

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

00562

N=2  
2 E.j.

FACULTAD DE QUIMICA

*Modificaciones en la estructura de Rubisco de maíz  
dependientes del estadio de desarrollo de la planta*

T E S I S

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS (BIOQUIMICA)

p r e s e n t a

*Biol. Norma A. Coria Gil*

México, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Enero,

1994



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se realizó en el departamento de Bioquímica Vegetal de la División de Posgrado de la Facultad de Química de la U. N.A.M., dentro del convenio de Intercambio Académico (U.N.A.M.) y el Departamento de Vinculación y Desarrollo (U.M.S.N.H.) bajo la asesoría de la Dra. Estela Sánchez-Jiménez y fue evaluada por el siguiente jurado:

Presidente:	Dr. Armando Gómez-Puyou.
Primer Vocal:	Dr. Alberto Huberman.
Secretaria:	Dra. María Luisa Ortega.
Primer Suplente	Dr. Jorge Vázquez Ramos.
Segundo Suplente:	Dra. Herminia Loza Tavera.

# INDICE

	Pag.
I. RESUMEN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
Introducción	3
Subunidad pequeña de la Rubisco (SS)	5
Subunidad grande de la Rubisco (LS)	8
Modificaciones postraduccionales de la Rubisco	11
Estabilidad	16
Ensamblaje de la Rubisco	17
III. ANTECEDENTES EN EL LABORATORIO	20
IV. HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVOS GENERALES	22
VI. METAS ESPECÍFICAS	23
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	24
Reactivos	24
Material biológico	27
Condiciones de crecimiento	28
Purificación de Rubisco	28
Metilación <i>in vitro</i> de la holoenzima de Rubisco de Maíz	29
Purificación de las subunidades LS y SS	29
Hidrólisis de la LS	30
Isoelectroenfoco de la SS	30
Western blot	31
Determinación de la concentración de proteínas	32

VIII. RESULTADOS	33
Purificación de la Rubisco	33
Metilación <i>in vitro</i> de la holoenzima de la Rubisco de maíz	43
Identificación de la presencia del péptido (21 aminoácidos) del amino terminal en la LS	46
Purificación de las subunidades LS y SS	47
Hidrólisis parcial de la LS con tripsina	48
Electroenfoque de la SS	51
IX. DISCUSION	52
X. CONCLUSIÓN	57
XI. BIBLIOGRAFÍA	58

## I. RESUMEN

La enzima ribulosa,1,5-bifosfato carboxilasa /oxigenasa (Rubisco, E.C. 4.1.1.39) está formada por dos tipos de subunidades: 8 grandes (LS) y 8 pequeñas (SS). La estructura cuaternaria de Rubisco es muy compleja y puede sufrir alteraciones por efecto de elementos ambientales. Además, se sabe que la LS sufre varias modificaciones postraduccionales: fosforilación, remoción de dos residuos del extremo amino y trimetilación en la Lis-14. Asimismo, se ha demostrado que la regulación de la actividad enzimática de Rubisco en la fase vegetativa se da principalmente a nivel transcripcional, mientras que en la fase reproductiva, aparentemente se debe a una estabilidad prolongada de la enzima o incremento de la actividad específica.

Los datos descritos sugieren que los cambios en la regulación enzimática de Rubisco, dependientes del estadio del desarrollo de la planta, podrían deberse a modificaciones estructurales o conformacionales en LS. También existe la posibilidad de que la expresión diferencial de SS (5 genes en maíz) esté involucrada en esta regulación.

Las metas del presente trabajo fueron purificar Rubisco de hojas de maíz en diferentes estadios de desarrollo, para determinar las posibles diferencias estructurales de LS o en la composición de los péptidos de la SS. Fueron seleccionados cuatro estadios de desarrollo para este estudio: dos de plántula y dos de planta adulta. La Rubisco se purificó de cada uno de estos estadios por precipitación diferencial con sulfato de amonio y a través de columnas de filtración. Los péptidos de la enzima fueron identificados en los ensayos electroforéticos por peso molecular y Western blot con anticuerpos policlonales contra la holoenzima de Rubisco de espinaca. Las subunidades LS y SS fueron separadas posteriormente por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida y recuperadas del gel para su caracterización. La SS fue analizada por isoelectroenfoque. Esta técnica mostró que no existe una expresión genética diferencial

de los genes que codifican este péptido dependiente del estadio de desarrollo de la planta. En la LS se probaron diferentes métodos para determinar el grado de metilación del péptido; se midió la capacidad de la Rubisco como sustrato de la N-metil transferasa específica para la Lis-14 para probar en forma indirecta si la LS se encontraba metilada o no *in vivo*. Como control se verificó que el extremo amino de LS no hubiera sido removido por hidrólisis en alguna de las etapas en estudio. Se hizo un Western blot de la LS de los 4 estadios con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los primeros 25 residuos del extremo amino, con lo que fue posible demostrar que, en los cuatro diferentes estadios, el péptido está completo. Finalmente se hizo una digestión parcial de LS con tripsina y el análisis electroforéticos de los productos. Los métodos citados mostraron que no existe metilación de LS en los diferentes estadios de desarrollo estudiados; sin embargo, parece que existen ciertas diferencias debidas a la estructura cuaternaria de la molécula de Rubisco en las distintas etapas de desarrollo. Se discute la importancia que estos cambios podrían tener en la regulación de la actividad enzimática de la Rubisco.



Para que la Rubisco se convierta en una enzima completamente funcional, es necesaria la formación de un complejo ternario (Rubisco-CO<sub>2</sub>-catión divalente). Este complejo ternario cataliza tanto la oxigenación como la carboxilación de la RuBP y contiene el CO<sub>2</sub> incorporado en forma de carbamato, en el ε-amino de la Lis-201 (CO<sub>2</sub> activador, es distinto al CO<sub>2</sub> sustrato que reacciona con RuBP) seguido de la unión rápida del ión metálico Mg (II). La unión del metal al sitio activador podría influir en la partición entre la captación del CO<sub>2</sub> y del O<sub>2</sub>, ya que se ha demostrado que la Rubisco de *R. rubrum* y de espinaca incubadas con Cu (II) muestran activación como oxigenasas, pero carecen de la actividad de carboxilasa (Schneider et al., 1992). La formación del carbamato es reversible y el catión desplaza el equilibrio de la reacción hacia la derecha.

La Rubisco forma un complejo con la Rubisco-activasa (RA), la cual ha sido considerada parte importante de la regulación de la actividad catalítica de Rubisco. En forma general, el mecanismo propuesto se basa en que la RA libera el efecto inhibitorio de varios azúcares fosforilados sobre la enzima (carboxiarabinitol-1-fosfato; xilosa-1,5-bi-fosfato; 3-cetoarabinitol-1,5-bi-fosfato) al afectar la afinidad de estos inhibidores por el sitio activo de la Rubisco y así permitir la entrada del CO<sub>2</sub> (Portis, 1992).

La Rubisco se encuentra altamente compartimentalizada en las células del haz vascular de las hojas verdes de las plantas C4. Específicamente, se presume que la carencia de Rubisco en las células del mesófilo se debe al silenciamiento de los genes en estas células por metilación del DNA (Ngerprasirtsiri et al., 1989).

La Rubisco en plantas superiores tiene un masa molecular de 550 kDa, está constituida de 16 subunidades: 8 subunidades grandes (LS) de un masa molecular de aproximadamente 55 kDa y ocho subunidades pequeñas (SS) de 14 kDa.

La subunidad grande contiene el sitio catalítico (Lorimer y Mizioko, 1980). La función de la SS es enigmática y ha sido objeto de considerables estudios; su influencia sobre la catálisis no es obvia. Por ejemplo, las cianobacterias están desprovistas completamente de SS y la catálisis procede en ausencia de este péptido; por lo tanto, puede no estar

directamente involucrada en la catálisis (Andrews, 1988). Sin embargo, se sabe que en plantas superiores su presencia incrementa notablemente la actividad, por lo que se sugiere que la SS ayuda a la holoenzima a mantener la estructura estable y activa (Paul et al., 1993).

### SUBUNIDAD PEQUEÑA DE LA RUBISCO (SS).

En las plantas superiores, la subunidad pequeña es codificada en el genoma nuclear por una familia multigénica de 3 a 15 miembros (*rbcS*) (Manzara y Gruissem, 1988). Los transcritos de la SS (*rbcS*) son traducidos en los ribosomas del citoplasma como un precursor, el cual da lugar a la forma madura durante su incorporación al cloroplasto. Posee una secuencia consenso en el extremo amino que le permite dirigirse al cloroplasto. Durante el transporte del péptido precursor, se remueve la zona líder, lo cual involucra dos pasos proteolíticos: el precursor de 20 kDa se convierte en una subunidad madura de 14 kDa (123 aminoácidos aproximadamente) vía un intermediario de 18 kDa (Ostrem et al., 1989). Mediante experimentos de entrecruzamientos fotoactivables se demostró que el precursor de la SS se une a una proteína presente en la superficie del cloroplasto. La localización de este ligando proteínico se determinó por la sensibilidad de degradación cuando cloroplastos intactos se incuban con enzimas proteolíticas, sugiriendo que esta proteína es el receptor para el transporte al interior del cloroplasto (Cornwell y Keegstra, 1987).

La SS está formada de cuatro filamentos  $\beta$  cubiertas por dos hélices  $\alpha$ . La subunidad pequeña posee tres regiones altamente conservadas: en el extremo amino de 10-21, entre los residuos 61-76 y hacia el extremo carboxilo del 98-116. El extremo amino forma un brazo irregular que se extiende hasta una SS vecina cuando se encuentran integradas formando la holoenzima de Rubisco (Schneider et al., 1992).

La regulación de la expresión de la SS es muy compleja y se da a diferentes niveles. Por ejemplo, en tomate se manifiesta una expresión genética diferencial de los 5 genes de *rbcS* (*rbcS1*, 2, 3A, 3B y 3C) dependiente del estadio de desarrollo de la hoja. Sin embargo, aún cuando el control a nivel transcripcional es determinante, hay una regulación postranscripcional significativa. Los mensajeros individuales tienen secuencias codificadoras muy conservadas; no obstante, presentan diferencias notables en los extremos 3' y 5' no traducido, regiones a las cuales se les han atribuido propiedades regulatorias a nivel transcripcional y postranscripcional, ya que se supone que les confieren a los mensajeros diferente estabilidad, de tal manera que la vida media de los diferentes transcritos no es la misma. En cotiledones de tomate los genes 1, 2 y 3A se acumulan en la oscuridad y el 3B es dependiente de la luz (Wanner y Gruijssem, 1991).

Asimismo, se ha reportado que la SS manifiesta una expresión específica del tejido y que ésta a su vez se ve afectada por las condiciones ambientales. Al analizar hojas etioladas de maíz (en donde se encuentran etioplastos), se observó que tres de los genes de la *rbcS* (*SS1*, *SS6* y *SS7*) tienen una expresión significativa tanto en células del haz vascular como en células del mesófilo. No obstante, la relación de los mensajeros fue diferente en los etioplastos de ambas células. Por análisis de dot blot se demostró que en etioplastos de células del haz vascular los mensajeros 1, 6 y 7 tienen una relación de 4:1:3. En cambio, en células del mesófilo, esta relación es de 2:1:1. Cuando se indujo enverdecimiento con iluminación (hojas verdes con cloroplastos maduros), se encontró una respuesta de activación transcripcional general del genoma durante la formación del cloroplasto, además de una estimulación selectiva de estos genes, ya que sólo dos de ellos contribuyen con el 80% de expresión de la Rubisco en hojas verdes de maíz (Sheen y Bogorad, 1986).

La monocotiledonea *Lemna gibba* es una planta acuática con raíces normalmente expuestas a la luz, contiene cloroplastos y presenta 6 genes de *rbcS*. El análisis de la expresión de los genes individuales en la raíz permitió detectar la expresión de solamente cinco genes de la SS (el gen SSU40B se expresó a muy bajos niveles en la raíz); en cambio en la fronda (hoja de monocotiledóneas) se expresaron los 6 genes y todos en altas concentraciones. Es probable que la carencia de expresión de este último gen, podría ser consecuencia de un control post-transcripcional, porque al realizar la transcripción *in vitro* de los genes se encontró que todos se sintetizaron a porcentajes comparables independientemente del tejido de origen: raíz o fronda. Por lo tanto, el mecanismo de expresión diferencial parece involucrar un mecanismo post-transcripcional específico del órgano (Silverthorne y Tobin, 1990).

En experimentos con plantas verdes de amaranto que fueron transferidas a oscuridad completa se observó que la síntesis de la SS fue rápidamente reprimida a pesar de no existir un cambio significativo en los niveles de mRNA. Es decir, después de la transición a la oscuridad, los mensajeros de la SS y de la LS permanecen unidos a los polisomas, pero no fueron traducidos *in vivo*, sugiriendo que el control de ambas subunidades en parte se da a nivel traduccional durante la elongación del péptido (Berry et al., 1988).

También se ha reportado que la inhibición de la síntesis de la SS durante la transferencia de la luz a la oscuridad afecta los mensajeros individuales de *rbcS* por una degradación rápida activa de los transcritos en forma diferencial, sugiriendo que la estabilidad de los mensajeros de la SS podría estar regulándose durante el desarrollo ya que el RNA de plantas adultas de frijol soya es degradado más rápidamente en la oscuridad que los mensajeros de plántulas (Thompson y Meagher, 1990)

En resumen, los genes de la SS manifiestan una expresión diferencial, dependiente del estadio de desarrollo y específica del órgano (Wanner and Gruissen, 1991); los

mensajeros manifiestan diferente estabilidad y la regulación de su traducción puede ser afectada por factores ambientales.

