \star - \star - FBP (1 mM) y Mg^{2+} (1 mM)

CFBPasa nativa - \star - \star - catálisis a altas concentraciones de
 \blacktriangle - \blacktriangle - FBP (3 mM) y Mg^{2+} (10 mM)

Tabla VII

Inhibición de la actividad <i>Fructosa-1,6-bisfosfatasa</i> (FBPasa) de espinaca por el anticuerpo homólogo ($I_{0.5}$)			
FBPasa			
Agregado del Ab	Activada		Nativa
	Alto	Bajo	Alto
A	1/200	1/562	1/800
B	1/300	1/6300	1/1000

Tabla VII. Se indican los valores de $I_{0.5}$ obtenidos en los experimentos descritos en la figura 56. Dichos valores representan la dilución de anticuerpos a la cual se obtiene el 50% de la inhibición de la actividad catalítica de la enzima en las condiciones indicadas.

En el caso de la CFBPasa de trigo, el anticuerpo policlonal preparado contra la proteína de fusión GST-CFBPasa descrita en la primer parte de esta tesis, carece de efectos, positivos o negativos, sobre la renaturalización de la CFBPasa (fig. 54). Además, a pesar de existir epitopes antigénicos, reconocidos en ensayos de ELISA y Western Blot por el anticuerpo monoclonal y por el policlonal, la interacción de éstos con la CFBPasa de trigo no produjo efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática.

C) PROTEINA DE FUSION DE 35 KDA

En el centro de la estructura primaria las CFBPasas contienen una secuencia aminoacídica cuyo grado de identidad es casi total.

-Arg-Cys-Val-Val-Asn-Val-Cys-Gly- espinaca

-Arg-Cys-Ile-Val-Asn-Val-Cys-Gly- trigo, colza, papa,
arabidopsis

Por el contrario, la homología es extremadamente baja en la región que la precede. Aparentemente, esta región denominada 170'S loop, está involucrada en la activación por luz vía sistema Ferredoxina-Tiorredoxina.

La estructura cristalográfica de la CFBPasa de cloroplastos de espinaca (Villeret et al., 1995), mostró que el 170'S loop está insertado entre los residuos Leu 153 y Gln 154 de la FBPasa de riñón de cerdo como una protrusión expuesta al solvente que no interacciona con las restantes subunidades (Marcus, Moberly and Labtshaw, 1988). La secuencia parcial del gen de la CFBPasa de trigo correspondiente a los aminoácidos 190 al 260 fue preparada mediante técnicas de PCR y análisis de restricción. Este fragmento de ADN fue expresado en E. coli en forma de proteína de fusión con la GST, la cual fue purificada mediante cromatografía de afinidad. Con esta proteína de fusión se procedió a preparar un anticuerpo policlonal en conejos.

Clonado y expresión de la proteína de fusión de 35 kDa.

La secuencia nucleotídica que codifica para el 170'S loop fue amplificado por PCR sobre el cDNA del gen de la enzima de trigo contenido en el plásmido Bluescript. El sitio de restricción para la enzima BamHI se incluyó en el oligonucléotido correspondiente al extremo 5', en tanto que el sitio de restricción para EcoRI se incluyó en el correspondiente al 3'. El fragmento amplificado se clonó direccionado en los sitios BamHI-EcoRI del polilinker del vector de expresión pGEX-2T. Se transformó la cepa DH5 α F'IQ por electroporación y los clones obtenidos se caracterizaron por análisis de restricción.

La expresión de la proteína de fusión de 35 kDa se indujo con 0.1 mM IPTG según se ve en la figura 57. Esta proteína permanece prácticamente en la fracción insoluble correspondiente a los cuerpos de inclusión. Su purificación se inició a partir de un precipitado de bacterias inducidas, resuspendidas en Tris HCl 10 mM (pH 8); NaCl 150 mM; EDTA 5 mM y tratadas con lisozima, DTT 5 mM y N-Lauroylsarcosina 1.5%. Luego de sonicar y centrifugar esta preparación se le agregó al sobrenadante Tritón X-100 3% y se lo sembró en una columna de GSH inmovilizado en agarosa. La proteína de fusión se eluyó en presencia de DTT, Tritón X-100 y GSH 5 mM (Frangioni and Neel, 1993). Las fracciones enriquecidas en la proteína de 35 kDa, volvieron a sembrarse en una columna de GSH-agarosa obteniéndose una fracción proteica pura (0.65 mg/ml) que se utilizó en la preparación de un anticuerpo policlonal. Dicho anticuerpo policlonal reconoce a la GST de S. japonicum, a la proteína de fusión GST-CFBPasa de 65 kDa, a la CFBPasa recombinante de trigo y en menor medida a la CFBPasa de cloroplastos purificada a partir de hojas de espinaca.

En experimentos de activación de la CFBPasa de trigo con NaTCA, el anticuerpo contra la proteína de 35 kDa no

reveló ningún efecto significativo sobre el proceso de activación (figura 58). Este anticuerpo también fue incapaz de impedir la activación enzimática mediada por la Trx de E. coli o la Trx-f de espinaca (figuras 59 y 60). En cambio, el anticuerpo policlonal preparado contra la CFBPasa de espinaca es capaz de disminuir 70% la actividad catalítica de la enzima de trigo (véase figura 61).

