

00581  
4  
20



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE BIOQUIMICA Y FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA VEGETAL

**"EL PAPEL DE LA RUBISCO ACTIVASA EN LA REGULACION DE  
LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS**  
**(BIOQUIMICA)**

P R E S E N T A  
**J. ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS**

MEXICO, D. F.

ABRIL DE 1994.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## "EL PAPEL DE LA RUBISCO ACTIVASA EN LA REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO"

### RESUMEN.

La actividad carboxilasa de la Ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) está fuertemente regulada por una gran cantidad de factores. Resultados obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio mostraron que durante el periodo de llenado del grano en maíz, la actividad específica de la enzima, cambia significativamente, sin que ello esté asociado a cambios en la concentración de la enzima o a la presencia de compuestos activadores y/o inhibidores de la actividad.

En este trabajo se muestra que los cambios en la actividad de Rubisco observados durante el periodo de llenado del grano tienen una buena correlación con los cambios que durante esa etapa se observan en la concentración de Rubisco activasa, y se presentan resultados experimentales enfocados a esclarecer el mecanismo a través del cual, la Rubisco activasa puede regular la actividad de la Rubisco.

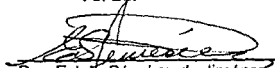
Los resultados obtenidos demuestran que la Rubisco activasa comparte una serie de características que distinguen a un grupo de proteínas denominadas chaperonas moleculares: a) forma complejos de alto peso molecular, b) tiene actividad de ATPasa, c) su concentración celular se incrementa por altas temperaturas (44°C), d) forma complejos con Rubisco parcialmente desnaturizada los cuales se rompen cuando hay ATP en el medio y sobre todo e) induce una recuperación muy significativa de la actividad que la Rubisco pierde como consecuencia de un tratamiento de desnaturización por calor en ausencia de iones.

Otra parte importante de este trabajo es el estudio de los elementos que regulan la expresión de la Rubisco activasa. Se observó que el desarrollo y factores ambientales (temperatura) son dos aspectos fundamentales en este proceso y que el efecto que la Rubisco activasa tiene sobre la actividad de la Rubisco, podría estar asociado a ciertos cambios estructurales que la Rubisco sufre durante el desarrollo de las plantas.

Este trabajo también incluye los resultados de la comparación que durante el periodo de llenado del grano se realizó en dos poblaciones de maíz genéticamente relacionadas pero con diferencias importantes en su rendimiento de grano ( $Z_0$  y  $Z_{20}$ ). El hecho de que en la población mejorada ( $Z_{20}$ ) se haya observado mayor actividad de Rubisco y también cantidades superiores de Rubisco activasa, hace pensar que la Rubisco activasa podría tener un papel importante en el incremento en la producción de grano que esta variedad ha experimentado como resultado del programa de mejoramiento a que se ha sometido.

Todos estos resultados llevan a proponer que la Rubisco activasa puede incrementar la actividad de Rubisco gracias a la capacidad que tiene para actuar como chaperona molecular y facilitar cambios estructurales que hacen a la Rubisco más eficiente, lo cual podría ser particularmente relevante durante el periodo de llenado del grano.

Vo. Bo.



Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

**AGRADECIMIENTOS:**

**ESTE TRABAJO FUE POSIBLE GRACIAS AL APOYO RECIBIDO DE LAS SIGUIENTES INSTITUCIONES:**

- DIVISION DE BIOQUIMICA Y FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA VEGETAL

- COLEGIO DE POSGRADUADOS  
CONVENIO DE COLABORACION UNAM-CP

- CONACyT  
BECA: 050841

- PADEP  
PROYECTO: " EL PAPEL DE LA RUBISCO ACTIVASA EN LA REGULACION  
DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO "

Este trabajo fué realizado en las instalaciones del Departamento de Bioquímica Vegetal de la Facultad de Química de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Estela Sánchez de Jiménez y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica) por el siguiente jurado:

<b>Presidente:</b>	<b>Dr. Jorge Vázquez.</b>
<b>Primer Vocal:</b>	<b>Dr. Miguel Lara.</b>
<b>Segundo Vocal:</b>	<b>Dr. Guillermo Mendoza.</b>
<b>Tercer Vocal:</b>	<b>Dr. Rolando Hernández.</b>
<b>Secretario:</b>	<b>Dra. Rosario Muñoz.</b>
<b>Primer Suplente:</b>	<b>Dra. Herminia Loza.</b>
<b>Segundo Suplente:</b>	<b>Dra. Adriana Ortíz.</b>

## INDICE DE ABREVIATURAS.

BTP	Bis tris propano.
CA1P	2 carboxiarabinitol 1-P.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
DTNB	5,5' - ditiobis - (ácido 2 nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Etilendiamino tetraacetato.
LS	Subunidad grande de la Rubisco.
LSbp	Proteína de unión a la subunidad grande de la Rubisco.
pb	Pares de bases.
PEG	Poli etilenglicol.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil.
PVP	Polivinilpirrolidona.
rbcSS	Mensaje de la subunidad pequeña de la Rubisco.
Rubisco	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa.
RuBP	Ribulosa-1,5-P.
SS	Subunidad pequeña de la Rubisco.

# INDICE

	página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
II.1. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO	3
II.2. ACTIVACION DE RUBISCO E INHIBICION POR METABOLIOS FOSFORILADOS	4
II.3. RUBISCO ACTIVASA	5
II.3.1. GENERALIDADES	5
II.3.2. CARACTERISTICAS DE LA RUBISCO ACTIVASA	6
II.3.3. REGULACION DE LA EXPRESION DE RUBISCO ACTIVASA	6
II.4. RESPUESTA DE LAS PLANTAS A ELEVADAS	7
II.5. CHAPERONAS MOLECULARES	8
<b>III. HIPOTESIS</b>	<b>10</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<b>V. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>12</b>
V.1. MATERIAL BIOLÓGICO	12
V.2. PURIFICACION DE RUBISCO ACTIVASA	12
V.3. PURIFICACION DE RUBISCO	14
V.4. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE RUBISCO	14
V.5. ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR	14
V.6. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE RUBISCO ACTIVASA	15
V.6.1. ACTIVIDAD DE ATPasa	15
V.6.2. ACTIVIDAD DE ACTIVASA	15
V.7. PREPARACION DE ANTICUERPOS CONTRA RUBISCO ACTIVASA	15
V.8. WESTERN-BLOT	16
V.9. INACTIVACION Y REACTIVACION DE RUBISCO	16
V.10. INMUNOPRECIPITACION	16
V.11. AGOBIO POR TEMPERATURA	17
V.12. AISLAMIENTO DE ADN	17
V.13. AISLAMIENTO DE ARN	17
V.14. GELES DE AGAROSA	18
V.15. TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS A MEMBRANAS	18
V.16. MARCADO DE LA SONDA E HIBRIDACION EN LAS MEMBRANAS	18
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>19</b>
VI.1. ARTICULO 1: <i>"Regulation of Rubisco during grain fill: possible role of Rubisco activase"</i>	19
VI.2. ARTICULO 2: <i>"Rubisco activase, possible new member of the molecular chaperone family"</i>	35
VI.3. EL PAPEL DE LA RUBISCO ACTIVASA EN LA REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO	53
VI.4. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DE LA RUBISCO ACTIVASA	53
VI.5. REGULACION DE LA EXPRESION DE LA RUBISCO ACTIVASA	57
VI.6. LA RUBISCO ACTIVASA COMO CHAPERONA MOLECULAR	68

<b>VII. DISCUSION</b>	<b>83</b>
<b>VII.1. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO     POR RUBISCO ACTIVASA</b>	<b>83</b>
<b>VII.2. LA RUBISCO ACTIVASA COMO UNA     CHAPERONA MOLECULAR</b>	<b>85</b>
<b>VII.3. FACTORES QUE CONTROLAN LA EXPRESION     DE LA RUBISCO ACTIVASA</b>	<b>86</b>
<b>VII.4. MODELO DE FUNCIONAMIENTO DE LA RUBISCO ACTIVASA</b>	<b>87</b>
<b>VII.5. LA RUBISCO ACTIVASA COMO MARCADOR DE LA     PRODUCTIVIDAD EN MAIZ</b>	<b>88</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>89</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>90</b>



## **"EL PAPEL DE LA RUBISCO ACTIVASA EN LA REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO"**

### **R E S U M E N .**

La actividad carboxilasa de la Ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) está fuertemente regulada por una gran cantidad de factores. Resultados obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio mostraron que durante el período de llenado del grano en maíz, la actividad específica de la enzima, cambia significativamente, sin que ello esté asociado a cambios en la concentración de la enzima o a la presencia de compuestos activadores y/o inhibidores de la actividad.