## SUBUNIDAD GRANDE DE RUBISCO (LS).

Los genes que codifican para la LS de la Rubisco (*rbcl*) se localizan en el genoma del cloroplasto. Existe un solo gen por molécula de DNA, pero cada cloroplasto contiene 10 a 100 moléculas de DNA y cada célula contiene de 10 a 200 cloroplastos (Chan and Wildman, 1972). Los transcritos son traducidos en los ribosomas del cloroplasto (Blair y Ellis, 1973). En la mayoría de los genes estudiados la secuencia codificadora es continua, se transcribe como un precursor con una longitud de 1.4kb y se procesa a un polipéptido de aproximadamente 475 aminoácidos. La secuencia codificadora está altamente conservada entre diferentes especies; por ejemplo, la similitud de la secuencia nucleotídica entre la Rubisco de maíz y espinaca es de 84% y a nivel de aminoácidos ésta aumenta a 90% (Zurawski et al., 1981).

En general, la LS (Fig. 2) consta de dos dominios claramente separados: el extremo amino (1-150), constituido por 5 filamentos  $\beta$  y tres hélices  $\alpha$  y un gran dominio hacia el extremo carboxilo (151-475). El dominio amino terminal contiene cinco filamentos  $\beta$  ( $\beta A$ - $\beta E$ ) y tres hélices  $\alpha$  que rodean a las  $\beta$ . La hélice  $\alpha A$  se encuentra a un lado de los filamentos  $\beta$  y las B y C se encuentran en el lado opuesto. La hélice D hace la conexión entre los dos grandes dominios de la LS. El dominio carboxilo terminal tiene una estructura secundaria central formada por un barril de ocho consecutivas  $\alpha/\beta$  que se pliegan de tal manera que las ocho filamentos  $\beta$  forman un núcleo rodeado de ocho hélices  $\alpha$  (barril  $\alpha/\beta$ ). La hélice  $\alpha E$  cierra el barril por un extremo.

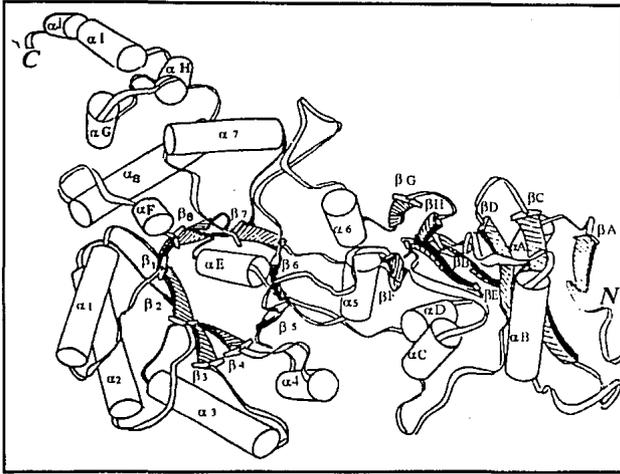


Fig. 2. Subunidad grande la la Rubisco (LS), la C indica el extremo carboxilo, la N el extremo amino; los cilindros, hélices  $\alpha$ ; las flechas, filamentos  $\beta$ . Tomado de Andersson et al., (1989).

La LS presenta dos regiones muy conservadas de los residuos 169 a 220 y de 321 a 340. Estas regiones son muy ricas en lisina (Lis), especialmente entre los residuos 175 y 335 (región implicada en la catálisis). En la Lis-201 se une el  $\text{CO}_2$  activador y el sitio de carbamilación ( sitio de unión del  $\text{CO}_2$  sustrato) es la Lis 191; sin embargo, se ha propuesto que las Lis 166, 191 y 329 participan durante la actividad catalítica (Chapman et al., 1987). Los residuos de Lis 166, 191 y 329 se encuentran en el asa que conecta el dominio del extremo amino de un filamento  $\beta$  a la hélice  $\alpha$  en la parte exterior del barril  $\alpha/\beta$  en el dominio carboxilo terminal (Schneider et al., 1986).

La Rubisco de *Rhodospirillum rubrum* (Fig.3) es una molécula dimérica ( $L_2$ ) que es la unidad mínima funcional de la enzima muy similar a la estructura reportada para

espinaca. Tiene dimensiones de 45 X 70 X 105 Å, con una forma elipsoide distorsionada.

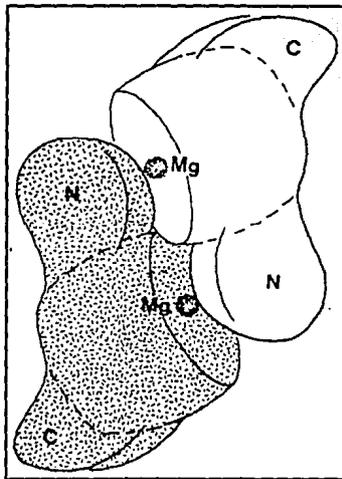


Fig 3. Diagrama esquemático del dímero de Rubisco ( $L_2$ ) ilustrando la interfase formada entre los extremos carboxilo de ambas subunidades y la interacción del dominio del extremo amino de una subunidad con el extremo carboxilo de la segunda subunidad (Andersson, et al. 1989)

La interfase entre las dos subunidades del dímero está formada por ocho contactos entre los dos dominios del extremo carboxilo. El segundo contacto involucra la región del sitio activo, en donde interacciona el extremo carboxilo (sitio catalítico) de una subunidad y el extremo amino de una segunda subunidad vecina. Esta interacción es de gran importancia funcional ya que cubre parcialmente el sitio activo; residuos de ambos dominios contribuyen a la formación del sitio activo (Andersson et al., 1989).

La regulación de la expresión de *rbcL* durante el desarrollo del cloroplasto se da a diferentes niveles: transcripcional, post-transcripcional y traduccional (Berry et al., 1985; Rodermel and Bogorad, 1985; Berry et al., 1986; Sasaki et al., 1987; Tobin and Siverthorne, 1985).

Deng and Grussem (1987) han proporcionado evidencias de que la expresión genética del cloroplasto es regulada primariamente a nivel post-transcripcional. Aún cuando la actividad transcripcional general del genoma del cloroplasto se incrementa en respuesta a la luz, no cambia la relación entre los diferentes transcritos de Rubisco. Más aún, se ha encontrado que los cambios en la actividad transcripcional son independientes del número de copias del DNA y que la actividad transcripcional relativa de ciertos genes, incluyendo *rbcL*, correlacionan con la fuerza del promotor (Grussem y Zurawski, 1985). La transferencia de la luz a la oscuridad provoca un rápido decremento en la síntesis de LS, independiente de los cambios en la concentración de mRNA (Grussem, 1989).

## MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES Y ESTABILIDAD DE RUBISCO

Las modificaciones postraduccionales de proteínas se dan en diversos grupos funcionales disponibles. El grupo funcional puede ser el extremo amino libre, el extremo carboxilo o la cadena lateral de los aminoácidos. El enlace peptídico *per se* también puede ser considerado parte funcional para las modificaciones post-transcripcionales. Se han detectado más de cuarenta derivados de la Lis-metilasa de proteína: N-metil derivados (Arg, Lis, Gln); O-metil éster (Ser y Tre) y metil éster lábil (Glu y Asp) (Wold, 1981).

Se ha reportado que la luz activa la metilación (30%) de un gran número de proteínas del cloroplasto y la Rubisco no es la excepción: es la principal proteína metilable y la

metilación decrece en presencia de inhibidores del transporte de electrones como 3-(3',4'-diclorofenil)-1',1'-dimetilurea o desacopladores de la fosforilación, indicando una dependencia de la actividad de la metiltransferasa del transporte de electrones y  $\Delta pH$  (Black et al., 1987). Posteriormente, se ha demostrado que la LS de Rubisco es el péptido que se metila (por medio de ( $^3H$ -metil)-S-adenosilmetionina); la metilación es más estable (N-metilaciones) en cloroplastos purificados de extractos de hojas de chícharo (Niemi et al., 1990). La caracterización de la mencionada modificación química ha sido objeto de estudios. La investigación se ha facilitado con estudios cristalográficos de la Rubisco ya existentes los cuales permitieron predecir que la metilación se encontraría en alguna parte del extremo amino, región localizada en la superficie de la proteína. Para demostrarlo, se realizó una hidrólisis parcial controlada con tripsina de la holoenzima de Rubisco de chícharo. Por HPLC y el análisis electroforético de los productos, se identificaron dos fragmentos tripticos. Los cortes fueron localizados en la Lis-8, y en la Lis-466 de la LS. La hidrólisis entre la Lis-14 y la Ala-15 fue bloqueada por la presencia de la trimetil-Lisina, cuya función no es clara; sin embargo, se ha visto que el bloqueo de la degradación de la Lis-14 limita la proteólisis de otros sitios (Lis-18 y Lis-466) cuando se incuba con el carboxiarabinitol (análogo de la RuBP), lo que sugiere una relación con la estabilidad de la enzima. La pérdida de susceptibilidad de la Lis-466 a la hidrólisis puede resultar de cambios conformacionales que limitan la accesibilidad de la tripsina al extremo carboxilo (Mulligan, et al., 1988). Los cambios en la región de Lis-466 podrían jugar un papel dinámico durante la catálisis, lo cual podría involucrar cambios en la estructura terciaria de LS o en la interacción entre subunidades (Niemi et al., 1990).

El análisis de aminoácidos de los péptidos tripticos del extremo amino y la comparación con la secuencia de nucleótidos del DNA demostró que la Pro-3 está bloqueada con una N-acetilación. Esto llevó al conocimiento del procesamiento postraduccional del

extremo amino, lo cual implica la remoción de Met-1 y de Ser-2 y la posterior acetilación de la Pro-3. El significado funcional de este procesamiento es desconocido. Houtz (1989) sugirió que la eliminación de los dos primeros aminoácidos podría ser importante en la regulación de la actividad, ya que el extremo amino de una subunidad cubre el sitio catalítico de una subunidad vecina.

La naturaleza del extremo amino está relacionada con el recambio de la proteína en algunos sistemas. El bloqueo de la degradación de la Lis-14 de la LS podría estar relacionada con la estabilidad de la enzima (Mulligan et al., 1988).

En apoyo a esta suposición, se realizó la hidrólisis con tripsina de la holoenzima de Rubisco de varias especies. En forma sorprendente, no en todos los casos se encontró protegida la Lis-14 contra la hidrólisis, lo que indica que no en todas las especies se encuentra trimetilada la LS. Esta suposición fue demostrada mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos del extremo amino (Fig.4).

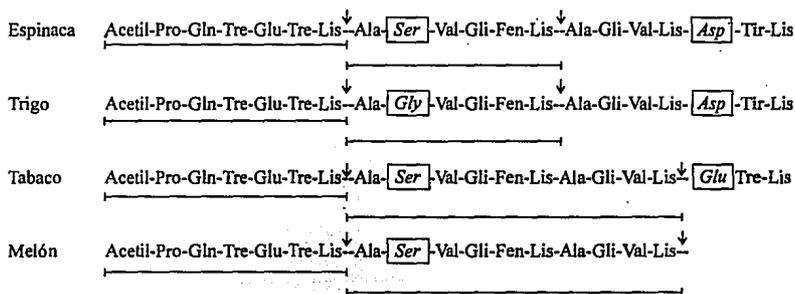


Fig. 4 Extremo amino de la LS de Rubisco de diferentes fuentes. Líneas sólidas y flechas denotan los fragmentos tripticos y los sitios de rompimiento proteolítico, respectivamente. Los cuadros indican los residuos que varían entre especies. Tomado de Houtz (1989).

El hecho de que la trimetilación no se encontrara en todas las especies complicó la comprensión de la función de esta modificación química en Rubisco.

Otras posibilidades podrían considerarse para interpretar la razón de estos cambios postraduccionales de la Rubisco. Por ejemplo, la acetilación del extremo amino podría estar relacionada con el ensamblaje de la holoenzima; la trimetil-Lis podría proveer de protección proteolítica a la LS, dado que el tejido vegetal podría contener proteasas específicas para Lis. (Houtz et al., 1989). Sin embargo, se ha reportado que el recambio de Rubisco en hojas senescentes de trigo resulta del entrecruzamiento intermolecular de la LS por puentes disulfuro (Cys-247) lo cual promueve el transporte rápido de la proteína a la membrana y finalmente a la degradación (Mehta et al., 1992).

El extremo amino de la LS es muy importante, no solamente porque es una región de procesamiento postraducciona l muy activo, sino porque además, es un requerimiento para la competencia catalítica, participa en la formación del sitio activo y muestra cambios conformacionales durante la catálisis (deducido por los cambios de accesibilidad tríptica de la Lis); por ello se ha sugerido que la remoción de los dos primeros aminoácidos de este dominio podría ser también importante en la regulación de la catálisis (Houtz, 1989).

La función de la trimetil-Lis, presente en Rubisco de algunas especies vegetales, no es a la fecha claramente entendida. A continuación se presenta la secuencia del extremo amino de la LS de algunas especies (Fig. 5).