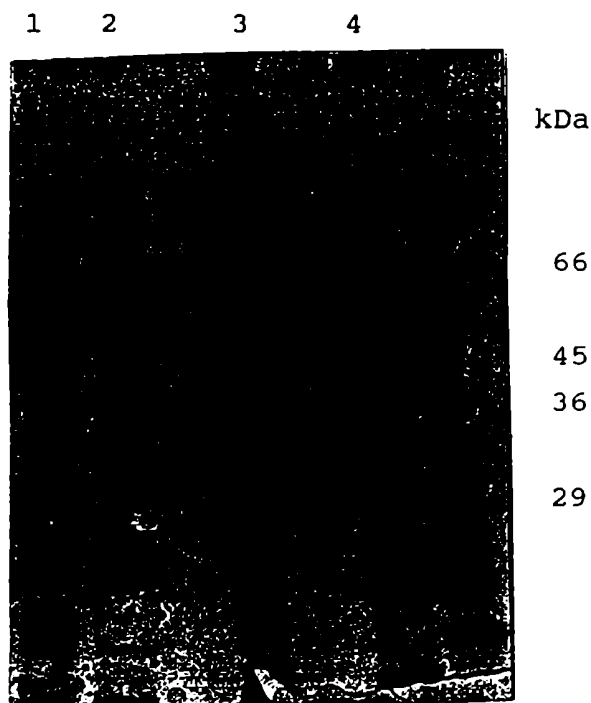


Figura 57. Expresión de la proteína de fusión de 35 kDa. Análisis por SDS-PAGE (11%) de las proteínas de E. coli inducidas con IPTG, que expresan la proteína de 35 kDa.

- (1) Proteínas solubles del cultivo inducido.
- (2) Proteínas solubles del cultivo sin inducir.
- (3) Fracción insoluble o cuerpos de inclusión, del cultivo inducido.
- (4) Proteínas totales del cultivo inducido.

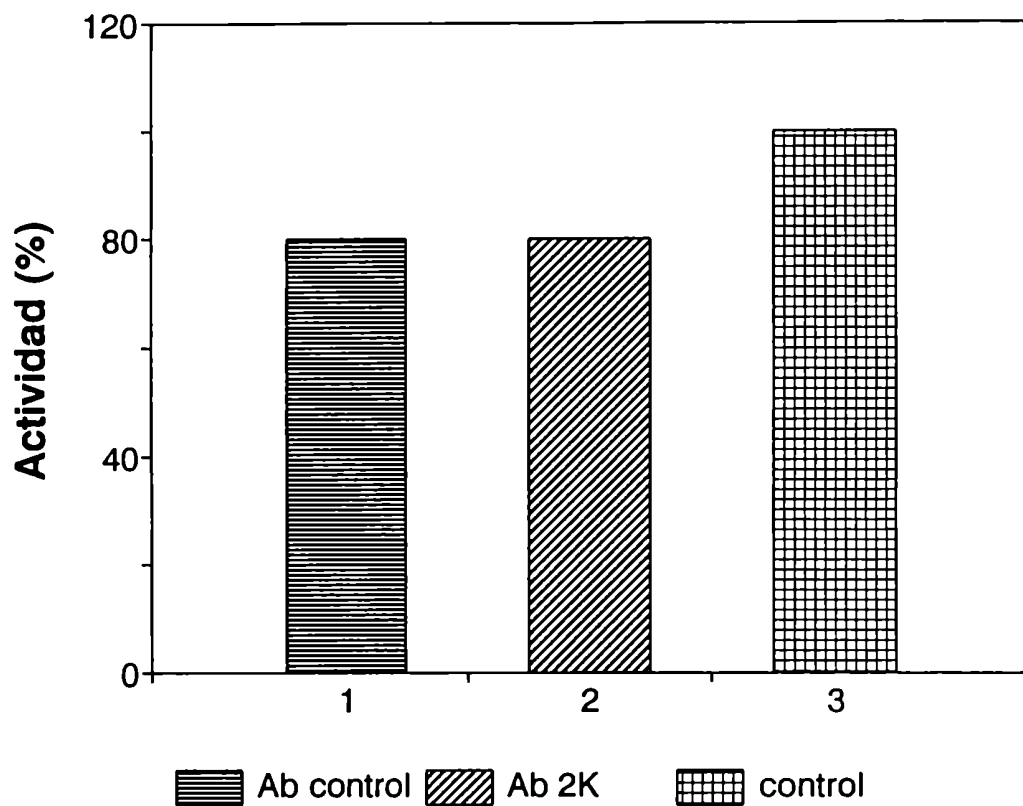


Figura 58. La CFBPasa ($1 \mu\text{g}$) se incubó durante 2 horas a 24°C en presencia de Tris-HCl 50 mM (pH 7.9) y una dilución $1/14$ de los anticuerpos policlonales (i) control, (ii) Ab2K, contra el fragmento "extra" de las CFBPasas autotróficas. Luego se agregó a la enzima una mezcla de activación que contenía DTT (5 mM), FBP (1 mM), CaCl_2 ($50 \mu\text{M}$) y NaTCA (0.21 M) ($V=50 \mu\text{l}$) con la cual se incubó durante 30 minutos ($V=50 \mu\text{l}$). Finalmente se determinó la actividad remanente a bajas concentraciones de FBP y Mg^{2+} durante 10 minutos ($V=1 \text{ ml}$).