En este trabajo se muestra que los cambios en la actividad de Rubisco observados durante el período de llenado del grano tienen una buena correlación con los cambios que durante esa etapa se observan en la concentración de Rubisco activasa, y se presentan resultados experimentales enfocados a esclarecer el mecanismo a través del cual, la Rubisco activasa puede regular la actividad de la Rubisco.

Los resultados obtenidos demuestran que la Rubisco activasa comparte una serie de características que distinguen a un grupo de proteínas denominadas chaperonas moleculares: a) forma complejos de alto peso molecular, b) tiene actividad de ATPasa, c) su concentración celular se incrementa por altas temperaturas (44°C), d) forma complejos con Rubisco parcialmente desnaturada los cuales se rompen cuando hay ATP en el medio y sobre todo e) induce una recuperación muy significativa de la actividad que la Rubisco pierde como consecuencia de un tratamiento de desnaturación por calor en ausencia de iones.

Otra parte importante de este trabajo es el estudio de los elementos que regulan la expresión de la Rubisco activasa. Se observó que el desarrollo y factores ambientales (temperatura) son dos aspectos fundamentales en este proceso y que el efecto que la Rubisco activasa tiene sobre la actividad de la Rubisco, podría estar asociado a ciertos cambios estructurales de la Rubisco sufre durante el desarrollo de las plantas.

Este trabajo también incluye los resultados de la comparación que durante el período de llenado del grano se realizó en dos poblaciones de maíz genéticamente relacionadas pero con diferencias importantes en su rendimiento de grano ( $Z_0$  y  $Z_{20}$ ). El hecho de que en la población mejorada ( $Z_{20}$ ) se haya observado mayor actividad de Rubisco y también cantidades superiores de Rubisco activasa, hace pensar que la Rubisco activasa podría tener un papel importante en el incremento en la producción de grano que esta variedad ha experimentado como resultado del programa de mejoramiento a que se ha sometido.

Todos estos resultados llevan a proponer que la Rubisco activasa puede incrementar la actividad de Rubisco gracias a la capacidad que tiene para actuar como chaperona molecular y facilitar cambios estructurales que hacen a la Rubisco más eficiente, lo cual podría ser particularmente relevante durante el período de llenado del grano.

## **"THE ROLE OF RUBISCO ACTIVASE IN THE REGULATION OF RUBISCO ACTIVITY"**

### **A B S T R A C T .**

The carboxylase activity of Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) is highly regulated by several factors. Results from our laboratory have shown that during the grain filling period of maize, the specific activity of this enzyme changed significantly, and that these changes are not associated to the enzyme concentration or to the presence of inhibitors or activators compounds.

This work shows that the changes observed in Rubisco activity during the grain filling period are correlated with Rubisco activase concentration and also shown data that might explains how Rubisco activase regulates Rubisco activity.

The results show that Rubisco activase shares some similar characteristics than a group of proteins called molecular chaperones: a) forms high molecular weight complexes, b) has an ATPase activity, c) it accumulates in leaves by high temperatures (44°C), d) forms complexes with partially denatured Rubisco and is realized from them by effect of ATP and e) induces significant restoration of Rubisco activity lost by heat treatment in the absence of ions.

Other important part of this work is the analysis of the elements that are involved in the regulation of Rubisco activase expression. We observed that the stage of development and environmental factors (i.e. temperature) are two important elements that are involved in Rubisco activase expression. These results also suggest that the effect of Rubisco activase on Rubisco activity during plant development might be associated with structural changes in Rubisco protein.

Finally, we compared Rubisco activity during the grain filling period of two related maize populations ( $Z_0$  and  $Z_{20}$ ) that have differences in grain yield. In the improved population ( $Z_{20}$ ) we observed high Rubisco activity and high Rubisco activase concentration. This suggest that Rubisco activase might have an important role in grain yield increment of  $Z_{20}$  population.

All these results suggest that Rubisco activase is a molecular chaperone that is able to increase Rubisco activity due to fact that it facilitates structural changes on Rubisco that increases Rubisco efficiency, this might be particularly relevant during the grain filling period.

## I. INTRODUCCION.

La fotosíntesis es un proceso que determina que la vida sobre el planeta sea tal y como la conocemos; gracias a él, los organismos que la realizan transforman la energía luminosa en energía química que es la que los otros seres vivos pueden aprovechar.

Dentro de la fotosíntesis la fijación del CO<sub>2</sub> es un componente muy importante. Básicamente consiste en incorporar el CO<sub>2</sub> ambiental a una molécula de RuBP para su posterior reducción. Esta reacción es llevada a cabo por la Ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco, E.C. 4.1.1.39).

La fotosíntesis en general y la fijación de CO<sub>2</sub> en particular son procesos íntimamente ligados a la productividad de las plantas. Por esta razón se hacen grandes esfuerzos tanto para entender su regulación como para explorar las posibilidades de hacerlos más eficientes. Sobre el particular se ha logrado establecer una serie de conocimientos que de manera muy general pueden resumirse en lo siguiente:

En primer lugar, la Rubisco es un complejo proteico de 550 kDa compuesto por ocho subunidades grandes y ocho pequeñas. Las primeras están codificadas en el genoma cloroplástico y allí mismo se sintetizan. Las segundas están codificadas en el genoma nuclear y se sintetizan en el citoplasma como precursores que después se traslocan al interior del cloroplasto (Jensen y Bahr, 1977). El ensamblaje de las mismas es mediado por una chaperona molecular (L.Sbp) la cual interacciona con la subunidad grande y la ayuda a adquirir una conformación que facilita la unión con la subunidad pequeña (Roy, 1989).

Para poder llevar a cabo la fijación del CO<sub>2</sub> la Rubisco debe ser activada, lo cual se logra mediante la incorporación de una molécula de CO<sub>2</sub> y otra de Mg<sup>+2</sup> por cada subunidad grande en un sitio diferente al catalítico (Lorimer, 1981). Esto le origina un cambio conformacional (Bowien y Gottschalk, 1992) que la deja lista para llevar a cabo el proceso catalítico.

Otro punto que es importante en la regulación de la actividad de la Rubisco es la disponibilidad de CO<sub>2</sub>. Sobre el particular, las estimaciones de las concentraciones de CO<sub>2</sub> en el interior del cloroplasto por sí solas no explican los altos niveles de activación que la Rubisco puede alcanzar en condiciones normales (Portis, 1990). Este no es el único problema, pues *in vitro* se ha observado que diferentes azúcares fosfatados como la RuBP (que es al mismo tiempo sustrato de la enzima) y el CA1P, son fuertes inhibidores del proceso de activación (Jordan y Chollet, 1983; Gutteridge *et al.*, 1986).

Independientemente de la importancia que la inhibición por RuBP pudiera tener en la regulación de la actividad de la Rubisco, en condiciones fisiológicas, parece obligada la existencia de algún elemento que facilite el proceso de activación.

Recientemente se ha propuesto a la Rubisco activasa como una enzima la cual, a través de un mecanismo todavía no bien entendido, ayuda a eliminar inhibidores (en particular RuBP) y de esta manera favorece el proceso de activación (Robinson *et al.*, 1988). A pesar de que este planteamiento ha sido apoyado con bastantes resultados experimentales, algunas características observadas en la Rubisco activasa hacen pensar que la eliminación de RuBP del complejo Rubisco-RuBP por la Rubisco activasa se lleva a cabo por un mecanismo conceptualmente diferente al propuesto.

Se debe considerar que otro nivel de regulación es el derivado de la necesidad que tienen las plantas para adecuar su metabolismo a los cambios que sufren como consecuencia de su desarrollo y/o de las variaciones en el ambiente. Un buen ejemplo para ilustrar lo anterior lo constituye la Rubisco: esta proteína tiene un recambio lento lo cual implica una exposición prolongada a factores ambientales adversos que a su vez pueden promover una serie de reacciones bioquímicas que la modifican postraduccionalmente (Crafts-Brandner *et al.*, 1991; Weidner y Fehling, 1985; Mehta *et al.*, 1992; Ferreira y Davies, 1989). Es importante mencionar que tanto la activación de la Rubisco como la catálisis que lleva a cabo son procesos mediados por cambios conformacionales y es de esperarse que ambas actividades se vean alteradas como resultado de modificaciones que afecten la estructura de la enzima.

Por otra parte, resultados obtenidos en nuestro laboratorio al medir la actividad de la Rubisco *in vitro* de extractos de la hoja superior a la mazorca durante el período de llenado del grano en maíz mostraron que la actividad de esta enzima puede incrementarse considerablemente en respuesta a ciertas situaciones fisiológicas sin que para ello se requiera la síntesis de más enzima.