	3	8	14	18
Espinaca	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Ser-Val-Gli-Fen-Lis			
Trigo	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Gli-Val-Gli-Fen-Lis			
Tabaco	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Ser-Val-Gli-Fen-Met <sub>3</sub> -Lis-Ala-Gli-Val Lis			
Melón	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Ser-Val-Gli-Fen-Met <sub>3</sub> -Lis-Ala-Gli-Val-Lis			
Pepino	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Ser-Val-Gli-Fen-Met <sub>3</sub> -Lis-Ala-Gli-Val-Lis			
Frijol soya	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Ser-Val-Gli-Fen-Met <sub>3</sub> -Lis-Ala-Gli-Val-Lis			
Chícharo	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Ser-Val-Gli-Fen-Met <sub>3</sub> -Lis-Ala-Gli-Val-Lis			
cowpea	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Lis-Val-Gli-Fen-Met <sub>3</sub> -Lis-Ala-Gli-Val-Lis			
Tomate	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Ser-Val-Gli-Fen-Met <sub>3</sub> -Lis-Ala-Gli-Val-Lis			
Papa	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Ser-Val-Gli-Fen-Met <sub>3</sub> -Lis-Ala-Gli-Val-Lis			
Petunia	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Ser-Val-Gli-Fen-Met <sub>3</sub> -Lis-Ala-Gli-Val-Lis			
Pimienta	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Ser-Val-Gli-Fen-Met <sub>3</sub> -Lis-Ala-Gli-Val-Lis			
<i>Chlamydomona</i>	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Gli-Ala-Gli-Fen-Lis			
<i>Marchantia</i>	Acetil-Pro-Gln-Tre-Glu-Tre-Lis-Ala-Gli-Val-Gli-Fen-Lis			

Fig. 5 Secuencia de aminoácidos y modificaciones post-traduccionales del extremo amino de la LS de Rubisco de diferentes especies de plantas. (tomado de Houtz, et al, 1992).

La SS es también objeto de modificaciones postraduccionales. Se ha reportado la fosforilación de SS en el citoplasma, hecho que ha sido asociado con el transporte del péptido hacia el interior del cloroplasto. Una cinasa de protefina dependiente de cAMP se ha encontrado unida a la membrana externa del cloroplasto de espinaca y se cree que esté relacionada con el transporte del polipéptido hacia el interior del cloroplasto (Foyer, 1985); sin embargo, este hecho también ha sido relacionado con el ensamblaje de la holoenzima (Ranjeva y Boudet, 1987).

También existen reportes que indican la presencia de una fosfocinasa estromal altamente específica para Rubisco, cuya actividad se ha relacionado con la activación de la enzima,

ya que la fijación de  $\text{CO}_2$  es directamente proporcional al grado de fosforilación. En trabajos relacionados con ambas subunidades de Rubisco se encontró que se fosforilan por la cinasa estromal, lo cual incrementa la actividad de la enzima durante la fijación de  $\text{CO}_2$ . Además, la fosforilación de la LS se revirtió cuando cesó la fijación de  $\text{CO}_2$  en la oscuridad (Foyer, 1985).

## ESTABILIDAD

Para analizar el efecto de la temperatura sobre la estructura terciaria de Rubisco durante la adaptación de la planta al frío, Huner and Macdowall (1978) purificaron la Rubisco de hojas de centeno provenientes de una planta susceptible y otra tolerante al frío. La Rubisco purificada fue inactivada a  $0^\circ\text{C}$  y se titularon los grupos sulfhidrilos con 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) indicando una diferencia en el estado de desnaturalización de la enzima. También se reportó una diferencia en la sensibilidad de estas dos plantas a desnaturalización de Rubisco con dodecil sulfato de sodio. Todo esto permitió concluir que la Rubisco sufre cambios conformacionales durante la adaptación al frío, y que muy posiblemente estén involucrados enlaces disulfuro en este proceso.

Previamente se ha reportado que bajo condiciones de campo, las hojas senescentes de frijol soya pierden progresivamente clorofila y, en general, los componentes fotosintéticos. La remoción de frutos acelera el porcentaje de la caída de la fotosíntesis. Además, disminuye la concentración de Rubisco; a su vez, Brandner et al., (1991) detectaron a la Rubisco en forma insoluble en la pastilla de extractos de frijol soya de plantas a las que se les cortó el fruto. Por otra parte Rintamäki (1991) reportó la existencia de una proteína solubilizadora (BP) que se une específicamente con la LS de la Rubisco y sugiere que reduce la tendencia a asociarse incorrectamente consigo misma.

Esta proteína fue clasificada como una chaperonina y presenta un 46 % de similitud con GroEL

## ENSAMBLAJE DE LA RUBISCO.

La estructuración final de la holoenzima Rubisco no es un proceso simple de auto-ensamblaje, sino que se requiere de un proceso en el que los péptidos se asocian transitoriamente con proteínas que facilitan su plegamiento. Goloubinoff et al., (1889) propusieron una vía de ensamblaje para la holoenzima de Rubisco (Fig. 6). El dímero  $L_2$  (dos subunidades de la LS) es el motivo estructural básico, con un mínimo de cinco pasos para llegar a la formación de la holoenzima hexadecamérica  $L_8S_8$  por medio del siguiente proceso: 1) plegamiento del monómero de la LS, 2) formación del dímero  $L_2$ , 3) tetramerización de los dímeros de la  $L_2$ , para dar un núcleo de  $L_8$  4) plegamiento de los monómeros de la SS y 5) asociación de la SS con el núcleo de la  $L_8$ . Las chaperoninas podrían estar involucradas en todos los pasos, aunque hay evidencias que sugieren que el paso 5 ocurre espontáneamente.

En ( $L_2$ ) el dominio del extremo amino de una LS se ensambla con el extremo carboxilo de otra LS.  $L_8$  es un tetrámero formado de 4  $L_2$ , dos agrupamientos separados de 4 SS, colocados arriba y abajo del octámero de la LS, cuyos dímeros son los responsables de la actividad, mientras la SS incrementa la actividad catalítica más de 100 veces (Andrews, 1988).

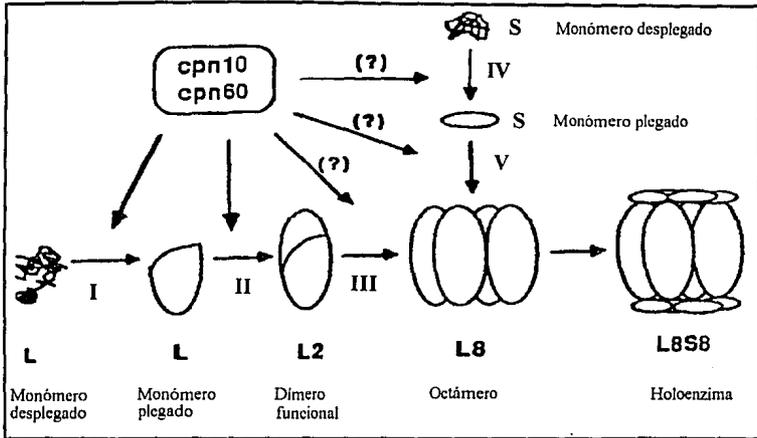


Fig. 6. Ensamblaje de la holoenzima de Rubisco (L8), L(LS), S(SS). Tomado de Gatenby y Ellis (1990).

Veinte residuos del extremo amino de la SS de espinaca forman un brazo irregular y éste se encuentra separado del resto de la estructura de la subunidad de tal manera que hace contacto estrecho con una LS y con una SS vecina (Knight et al., 1990). La eliminación de los primeros residuos del extremo amino de SS no afectan la afinidad de unión ni las propiedades catalíticas (contacto SS vecino) de la enzima. La eliminación de 12 aminoácidos (contacto de otra SS y LS), no afecta la unión de ambos péptidos, pero reduce la actividad enzimática (5 veces). La remoción de un solo residuo adicional (13 aminoácidos) baja la unión hasta 80 veces y paradójicamente se recupera la actividad (40 % del valor original). Ninguna de estas lesiones afecta la Km de RuBP o CO<sub>2</sub>. Finalmente, la eliminación de los 20 aminoácidos del extremo amino de la SS deja a la holoenzima totalmente incapaz para ensamblarse. De estos estudios se concluyó que el extremo amino de la SS mantiene la estructura de la holoenzima (Paul et al., 1993).

Dieciséis aminoácidos del extremo amino de la SS forman una interfase con veinte residuos de la cadena de la LS por puentes de hidrógeno, uniones salinas e interacciones hidrofóbicas. Modificaciones en las cadenas laterales de los aminoácidos de esta zona mostraron que ellos participan en el ensamblaje de la holoenzima. Así, la sustitución de Arg 53 (forma un puente de hidrógeno con una LS) por un Glu inhibe completamente el ensamblaje, lo que sugiere que la Arg-53 es esencial en la estructura cuaternaria de Rubisco de plantas superiores (Flachsmann y Bohner, 1992).

La expresión de los genes de las dos subunidades de Rubisco proporciona un sistema importante para estudiar el desarrollo y regulación de estas proteínas por la luz. Por otra parte, ayuda a entender como se regula la expresión del genoma nuclear y del cloroplasto en cantidades equimolares.

La Rubisco ha servido por muchos años como un sistema modelo importante para estudiar la biogénesis del cloroplasto. Su principal contribución ha sido en aspectos de la expresión de genes del cloroplasto (Blair et al., 1973; Deng et al., 1987), procesamiento de proteínas y regulación de la fotosíntesis (Cornwell and Keegstra 1987), así como, más recientemente, en el ensamblaje con chaperoninas (Goulobinoff et al., 1989; Gatenby and Ellis, 1990).

## II. ANTECEDENTES EN EL LABORATORIO

Experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio han demostrado que existe una relación entre la actividad enzimática de la Rubisco en la hoja arriba de la mazorca durante el llenado de grano de maíz y el rendimiento en el grano de la planta. Esto se logró observar al hacer un análisis comparativo entre dos variedades de maíz: una original y otra mejorada para mayor rendimiento, obtenida en 18 ciclos de selección masal estratificada. Asimismo, se realizó un estudio comparativo de la actividad de Rubisco en diferentes estadios de desarrollo, con el que se logró demostrar que la regulación de la actividad enzimática en plántulas (fase vegetativa) es diferente a la manifestada en plantas adultas (fase reproductiva) (Loza Tavera et al., 1987). En plántulas, la actividad de Rubisco depende principalmente de la síntesis *de novo* de la proteína. En cambio, en hojas de plantas adultas, la regulación se da a otro nivel: la concentración de Rubisco no se correlaciona con la concentración de sus transcritos y la cantidad de proteína declina parcialmente a pesar de que en este período se aumenta en forma transitoria la actividad específica de la enzima. Estos resultados llevaron a concluir que en estadios tempranos del desarrollo la actividad de Rubisco es controlada a nivel transcripcional, mientras que en fases posteriores la regulación es debida a la estabilidad de la enzima y a su capacidad de ser activable por Rubisco-activasa (Martínez, 1994). Estas observaciones permitieron ver lo complejo que es la regulación de la actividad de esta proteína; su regulación cambia dependiendo de las condiciones fisiológicas de la planta. En plántulas en donde la síntesis general de proteínas es muy activa los transcritos de Rubisco se incrementan, en cambio, en plantas adultas el proceso se basa en activar o estabilizar la enzima ya presente.

Los resultados mencionados anteriormente sugieren que es muy posible que la enzima sufra alguna(s) modificaciones estructurales o conformacionales que mantengan su estructura por más tiempo y la hagan más activa durante el llenado del grano de maíz. Dentro de todas las modificaciones postraduccionales reportadas para la LS de Rubisco, la trimetilación en la Lis-14 es el candidato favorito para explicar los cambios en estabilidad de la Rubisco y que este hecho de alguna forma cambie las propiedades del centro catalítico y la activen. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que los genes de la SS al manifestar una expresión diferencial cambien las propiedades fisicoquímicas de la enzima.

## **IV. HIPÓTESIS**

Durante el llenado del grano del maíz, la actividad de Rubisco está regulada por cambios estructurales debidos a tri-metilación en la Lis-14 de la LS, por la expresión genética diferencial de SS o por cambios conformacionales en la holoenzima de Rubisco.

## **V. OBJETIVOS GENERALES**

- Evaluar si existen diferencias en el nivel de metilación de la LS, en los estadios de desarrollo seleccionados.
- Determinar la composición de los isomorfos de la SS en los estadios de prueba.

## VI. METAS ESPECÍFICAS

- 1.- Extraer la Rubisco de hojas de maíz de los estadios de desarrollo: P3, P7, A3 A7.
- 2.- Purificar la Rubisco por procedimientos convencionales y finalmente aislar las subunidades LS y SS a partir de PAGE-SDS.
- 3.- Buscar tri-metil-Lis en la LS por medio de:
  - a) Metilación *in vitro* (incorporación de  $^3\text{H-SAM}$ ) de la LS.
  - b) Degradación parcial de la LS con tripsina y análisis de los péptidos producidos.
- 4.- Determinar por isoelectroenfoque la composición de isomorfos de la SS en los cuatro estadios de desarrollo seleccionados.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### REACTIVOS.