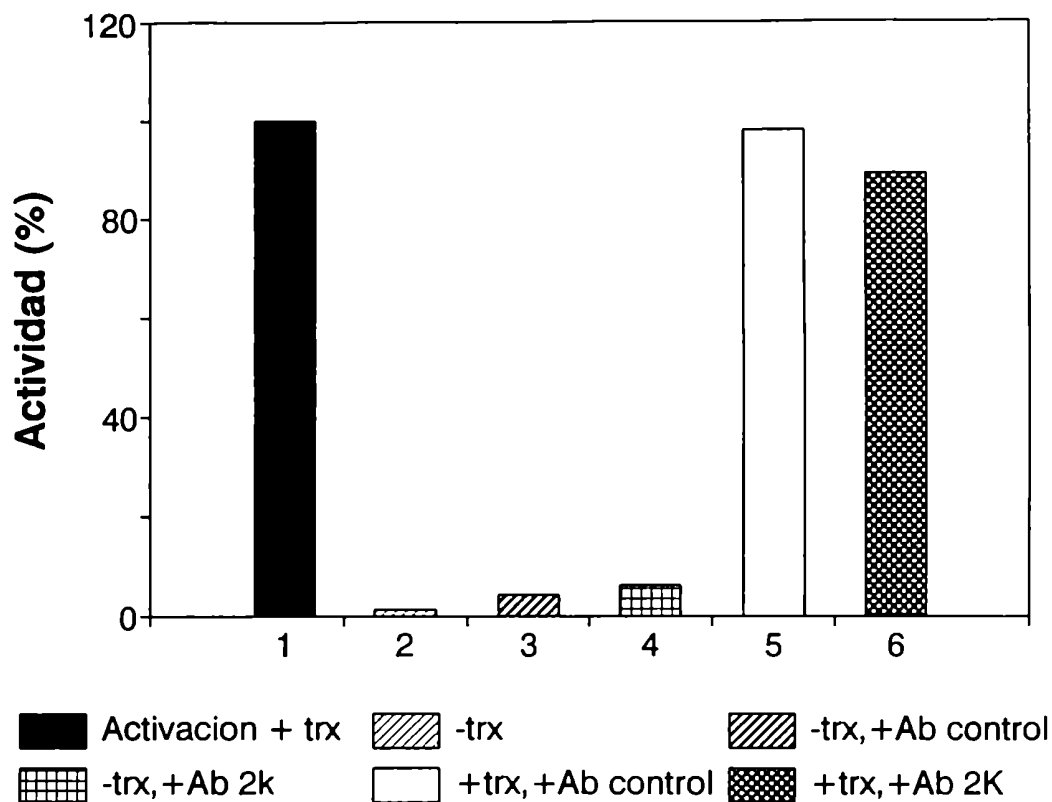


Figura 59. La enzima (5 μ g) se incubó durante 30 minutos a 24°C en presencia de Tris-HCl 50 mM (pH 7.9) y (i) Ab2K (1/10), (ii) suero normal (1/10) (V=45 μ l). Luego se agregó a la solución de enzima DTT 5 mM y Trx de *E. coli* (2.5 μ M) en los casos indicados (V=50 μ l). Se incubó durante 30 minutos y se determinó la actividad catalítica agregando una solución que contenía bajas concentraciones de FBP y Mg²⁺ (V=250 μ l).

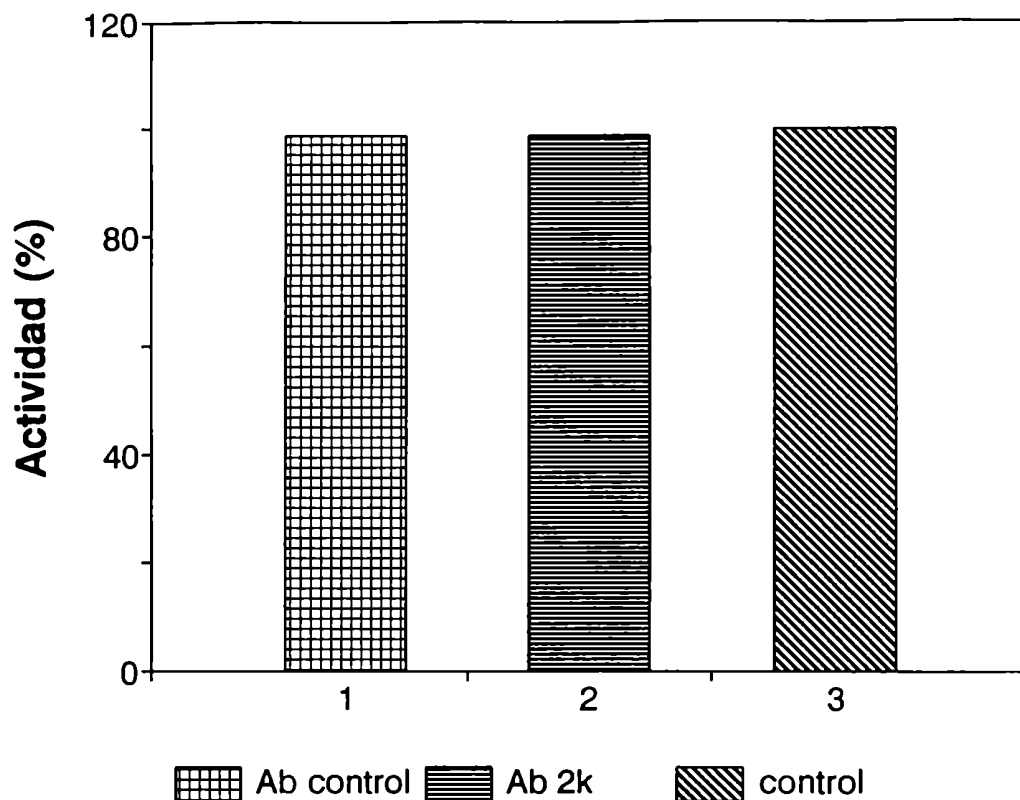


Figura 60. El experimento se realizó como el de la figura 58. La diferencia radica en que la enzima se activó en presencia de DTT 5 mM y Trx-f de espinaca (2.5 μ M).
 Blanco sin Trx-f: actividad= 0%
 con Trx-f: actividad control= 100% (12.9 U/mg)