Esto indica que a lo largo de la vida de una planta las características de la Rubisco no son siempre las mismas y que puede existir al menos en dos formas: una más activa que la otra. Tomando en cuenta la información anterior y las evidencias experimentales disponibles, consideramos que los cambios que presenta la actividad de la Rubisco durante el período de llenado del grano constituyen un buen modelo experimental para investigar el mecanismo de acción de la Rubisco activasa.

## II. ANTECEDENTES.

### II.1. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO.

Las plantas tienen que establecer un equilibrio muy delicado entre los diferentes procesos de su metabolismo y adecuarlo a situaciones muy particulares derivadas de alteraciones estructurales y funcionales inducidas por el desarrollo o por cambios en el ambiente. El proceso de fijación del CO<sub>2</sub> que lleva a cabo la Rubisco es un buen ejemplo de lo anterior: la Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco E.C. 4.1.1.39) es una enzima bifuncional que puede catalizar tanto la primer reacción de la fijación fotosintética del CO<sub>2</sub> como de la fotorespiración (Lorimer, 1981). La Rubisco de plantas superiores, algas y de muchas bacterias fotosintéticas es en realidad un complejo protéico formado por ocho subunidades pequeñas (SS) y ocho grandes (LS), pero también hay ejemplos de algunas bacterias fotosintéticas cuya Rubisco está constituida por sólo cuatro subunidades grandes (Jensen y Bahr, 1977). Las SS están codificadas por una pequeña familia de genes nucleares y se sintetizan en el citoplasma como precursores que después se trasladan al interior del cloroplasto; las subunidades grandes están codificadas en el genoma cloroplástico (Jensen y Bahr, 1977). El ensamblaje de ambas subunidades que finalmente da origen a la enzima funcional está mediado por una chaperona molecular denominada proteína de unión a la subunidad grande (LSbp) la cual se une transitoriamente a estas subunidades grandes y facilita su posterior interacción con las subunidades pequeñas (Roy, 1989).

Dentro de la gran cantidad de factores ambientales que regulan a la Rubisco, se encuentra la luz. En cotiledones de *Amaranthus hypochondriacus* se observó que poco tiempo después (4h) de que estos son pasados de oscuridad a luz hay un incremento muy importante en la síntesis de los dos tipos de subunidades que forman a la enzima, a tiempos mayores (12h) se observó que los niveles de los mensajeros que codifican para ambas subunidades también se incrementan (Berry *et al.*, 1986).

Cuando se hizo el experimento contrario y los cotiledones de *Amaranthus* se pasaron de luz a oscuridad, se observó que durante las primeras 4h las cantidades de la LS y SS disminuyeron 10 y 20 veces más respectivamente que el resto de las proteínas (Berry *et al.*, 1988). También se observó que la disminución en la cantidad de proteína está asociada a un incremento importante en la cantidad de los ARNm funcionales que codifican para ambas proteínas los cuales se asocian a polisomas pero no se traducen (Berry *et al.*, 1988).

La calidad de la luz es también un elemento muy importante en la regulación de la Rubisco. Se ha demostrado que en los genes que codifican la SS antes del inicio de la transcripción existe una región menor a 500 pb la cual responde a señales que se traducen por el mecanismo de fitocromo y que son responsables de estimular la transcripción (Kuhlemier *et al.*, 1987) y en *Chlorogonium* se ha demostrado que la luz azul induce fuertemente el aumento tanto de la cantidad de los ARNm que codifican las dos subunidades como de los respectivos polipéptidos (Roscher y Zetsche, 1986).

También se ha establecido que el estado metabólico puede inducir modificaciones importantes en la estructura de la Rubisco: en soya cuando se eliminan los frutos, la Rubisco modifica sus características y como consecuencia, una fracción importante de la enzima se pega a las membranas; en estas condiciones la actividad disminuye significativamente (Crafts-Brandner *et al.*, 1991). Algo importante es que la proporción de Rubisco que se une a las membranas puede variar mucho de un cultivar a otro, en algunos es aproximadamente el 30% mientras que en otros llega al 99% (Crafts-Brandner *et al.*, 1991).

Por otro lado, se ha observado que cambios drásticos en el ambiente pueden repercutir sobre las características de la Rubisco. De manera general puede afirmarse que la magnitud así como la naturaleza de las alteraciones depende tanto del ambiente como de las condiciones fisiológicas y de la especie de que se trate. En trigo por ejemplo, se ha observado que el aumento en la temperatura (36°C) produce cambios conformacionales que dan como resultado una forma de Rubisco mucho más hidrofílica que la nativa (Weidner y Fehling, 1985).

La Rubisco de plantas superiores (*Triticum aestivum* L. y *Spirodela oligorrhiza*) al igual que la de algas (*Chlamydomonas reinhardtii* y *C. moewussii*) es altamente sensible a agentes oxidantes, lo cual da como resultado la formación de puentes disulfuro entre subunidades grandes con la consecuente pérdida de la actividad enzimática (Mehta *et al.*, 1992). Es probable que un mecanismo parecido sea el que opera durante la senectud de las hojas en donde, se ha observado que las condiciones en el interior del cloroplasto se vuelven más oxidantes (Mehta *et al.*, 1992).

No siempre se ha podido establecer cual es el mecanismo implicado en la alteración de las propiedades de la Rubisco. Sin embargo, se ha observado que en respuesta al agobio osmótico se induce un sistema de oxidación responsable de disminuir la cantidad de grupos -SH expuestos; como resultado se modifican las características estructurales y la enzima adquiere una forma más ácida (Ferreira y Davies, 1989). El sistema de oxidación responsable de tales modificaciones también puede ser inducido por oscuridad y bajas concentraciones de CO<sub>2</sub> (Ferreira y Davies, 1989).

Como puede observarse, la actividad de la Rubisco es controlada a diferentes niveles y la importancia de los mismos varía dependiendo de la especie y de los cambios que se producen durante el desarrollo. Para el caso particular de maíz, se sabe que durante el crecimiento de las plántulas la actividad se regula fundamentalmente por la velocidad de síntesis (Loza-Tavera *et al.*, 1990; Loza-Tavera, 1992), mientras que en etapas posteriores pueden observarse cambios que modifican la actividad de la enzima ya sintetizada (Martínez-Barajas, 1989).

## II.2. ACTIVACION DE RUBISCO E INHIBICION POR METABOLITOS FOSFORILADOS.

Para llevar a cabo la catálisis (carboxilación y oxigenación), la enzima debe ser activada. La activación de la Rubisco consiste en la unión lenta y reversible de CO<sub>2</sub> y Mg<sup>2+</sup> (Lorimer, 1981), e involucra cambios conformacionales muy importantes (Bowling y Gottschalk, 1992). El paso limitante de este proceso es la unión de una molécula de CO<sub>2</sub> en el residuo Lys-201 de la subunidad grande, esto es seguido por la rápida unión del metal; la activación total implica la formación de este complejo ternario en cada una de las subunidades grandes, de tal manera que la actividad observada es proporcional al grado de activación (Jordan y Chollet, 1983).

El CO<sub>2</sub> de activación está continuamente intercambiándose y el recambio ocurre a una tasa mayor en luz. Sin embargo, la constante observada para la activación y el intercambio es similar (Belknap y Portis, 1986). La Rubisco tiene una *Kactivación* (CO<sub>2</sub>) de 25-30 μM, aproximadamente tres veces mayor que la concentración que se ha estimado en el interior del cloroplasto de plantas tipo C3 (10 μM), de tal manera, que al menos en esas especies es difícil de explicar los altos niveles de activación observados *in vivo* a altas intensidades luminosas (Portis *et al.*, 1986).

En un experimento consistente en activar Rubisco previamente inactivada con RuBP (después de haber sido desionizada para eliminar CO<sub>2</sub> y Mg<sup>2+</sup> se incubó en una solución con 1 mM de RuBP), se observó que la unión del CO<sub>2</sub> de activación disminuyó en 95 % (Jordan y Chollet, 1983). La unión de RuBP a Rubisco hace que la enzima modifique su estructura. Sin embargo, no es igualmente efectiva en todas las especies (Jordan y Chollet, 1983); en general se ha observado que la Rubisco de plantas superiores es inhibida por RuBP como consecuencia de la incapacidad del complejo E-RuBP para ser activado por CO<sub>2</sub> y Mg<sup>2+</sup>. Por su parte, la Rubisco de microorganismos que está compuesta por un solo tipo de subunidades casi no es inhibida por la RuBP (Jordan y Chollet, 1983).