Tripsina, inhibidor de tripsina (tipo II-S), MOPS (ácido 3--N-morfolino-2-hidroxiopropanosulfónico), DTT, PMSF ( fluoruro de Fenilmetilsulfonil ), Tris-HCl (Tris-hidroximetil-aminometano), leupeptina, anfolinas, acrilamida, Bis-acrilamida, Sephadex, Sephacril, azul de coomassie R y urea, fueron adquiridos de Sigma; EDTA (sal disódica ácido etilendinitrilo tetracético),  $\beta$ -mercaptoetanol,  $MgCl_2$  y reactivo de Folin-Ciocalteau, de Merck y  $(NH_4)_2SO_4$  de Mallinckrodt.

### MATERIAL BIOLÓGICO.

El maíz utilizado fue de la variedad Zacatecas 58 mejorada (Z22) obtenida mediante 22 ciclos de selección masal estratificada para mayor rendimiento de grano (obsequiado amablemente por el Dr. José Molina del Colegio de Posgraduados de Montecillos, Edo de México), en el que se han realizado los estudios de actividad y síntesis de Rubisco ya mencionados.

Para purificar la enzima Rubisco se seleccionaron hojas de 4 diferentes estadios de desarrollo de la planta de maíz: 2 de plántula y 2 de adultas: 3er estadio de desarrollo de

plántulas (P3) que corresponde a la fase logarítmica de síntesis de la Rubisco; 7º estadio de desarrollo de plántula, en el que la síntesis de proteínas se encuentra en estado estacionario o en equilibrio (P7); 3er estadio de plantas adultas (durante el llenado del grano), en el que se manifiesta la máxima actividad enzimática de Rubisco; sin embargo, la concentración de transcritos, así como la concentración de proteína de LS y SS no se incrementan (A3) y finalmente el 7º estadio de adultas (senescencia de la hoja), en el que los transcritos, la concentración de proteína y la actividad enzimática declinan (A7) (Loza et al., 1990 y Martínez et al., 1993).

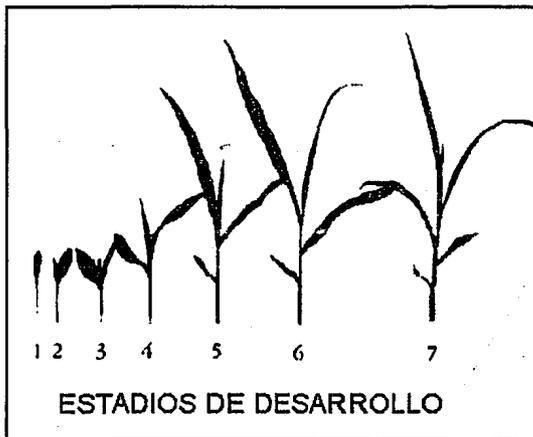


Fig. 7. Estadios de desarrollo de las plántulas de maíz. Tomado de Loza et al., (1989).

Las características morfológicas que identifican los diferentes estadios de desarrollo de la plántula se mencionan en la cuadro 1.

CUADRO 1. EDADES FISIOLÓGICAS SELECCIONADAS PARA EL ANÁLISIS DE LA SEGUNDA HOJA EN PLÁNTULAS DE MAÍZ

ETAPAS	DESCRIPCIÓN.
1	La segunda hoja apenas es visible, en tanto que la hoja cotiledonal permanece enrollada y aún no se le distingue la lígula.
2	La segunda hoja permanece enrollada, la lámina foliar de la hoja cotiledonal se ha extendido y su lígula es visible pero aún no se expone.
3	La segunda hoja empieza a desarrollarse, la primera tiene la lígula bien expuesta y se distingue una pequeña parte de la lámina de la tercera hoja.
4	La segunda hoja no se ha desarrollado completamente, tiene un tamaño casi igual al de la hoja cotiledonal. La tercera hoja ya es claramente visible pero permanece enrollada.
5	Tanto la primera como la segunda hoja tienen la lígula expuesta, son visibles las láminas de la tercera y la cuarta hoja; en este momento la segunda hoja ha alcanzado su tamaño máximo y deja de crecer.
6	Tres días después de que la segunda hoja ha alcanzado su tamaño máximo.
7	5 días después de que la segunda hoja ha alcanzado su tamaño máximo.

Tomado de: Tesis de maestría de Eleazar Martínez Barajas (1987), Fac. de Química, UNAM.

En plántulas se escogió la segunda hoja ya que es la parte de la plántula en donde se ha reportado mayor actividad de la enzima que en el resto de las hojas. Los estadios fisiológicos se establecen de acuerdo con el grado de desarrollo y no en cuanto a tiempo de crecimiento, ya que éste se ve acelerado o retrasado dependiendo de las condiciones

ambientales. En plantas adultas se uso la hoja inmediatamente superior a la mazorca, en donde se han reportado incrementos en actividad durante el llenado del grano, probablemente debidos a la mayor demanda de fotosintatos para el crecimiento del grano (Tanaka y Yamaguchi, 1977). El periodo de llenado del grano se consideró desde la antesis (floración masculina) hasta la madurez fisiológica del grano.

## CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

a) Plántulas. - Las semillas seleccionadas fueron germinadas en macetas con tierra de encino en el invernadero del departamento de Bioquímica ( Fac. de Química). Se regaron regularmente con agua corriente y las hojas fueron removidas de la planta en el momento en que presentaban el grado de desarrollo deseado.

b) Plantas adultas. - El maíz se cultivo en los terrenos de siembra del Colegio de Posgraduados de Chapingo en Montecillos, Edo. de México, localizado a 19°53'N y 98°53'O y a 2245 m de altitud

Muestreo de tejidos. - A las hojas de las plantas adultas colectadas se les cortaron ambos extremos (punta y base de la hoja) dejando aproximadamente 2/3 del área de la hoja y también fue removida la nervadura central. En el caso de las plántulas, a la hoja solamente se le removió la nervadura central. Inmediatamente después de colectadas las hojas fueron congeladas en nitrógeno líquido y el tejido se almacenó a -70°C hasta su procesamiento posterior. Para implementar cada muestra se mezclo tejido de 5 hojas para tener mejor representada la población de plantas.

## PURIFICACIÓN DE LA RUBISCO.

Todos los pasos de purificación se realizaron a 4°C, a menos que otra condición se especifique. Se siguió el método de Robinson et al., (1988), con algunas modificaciones. Se utilizaron 30 g de hojas de maíz para la extracción de la proteína soluble total de la hoja. El tejido se homogeneizó en nitrógeno líquido en un mortero previamente enfriado a 4°C y el tejido pulverizado se resuspendió en amortiguador (2 ml / g) conteniendo MOPS 10 mM, EDTA 1 mM, ATP 1 mM, DTT 15 mM, benzamidina 2 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 0.1 mM y MgCl 1 mM a pH 7 (potenciómetro Conductronic pH 20) y se terminó de homogeneizar el tejido con el Politron (J.K, Ika-werk, Ultra-Turrax). El extracto crudo se filtró a través de doble gasa para remover todo el tejido que no se homogeneizó y posteriormente se centrifugó (centrífuga Beckman J2-21, rotor JA-20) a 17500 rpm / 40 min / 4°C. El sobrenadante se precipitó con solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a pH 7, la cual se adicionó lentamente con agitación constante hasta llegar al 35 % de saturación, se dejó reposar durante toda la noche y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm / 5min y el precipitado se recuperó en 1.5 ml de amortiguador con  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, EDTA 0.1 mM y Tris-HCl 0.1 mM a pH 7.7. Esta fracción se paso a través de una columna de Sephadex G-200 (3 cm X 50 cm , con un volumen de cama de 150 ml), la elución del extracto se realizó con un amortiguador que contenía 0.1 mM de EDTA, 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y 5 mM de Tris-HCl a pH 7.6. La muestra fraccionada se colectó (colector de fracciones LKB, Bromma, 2112) en fracciones de 3 ml. La Rubisco se detectó mediante electroforesis de cada fracción en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% (Leammlí, 1970 ), posteriormente las fracciones en las que se detectó la Rubisco fueron concentradas por una membrana Amicon 100 y se fraccionaron a través de una segunda columna de Sephacril S-300 con un volumen de cama de 100 ml (columna de 1.7 cm X 60 cm) y se juntaron la fracciones en las que se encontró a la Rubisco, la preparación se concentró por

una membrana Amicon 100, se le adicionó glicerol a una concentración final de 50 % y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis posterior.

## METILACIÓN *IN VITRO* DE LA HOLOENZIMA DE RUBISCO DE MAÍZ.

Las muestras provenientes de la elución de la columna de Sephacril S-300 se concentraron por Amicon 100 las cuales contienen un enriquecimiento en la concentración de la enzima Rubisco. A estas muestras se les adicionó 50 % glicerol ( $v/v$ ) y fueron enviadas al laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Kentucky, USA, en donde el Dr. Houtz posteriormente realizó la metilación *in vitro* de la holoenzima de Rubisco de maíz con la 5-adenosilmetionina: ribulosa-bifosfato carboxilasa LS (Lis)  $^{\epsilon}\text{N}$ -metiltransferasa, purificada de hojas de chicharo, incubadas con  $200\ \mu\text{M}$  de  $^3\text{H}$ -S-adenosil metionina ( $^3\text{H}$ -SAM) a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 90 min (Houtz et al., 1991).

## PURIFICACIÓN DE LAS SUBUNIDADES LS Y SS

Con la finalidad de separar y obtener puras las dos subunidades de Rubisco (LS y SS), las fracciones concentradas por Amicon 100 provenientes de la columna de Sephacril S-300 se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 16 % y en corridas independientes se obtuvieron los péptidos de la SS y LS puras.

Para obtener la LS se corrió durante 10 h en donde la banda de SS se alcanzó a salir del gel, pero fue necesario, para tener una buena resolución de las bandas y así poder asegurar que a la hora de cortar la banda del gel correspondiente a la LS no viniera contaminada con otros péptidos. En el caso de la SS, un corrimiento electroforético de 5 h a 10 mA fue suficiente para separarla del resto de los polipéptidos (los extractos ya tienen poca proteína de bajo peso molecular).

Para identificar las bandas de Rubisco en el gel de poliacrilamida desnaturalizante se recortaron los extremos del gel y se tiñeron con azul de Coomassie. Los fragmentos del gel teñido se acomodaron en su posición original (a un lado del gel que no se tiñó), se localizó la altura de las bandas de la LS y SS en el gel teñido y se recortó la banda del resto del gel. Posteriormente, las bandas removidas se fragmentaron en cuadritos lo más pequeño que fue posible y se incubaron en urea 8 M a 40°C / 24 h con agitación (Lab line orbit environ-shaker) para facilitar la extracción de los polipéptidos del gel. Se descartaron los pedacitos del gel y la solución de urea con la LS o la SS se diluyó en Tris-HCl 2 mM a pH 8 (1:4 v/v) y se concentró por Amicón 10. Los péptidos obtenidos por extracción con urea 8 M fueron identificados por Western blot.

#### HIDRÓLISIS DE LA LS.

Se realizó una hidrólisis parcial de la LS (1 mg) con tripsina (Sigma) al 0.025 % / 2min / 37° C en Tris.HCl 2mM a pH 8. El análisis de los fragmentos de la hidrólisis se realizó mediante una electroforesis de poliacrilamida en gel desnaturalizante al 14%. Se corrió a 10 mA durante 7 h y el gel fue teñido con azul de Coomassie.

#### ISOELECTROENFOQUE DE LA SS.

La SS purificada se sometió a un electroenfoque (HSI, Hoefer Scientific Instruments,US) en un gel al 8 % de acrilamida y Anfollinas con un intervalo de pH 4-8, durante 8 h a 380 V. El método original (Torrent, 1991) fue ajustado a estas condiciones después de varios ensayos hasta que se logró un electroenfoque adecuado. El corrimiento electroforético se realizó en un gel vertical convencional y para evitar que se saliera el gel (4 %) se colocó un

centímetro de gel de poliacrilamida al 14 % en la parte inferior, lo cual permitió retener el gel dentro de los vidrios del instrumento.

## WESTERN BLOT

Los péptidos de Rubisco fueron identificados por Western blot (Torrent, 1991). La transferencia de proteínas se realizó inmediatamente después de terminada la electroforesis en PAGE/SDS (para evitar que se difundieran las proteínas). Para ello, previamente se cortó el papel filtro (del tamaño del gel) que sería utilizado para la transferencia de proteínas. El orden en que se colocó el papel filtro y las soluciones que se usaron fueron las siguientes:

NUM. DE FILTROS	TIPO DE FILTRO	SOLUCION
7	Whatman normal	Anódica I
2	Whatman normal	Anódica II
1	Whatman MM	Anódica II
2	Papel de nitrocelulosa	Anódica II
	G E L	
1	Whatman MM	Catódica III
2	Whatman normal	catódica III

Solución anódica I pH 10.4 - Tris-HCl 0.3 M y metanol al 20 %.

Solución anódica II pH 10.4, Tris-HCl 25 mM y metanol al 20 %

Solución catódica III- pH 7.2, 3-amino-hexano-n-caproico 10 mM mas 20 % de metanol.

La transferencia se hace a 2 mA /cm<sup>2</sup>/ 90 min.

Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell, 0.2  $\mu\text{m}$ ) se lava con TBS (NaCl 0.15 M y Tris-HCl 50 mM a pH 7.4) y se incuba con agitación (Haefer Scientific Instruments, San Francisco) a temperatura ambiente en la solución de saturación ( Tween 0.5 %, leche descremada en polvo 5.0 % en TBS) durante 1 h, después se incuba durante 45 min en TBS y se adiciona el anticuerpo (anti-Rubisco de espinaca) diluido 1:3000 en TBS y se deja en agitación durante toda la noche a 4° C. Se lava con TBS durante 15 min, un segundo lavado con TBS con NaCl 1M por 1 min y un tercer lavado con TBS durante 1 min. Finalmente se incuba con el segundo anticuerpo de inmunoglobulinas conjugadas con peroxidasa en la solución de saturación (1:2000, V/v), durante 2 h a temperatura ambiente, se lava 2 veces con TBS, cada uno por 15 min y se revela ( 4-cloro-1-naftol 0.11 g, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %, en 5.5 ml de metanol y 16.5 ml de TBS). La reacción se detiene con agua. Finalmente se enjuaga con TBS y se deja secar la membrana a temperatura ambiente.

## DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Folin-Lowry (1951): se mezclaron 5ml de solución alcalina [Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(20 g/L), 0.1 NaOH], más [CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (5 g / L) con tartrato sódico potásico (10 g / L)]. 50 ml de esta mezcla se adicionan a un 1 ml de muestra. Posteriormente se adicionó 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu y se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente y finalmente se hicieron las lecturas a 750 nm en espectrofotómetro (DU 650, Beckman). La concentración de proteínas se determinó en equivalentes de albúmina bovina.

Se utilizó la metodología de Laemmli (1970) para las electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes .

## VIII. RESULTADOS

### PURIFICACIÓN DE RUBISCO.

Una vez determinados los estadios fisiológicos de las hojas de maíz que serían utilizados en la purificación de la Rubisco, fue imprescindible primeramente seleccionar un método que permitiera detectar las subunidades de la Rubisco en forma sencilla y rápida para seguir la proteína en los diferentes pasos de purificación. La identificación de las subunidades se realizó en extractos crudos de las hojas de maíz provenientes de los cuatro diferentes estadios de desarrollo (ver metodología). Para ello se realizó un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 12 % durante 8 h a 10 mA. En la fig. 8 se muestra la electroforesis (PAGE / SDS) de los extractos crudos (proteína soluble total) de las muestras anteriormente mencionadas. Las subunidades fueron identificadas por su masa molecular y se usó como un control la Rubisco purificada de hojas de espinaca.

La localización de las dos subunidades de Rubisco se indican mediante una flecha y se puede observar que estas bandas sobresalen notoriamente debido a su abundancia relativa respecto al resto de las proteínas (la intensidad de la banda es directamente proporcional a la concentración del polipéptido). Finalmente, en esta figura es importante destacar que la LS de la Rubisco de maíz presenta una masa molecular ligeramente menor que la LS de espinaca (fig. 8).

La comparación de la movilidad electroforética entre las bandas de las proteínas de los extractos crudos de las hojas de maíz y la proteína pura de Rubisco de espinaca, sugiere fuertemente que las bandas más intensas corresponden a las subunidades de la Rubisco.

Sin embargo fue necesario demostrarlo directamente y para ello se realizó un Western blot revelado con anticuerpos policlonales dirigidos contra la Rubisco de espinaca en una dilución 1:3000.

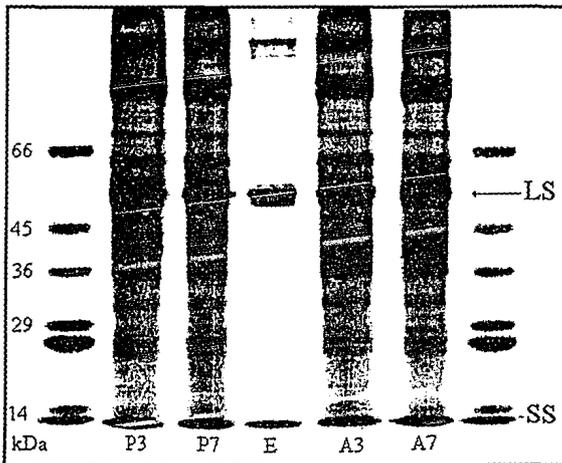


Fig 8. Identificación de los péptidos de Rubisco. Análisis electroforético (PAGE-SDS 12%) de los extractos crudos de hojas de maíz, teñidos con azul de coomassie. PM (marcadores de masa molecular), E (Rubisco de espinaca).

En la Fig. 9 se puede observar que el anticuerpo fue capaz de reconocer las bandas de Rubisco; cabe hacer notar que además el anticuerpo policlonal dirigido contra la holoenzima de Rubisco también reconoce otras bandas de mayor masa molecular (ver discusión).

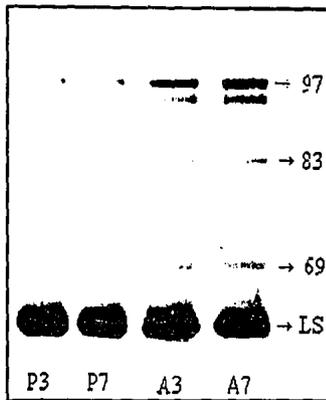


Fig 9. Western blot de la LS en extractos crudos de hojas , revelado con anticuerpos policlonales dirigidos contra la Rubisco de espinaca.

En resumen, los resultados de la electroforesis y el Western blot (figuras 8 y 9) muestran que las bandas identificadas efectivamente corresponden a los péptidos de Rubisco.

Inicialmente se realizó la extracción de Rubisco de hojas de espinaca siguiendo la metodología ya descrita por Robinson (1988), con el objeto de probar el método de la purificación antes de iniciar la purificación de Rubisco de hojas de maíz. Brevemente, la metodología consiste en una extracción de proteínas de la hoja mediante un macerado seguido de una centrifugación, posteriormente se precipita con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 0-35 % (fracción en donde precipita la Rubisco-activasa) y al sobrenadante se le hace un segundo precipitado pero a una concentración de 35-55 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (en la que precipita Rubisco). En la fig. 10 se muestran los resultados de esta metodología en donde se puede observar el perfil de elución de la proteína de hojas de espinacas de una columna de exclusión molecular G-200 después de la precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a una concentración de 35-55%. Se analizaron todas las fracciones obtenidas por PAGE/SDS como se indicó en la metodología. Las fracciones en donde se detectó la

Rubisco por medio de análisis electroforético (PAGE/SDS) se representan como un área sombreada bajo la curva. Esta es la posición esperada para la elución de la proteína.

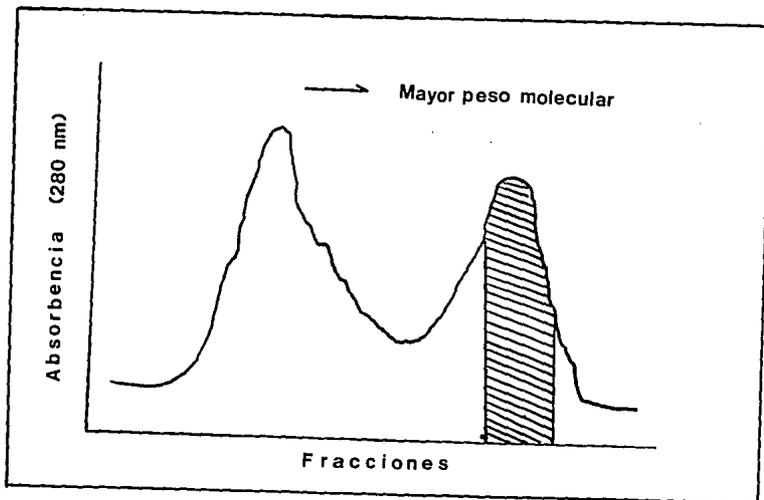


Fig 10. Perfil del fraccionamiento de la fracción 35-55 % de sulfato de amonio concentrado de Rubisco de Espinaca en una columna de Sephadex G-200. El área sombreada bajo la curva indica la localización de Rubisco.

Después de que se reprodujo la metodología de Robinson en espinaca, se prosiguió con la purificación de Rubisco de extractos de hoja de maíz aplicando la misma metodología. Los extractos de proteína soluble total de las hojas fueron centrifugados y precipitados y como se indicó en el caso de espinaca, la pastilla fue resuspendida en un volumen mínimo y posteriormente las muestras se fraccionaron a través de una columna de Sephadex G-200. En las figuras 11 y 12 se observan los perfiles de elución de los fraccionamiento de proteínas de P3 y P7.

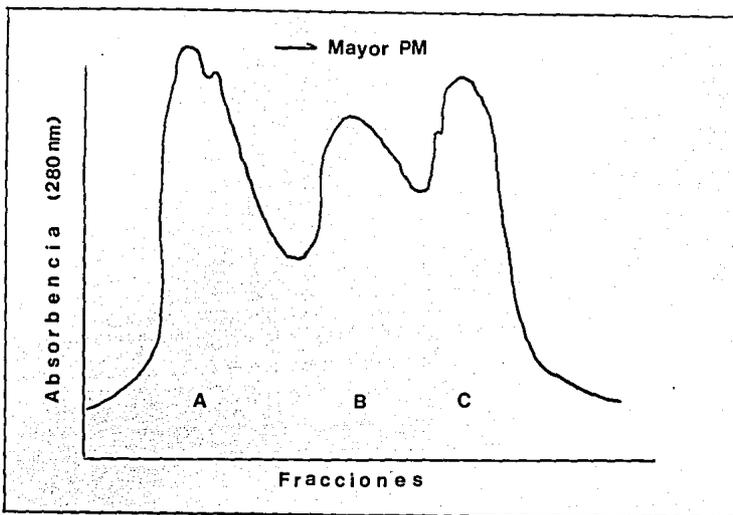


Fig 11. Perfil del fraccionamiento de la fracción 35-55 % de sulfato de amonio concentrado de proteínas de extractos de hoja de P3 en una columna de Sephadex G-200.

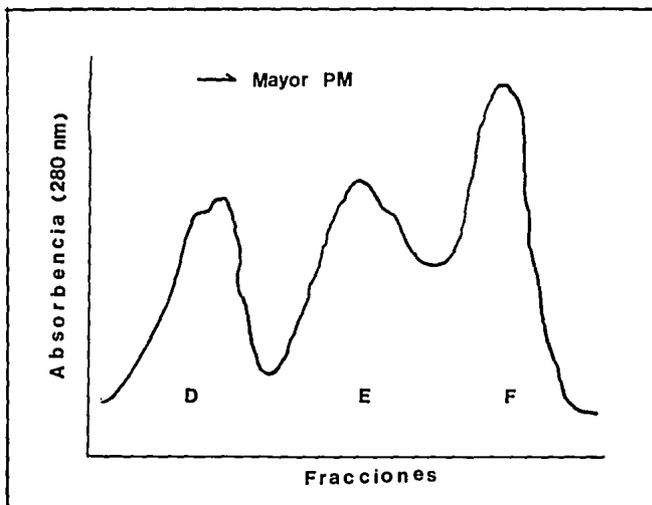


Fig 12. Perfil del fraccionamiento de proteínas de extractos de hojas P7 precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  35- 55% , por una columna de Sephadex G-200.

Las fracciones de esta columna (G-200) se sometieron a un corrimiento electroforético para tratar de localizar la zona en la que se encontraba Rubisco; sin embargo, no fue posible reconocer los péptidos característicos de Rubisco a pesar de que es fácil detectarla al calcular su masa molecular, como en el caso de espinaca.

Debido a que no se encontró la banda de Rubisco en la precipitación con sulfato de amonio del 35-55%, se buscó en la fracción del 0-35%. En las figuras. 13 y 14 se muestran las fracciones de elución de una columna de sephadex G-200 de los péptidos correspondientes de hoja de P3 y P7. Las fracciones de la columna en donde se encontró la Rubisco (PAGE-SDS) se señala en sombreado.

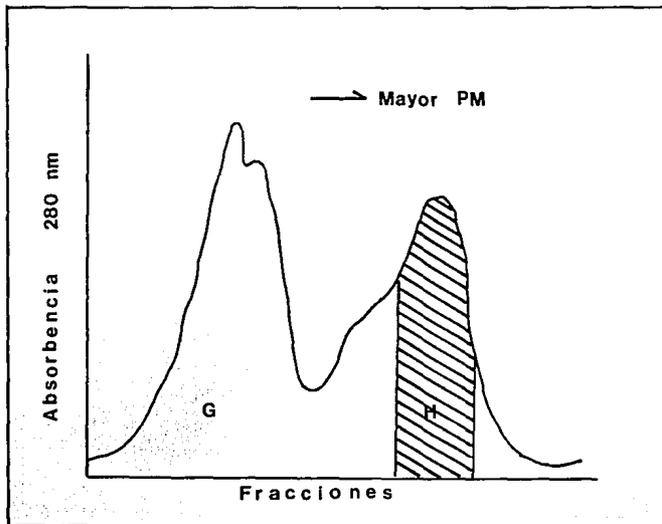


Fig.13 Fraccionamiento de proteínas de extractos de hoja de maíz de P3 precipitados con  $(\text{NH}_2)\text{SO}_4$  0-35 % por una columna de Sephadex G-200

Fig.14 Fraccionamiento de proteínas de extractos de hoja de maíz de P7 precipitados con  $(\text{NH}_2)\text{SO}_4$  0-35 % por una columna de Sephadex G-200

El análisis electroforético de los diferentes picos del fraccionamiento por la columna de Sephadex de las muestras P3 y P7, se observan en la fig 15.