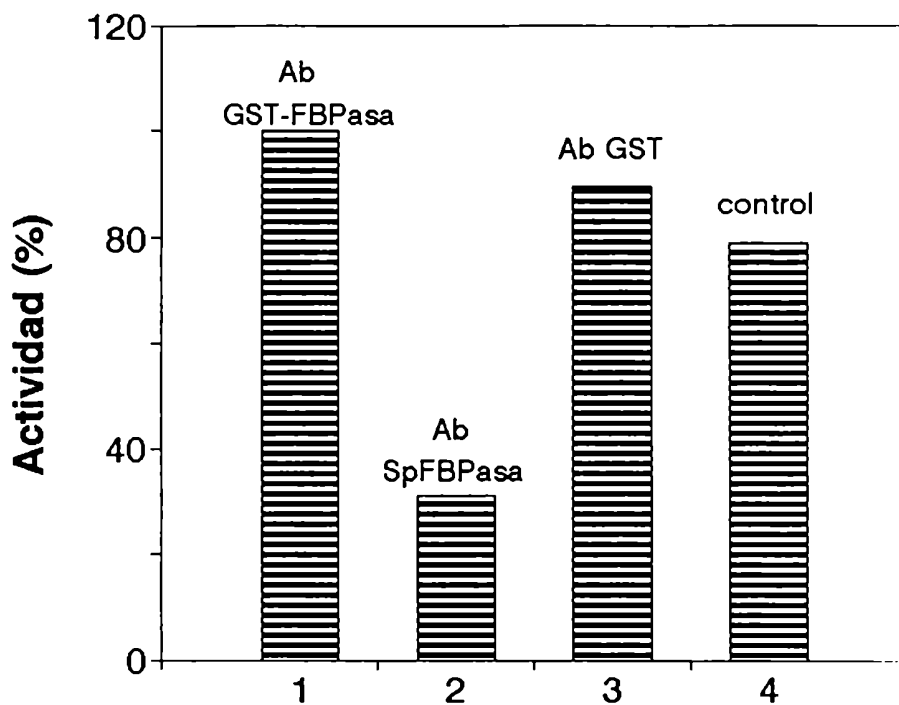


Figura 61. La CFBPasa (4 μ g) se incubó por una hora a 24°C en presencia de tris-HCl 50 mM (pH 7.9) y una dilución 1/20 de los anticuerpos policlonales contra (i) GST-CFBPasa, (ii) CFBPasa de espinaca, (iii) GST. Luego se determinó la actividad remanente en presencia de DTT 5 mM y altas concentraciones de FBP y Mg^{2+} (V=0.2 ml).

REFERENCIAS

- Anderson, L.E., and Ben-Bassat, D, (1981) Membrane-bound metabolism enzymes in pea leaf chloroplast. In: Photosynthesis IV. Regulation of carbon metabolism (Akoyuroglou, G., ed.) 373-378, Balaban International Science Services, Philadelphia. .
- Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of proteins chains. Science 181, 223-230.
- Arnon, D.I.(1955). The chloroplast as a complete photosynthetic unit. Science 122, 9-16.
- Babbit, P., West, B., Buelchter, D., Kuntz, I., and Kenyon, G. (1990) Removal of a proteolytic activity associated with aggregates formed from expression of creatine kinase in *E. coli* leads to improved recovery of active enzyme. Biotech. 8, 945-947.
- Ballicora, M.A. and Wolosiuk, R.A. (1990) Effect of alkaline pH on the activity and the structure of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. Plant Sci. 70, 35-41.
- Ballicora, M.A., and Wolosiuk, R.A. (1994) Enhancement of the reductive activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by modulators and protein perturbants. Eur. J. Biochem. 222, 467-474.
- Bensadoun, A. and Weinstein, D. (1976) Anal. Biochem. 70, 241.
- Blankenship, E. and Prince, C.(1985), Trends Biochem. Sci. 10, 382-383
- Blum, P., Velligan, M., Lin, N. and Martin, A. (1992) DnaK-mediated alterations in human growth hormone protein inclusion bodies. Biotech. 10, 302-304.
- Bowden, G.A., Paredes, A., and Georgiou, G. (1991) Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. Biotech. 9, 725-730.
- Bradford, M. (1976) Anal. Biochem., 72, 248
- Buchanan, B.B. (1980) Annu. Rev. Plant Physiol. 31, 341-374
- Buchanan, B.B. (1991) Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: The Ferredoxin/Thioredoxin System. Arch. Biochem. Biophys. 288, 1-9