La inhibición por RuBP de la Rubisco de espinaca alcanza 50 % con concentraciones de 0.4 mM de RuBP, mientras que con la enzima de *Rhodospirillum rubrum* se requiere de 67 a 270 mM para lograr el mismo efecto. Estas diferencias pueden explicarse en términos de la *Kd* y la vida media de los complejos formados: la *Kd* para el complejo resultante entre la Rubisco de *R. rubrum* y la RuBP es de 5.9 mM; la misma constante cuando se utiliza Rubisco de espinaca tiene

un valor de 0.021 mM (Jordan y Chollet, 1983). Además, la vida media del complejo RuBP-Rubisco de espinaca es de 240 min mientras que el complejo formado con la enzima de *R. rubrum* es de sólo 2 min (Jordan y Chollet, 1983).

Dadas las características de la interacción entre la Rubisco y la RuBP se ha propuesto a este fenómeno como la causa de los bajos niveles de activación que en ciertas condiciones se observan *in vivo*; de hecho, hay información que sugiere una buena correlación entre la cantidad de RuBP unida a Rubisco y la cantidad de sitios activos remanentes (Brooks y Portis, 1988). Esta información ha permitido elaborar un modelo de acuerdo con el cual la Rubisco activasa es una enzima que puede romper los complejos Rubisco-RuBP en un proceso que requiere ATP (Robinson *et al.*, 1988).

La inhibición de la actividad de Rubisco por RuBP es el ejemplo mejor estudiado. Sin embargo, existen otros metabolitos que pueden también ejercer un efecto similar. En 1986 se reportó que el 2 carboxiarabinitol 1-P (CA1P) podía inhibir la actividad de Rubisco (Gutteridge *et al.*, 1986). El CA1P es un compuesto que se sintetiza durante la noche (Gutteridge *et al.*, 1986), y cuando las plantas reciben una cantidad de luz suficiente (día), se estimula la actividad de una fosfatasa que lo inactiva y revierte su efecto (Seemann *et al.*, 1990). La regulación de la actividad de la Rubisco por CA1P es muy importante en plantas tipo C3 (Seemann *et al.*, 1990). Se ha encontrado que las plantas tipo C4 (incluido maíz) también pueden acumular CA1P (Moore *et al.*, 1991); sin embargo, el efecto que este compuesto tiene sobre la actividad de Rubisco en maíz es poco importante (Sage y Seemann, 1993).

## II.3. RUBISCO-ACTIVASA.

### II.3.1. GENERALIDADES.

En 1982 se encontró una mutante de *Arabidopsis* que para crecer requería elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub>. La Rubisco purificada de dicha mutante exhibió las mismas propiedades que la enzima extraída de plantas normales; el resto de las enzimas que participan en el ciclo de Calvin tampoco mostró daños. Este carácter segregó en proporción 3:1, lo cual se interpretó como una característica controlada por un solo gen nuclear (Somerville *et al.*, 1982). Los experimentos siguientes demostraron que junto con la mutación, había fallas en el proceso de activación de la Rubisco; por esta razón, la mutación se denominó *rca* (Activasa de la Ribulosa Bifosfato Carboxilasa). Sin embargo, esto no descartaba el que junto con la mutación también hubiese deficiencias en alguna otra proteína(s) que a su vez influyera en los niveles de diversos metabolitos que *in vitro* se han manifestado como reguladores importantes de la actividad de la Rubisco (Somerville *et al.*, 1982). En trabajos posteriores se demostró que en los cloroplastos de plantas de *Arabidopsis* junto con la mutación *rca* se observa la ausencia de dos proteínas con masas moleculares correspondientes a 47 y 50 kDa (Salvucci *et al.*, 1985).

La falta de estas proteínas no permitía que la Rubisco se activara cuando las plantas se pasaban de oscuridad a luz (Salvucci *et al.*, 1985), esto fue superado cuando los extractos de plantas mutantes se complementaron con una fracción desprovista de Rubisco que se obtuvo de plantas normales de *Arabidopsis* o de espinaca. Sin embargo, el papel de la luz para llevar a cabo la activación de la Rubisco mediada por el producto *rca* era algo que seguía sin entenderse (Salvucci *et al.*, 1985).

Poco después se propuso que el producto *rca* podría ser responsable de los cambios de activación que la Rubisco experimentaba por efecto de la luz, de la misma manera en que otras enzimas que participan en el ciclo de Calvin son activadas por el sistema ferredoxina-tiorredoxina (Salvucci *et al.*, 1987). En un análisis más detallado, se estableció que la activación de la Rubisco mediada por *rca* era dependiente de ATP y que el ADP actuaba como un fuerte inhibidor del proceso (Streusand y Portis, 1987).

### II.3.2. CARACTERISTICAS DE LA RUBISCO-ACTIVASA.

La Rubisco-activasa es una enzima cloroplástica que en muchas especies está constituida por dos polipéptidos de pesos moleculares aproximados a 41 y 43 kDa respectivamente (en la literatura existen discrepancias en cuanto a la exactitud de estos valores), sin embargo, la proporción de cada uno cambia dependiendo de la especie (Salvucci *et al.*, 1987). La Rubisco activasa purificada de espinaca forma complejos de masa molecular aproximada a 200 kDa (Salvucci *et al.*, 1987). En otros reportes se ha informado que los complejos pueden alcanzar 250 kDa y que probablemente estén formados por hexámeros, sin embargo, se desconoce si están constituidos sólo por un tipo o son mezclas de las dos subunidades (Werneke *et al.*, 1989).

Esta enzima es capaz de realizar dos actividades: la hidrólisis de ATP y la activación de Rubisco que ha sido inhibida por RuBP, la cual a su vez, es dependiente de hidrólisis de ATP (Robinson y Portis, 1989a).

En lo que a hidrólisis de ATP se refiere, la enzima purificada de espinaca puede hidrolizar de 1.0 -1.5 mmol de ATP/min/mg de proteína. El pH óptimo es de 8.0 a 8.5 y puede ser inhibida por *p*-hidroximercurio benzoato. La actividad de ATPasa al igual que la capacidad para activar los complejos Rubisco-RuBP es estrictamente dependiente de ATP, es decir, no puede utilizar otros nucleótidos y es fuertemente inhibida por ADP; además, tiene un alto requerimiento de Mg<sup>2+</sup> que puede ser parcialmente sustituido por otros cationes divalentes (Robinson y Portis, 1989b). La actividad de ATPasa es una propiedad intrínseca y puede ser necesaria para la activación de los complejos Rubisco-RuBP; sin embargo, la hidrólisis es más rápida que la activación (Robinson y Portis, 1989b).

Por otro lado, la incubación de la enzima a 43 °C por 5 min inhibe por completo a las dos actividades; mientras que a 38 °C se observa una disminución de 50 % en ambos casos; el ATP tiene un papel importante pues hace que la enzima sea más estable. Esto se aprecia con claridad cuando la enzima se incuba a temperaturas mayores a 25 °C; la estabilización puede ser parcialmente lograda con ADP (Robinson y Portis, 1989b).

### II.3.3. REGULACION DE LA EXPRESION DE RUBISCO ACTIVASA.

Tanto en espinaca como en *Arabidopsis* se ha encontrado un solo gen nuclear que codifica para Rubisco activasa (*rca*) (Werneke *et al.*, 1988b). Inicialmente se observó que la traducción *in vitro* del poli(A)<sup>+</sup>, producía una proteína de 51 kDa y se pensó que este polipéptido en realidad era un precursor que al momento de pasar al interior del cloroplasto se cortaba para dar origen a los polipéptidos de 41 y 45 kDa (Werneke *et al.*, 1988b). De igual manera se observó que la proporción de ambos polipéptidos puede cambiar de una especie a otra, pero en cada una, es constante durante todo el ciclo de vida (Werneke *et al.*, 1988b).

Un análisis más detallado reveló que el gen *rca* de espinaca consta de seis intrones y un intrón auxiliar que precede al último intrón verdadero, de tal manera que a causa de un procesamiento alternativo pueden generarse dos tipos de mRNA. El mecanismo que se ha sugerido es el siguiente: si en el procesamiento se utiliza el segundo extremo 5' (y no se elimina el intrón auxiliar), una región de 22 bases para espinaca y 11 para *Arabidopsis* es retenida, lo cual da origen a un codón de terminación y cuando el mensaje se traduce, la proteína resultante tiene un peso de 44 kDa; en cambio, si se usa el primer extremo 5', el intrón auxiliar es eliminado y el mensaje que se produce contiene la información para 37 aminoácidos más lo que genera un polipéptido con un peso molecular final de 47 kDa (Werneke *et al.*, 1988b). Esta información pudo confirmarse a través del análisis de la composición de los extremos de las proteínas resultantes: el amino terminal para los dos péptidos fue igual, mientras que el carboxilo resultó diferente (Werneke *et al.*, 1988b).