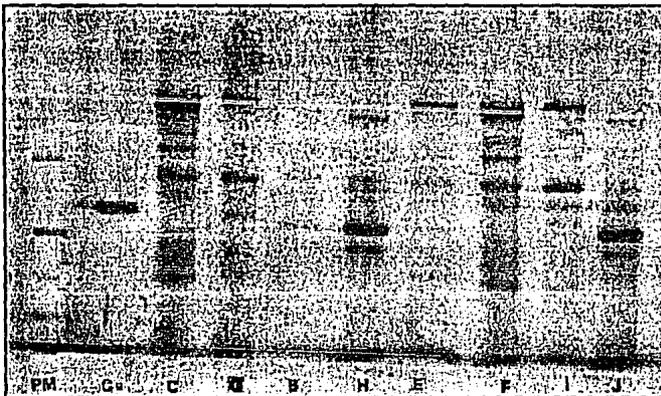


Fig. 15 Electroforesis PAGE/SDS, teñido con azul de coomassie, de las fracciones de Sephadex G-200. Las fracciones de la B a la J corresponden a los picos de las figuras: 11, 12, 13 y 14.

En la fig.16 se muestra el análisis electroforético de todas las fracciones del pico J de la columna de Sephadex G-200 de P7 (fig. 14).

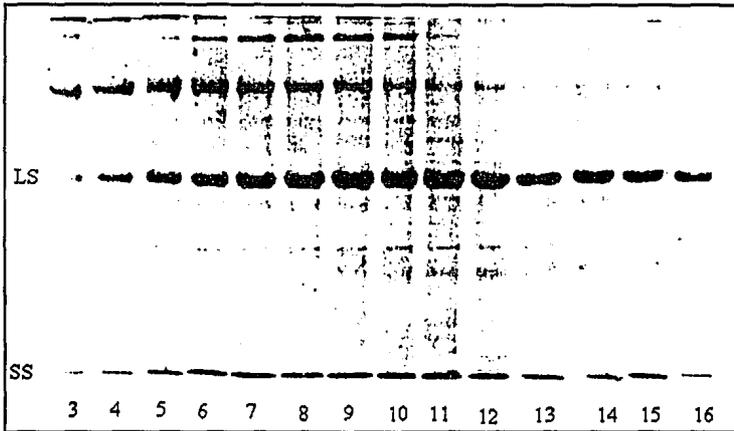


Fig. 16 PAGE-SDS 12 % teñido con azul de coomassie. Fracciones del pico J (3-16) obtenidas de la columna de Sephadex G-200 de la muestra P7.

Con base en estos resultados, la purificación de la Rubisco de plantas adultas se llevó a cabo utilizando el fraccionamiento al 35% de sulfato de amonio y el precipitado directamente se pasó a través de la columna de Sephadex G-200.

Las fracciones de la elución de la columna Sephadex G-200 anteriormente mencionada, en donde se detectó la presencia de Rubisco, fueron concentradas por Amicon 100 y posteriormente se fraccionaron por una columna de Sephacril S-300. El perfil de elución de la muestra P3 se puede observar en la fig. 17.

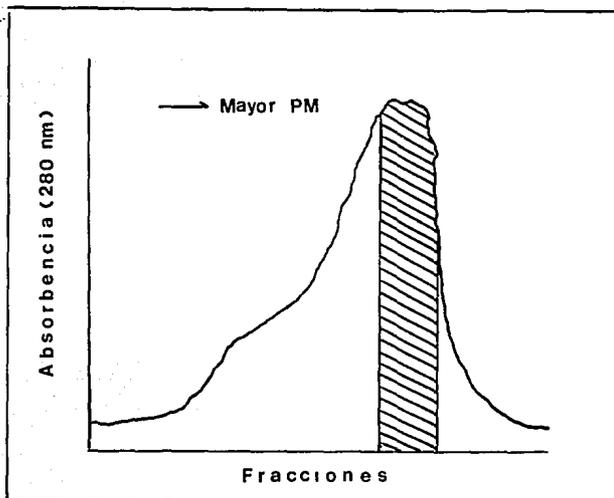


Fig.17 Fraccionamiento por Sephacril S-300 de la Rubisco (P3) proveniente de la columna de G-200.

Las fracciones enriquecidas con Rubisco provenientes de la columna de Sephacril S-300, al igual que en los pasos anteriores, se juntaron y se concentraron por Amicón 100. En la fig.18 se observa el análisis electroforético así como el respectivo Western blot de las muestras de los 4 diferentes estadios fisiológicos de la planta de maíz purificadas por una columna de Sephacril S-300.

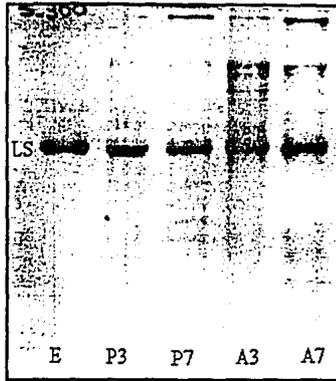


Fig.18 A) Análisis electroforético PAGE-SDS 12% teñido con azul de coomassie

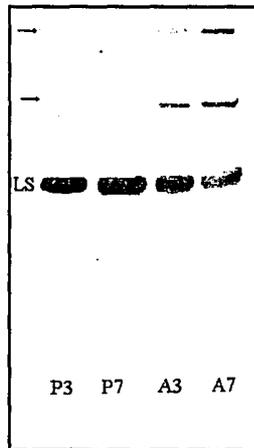


Fig. 18 B) Western blot, revelado con anticuerpos dirigidos contra la LS de Rubisco de espinaca. Muestras eluidas de una columna de Sephacril S-300.

Ya que la Rubisco es un complejo polipeptídico muy pesado ( 550 kDa ), sale en las primeras fracciones de las columnas de exclusión molecular y debido a su gran abundancia relativa, se pueden eliminar bastantes fracciones y utilizar solamente aquellas en donde la concentración de la proteína sea significativa. Vale la pena señalar que la metodología utilizada es más efectiva para la purificación de la proteína de extractos provenientes de plantas adultas que para las plántulas ya que a pesar de que se logra extraer una buena proporción de Rubisco de los tejidos se recupera poca después de todo el procedimiento (cuadro 2).

PASOS DE PURIFICACIÓN	P3 Proteína (mg)	P7 Proteína (mg)	A3 Proteína (mg)	A7 Proteína (mg)
Extracto crudo	823.3	784.3	536.8	501.6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	56.7	61.2	101.2	96.39
Sephadex G-200	8.9	10.3	23.0	30.2
Sephacril S-300	1.7	1.8	2.3	2.8
Número de veces				
Purificación	484	436	233	172

Cuadro 2. Purificación de Rubisco. Concentración de proteínas (mg) en los diferentes pasos de purificación.

## METILACIÓN *IN VITRO* DE LA HOLOENZIMA DE RUBISCO DE MAÍZ

Para iniciar la búsqueda de las posibles diferencias estructurales que pudieran presentarse en Rubisco entre las hojas de maíz de las distintas fases de desarrollo de la planta, se diseñó un experimento que permitiera determinar si existen cambios en los

patrones de metilación dependientes de estadios de crecimiento de la hoja. Para ello, se enviaron muestras de Rubisco parcialmente purificadas después de las dos columnas de filtración al departamento de Bioquímica de la Universidad de Kentucky, EU, en donde el Dr. Robert Houtz las usó como sustrato para medir la actividad enzimática de la S-adenosilmetionina- $P_2$  carboxilasa LS (Lis)  $\epsilon$  N-metiltransferasa, enzima altamente específica, capaz de incorporar grupos metilos exclusivamente en la Lis-14. Este ensayo se realizó con el objeto de investigar en forma indirecta si la Rubisco se encontraba metilada o no en la Lis-14; de tal manera que si la Rubisco de hojas de maíz servía como sustrato a la metil transferasa, se podría asumir que no estaba metilada en la Lis-14 de la LS y lo contrario sucedería si la metil transferasa no lograba incorporar metilos a la holoenzima; se asumiría entonces que la LS habría sido metilada *in vivo*.

Para realizar este experimento, las muestras de las cuatro diferentes fases de desarrollo (eluidas en la columna de Sephacril S-300) se incubaron con la metiltransferasa altamente purificada, más 200  $\mu$ M de [ $^3H$ ]-SAM por 90 min a 30°C. Como control negativo se usó BSA y el control positivo fue la Rubisco de espinaca (sustrato ideal) no metilada *in vivo*. Además, se incluyó la muestra de A7 a la cual se le adicionó Rubisco activasa (chaperona que se une fuertemente a la Rubisco desnaturalizada) en un sistema generador de energía, para saber si ésta afectaba la metilación de Rubisco *in vitro*.

La eficiencia de metilación para la Rubisco de espinaca fue de 85 %, el cual fue ajustado al 100 % de los sitios teóricos metilables.

Los resultados de la actividad de la enzima metil transferasa muestran que no hay una diferencia significativa en el grado de metilación de las cuatro muestras (P3, P7, A3 y A7) el cual fluctuó entre 70 y 97 % de incorporación de trimetil-Lis. Una excepción a estos resultados es la muestra de A7 + RA que resultó con baja incorporación de grupos metilos (cuadro 3).

Sustrato	DPM	pmoles CH <sub>3</sub> incorporados	Sitios metilables pmoles teóricos	% de grupos metilos incorporados
BSA (250 µg)	529	-----	-----	-----
RE (5 µg)	3317	191.6	224.7	100
P3 (20.75 µg)	79626	553.1	932.6	70
P7 (15.12 µg)	61745	428.0	679.8	74
A3 (14.20 µg)	75349	523.2	638.4	97
A7 (11.72 µg)	61956	429.4	526.7	96
A7 (80 µg) + RA (20 µg)	74242	515.4	4494.4	14

Cuadro 3. Actividad enzimática de la metil transferasa, purificada de chícharo. BSA (seroalbúmina bovina), control negativo; RE (Rubisco de espinaca), control positivo.

El experimento de la muestra A7 más la adición de la RA, (cuadro. 3) es interesante: la adición de la Rubisco-activasa disminuyó la susceptibilidad de la LS a ser metilable. De un 96% de incorporación de trimetil-Lis para A7, la presencia de RA disminuyó la incorporación de trimetil-Lis a un 14% los grupos metilos incorporados. Puesto que del total de la proteína de la muestra A7 + RA, el 20% corresponde a Rubisco-activasa, el cálculo de los sitios metilables teóricos debe corregirse en base al total de Rubisco exclusivamente para que no se alteren los resultados, por tanto se modificaría a un 17%. No obstante, la diferencia en la concentración de proteínas no logra justificar la diferencia en el grado de metilación de Rubisco (A7 + RA). La comparación de este 17% con el 96% de la muestra A7, sugiere que la RA, por tener la capacidad de unirse fuertemente a la Rubisco, hace inaccesible los sitios de metilación para la enzima y por lo tanto esta asociación impide la metilación de la Rubisco.

## IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DEL PÉPTIDO (25 AMINOÁCIDOS) DEL EXTREMO AMINO DE LA LS.

Un control necesario para apoyar la interpretación de los datos de metilación era el tener la seguridad de que el péptido amino terminal de la LS no había sido removido del péptido por hidrólisis y por tanto la disminución en la capacidad de la metil-transferasa para incorporar grupos metilos a la Rubisco no se debía a la carencia de dicho extremo amino. Para este efecto se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante de extractos de Rubisco después de purificada por las columnas de filtración y posteriormente la proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se envió a la Universidad de Kentucky, donde el Dr. Houtz reveló las bandas de la LS con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los primeros 25 aminoácidos del extremo amino (fig. 19).

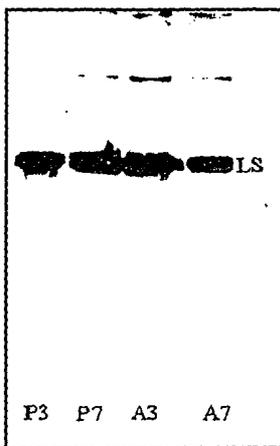


Fig. 19. Identificación de la presencia del extremo amino en la LS por Western blot. La LS fue revelada con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los primeros 25 aminoácidos del extremo amino.

Este experimento demuestra la integridad del polipéptido de la LS ya que el anticuerpo fue capaz de reaccionar con el polipéptido de la LS de los 4 diferentes estadios de desarrollo; por lo tanto, se demuestra que el sitio blanco de la metil transferasa se encuentra presente en las 4 muestras, aún las que proceden de hojas con inicio de senescencia como son las muestras P7 y A7.

## PURIFICACIÓN DE LA LS Y SS.

Como dijimos antes, los ensayos de la metil-transferasa sugieren que la LS de la Rubisco de los diferentes estadios fisiológicos estudiados no está metilada *in vivo*. Para demostrar en forma directa si las muestras están metiladas o no, se siguieron dos estrategias: a) hidrólisis triptica controlada del péptido de la LS y el análisis electroforético de los fragmentos, b) hidrólisis ácida total de la LS y análisis de los aminoácidos.

Para este propósito fue necesario obtener pura la subunidad grande de la Rubisco. La LS pura se obtuvo al extraer el polipéptido de un gel de poliacrilamida desnaturizante. Este se cortó en pequeños fragmentos y se incubó en urea 8 M a 40° / 24 h con agitación. En la fig. 20 se muestra el corrimiento, en un análisis electroforético en gel desnaturizante, de la LS recuperada del gel por extracción con urea.