- Buchanan, B.B., Wolosiuk, R.A. and Schurmann, P. (1979) Thioredoxin and enzyme regulation. Trends in Biochem. Sci. 4, 93-96.
- 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.
- Carlson, J. and Yarmush, M. (1992) Antibody assisted protein refolding. Biotechnology 10, 86-91.
- Carrasco, J.L., Chueca, A., Hermoso, R., Lázaro, J.J., Ramos, J.L., Sahraway, M., and López Gorgé, J. (1994) Cloning, structure and expression of a pea cDNA clone coding for a photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase with some features different from those of the leaf chloroplast enzyme. Planta 193, 494-501.
- Chao, S., Raines, C., Longstaff, M., sharp, P.J., gale, M.D. y Dyer, T. (1989). Chromosomal location and copy number in wheat and some of its close relatives of genes for enzymes involved in photosynthesis. Mol. Gen. genet. 218, 423-430.
- Chen, P.S., Toribara, T.Y. and Warner, H. (1966). Microdetermination of phosphorus. Anal. Chem. 28, 1756-1758.
- Chua, N.H., and Schmidt, G.W. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 6110-6114.
- Chueca, A., Lázaro, J.J., and López Gorgé. (1984) Light-induced nuclear synthesis of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. Plant Physiol. 75, 539-541.
- Cleland, J., and Wang, D. (1990) Cosolvent assisted protein refolding. Biotech. 8, 1274-1278.
- 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
- Creighton, T. (1977) J. Mol. Biol. 113, 329
- Creighton, T., Zapún, A., and Darby, N. (1995) Mechanisms and catalysts of disulphide bond formation in proteins. Trends Biochem. Sci. 13, 18-22.
- Cséke, C., Nishizawa, A. and Buchanan, B., (1982) Plant Physiol. 70, 658-661

- Cséke, C. and Buchanan, B.B. (1986) Regulation of the formation and utilization of photosynthate in leaves. Biochim. Biophys. Acta 853, 43-64.
- Danielson, H. and Mannervick, B. (1985) Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. Biochem. J. 231, 263-268.
- Droux, M., Jacquot, J.P., Mirginiac-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.
- Ellis, R.J. (1979). The most abundant protein in the world. Trends in Biochem. Sci. 4, 241-244.
- Ellis, R.J. (1990). Molecular Chaperones: the plant connection. Science 250, 954-958.
- Ferreyra, R., Soncini, F. and Viale, A. (1993) Cloning, characterization, and functional expression in *E. coli* of chaperonin (GroESL) genes from the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. J. Bacteriol. 175, 1514-1523.
- Ferri, G., Stoppini, M., Meloni, M., Zapponi, M. 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.
- Fonollá, J., Hermoso, R., Carrasco, J., Chueca, A., Lázaro, J.J., Prado, F., and López Gorgé, J. (1994) Antigenic relationship between chloroplast and cytosolic fructose-1,6-bisphosphatases. Plant Physiol. 104, 381-386.
- Ford, D. M., Jablonsky, P.J., Mohamed, A., and Anderson, L.E. (1987) Protein modulator appears to be a complex of ferredoxin, ferredoxin/thioredoxin reductase, and thioredoxin. Plant Physiol. 83, 628-632.
- Franck, J. y Gaffron, H. (1941). Photosynthesis, facts and interpretation. Adv. Enzym. 1, 199-262.
- Frangioni, J., and Neel, B. (1993) Solubilization and purification of enzymatically active Glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. Anal. Biochem. 210, 179-187.
- Frankel, S., Sohn, R., and Leinward, L. (1991) The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. Proc. Acad. Sci. 88, 1192-1196.

- Freedman, R. (1994) Folding helpers and unhelpful folders. Current Biology 4, 933-935.
- Freedman, R. (1995) The formation of protein disulphide bonds. Current Opinion in Structural Biology. 5, 85-91.
- Frieden, C. (1970) Kinetic aspects of regulation of metabolic processes. The hysteretic enzyme concept. J. Biol. Chem. 245, 5788-5799.
- Friguet, B., Djavadi-Ohanian, L. and Goldberg, E. (1989) Chapter 12 in Protein Structure. A practical Approach (Creighton T., ed.) 287-310 IRL Press.
- Galfr, G.A. and Milstein, C., (1981) Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. Meth. Enzymol. 73, 3-46.
- Georgopoulos, C. (1992) The emergence of the chaperone machine. Trends Biochem. Sci. 17, 295-299.
- Gething, M. and Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. Nature 355, 33-45.
- Goldberg, M.E. (1991) Investigating protein conformation dynamics and folding with monoclonal antibodies. Trends in. Biochem. Sci. 16, 358-362.
- Goff, S. and Goldberg, A. (1985) Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of lon and other heat shock genes. Cell 47, 587-595.
- Goloubinoff, P., Gatenby, A. and Lorimer, G. (1989) Nature 337, 44-47.
- Gontero, B., Cardenas, M., and Richard, J. (1988) A functional five-enzyme complex of chloroplasts involved in the Calvin cycle. Eur. J. Biochem. 173, 437-443
- Gragerov, A., Martin, E., Krupenka, M., Kashleu, M. and Nikiforov, V. (1991) Protein aggregation and inclusion body formation in *E. coli* rpoH mutant defective in heat shock protein induction. FEBS Lett. 291, 222-224.
- Gutteridge, S. (1990). Limitations of the primary event of CO₂ fixation in photosynthetic organisms: the structure and mechanism of Rubisco. Biochim. Biophys. Acta 1015, 1-14.
- Haase-Pettingell, C., and King, J., (1988) Formation of aggregates from a termolabile in vivo folding intermediate in P22 tailspike maturation. J. Biol. Chem. 263, 4977-4983.