En un análisis posterior se encontró que el gen tiene dos regiones (163-170 y 218-227) de fuerte homología con dominios que unen nucleótidos (Werneke *et al.*, 1988b).



Sin embargo, esta forma de organización y expresión de la información para *rca* parece no ser la única, pues recientemente se ha informado que en cebada existe un sistema más complejo. De acuerdo con él, en un segmento de ADN de 8,8 kb se encuentran dos genes para *rca* con 87 % de identidad entre ambos. El primero, denominado *rca A* es procesado alternativamente y puede generar dos especies de mRNA (*rca A1* y *A2*). El mensaje *rca A2* tiene una inserción de 50 pb la cual origina un codón de terminación y por esta razón, el polipéptido resultante es de 42 kDa, mientras tanto, el polipéptido codificado por el mRNA *rca A1* pesa 46 kDa. El mensaje *rca B* tiene una organización muy diferente: sólo posee un intrón de 2.22 kb y un producto proteico de 42.7 kDa. Cuando se utilizaron sondas específicas para ambos genes, se estableció que el mensaje de *rca A* es 100 veces más abundante que el de *rca B*. Además, los mensajes de *rca A1* y *A2* se acumulan de manera diferente: *rca A2* es más abundante que *rca A1*. Sin embargo después de la traducción la relación entre los productos proteicos codificados por *rca A1*: *rca A2* + *rca B* es aproximadamente 1:2; lo cual implica un fuerte control traduccional o bien diferencias importantes en la estabilidad de los productos proteicos (Rundle y Zielinski, 1991).

Es muy probable que en otras especies se encuentren complicaciones mayores, pues recientemente se ha informado que en tabaco hay 7 genes que codifican para Rubisco activasa (Snyder y Ogren, 1993).

En lo que se refiere a la proteína, cuando en geles desnaturalizantes se analiza un extracto crudo de espinaca, se observan dos bandas de aproximadamente 47 y 43 kDa cada una. En el extracto crudo la intensidad de ambas bandas suele ser similar; sin embargo, con frecuencia la banda más pesada es menos intensa, algo similar sucede en frijol, cilantro y *Arabidopsis*. Otras especies como es el caso de soya, chícharo, avena y cebada, se caracterizan por tener gran abundancia relativa de la banda de 43 kDa, en tanto maíz y tabaco presentan prácticamente sólo la banda de 43 kDa (Salvucci *et al.*, 1987).

En *Chlamydomonas rca* se expresa como una sola banda de 41 kDa y tiene una identidad de 60 a 65 % con la *rca* de espinaca. Este valor podría parecer bajo, sin embargo, se distinguen cuatro regiones con una identidad superior al 90 %, las cuales probablemente constituyen dominios funcionales importantes (Roesler y Ogren, 1990). Interesantemente se ha observado que la Rubisco activasa de espinaca puede activar eficientemente a la Rubisco de *Chlamydomonas*, pero lo contrario no sucede (Roesler y Ogren, 1990).

La expresión de *rca* es dependiente del tejido, la edad fisiológica y las condiciones ambientales: en cebada se expresa sólo en las hojas, el mensaje y la proteína se acumulan con una tendencia similar a la mostrada por la Rubisco, lo cual sugiere que durante el desarrollo, se mantiene la estequiometría entre ambas enzimas; por otro lado, la acumulación del mensaje para Rubisco activasa es dependiente de la luz (Zielinski *et al.*, 1989).

En *Atriplex* se analizaron plantas con metabolismo C3 y C4 y se encontró que la distribución del mensaje para *rca* es similar a la observada en el mensaje de *rbcsS*; interesantemente pudo constatarse que en la vaina del haz vascular de las plantas C4, no obstante las altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, hay también altas cantidades de mensaje para *rca* (Hudson *et al.*, 1992), desafortunadamente no se midieron las cantidades de la proteína correspondiente.

#### II.4. RESPUESTA DE LAS PLANTAS A LAS TEMPERATURAS ELEVADAS.

Las plantas que crecen en el campo están sujetas a condiciones ambientales cambiantes y en muchos casos adversas: sequía, exceso de agua, temperaturas extremas, exceso de sales, metales pesados, altas intensidades luminosas e infecciones de patógenos son solo algunas de las más comunes (Ho y Sachs, 1989).

A diferencia de los animales, las plantas no pueden moverse para escapar del ambiente por lo que la capacidad de sobrevivencia muchas veces depende de la capacidad que tengan para reordenar su programa genético y hacer los ajustes estructurales y metabólicos necesarios (Ho y Sachs, 1989).

El impacto que las temperaturas elevadas tienen sobre el metabolismo de las plantas es uno de los aspectos que mayor atención han recibido; de manera muy general, sus efectos puede dividirse en tres puntos: a) desnaturalización de proteínas que deben ser eliminadas y reemplazadas, b) alteraciones metabólicas que causan la acumulación o la disminución de ciertos metabolitos y c) cambios en las propiedades de las membranas (Ho y Sachs, 1989).

Cuando los organismos se someten a temperaturas 5-10°C por arriba de la temperatura normal para su crecimiento se induce la síntesis de un grupo particular de proteínas (que normalmente no se encuentran o que existen en concentraciones muy bajas), mientras que las proteínas normalmente producidas dejan de sintetizarse (Brodl, 1989). La respuesta es limitada y transitoria, es decir la capacidad que tienen las plantas para observar estos cambios se pierde después de algunas horas y tan pronto como deja de percibirse el estímulo, se regresa al patrón original de síntesis de proteínas (Ho y Sachs, 1989).

En el laboratorio las mejores condiciones para inducir la síntesis de estas proteínas es el incremento brusco a 39 - 42 °C, sin embargo no es un requisito indispensable, pues incrementos graduales (2.5 °C/h) producen un efecto similar (Ho y Sachs, 1989).

Las proteínas inducidas se clasifican en tres grupos en base a su masa molecular: 1) 68 - 104 kDa, este grupo incluye a proteínas que son comunes a todos los organismos estudiados, 2) 20 - 33 kDa y 3) 15 - 18 kDa, las proteínas de estos dos últimos grupos son exclusivas de plantas superiores (Ho y Sachs, 1989). Sin embargo, se ha observado que la respuesta puede variar de un tejido a otro: en las plúmulas de maíz se induce la síntesis de proteínas de 108, 89, 84, 76, 73, 23 y 18 kDa y puede haber notables diferencias entre variedades (Rees *et al.*, 1986).

Como puede observarse, la respuesta a temperaturas elevadas involucra cambios importantes en el patrón de síntesis de proteínas: mientras que algunas dejan de sintetizarse, hay un grupo de mensajes específicos que se traducen preferencialmente (Brodl, 1989).

En muchas plantas el principal punto de control de este proceso es a nivel transcripcional (Brodl, 1989). Sin embargo, esto no constituye una regla; se ha observado que en los cultivos de zanahoria el mecanismo involucrado depende de las características de las células: en callos se observa un fuerte estímulo de la transcripción mientras que en etapas embrionarias la traducción de los mensajes es mucho más eficiente (Apuya y Zimmerman, 1992).

No se sabe mucho acerca de la función de las proteínas inducidas, pero el hecho de que su síntesis sea una respuesta altamente conservada a lo largo de toda la escala evolutiva hace pensar que tienen una función importante en la termotolerancia que exhiben algunos organismos (Brodl, 1989).

## II.5. CHAPERONAS MOLECULARES.

En 1973 Anfinsen informó sobre la capacidad que tiene la ribonucleasa para renaturalizarse *in vitro*. Como consecuencia, se estableció una hipótesis que postula que la secuencia de aminoácidos contiene la información necesaria para que las proteínas se estructuren y por sí solas alcancen la conformación funcional. Esto probablemente se cumpla con proteínas pequeñas, sin embargo, cuando las proteínas son más complejas, la(s) estructura(s) funcional(es) es solo una de las muchas que puede adoptar una cadena de péptidos, de tal manera que también pueden producirse estructuras no funcionales. Recientemente han aparecido reportes en donde se señala que la estructuración y el ensamblaje de algunas proteínas se realiza con ayuda de un grupo muy particular de proteínas a las cuales se ha denominado chaperonas moleculares (Ellis y van der Vies, 1991).