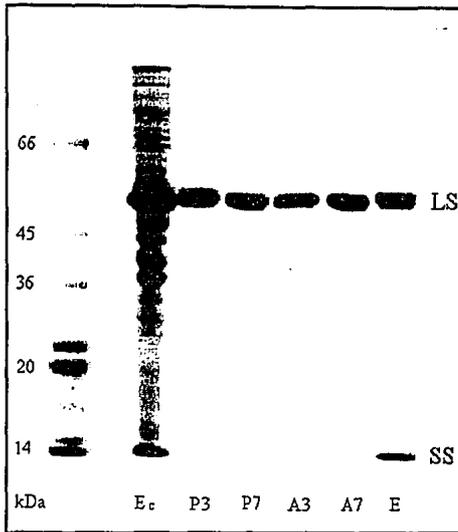


Fig.20. Análisis del nivel de purificación y la integridad de la LS de Rubisco en los cuatro diferentes estadios fisiológicos de la hoja de maíz. LS obtenida del gel de poliacrilamida por extracción con urea 8M. PAGE-SDS 12%. Marcadores de masa molecular (kDa), extracto crudo de espinaca (Ec) y Rubisco pura de espinaca (E)

Como puede observarse en esta figura, la LS fue extraída en forma pura de los geles y el tratamiento con urea generó degradación de la proteína

### HIDRÓLISIS PARCIAL DE LA LS CON TRIPSINA.

Antes de iniciar la hidrólisis de la LS de maíz se realizó un experimento preliminar para definir las condiciones adecuadas de hidrólisis. En este experimento se llevó a cabo una hidrólisis de albúmina bovina con tripsina al 0.05 % a 40° C durante 60, 90 y 120 min. Los resultados se muestran en la fig. 21. Como puede observarse, en la primera hora de incubación con la tripsina ya se ha llegado a la hidrólisis total de la proteína.

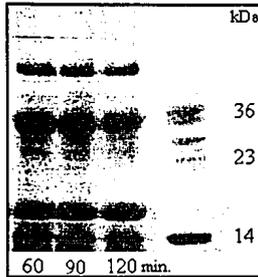


Fig.21. Hidrólisis de la seroalbúmina bovina con tripsina (0.05%) a 37°C a diferentes intervalos de tiempo. kDa (marcadores de masa molecular).

Posteriormente se siguió con la hidrólisis de la LS de P7 con enzima más diluida (0.0025 % de tripsina) y a temperatura más baja 37° C en un intervalo de tiempo de incubación de 0 a 60 min (fig.22).

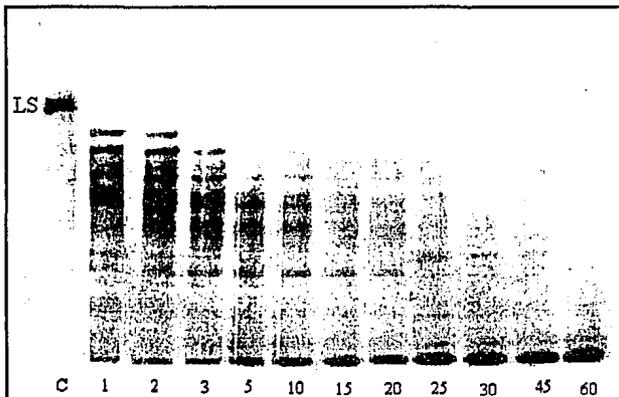


Fig.22. Hidrólisis de la LS de P7 con tripsina (0.0025%) a 37°C a diferentes intervalos de tiempo. PAGE-SDS 14%. De 1 a 60 min.

Los resultados de la fig. 15 muestran que el tiempo óptimo de incubación para la degradación parcial de la LS se encuentra en los primeros 3 min de incubación por lo que se decidió hacer la degradación de LS de P3, A3 y A7 a 2 min de incubación, bajo estas últimas condiciones. Asimismo, puede notarse como se va acumulando una banda de 14 kDa (aproximadamente) conforme transcurre el tiempo (fig. 22).

Los fragmentos resultantes de la hidrólisis de la LS con tripsina al 0.0025 % / 1 mg de proteína durante 2 min a 37°C de hojas de maíz de las cuatro muestras, se analizaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 14%. En la fig. 23 se puede observar el corrimiento de los péptidos tripticos de cada una de las muestras analizadas. Como puede notarse, no hay diferencias notorias en los primeros tres estadios (P3, P7 y A3); sin embargo, en la muestra A7 se observa una mayor acumulación de fragmentos peptídicos de menor masa molecular (45 a 29 kDa) que en las muestras anteriormente mencionadas (ver discusión).

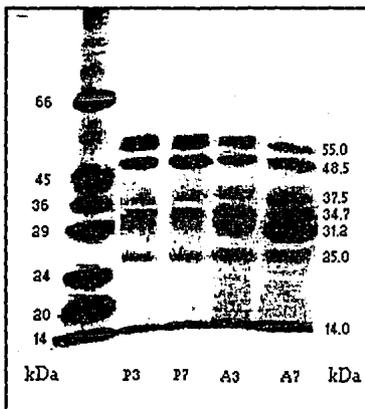


Fig.23. Análisis electroforético de los productos de hidrólisis controlada de la LS de maíz Hidrólisis con tripsina (0.0025%) a 37°C/2 min. de P3, P7, A3 y A7. PAGE-SDS 14%.

## ISOELECTROENFOQUE DE LA SS.

En la introducción se mencionó que los genes que codifican la SS de maíz son específicos de tejido, además de que su expresión genética es dependiente del estadio de desarrollo. Por tal motivo, no se pudo descartar la posibilidad de que los cambios en la regulación de la actividad de Rubisco en los diferentes estadios fisiológicos de la hoja de maíz estuvieran determinados por una expresión diferencial de estos genes. Para determinar si cambia el patrón de expresión en cuanto al aporte relativo de cada una de los diferentes isomorfos de la SS, se realizó un electroenfoque de la SS purificada, aislada del gel de PAGE-SDS por el mismo procedimiento que la LS. Los resultados del electroenfoque muestran tres bandas mayoritarias (fig.24) Los tres isomorfos de los péptidos de la SS en los cuatro diferentes grados de desarrollo de la hoja no mostraron diferencias significativas en la proporción de éstos. Tampoco se observó la aparición de algunas otros isomorfos en alguno de los estadios.

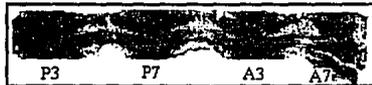


Fig.24. Isoelectroenfoque de la SS de Rubisco en 4 diferentes estadios de desarrollo de la hoja de maíz

## IX. DISCUSIÓN

Los resultados descritos en este trabajo demuestran que la Rubisco de maíz se comporta diferente a la de otras especies ( C3 ), ya que fue necesario introducir modificaciones en la concentración de sulfato de amonio (al 35 %) para tener un método adecuado de purificación para Rubisco de maíz (C4). Los péptidos purificados de esta preparación efectivamente correspondieron a la LS y SS de Rubisco. La identificación de los péptidos se realizó por peso molecular y la comparación migratoria con la Rubisco purificada de espinaca como control, mediante un corrimiento electroforético (fig.8). Estos resultados fueron confirmados por Western Blot revelado con anticuerpos policlonales dirigidos contra la Rubisco de espinaca (fig. 9). Asimismo su identificación es apoyada por el reconocimiento del péptido de la LS en el Western blot revelado con el anticuerpo monoclonal dirigido contra los primeros 25 aminoácidos del extremo amino de la LS (fig. 19).

El grado de purificación alcanzado por precipitación con sulfato de amonio y por exclusión de masa molecular (fig.18 A) fue suficiente para someter las muestras al análisis de la metilación *in vitro* de la Rubisco, así como realizar la separación de la LS y la SS del resto de las proteínas por extracción de estos péptidos del gel con urea después de la electroforesis (fig.20). La purificación de la SS fue sencilla debido a que fueron eliminadas todas las moléculas de bajo PM durante la elución por las columnas de exclusión molecular de las 4 muestras analizadas, en cambio la LS quedó rodeada de varios péptidos contaminantes y esto fue resuelto dejando correr por más tiempo la electroforesis, a fin de separarlos y extraer con urea exclusivamente al péptido de la LS del gel de poliacrilamida. Por otra parte, cuando se realizó la transferencia de proteínas de PAGE-SDS a la membrana de nitrocelulosa y se reveló con anticuerpos dirigidos contra la Rubisco de espinaca (Western blot), el anticuerpo mostró capacidad de entrecruzamiento con bandas

de mayor peso molecular a los predichos para la LS. Esto sugiere que las bandas de mayor masa molecular corresponden a agregados de las subunidades de Rubisco en diferentes proporciones (fig. 9). Además se logró detectar estos mismos agregados en el Western blot revelado con anticuerpos dirigidos contra los primeros 25 aminoácidos del extremo amino de la LS (fig. 19). Los agregados de las subunidades de Rubisco se observaron en mayor proporción en las muestras de hojas adultas en senescencia que en las de plántulas (fig. 18 B).

Este fenómeno de insolubilidad o agregación de la Rubisco ha sido observado por diversos autores; en especial coincide con los resultados de Crafts-Brandner (1991), quienes demostraron que durante la remoción de frutos no disminuye la concentración de la Rubisco aunado al descenso general en la fotosíntesis como fue reportado anteriormente. En realidad, la Rubisco se insolubiliza durante el proceso de purificación y es difícil detectarla. Estos autores pudieron encontrarla en el precipitado de los extractos, donde se detectó unida a una proteína de 30 kDa.

Una vez obtenidas las subunidades puras, el objetivo primordial se centró en determinar si la LS de la Rubisco se encontraba metilada o no en la lisina 14 y si esta característica cambiaba debido al estadio fisiológico de la planta. Se utilizaron diferentes estrategias para ello: 1) Metilación de la holoenzima de Rubisco *in vitro* y 2) degradación parcial controlada de la LS con tripsina.

Para el análisis de la metilación *in vitro* se usaron extractos parcialmente purificados de la holoenzima de Rubisco ya que la metiltransferasa es altamente específica para la Lis-14 de la LS de Rubisco. Los resultados descritos de la actividad de metiltransferasa sobre la Rubisco de maíz (cuadro 3) sugieren que *in vivo* la LS de la Rubisco de las cuatro muestras analizadas no se encuentran metiladas debido a que fueron sustratos aceptables para la

metiltransferasa, o a que la Rubisco estuviera parcialmente metilada, ya que en ningún caso se logró una incorporación de trimetil-Lis al 100 % a la LS de Rubisco

Sin embargo, es importante hacer notar que aunque la enzima no siempre logró incorporar los grupos metilos con la misma eficiencia, los resultados si revelan que las cuatro muestras pudieron ser metiladas hasta una proporción muy significativa (70 a 97 %) lo que sugiere fuertemente ausencia de metilacion en la LS de maíz.

El experimento de la muestra A7 más la adición de la RA, (cuadro 3) es interesante. La adición de la Rubisco-activasa disminuyó la susceptibilidad de la LS a ser metilable (bajó de 96% a 17% los grupos metilos incorporados). Por lo que se sugiere que la RA, por tener la capacidad de unirse fuertemente a la Rubisco (Sánchez de Jiménez et al., 1994), hace inaccesible para la metil-transferasa los sitios de metilación y por tanto esta asociación impide la metilación de la Rubisco.

Con esta estrategia no se puede excluir que la falta de incorporacion de grupos metilos en la LS se debiera a la pérdida del fragmento del extremo amino de este péptido el cual contiene el sitio blanco para la metil transferasa. Hilditch y col. (1991) reportaron la existencia de una endopeptidasa vacuolar (45 kDa) que durante la purificación de la Rubisco hidroliza el extremo amino de la LS, sin alterar la estructura de  $L_8S_8$  de la Rubisco. Sin embargo, el análisis inmunológico del extremo amino de la LS indica que la LS de las cuatro muestras está completo (fig. 19) y por lo tanto está presente el sitio blanco para la metil transferasa.

Por otra parte los resultados de la hidrólisis parcial controlada con tripsina de la LS también sugieren que no está presente la trimetil-Lis en el residuo 14 (fig.23), ya que en todos los casos se encontró un patron similar de hidrólisis. Una excepcion a esto fue la muestra A7 (el extracto proviene de hojas senescentes), que aún cuando se detectaron los mismos

productos de hidrólisis se encontró una mayor acumulación de fragmentos peptídicos de menor masa molecular (30 a 40 kDa).

De los 5 genes de *rbcS*, 3 son expresados activamente (90% de RNAm), 2 de los cuales constituyen el 80% de los transcritos en hojas de maíz en enverdecimiento. El análisis por hibridación con sondas específicas, traducción *in vitro* e inmunoprecipitación mostraron que éstos corresponden a SS1, SS6 y SS7, en donde SS1 participa con el 45 %, SS7 35 % y SS6 10% (Sheen and Bogorad, 1986). Estos resultados son congruentes con los datos obtenidos en el presente trabajo, en el que se obtuvieron 3 bandas predominantes de péptidos SS en las hojas, tanto en plantas adultas como en las jóvenes (fig. 24). La proporción de isomorfos de la SS en las diferentes etapas fisiológicas no cambió. Sin embargo, es importante señalar que se presenta una ligera diferencia en A7. Loza y col. (1990) reportaron que en esta etapa de desarrollo no se observa síntesis *de novo* de la SS. Lo cual indica que hay una degradación diferencial de los isomorfos y por tanto se sugiere que en los estadios de desarrollo estudiados, la expresión diferencial de los genes de la SS no explicaron los cambios de regulación de la actividad de Rubisco.