- Habig, W., Pabst, M., and Jakoby, W. (1974) Glutathione S-Transferases. J. Biol. Chem. 249, 7130-7139.
- Halenbeck, R., Kawasaki, E., Wrinn, J. and Kothe, K. (1989) Renaturation and purification of biologically active human macrophage colony stimulating factor expressed in E.coli. Biotech. 7, 710.
- Hanstein et al. (1971) Arch.Biochem. Biophys. 147, 534-544
- Hartley, D., and Kane, F. (1988) Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. Biochem. Soc. Trans. 16, 101-102.
- Hermoso, R., Fonollá, J., de Felipe, M.R., Vivo, A., Chueca, A., Lázaro, J.J. and López Gorgé, J. (1992) Double immunogold localization of thioredoxin f and photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase in spinach leaves. Plant Physiol. Biochem. 30, 39-46.
- Hershey, H.P., Barber, R.F., Idler, K., Murray, M. y Quail P.H. (1987). Nucleotide sequence and characterization of a gene encoding the phytylcinnamoyl polypeptide from oat. Gene 61, 339-348.
- Hertig, C.M., and Wolosiuk, R.A. (1980). Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 325-333.
- 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.
- Hill, R. and Bendall, F. (1960) Nature 186, 136-137.
- Hockney, R. (1994) Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. Trends. Biotech. 12, 456-463.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. Annu. Rev. Biochem. 54, 237-271.
- Horowitz, P and Criscimagna, N. (1986) Low concentrations of guanidinium chloride expose apolar surfaces and cause differential perturbation in catalytic intermediates of rhodanase. J. Biol. Chem. 261, 15652-15658.
- Horsnell, P., and Raines, C. (1991) Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*. Plant. Mol. Biol. 17, 185-186.
- Issakidis, E., Saarinen, M., Decottignies, P., Jacquot, J.P., Cretin, C., Gadal, P. and Mirginiac-Maslow, M. (1994) J. Biol. Chem. 269, 3511-3517.

-Jacquot, J.P., López-Jaramillo, J., Chueca, A., Cherfils, J., Lemaire, S., Chedozeau, B., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Wolosiuk, R.A. and López Gorgé, J. (1995). High-level expression of recombinant pea chloroplast Fructose-1,6-bisphosphatase and mutagenesis of its regulatory site. Eur. J. Biochem. 229, 675-681.

-Jaenicke, R. and Rudolph, R. (1989) Folding Proteins. chapter 9. in A Practical Approach. 191-223. (Creighton, T.ed.) IRL Press

-Jordan, J.B., and Chollet, R. (1983). Inhibition of ribulose biphosphate carboxylase by substrate ribulose 1,5-bisphosphate. J. Biol. Chem. 258, 13752-13758.

-Katogini, F., Lam, E. and Chua, N.H. (1989) Two tobacco DNA-binding proteins with homology to nuclear factor CREB. Nature 340, 727-730.

-Kay, R., Chan, A., Daly, M., and McPherson, J. (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. Science 236, 1299-1302.

-Kay, S. Keith, B., Shinizaky, K., Chye, M. and Chua, N.H. (1989) The rice phytochrome gene: structure, autoregulated expression and binding of GT-1 to a conserved site in the 5' upstream regions. Plant cell 1, 351-360.

-Ke, H.M., Thorpe, C.M., Seaton, B.A., Marcus, F., and Lipscomb, W.N. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 1475-1479.

-Kelly, G.J. and Latzko, E. (1977). Plant Physiol. 60, 295-299.

-Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.H., and Buchner, J. (1991) Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. Biotech. 9, 825-829.

-Kobmann, J., Müller-Rober, B., Dyer, T., Raines, C., Sonnewald, U., and Willmitzer, L., (1992) Cloning and expression analysis of the plastidic fructose-1,6-bisphosphatase coding sequence from potato: circumstantial evidence for the import of hexoses into chloroplasts. Planta 188, 7-12.

-Kreimer, G., Melkonian, M., Holtum, L.A.M., and Latzko, E. (1988) Stromal free calcium concentration and light-mediated activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. Plant Physiol. 86, 423-428.

-Ladror, U., Latshaw, S., and Marcus, F. (1990) Spinach cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase. Purification, enzyme

properties and structural comparisons. Eur.J. Biochem. 189, 89-94.

-Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

-Lamotte-Guery, F., Miginiac-Maslow, M. Decottignies, P., Stein, M., Minaid, P., and Jacquot., J.P.(1991) Mutations of a negatively charged aminoacid in thioredoxins modifies its reactivity with chloroplastic enzymes. Eur. J. Biochem. 196, 287-294.

-Lloyd, J., Raines, C., John, U., and Dyer, T. (1991) The chloroplast FBPase gene of Wheat: structure and expression of the promoter in photosynthetic and meristematic cells of transgenic tobacco plants. Mol. Gen. Genet. 225, 209-216.

-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, 265-276.

-Marcus, F., Moberly, L., and Latshaw, S. (1988) comparative amino acid sequence of fructose-1,6-bisphosphatases: identification of a region unique to the light-regulated chloroplast enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 5379-5383.

-Marcus, F., and Harrsch, P. (1990) Aminoacid sequence of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. Arch. Biochem. Biophys. 279, 151-157.

-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.

-Marston, F.A.O. (1986) the purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. Biochem. J. 240, 1-12

-Missiakas, D., Georgopoulos, C. and Raina, S. (1993) Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene dsbB whose product is involved in the formation of disulfide bonds in vivo. Proc. natl. Acad. Sci. 90, 7084-7088.