El nombre de chaperonas moleculares fue propuesto por Laskey en 1978. Es una definición funcional que se aplica a un grupo muy heterogéneo de proteínas que tienen la capacidad de unirse temporalmente a proteínas parcialmente estructuradas, y evitan que se formen otras estructuras que pueden ser energéticamente más favorables, pero que carecen de actividad biológica (Ellis y van der Vies, 1991). La temporalidad de la interacción que establecen las chaperonas moleculares radica en que no forman parte de la estructura funcional de las proteínas a las cuales se unen (Ellis y van der Vies, 1991).

Las chaperonas moleculares se encuentran en todos los seres vivos y se ha observado que participan en procesos en donde es necesario que las proteínas adquieran o recuperen la estructura funcional: durante la síntesis y el transporte de proteínas, en la formación de complejos, en la biogénesis de organelos y en la tolerancia y/o recuperación de los daños causados por diferentes tipos de estrés entre otros (Ellis y van der Vies, 1991).

No se conoce con exactitud el mecanismo que permite a las chaperonas moleculares llevar a cabo las funciones antes mencionadas. Sin embargo, al parecer, pueden reconocer ciertos dominios presentes en muchas proteínas, los cuales quedan expuestos cuando las proteínas son parcialmente desnaturalizadas y la unión de las chaperonas hace menos probables otras alternativas de ensamblaje (Viitanen *et al.*, 1992).

La regulación de la expresión de las chaperonas es un aspecto del que se desconocen muchos puntos importantes. Muchas de ellas son proteínas cuya síntesis se estimula por temperaturas elevadas y se ha sugerido que forman parte de la estrategia de los seres vivos para enfrentar condiciones ambientales adversas (Ellis y van der Vies, 1991). En la literatura hay una buena cantidad de trabajos que ponen de manifiesto la capacidad de las chaperonas para proteger o reparar a las estructuras de diferentes proteínas mediante procesos que son dependientes de la hidrólisis de ATP. Algunos ejemplos que ilustran lo anterior son los siguientes:

La ARN polimerasa calentada a 45°C en baja concentración de sales se desnaturaliza y pierde el 90-95% de su actividad después de 5 min. Un exceso molecular de la chaperona cpn 60 puede proteger a la ARN polimerasa de la inactivación y también logra que la enzima desnaturalizada recupere el 80% de su actividad original (Skowrya *et al.*, 1990).

Se ha observado que en algunas cepas de *E. coli* cuando se cultivan a 42°C, el represor para  $\lambda$  se desnaturaliza y pierde su actividad; las chaperonas Dna k, Dna J y Grp E pueden reestructurarlo (Gaitanaris *et al.*, 1990).

La Rubisco de *Rhodospirillum rubrum* tratada con 8 M de urea o 6 M de cloruro de guanidina se desnaturaliza y pierde su actividad. Al agregar un exceso de las chaperonas cpn 60, cpn 10 y del complejo Mg-ATP recupera el 80% de la actividad original (Goloubinoff *et al.*, 1989).

También se ha observado que la traslocación de proteínas se favorece si hay chaperonas. Sobre el particular Miernyk *et al.* (1992) observaron que tanto la hsp 70 de cerebro de bovino, como la Dna k de *E. coli* y la cpn 60 de cloroplastos de chicharo favorecen la traslocación de proteínas pero con eficiencias muy variables: 70, 47 y 16 % respectivamente.

Recientemente se ha propuesto que las chaperonas no actúan solas. Langer *et al.* (1992) usando rodanasa de mitocondria de bovinos desnaturalizada por el tratamiento con 6 M de cloruro de guanidina observaron que el tratamiento con Dna k, Dna J, Grp E, Gro EL y Gro ES era capaz de inducir una recuperación importante de la actividad. Los mejores resultados se lograron cuando las mismas se agregaron en el orden antes mencionado.

### III. HIPOTESIS.

#### PREMISAS:

Evidencias experimentales obtenidas en nuestro laboratorio mostraron que la actividad específica de la Rubisco puede variar dependiendo de las condiciones fisiológicas de la planta, sin que ello esté asociado a la presencia de compuestos activadores o inhibidores de la actividad (Martínez-Barajas, 1989), o bien, a un recambio acelerado de la Rubisco presente (Loza-Tavera, 1992).

Por otro lado, la Rubisco activasa es una proteína que bajo ciertas condiciones experimentales ha demostrado ser capaz de eliminar a la RuBP de los complejos inactivos Rubisco-RuBP, y de esa manera incrementar la actividad de la Rubisco (Robinson *et al.*, 1988). Sin embargo, hay una serie de elementos en esta reacción que no han sido adecuadamente considerados:

a) Tanto la activación de la Rubisco como la catálisis de fijación de CO<sub>2</sub> involucran cambios conformacionales muy importantes (Bowien y Gottschalk, 1992).

b) Algunas de las características reportadas para la Rubisco activasa son semejantes a las conocidas para las proteínas denominadas chaperonas moleculares, y por lo tanto,

c) Es probable que la Rubisco activasa actúe como chaperona molecular y mediante su interacción con la Rubisco facilite los cambios conformacionales que para la actividad de esta última se requieren.

Con base en estas ideas se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

La Rubisco activasa tiene características de chaperona molecular, las cuales le permiten interaccionar fuertemente con la Rubisco y facilitar cambios conformacionales en esta proteína. Esa interacción es la que permite la liberación de la Rubisco del complejo inactivo Rubisco-RuBP que se ha observado en los experimentos realizados *in vitro*.

Fisiológicamente, la actividad de la Rubisco es afectada tanto por alteraciones producidas por modificaciones covalentes como por la interacción con diversos metabolitos. En ambos casos se afecta la estructura de la enzima y se dificultan los cambios conformacionales necesarios tanto para la activación como para la catálisis. Bajo estas condiciones, la Rubisco activasa es el factor limitante de la actividad de la Rubisco pues ofrece una vía para revertir el efecto negativo de las alteraciones estructurales mencionadas.

#### IV. OBJETIVOS:

Los objetivos planteados para el desarrollo de la presente investigación, son los siguientes:

##### OBJETIVOS GENERALES:

- 1.- Analizar el papel de la Rubisco activasa en la regulación de la actividad de la Rubisco en maíz.
- 2.- Analizar las similitudes de la Rubisco activasa con las chaperonas moleculares.

##### OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Analizar las condiciones que se requieren para la inhibición de Rubisco por RuBP y la reactivación subsecuente por Rubisco activasa.
- 2.- Analizar si las concentraciones de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{MgCl}_2$  (10 mM de cada uno de ellos) que normalmente se utilizan para activar a la Rubisco son suficientes para activar a toda la enzima presente en un extracto crudo de hojas de maíz.
- 3.- Estudiar el efecto que la edad fisiológica de la planta y/o los cambios ambientales tienen sobre la expresión de la Rubisco activasa y la capacidad de la Rubisco para ser activada por Rubisco activasa.
- 4.- Investigar si la concentración de Rubisco activasa puede ser un factor que limite la actividad de la Rubisco *in vivo*.
- 5.- Investigar si *in vitro* la Rubisco activasa tiene la capacidad de reactivar preparaciones de Rubisco parcialmente desnaturalizadas.

## V. MATERIALES Y METODOS.

En este apartado se presentan con detalle los métodos utilizados, sobre todo, aquellos que en los artículos anexos se describen muy brevemente.

### V.I. MATERIAL BIOLÓGICO.

Los experimentos se realizaron con plantas de maíz de las poblaciones Zacatecas 58 Original y el ciclo 20 de un programa de mejoramiento por selección masal para incrementar el rendimiento de grano, mismas que generosamente fueron proporcionadas por el Dr. José Molina Galán del Centro de Genética del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México.

Los estudios con plántulas se realizaron con plantas cultivadas en invernadero. Las semillas se sembraron en agrolita y cada tercer día se regaron alternadamente con agua o solución de Hoagland. El análisis de las mismas consistió en seguir el desarrollo de la segunda hoja para lo cual se definieron las etapas que se muestran en la figura 1.

En el caso de los experimentos con plantas adultas, se utilizó la hoja inmediatamente superior a la mazorca de plantas cultivadas en el campo experimental del Colegio de Postgraduados. Los muestreos se hicieron semanalmente durante todo el período de llenado del grano poniendo especial cuidado en que los mismos siempre se realizaran entre las 11:00 y 12:00 hrs. Cada muestra estuvo constituida por 6 hojas seleccionadas aleatoriamente, las cuales después de cortar los extremos se combinaron para formar paquetes en donde todas estaban igualmente representadas.