Los resultados anteriores sugieren que la Rubisco, más que cambios postraduccionales del péptido de la LS o diferencias de los isomorfos de la SS que la constituyen, podría presentar cambios conformacionales o de ensamblaje en las diferentes etapas de desarrollo, las cuales afectan la estructura cuaternaria de la enzima. Estos cambios harían que en etapas avanzadas en la vida de la hoja, se encontrara más accesible el sitio donde ocurre la trimetilación (cuadro 3). Esta sugerencia se apoya también en resultados obtenidos en nuestro laboratorio, los cuales muestran que la Rubisco activasa (una chaperona molecular que organiza la estructura y reactiva a la Rubisco que ha sido alterada en su estructura cuaternaria), tiene mayor efecto de activación sobre la Rubisco de P7 y A7, procedentes de

hojas que han iniciado el proceso de senectud, que sobre la enzima extraída de P3 y A3 (Martínez Barajas, 1994).

Las proteínas no son estructuras rígidas, tienen movimientos dinámicos y la Rubisco no es la excepción; por ejemplo: en centeno se observan diferencias conformacionales en la Rubisco dependiendo de la sensibilidad al frío de la planta como fue demostrado mediante la titulación con DTNB. Por otra parte, la Rubisco también sufre cambios conformacionales con cambios bruscos de temperatura como es el descongelamiento (Heuer, 1990).

## X. CONCLUSIONES

El grado de purificación alcanzado para Rubisco por el método descrito, fue suficiente para someter las muestras al análisis de la metilación *in vitro* de la LS de Rubisco; así como la extracción de la LS y la SS del gel con urea después de la electroforesis.

El isoelectroenfoco de la SS muestra que no existe una aparente expresión genética diferencial de los genes que codifican este péptido, dependiente del estadio de desarrollo de la planta.

Los diferentes métodos que se probaron para determinar el grado de metilación del péptido LS coinciden en mostrar ausencia de metilación. El análisis electroforético de los productos de la digestión parcial con tripsina de LS, mostró que la Rubisco no presenta trimetil-lisina en la LS de los estadios de desarrollo de la planta estudiados.

La capacidad de la Rubisco como sustrato de la N-metil transferasa indica que la LS de maíz no se encuentra metilada. La LS de maíz conserva el extremo amino en los 4 estadios fisiológicos estudiados.

La hipótesis del presente trabajo fue que durante el llenado del grano de maíz, la actividad de Rubisco está regulada por: cambios estructurales debidos a tri-metilación en la Lis-14 de la LS, por la expresión genética diferencial de la SS o por cambios conformacionales en la holoenzima de Rubisco. Con base en lo anteriormente mencionado se concluye que la Rubisco más que modificaciones químicas en su estructura molecular presenta cambios conformacionales en la estructura cuaternaria dependientes del desarrollo, los cuales podrían ser responsables de que, se pierda la actividad enzimática de la Rubisco, especialmente en las etapas avanzadas en la vida de la hoja.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson J., Knight S., Scheneider G., Lindqvist Y., Lindqvist T., Brändén C. and Lorimer G. (1989). Crystal structure of the active site of ribulose-bisphosphate carboxylase. *Nature* **337**: 229-234.
- Andrews T. J. (1988). Catálisis by cyanobacterial ribulose-bisphosphate carboxylase large subunits in the complete absence of small subunit. *J. Biol. Chem.* **263** (25): 12213-12219.
- Berry J. O., Nikolau B. J., Carr J. P. and Klessig D. F. (1985). Transcriptional and post-transcriptional regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in light- and dark-grown amaranth cotyledons. *Mol and Cell Biol* **5**: 2238-2246.
- Berry J.O., Nikolau B. J., Carr J. P. and Klessig D. F. (1986). Translational regulation of light induced ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in amaranth. *Mol and Cell Biol* **6**: 2347-2353.
- Berry J.O., Nikolau B.J. and Klessig D.F. (1988). mRNAs encoding Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase remain bound to polysomes but are not translated in amaranth seedlings transferred to darkness. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 4190-4194.
- Black M.T., Meyer D., Widger W.R. and Cramer W.A. (1987). Light-regulated methylation of chloroplast proteins. *J. Biol. Chem.* **262** (20): 9803-9807.
- Blair G. and Ellis R. (1973). Protein synthesis in chloroplasts I. Light driven synthesis of large subunit of fraction I protein by isolated pea chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **319**: 223-234.
- Bradner S. C., Salvucci M. E. and Egli D. B. (1991). Fruit removal in soybean induces the formation of an insoluble form of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in leaf extracts. *Planta.* **183**: 300-306.
- Chan P. and Wildman S. (1972). Chloroplast DNA codes for the primary structure of the large subunit of fraction I protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **277**: 677-680.
- Cornwell K. L. and Keegstra K. (1987). Evidence that a chloroplast surfaceprotein is associated with a specific binding site for the precursor to the small subunit of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxilase. *Plant Physiol.* **85**: 780-785.

-Crafts B., Salvucci M. and Egli B. (1991). Fruit removal in soybean induces the formation of an insoluble form of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in leaf extracts. *Planta*. **183**: 300-306.

-Deng X. W. and Gruissen W. (1987). Control of plastid gene expression during development: limited role of transcriptional regulation. *Cell*. **49**: 379-387.

-Flachmann R., and Bohner H. (1992). Replacement of a conserved arginine in assembly domain of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase small subunit interferes with holoenzyme formation.

-Foyer C.H. (1985). Stromal protein phosphorylation in spinach chloroplasts. *Biochem. J.* **231**: 97-103.

-Gatenby, A.A. and Ellis, R. J. (1990). Chaperonin function: The assembly of rubisco. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**: 125-149.

-Goulobinoff P., Gatenby A. and Lorimer G. (1989). GroEL heat proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *E. coli*. *Nature*. **337**: 44-47.

-Gruissem W. and Zurawski G. (1985). Identification and mutational analysis of the promoter for a spinach chloroplast transfer RNA gene. *EMBO J.* **4**: 1637-1644.

-Gruissem, W. (1989). Chloroplast gene expression: How plants turn their plastids on. *Cell* **56**: 161-170.

-Heuer B. and Portis R. (1990). Activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase as a function of storage conditions. *Plant Physiol.* **93**: 1511-1513.

-Hilditch C., Jones P., Banding P., Smith A. and Rogers L. (1991). Ribulose biphosphate carboxylases from macroalgae: Proteolysis during extraction and properties of the enzyme from *Porphyra umbilicalis*. *Phytochemistry*. **30** (3): 745-750.

-Houtz R. L., Tufts J., Mulligan R., and Tulbert N. (1989). Post-translational modifications in the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 1855-1859.

-Houtz R.L., Royer M. and Salvucci M.E. (1991). Partial purification and characterization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit <sup>14</sup>N-methyltransferase. *Plant Physiol.* **97**: 913-920.

-Huner, N.P. and Mac Dowall, D.H. (1978). Evidence for a *in vitro* conformational change in rubisco from Puma Rye during cold adaptation. *Can. J. Biochem.* **56**: 1154-1161.

- Knight S., Anderson I. and Brändén C. I. (1990). Crystallographic analysis of ribulose 1,5-bisphosphate from spinach at 2.4 Å resolution. Subunit interactions and active site. *J. Mol. Biol.* **215**: 113-160.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lorimer G.H. and Mizioko, H.M. (1980). Carbamylation formation on the epsilon-amino group of a lysyl residue as the basis for the activation of ribulose bisphosphate carboxylase by  $CO_2$  and  $Mg^{2+}$ . *Biochemistry.* **19**: 5321-5328.
- Lowry O.H., Rosebrough A.L, Farr A.L and Randall (1951). *J. Biol Chem.* **193**: 265-268.
- Loza T., Martínez B.E., Serrano B., Molina J., Ortega D.M.L. and Sánchez J. (1987).  $CO_2$ -fixation enzymes in maize (*Zea mayz* L.) and grain yield. *Can. J. Bot.* **65**: 607- 611.
- Loza T.H., Martínez, B.E. and Sánchez J.E (1990). Regulation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase expression in second leaves of maize seedlings from low and high yield populations. *Plant Physiol.* **93**: 541-548.
- Manzara, T. and Gruißem W. (1988). Organization and expression of the genes encoding ribulose,5,-bisphosphate carboxylase in higher plants. *Photosynthesis Research.* **16**: 117-139.
- Martínez Barajas E. (1987). Análisis de la Regulación de la Actividad de la Ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa *in* maíz. Tesis de maestría en ciencias. Dpto. de Bioquímica, Fac. de Química, UNAM.
- Martínez B. (1994). Papel de la Rubisco activasa en la regulación de la actividad de la Rubisco. Tesis Doctoral. Facultad de Química
- Metha R, Fawcett T, Porath D and Mattoo A. (1992) Oxidative stress causes rapid membrane translocation and *in vivo* degradation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxigenase. *J. Biological Chem.* **267** (4): 2810-2816
- Mulligan R., Houtz R. and Tolbert N. (1988). Reaction intermediate analogue binding by rubisco cause specific change in proteolytic sensitivity: the amino terminal residue of the large subunit is acetylated proline. *Proc Natl Acad Sci* **85**: 1513-1517.
- Niemi K.J., Adler J. y Selman B.R. (1990). Protein metylation in pea chloroplasts. *Plant Physiol.* **95**: 1235-1240.

-Ngemprasirtsiri J.N., Chollet R., Kobayashi, H; Sugyammatt and Azazawa, T. (1989). DNA methylation and the differential expression of C4 photosynthesis genes in mesophyll and bundle sheath cells of greening maize leaves. *J.Biol.Chem.* **264** (14): 8241-8248.

-O'Farrel, P.H. (1975). High resolution two dimensional electrophoresis of protein. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.

-Ostrem, J. A., Ramage R.T., Bohnert H.J. and Wasmann C.C. (1989). Deletion of the carboxyl-terminal portion of the transit peptide affects processing but not import or assembly of the small subunit of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **264** (7): 2662-2665.

-Paul K., Morell M. and Andrews T. J. (1993). Amino-terminal truncations of the ribulose-bisphosphate carboxylase small subunit influence catalysis and subunit interactions. *Plant Physiol.* **102**: 1129-1137.

-Portis A.R. (1992). Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase activity. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **43**: 415-437.

-Ranjewa R. and Boudet A. (1987). Phosphorylation of proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **38**: 73-93.

-Rintamäki E. (1991). Rubisco subunit binding protein increases the solubility of Rubisco large subunit *in vitro*. *Plant. Physiol. Biochem.* **29** (1): 1-8.

-Robinson S.P., Streusand V. J., Mark J. and Portis A.R. (1988). Purification and assay of Rubisco Activase from leaves. *Plant Physiol.* **88**: 1008-1014.

-Rodermel, S.R. and Bogorad L. (1985). Maize plastid photogenes: mapping and photoregulation of transcript levels during light induced development. *J. Cell Biol* **100**: 463-476.

-Sánchez J.E., Medrano L. and Martínez B.E. (1994). Rubisco activase, possible new member of the molecular chaperone family. *Sometido a Biochemistry.*

-Sasaki, Y., Nakamura Y. and Matsuno R. (1987). Regulation of gene expression of ribulose bisphosphate carboxylase in greening pea leaves. *Plant Mol Biol.* **8**: 375-382.

-Sheen J.Y. and Bogorad L. (1986). Expression of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit gene and three small subunit genes in two cell types of maize leaves. *EMBO J.* **5** (13): 3417-3422.

-Schneider G., Lindqvist Y., Brändén C. and Lorimer G. (1986). Three-dimensional structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum* at 2.9 Å *EMBO J.* **5** (13): 3409-3415.

- Schneider G., Lindqvist Y. and Brändén C. (1992). Rubisco: Structure and mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**: 119-143.
- Silverthorne J. and Tobin E. (1990). Post-transcriptional regulation of organ-specific expression of individual *rbcS* mRNAs in *Lemna gibba*. *The Plant Cell.* **2**: 1181-1190.
- Tanaka A. y Yanaguchi, J. ( 1977 ). Producción de materia seca, componentes del rendimiento y rendimiento de grano de maíz. Versión en español y traducida por J. Koshashi. Colegio de Posgraduados de Chapingo, Mex. 124 pp.
- Thompson D. and Meagher R. (1990). *Nucleic Acids Res.* **18**:3621-3629.
- Tobin, E. and Silverthorne J. (1985). Light regulation of gene expression in higher plants. *Ann Rev. Plant Physiol.* **36**: 569-593.
- Torrent Q. M. (1991). Mecanismo de acción de fitorreguladores en el desarrollo y germinación de semillas. Facultad de Química, UNA y el Depto de Genética Molecular, Barcelona, España.
- Wanner L., and Gruissen W. (1991). Expression dynamics of the tomato *rbcS* gene family during development. *Plant Cell.* **3**: 1289-1303.
- Wold F. (1981). *In vivo* chemical modification of proteins (Post-translational modification). *Ann. Rev. Biochem.* **50**: 783-814.
- Zurawski G., Perrot B., Bottomley W. and Whitfeld. (1981). The structure of the gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA. *Nucleic Acid Res.* **9**: 3251-3270.