-Mitraki, A., Betton, J.M., Desmadrie, M. and Yon, J.M.,(1987). Quasi-irreversibility in the unfolding-refolding transition of phosphoglycerate kinase induced by guanidine hydrochloride. Eur. J. Biochem. 163, 29-34

- Mitraki, A., and King, J. (1989) Protein folding intermediates and inclusion body formation. Biotech. 7, 690-697.
- Mitraki, A. and King, J. (1992) Amino acid substitutions influencing intracellular protein folding pathways. FEBS Lett. 1, 20-25.
- Mora García, S., Hagelin, K. and Wolosiuk, R.A. (1995). Protein Express. Purif. 6, 213-219.
- Mora García, S., Ballicora, M.A. and Wolosiuk, R.A. (1996) Chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase: modification of non-covalent interactions promote the activation by chimeric Escherichia coli thioredoxins. FEBS Lett. 380, 123-126.
- Murky, M. Samuelson, E., Naguyen, T., Mignard, L., Power, U., Binz, H., Uhlén, M. and Stahl, S. (1995) Hydrophobicity engineering to increase solubility and stability of recombinant protein from respiratory syncytial virus. Eur. J. Biochem. 230, 38-44.
- Neet, K.E., Ainslie, G.R. jr. (1980). Hysteretic enzymes. Meth. Enzymol. 64, 192-226.
- Nicholson, S., Easterby, J.S., and Powls, R. (1987) Properties of a multimeric protein complex from chloroplasts possessing potential activities of NADPH-dependent glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase and phosphoribulokinasa. Eur. J. Biochem. 162, 423-431.
- Oi, V.T. and Herzenberg, L.A. (1980) Immunoglobulin-producing hybrid cell lines. En Selected methods in cellular immunology, Mishell, B.B. and Shiigi, S.M. (eds.) W.H. Freeman Co., San Francisco, C.A. pp.366-367.
- Pace, C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. Methods in enzymology, 131; 266.
- Pappa, H. and Cass, A. (1993) A step towards understanding the folding mechanism of horseradish peroxidase. Eur. J. Biochem. 212, 227-235
- Plá, A. and López gorgé, J. (1981) Thioredoxin/fructose-1,6-bisphosphatase affinity in the enzyme activation by the ferredoxin/thioredoxin system. Biochim. Biophys. Acta 636, 113-118.
- Portis Jr. (1990) Rubisco Activase. Biochim. Biophys. Acta 1015, 15-28.

- 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.
- Prado, F., Lázaro, J.J., and López Gorgé, J. (1991) Regulation by Ca^{2+} of a cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase from spinach leaves. Plant Physiol. 96, 1026-1033.
- Prat-Gay, G., Paladini, A., Jr., Stein, M., and Wolosiuk, R.A. (1991) The effect of high hydrostatic pressure on the modulation of regulatory enzymes from spinach chloroplast. J. Biol. Chem. 266, 20913-20921.
- 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
- 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.
- Puri, N. and Cardamone, M. (1992) A relationship between the starting secondary structure of recombinant porcine growth hormone solubilised from inclusion bodies and the yield of native (monomeric) protein after in vitro refolding. FEBS Lett. 305, 177-180.
- Raines, C., Lloyd, J. C., Longstaff, M., Bradley, D., and Dyer, T. (1988) Chloroplast Fructose-1,6-bisphosphatase: the product of a mosaic gene. Nucl. Ac. Res. 16, 7931-7942.
- Raines, C.A., Lloyd, J.C., Willingham, N.M., Potts, S., and Dyer, T.A. (1992). cDNA and gene sequences of wheat chloroplast sedoheptulose-bisphosphatase reveal homology with fructose-1,6-bisphosphatase. Eur. J. Biochem. 205, 1053-1059.
- Reichard, P. (1968). The biosynthesis of deoxyribonucleotides. Eur. J. Biochem. 3, 259-266.
- Rodríguez Andrés, A., Lázaro, J.J., Chueca, A., Hermoso, R., and López Gorgé, J. (1987) Binding of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase to chloroplast membranes. Plant Sci. 52, 41-48.
- Rodríguez Andrés, A., Lázaro, J.J., Chueca, A., Hermoso, R., and López Gorgé, J. (1990) Effect of alcohols on the association of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase to thylacoid membranes. Physiol. Plant. 78, 409-413.

- Rodríguez Suárez, R., and Wolosiuk, R.A. (1993) Sequence of a cDNA encoding chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from rapeseed. Plant Physiol. 103, 1453-1454.
- Rodríguez Suárez, R., and Wolosiuk, R.A. (1995) High level expression in Escherichia coli, purification and properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from rapeseed (Brassica napus) leaves. Photos. Res. 46, 313-322.
- Sachetta, P. et al. (1993) Eur. J. Biochem. 215, 742-745.
- Sahraway, M., Chueca, A., Hermoso, R., Lázaro, J.J., and López Gorgé, J.(1990) In vivo and In vitro synthesis of photosynthetic fructose-1,6-bisphosphatase from pea (Pisum sativum L.). Planta 182, 319-324.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second edition. (1989). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Niklen, S. and Coulson, A. R. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separations of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166, 368-379.
- Scheibe, R. (1990) Light-Dark modulation: regulation of chloroplast metabolism in a new light. Bot. Acta 103, 327-334
- Scheibe, R. (1991). Redox-modulation of chloroplast enzymes. Plant Physiol. 96, 1-3.
- Schein, C. (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. Biotech. 7, 1141-11479.
- Schreier, P.H., Seftor, E.A., Schell, J. and Bohnert, H.J. (1985) Embo J. 4, 25-32.
- Schurman, P. and Wolosiuk, R.A.(1978) Biochem. Biophys. Acta 522, 130
- Schurmann, P., Roux, J. and Salvi, L. (1985) Modification of thioredoxin specificity of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by substrate and Ca^{2+} . Physiol. Veg. 23, 813-818.
- Simmons, P.C. and Vander Jagt, D.L. (1977) Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione affinity chromatography. Anal. Biochem. 82, 334-341