Tanto las hojas de plántulas como las de plantas adultas, después de ser cortadas se congelaron con nitrógeno líquido. Las primeras se usaron inmediatamente, mientras que las segundas ya en el laboratorio se sacaron del termo con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C.

### V.2. PURIFICACION DE RUBISCO ACTIVASA.

El método que a continuación se describe se basa fundamentalmente en el descrito por Robinson *et al.* 1988.

Hojas frescas de espinaca se lavaron muy bien con jabón y se enjuagaron con abundante agua destilada. Se retiraron las nervaduras más importantes y se molieron con nitrógeno líquido hasta convertirlas en un polvo muy fino. El polvo se agregó lentamente al amortiguador de extracción compuesto por: 50 mM BTP pH 7.0, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 10 µM leupeptina, 1mM benzamidina y 2% PVP. Se utilizó una relación 2 ml de amortiguador/g de tejido y después de mantener en agitación moderada por 20 min, el extracto se filtró a través de ocho capas de gasa, una de miracloth y otra más de nylon con poro de 20 µm.

El extracto se centrifugó a 20000g por 15 min y el sobrenadante se precipitó agregando una solución saturada de sulfato de amonio (pH 7.0) hasta alcanzar una concentración final de 35 %. El volumen requerido se agregó lentamente con agitación constante y después de 20 min, se centrifugó a 15000g por 15 min. En el precipitado se encuentra prácticamente toda la Rubisco activasa mientras que en el sobrenadante está la mayor parte de la Rubisco.

Después de eliminar el exceso de sulfato de amonio, el precipitado se resuspendió en un volumen mínimo de 20 mM BTP (pH 7.0), 1mM ATP y 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Para eliminar sales se precipitó agregando PEG 10000 hasta una concentración final de 17%. Después de agitar por 30 min se centrifugó a 15000g por 15 min. Una vez que se eliminó el exceso de PEG, el precipitado se resuspendió en el amortiguador usado antes. El resuspendido se centrifugó 20 min a 16 000g y el precipitado se volvió a resuspender. La enzima así obtenida se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C.



**Figura 1. Etapas seleccionadas para el estudio del desarrollo de la segunda hoja en plántulas de maíz.**

Esta fracción se cargó a una columna de DEAE celulosa de donde las proteínas se despegaron utilizando un gradiente de NaCl de 0 a 0.5 M. Las fracciones se analizaron por electroforesis y aquellas que contenían Rubisco activasa (las que eluyen a una concentración aproximada a 230-260 mM de NaCl), se reunieron y se dializaron contra 20 mM BTP (pH 7.0), 1 mM ATP y 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Posteriormente la muestra se cargó a una columna de Q-sefarosa de donde la Rubisco activasa se obtuvo siguiendo un procedimiento exactamente igual al utilizado con la columna de DEAE celulosa. En este caso, la proteína de interés eluyó a una concentración muy similar de NaCl.

La proteína obtenida por este procedimiento se analizó en geles de poliacrilamida y de acuerdo con el número de bandas visibles por la tinción con azul de Coomassie, resultó tener una pureza superior al 95 %.

### V.3. PURIFICACION DE RUBISCO (Wishnick y Lane, 1971).

Al sobrenadante obtenido después de la precipitación al 35% se le agregó sulfato de amonio sólido hasta alcanzar una concentración final de 55%. El precipitado se recuperó centrifugando a 10000g por 15 min y después de eliminar el exceso de sulfato de amonio, se resuspendió en: 50 mM Tricina (pH 7.5), 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 mM DTT. La proteína resuspendida se reprecipitó con una concentración final de 14.28% de PEG 10000 y después de centrifugar 15 min a 20000g y eliminar el exceso de PEG, el precipitado se resuspendió en un volumen mínimo del amortiguador ya mencionado. La solución resultante puede quedar un poco turbia y para clarificarla fue necesario centrifugar a 20000g por 20 min. El sobrenadante se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C.

Para el resto de la purificación se utilizaron también las columnas de DEAE celulosa y Q-sefarosa de las cuales la Rubisco eluyó a una concentración de 300 mM de NaCl.

### V.4. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE RUBISCO.

La medición de la actividad se hizo en extractos crudos los cuales fueron preparados moliendo 1g de tejido con nitrógeno líquido, antes de que se descongelara se agregaron 2 ml del amortiguador de extracción (100 mM Tricina NaOH pH 8.1, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM EDTA, 10 mM DTT y 1 mM PMSF) y se centrifugó a 15000g por 10 min; la actividad de Rubisco en los extractos se midió utilizando la siguiente mezcla de reacción: 100 mM Tricina-NaOH, pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> (New England Nuclear 100 µCi/mmol) y 0.5 mM RuBP (Robinson *et al.*, 1988). El ensayo se inició agregando el extracto y se desarrolló a 25°C por 1 min. La reacción se paró a 0, 20, 40 y 60 seg agregando 200 µl de HCl 3N en metanol. Las muestras se evaporaron a 65°C y el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> incorporado en compuestos estables en ácido se midió en un contador de centelleo (Packard Instruments). Finalmente, la actividad total se calculó a partir del valor de la pendiente obtenida.

### V.5. ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR (Preneta, 1989).

El peso molecular de la Rubisco activasa y de la Rubisco desnaturalizada por calor fue estimado con una columna de filtración (Sephacryl S-400) de 90 cm de longitud y 0.6 cm de diámetro interior equilibrada en un amortiguador compuesto de 50 mM BTP (pH 7.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 mM NaHCO<sub>3</sub>. La columna fue calibrada con los siguientes estándares: Ureasa, Ferritina, Catalasa y Aldolasa, cuyos pesos moleculares son: 545, 450, 240 y 158 kDa respectivamente.

Para confirmar los resultados obtenidos, se compararon los perfiles de elución de la Rubisco nativa y desnaturalizada por calor en una columna de dimensiones similares llena de Ultrogel ACA-22 (con un rango de exclusión de 100,000 a 1,200,000) y equilibrada en 50 mM Tricina (pH 7.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 mM NaHCO<sub>3</sub>.



## **V.6. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE RUBISCO ACTIVASA.**

### **V.6.1. ACTIVIDAD DE ATPasa (Robinson y Portis, 1989b).**

La hidrólisis de ATP se determinó mediante un ensayo espectrofotométrico; para ello, la enzima se incubó a 27°C en el siguiente medio de reacción: 50mM Tricina-KOH (pH 8.0), 20 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM ATP, 0.3 mM NADH, 1 mM fosfoenolpiruvato, 12 u/ml piruvato cinasa y 12 u/ml lactato deshidrogenasa y se siguió la oxidación de NADH por los cambios en la absorbencia a 340 nm.

En estas condiciones, la oxidación del NADH sucede a la misma velocidad con que se da la hidrólisis de ATP.

### **V.6.2. ACTIVIDAD DE ACTIVASA (Robinson *et al.*, 1988).**

Este ensayo se realizó tanto con Rubisco de espinaca purificada como con extractos crudos de malz. De acuerdo con este procedimiento, la Rubisco inactivada por su sustrato (RuBP), puede ser reactivada por Rubisco.

La fuente de Rubisco se pasó por una columna de Sephadex G-25 (20 cm de longitud por 0.5 cm de diámetro interior) equilibrada con Tricina 50 mM (pH 8.0). A continuación, a la enzima desionizada se le agregó RuBP hasta alcanzar una concentración final de 1.5 mM y se incubó a 4°C por 30 min. El ensayo de reactivación se desarrolló en el siguiente medio de reacción: 100 mM Tricina-NaOH (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub> (la concentración de este cambió dependiendo del experimento), 4 mM RuBP, 1mM ATP, 3 mM fosfocreatina y 20 u/ml de creatina cinasa. La reacción se llevó a cabo a 27°C, primeramente se mezclaron 15 µg de Rubisco activasa con el amortiguador de reacción y 30 seg después se agregaron 20 µg del complejo Rubisco-RuBP en un volúmen final de 175 µl. La reactivación se siguió midiendo los cambios en la actividad de Rubisco después de 15 min de incubación.

Otra serie de experimentos tendientes a observar la actividad de Rubisco activasa se llevaron a cabo usando como sustrato a la Rubisco desnaturalizada por calor y eliminando la RuBP del sistema de reactivación.

## **V.7. PREPARACION DE ANTICUERPOS CONTRA RUBISCO ACTIVASA.**

Los anticuerpos contra la Rubisco activasa de espinaca fueron producidos en conejos Nueva Zelanda. La Rubisco activasa se analizó en un gel de poliacrilamida; de allí, se recortaron las bandas correspondientes a Rubisco activasa que después de ser electroeluidas se utilizaron como antígeno.