- Smeekens, S., de Groot, M., Van Binsbergeau, J., and weisbeek, P. (1985) Nature 317, 456-458.
- Smith, B.D., Davern, K.M., Board, P.G., Tiu, W.U., García, E.G. and Mitchell, G.F. (1986) Mr 26000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129 J mice is a parasite glutathione S-transferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8703-8707.
- Smith, B.D. and Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with Glutathione S-transferase. Gene 67, 31-40.
- Soulié, 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.
- Speed, M., Wang, D., and King, J. (1995) Multimeric intermediates in the pathway to the aggregated inclusion body state for P22 tailspike polypeptide chains. Protein Science. 4, 900-908.
- Stein, M. and Wolosiuk, R.A. (1987) The effect of chaotropic anions on the activation and activity of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. J. Biol. Chem. 262, 16171-16179.
- Stein, M., Lázaro, J.J., and Wolosiuk, R.A. (1989) Concerted actions of cosolvents, chaotropic anions and thioredoxin on chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. Reactivity to iodoacetamide. Eur. J. Biochem. 185, 425-431)
- Stitt, M. and Heldt, H. W. (1981). Physiological rates of starch breakdown in isolated intact spinach chloroplasts. Plant Physiol. 68, 755-761.
- Strandberg, L. and Enfors, S. (1991) Factors influencing inclusion bodies formation in the production of a fused protein in *E. coli*. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1669-1674.
- Szekeres, M., Droux, M., and Buchanan, B.B. (1991) The ferredoxin-thioredoxin reductase variable subunit gene from *Anacystis nidulans*. J. Bacteriol. 173, 1821-1823.
- Tanaka, K., Ono, C., Sugimoto, T., and Kondo, N. (1990). Light dependent release of carbon metabolism enzymes from chloroplast thylacoids has no relation to light-activation of the enzymes. Agric. Biol. Chem. 54, 2149-2151
- Tandon, S. and Horowitz, P (1986) Detergent-assisted refolding of guanidium chloride-denatured rhodanase. J. Biol. Chem. 261, 15615-15618.

- Thatcher, D., and Hitchcock, A. (1994) Protein Folding in Biotechnology Chapter 9, in Mechanisms of protein folding. Roger Pain. Ed. IRL Press
- Tokatlidis, K., Dhurjati, P., Millet, J., Béguin, P. and Aubert, J.P. (1991) High activity of inclusion bodies formed in *E. coli* overproducing *Clostridium thermocellum* are made of native enzyme that resists 8 M urea. FEBS lett. 282, 205-208.
- Tsou, C.L. (1993) Conformational flexibility of enzyme active sites. Science 262, 380-381.
- Van den Broeck, G., Timko, M.P., Kansh, A.P., Cashmore, A.R., Van Montagu, M., and Herrera-Estrella, L. (1985) Nature 313, 358-363.
- Vanhove, M. et al. (1995) Proteins: structure, function and genetics 22, 110-118.
- Villeret, V., Huang, S., Zhang, Y., Xue, Y. and Lipscomb, W. (1995) Crystal structure of spinach chloroplast Fructose-1,6-bisphosphatase at 2,8 Å resolution. Biochem. 34, 4299-4306.
- Von Hippel y Wong, 1964, Science 145, 577-580
- Willkinson, D. and Harrison, R. (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Biotech. 9, 443-447.
- Wolosiuk, R.A. and Buchanan, B.B. (1976a) Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. Nature (London) 266, 565-567.
- Wolosiuk, R.A. and Buchanan, B.B. (1976b) Studies on the regulation of chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Biol.Chem. 251, 6456-6461.
- 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.
- 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.
- Wolosiuk, R.A., Hertig, C.M. Nishizawa, A. N., and Buchanan, B.B. (1982). Enzyme regulation in C4 photosynthesis. Role of Ca^{2+} in thioredoxin-linked activación of sedoheptulose bisphosphatase from corn leaves. FEBS Lett. 140, 31-35.

-Wolosiuk, R.A., Corley, E., Crawford, N.A., and Buchanan, B.B. (1985) Dual effects of organic solvents on chloroplast phosphoribulokinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. FEBS Lett. 189, 212-216.)

-Wolosiuk, R.A. (1986) The role of thioredoxin-f and organic solvents in the regulation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. Thioredoxins and glutaredoxin systems: structure and function. ed. Holmgren et al. Raven Press, N. Y.

-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)

-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

-Wolosiuk, R.A., Ballicora, M.A., and Hagelin, K. (1993) The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO₂ assimilation: enzyme modulation. FASEB J. 7, 622-637)

-Yvon, M., Chabanet, C. y Pelissier, J-P. (1989) Int.J.Peptide Protein Res. 34, 166-176

-Zardeneta, G. and Horowitz, P. (1992) Micelle-assisted protein folding. J. Biol. Chem. 267, 5911-5816.

-Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O. and Georopoulos, C. (1991). The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. Annu. Rev.Microbiol. 45, 301-326.

-Zettlmeissi, G., Rudolph, R. and Jaenicke, R. (1979) Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. Physical properties and kinetics of aggregation. Biochem. 18, 5567-5571.

-Zhang, Y., Liang, J., Huang, S., Ke, H. and Lipscomb, W. (1993) Crystallographic studies of the catalytic mechanism of the neutral form of fructose-1,6-bisphosphatase. Biochem. 32, 1844-1857.

-Zimmerman, G., Grahame J. Kelly, and Latzko, E., (1978) Purification and properties of spinach leaf cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphatase. J. Biol. Chem., 253, 5952-5956.

-Zimmerman, G., Kelly, G.J. and Latzko, E. (1976) Eur. J. Biochem. 70, 361-367.