La recuperación de la proteína se hizo por electroelución. Para ello, los pedazos de acrilamida con la proteína se pusieron dentro de una bolsa de diálisis con un rango de exclusión de 10 a 14 kDa y se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal. En condiciones desnaturalizantes similares a las empleadas para hacer la electroforesis previa, la proteína se extrajo del gel por espacio de 2 h a 30 mA.

La proteína recuperada del amortiguador que ocupaba el interior de la bolsa, fue re-analizada y después de comprobar su pureza, se utilizó como antígeno para la obtención de los anticuerpos. El esquema de inmunización constó de inyecciones semanales aplicadas subcutáneamente por espacio de 5 semanas. En la primera se utilizó 1 mg de proteína homogenizada en proporción 1:1 con el adyuvante completo de Freund. Cabe mencionar que el volumen resultante se inyectó en varias zonas de la espalda.

Para las cuatro restantes la única diferencia fue el uso de adyuvante incompleto.

En la muestra de suero obtenida al momento de hacer la última inoculación se observó un título de 1:2500 y tres días después se realizó la punción cardíaca.

La sangre obtenida se dejó coagular a 4°C y 4 h después se centrifugó a 1500g por 15 min. El suero obtenido se dividió y se almacenó congelado a -70°C.

#### V.8. WESTERN-BLOT.

Para determinar los cambios en las concentraciones de Rubisco y Rubisco activasa en extractos crudos, se utilizaron 15 µg de proteína soluble determinada por el método de Bradford (1976). Las muestras primeramente se sometieron a una electroforesis desnaturalizante (Laemmli, 1970), después las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 µm de poro (Sleicher & Shuell) utilizando un aparato de transferencia en húmedo (LKB, Bromma, Suecia) a razón de 0.75 mA/cm<sup>2</sup>. En estas condiciones, la transferencia de la mayoría de las proteínas se completa en 1h. Las membranas se procesaron siguiendo un método similar al reportado por Ferreira y Shaw (1989) y se probaron contra anticuerpos contra Rubisco activasa de espinaca diluidos 1:2500 (para los primeros trabajos se utilizaron anticuerpos generosamente donados por el Dr. W. L. Ogren de la Universidad de Illinois; después se emplearon los obtenidos en nuestro laboratorio), contra la subunidad grande de la Rubisco de espinaca (diluidos 1:2500) y contra Gro EL (diluidos 1:1200 y generosamente donados por el Dr. D. Govezensky del Instituto Weizmann, Israel). Para el revelado se utilizó un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (Sigma) y la reacción se visualizó por fluorescencia (sistema ECL, Amersham).

#### V.9. INACTIVACION Y REACTIVACION DE RUBISCO.

Estos experimentos se realizaron con Rubisco y Rubisco activasa purificadas de espinaca. El objetivo de los mismos es demostrar que la Rubisco puede ser parcialmente desnaturalizada y que la Rubisco activasa puede contribuir a la recuperación de la actividad.

La enzima desionizada (libre de CO<sub>2</sub> y Mg<sup>2+</sup>) se calentó a 55°C por 1 h con lo que se obtuvo una disminución de 75% en la actividad. El ensayo de reactivación se realizó en un medio similar al descrito para medir la reactivación del complejo Rubisco-RuBP (eliminando RuBP).

#### V.10. INMUNOPRECIPITACION (Miernyk *et al.*, 1992)

Con estos experimentos se buscó establecer la existencia de interacciones entre la Rubisco y la Rubisco activasa. Para esto, 10 µg de Rubisco desnaturalizada o nativa se pusieron a interaccionar con 30 µg de Rubisco activasa en presencia o ausencia de ATP en un volumen final de 100 µl y después de incubar a 27°C por 30 min, fueron inmunoprecipitados con suero contra Rubisco o Rubisco activasa siguiendo el procedimiento que a continuación se describe:

A 100 µl de extracto se agregaron 200 µl de amortiguador A ( 10 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.05 % Nonidet P-40 y 1 mM de PMSF) y 30 µl de suero con anticuerpos contra la subunidad grande de la Rubisco o Rubisco activasa (con título 1:2500 y 1:2000 respectivamente) y se dejó incubar toda la noche a 4°C con agitación suave.

Al día siguiente se añadieron 20 µl de proteína A-Sefarosa (30 mg/ml de amortiguador A) y se incubó 2 h a temperatura ambiente.

Después la muestra se colocó en una punta de pipeta tapada con fibra de vidrio, la cual estaba a su vez colocada en un tubo eppendorf atravesando la tapa previamente horadada.

Se lavó 3 veces con 200 µl de amortiguador B ( 100 mM Tris (pH 7.5), 1mM NaCl, 1mM EDTA, 0.05% Nonidet P-40 y 0.25% Tritón X-100) y 2 veces más con amortiguador A.

Una vez lavada la resina, las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron con un volumen mínimo del amortiguador que se usa para desnaturalizar las muestras que se analizan en geles de poliacrilamida con SDS.

### **V.11. AGOBIO DE TEMPERATURA (Beator *et al.*, 1992).**

Con estos experimentos se buscó observar si al igual que con algunas chaperonas moleculares, los cambios de temperatura podían ejercer algún efecto sobre las concentraciones de Rubisco activasa.

En los experimentos con plantas completas, se utilizó la segunda hoja de plántulas de diferentes edades que fueron calentadas por 4 h a 43°C y una humedad relativa cercana a la saturación.

Transcurrido ese tiempo, las plantas se regresaron a las condiciones originales (25°C) y la recuperación de las mismas se siguió por periodos de hasta 18 h. Todo esto en presencia de luz a una intensidad aproximada a 250  $\mu\text{E}/\text{m}^2$ .

### **V.12. AISLAMIENTO DE ADN (Dellaporta *et al.*, 1985).**

Para la obtención de éste, 1 g de tejido fue finamente molido con nitrógeno líquido y antes de que se descongelara, se agregaron 15 ml de amortiguador de extracción (100 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA, 0.5 M NaCl y 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) y 1 ml de SDS al 20 %. Se agitó vigorosamente y se incubó a 65°C por 10 min.

El siguiente paso fue agregar 5 ml de acetato de potasio 5M. Se agitó vigorosamente y se incubó a 0°C por 20 min. Pasado ese tiempo, los tubos se centrifugaron a 25000g por 20 min y el sobrenadante se filtró por Miracloth. Se agregaron 10 ml de isopropanol y se incubó a -20°C por 30 min.

El ADN se obtuvo centrifugando a 20000g por 15 min. Con cuidado se eliminó el sobrenadante y se puso a secar el precipitado.

La pastilla de ADN se disolvió en 0.7 ml de 50 mM Tris pH 8.0 y 10 mM EDTA. Se transfirió a un tubo eppendorf y se centrifugó por 10 min para eliminar todo el material que no se solubilizó.

El sobrenadante se pasó a otro tubo y se agregaron 75  $\mu\text{l}$  de acetato de sodio 3 M y 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol, se mezcló suavemente y se centrifugó por 30 seg. La pastilla de ADN se lavó con etanol al 80 % y después de secarla, se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de 10 mM Tris pH 8.0 y 1 mM EDTA.

### **V.13. AISLAMIENTO DE ARN (Wilkinson, 1991).**

Un g de tejido fresco se molió con nitrógeno líquido. Se agregaron 5 ml de amortiguador de extracción (20 mM MES pH 7.0, 8 M de cloruro de guanidina, 20 mM EDTA y 50 mM  $\beta$ -mercaptoetanol). El homogenizado se transfirió a un tubo corex que a su vez contenía un volumen igual de la mezcla fenol/cloroforno/alcohol isoamílico (25:24:1 v/v), se agitó vigorosamente y se centrifugó 30 min a 10000g. La fase acuosa se pasó a un tubo limpio.

Se agregó 1/10 del volumen de la fase acuosa de ácido acético 1M y 0.7 volúmenes de etanol frío. Se mezcló y se incubó a -70°C por 30 min.

El ARN se obtuvo centrifugando a 5000g por 5 min.

La pastilla se lavó dos veces con etanol al 70% y se resuspendió en 1 ml de 4 M de acetato de potasio pH 4.8. Nuevamente, el ARN se obtuvo centrifugando a 5000g por 5 min y después de que la pastilla se secó, se disolvió en 3 ml de agua.

Para eliminar el ADN contaminante se agregó un volumen igual de 4 M de LiCl y se incubó 1 h a 4°C.

El ARN se obtuvo por centrifugación a 5000g. La pastilla obtenida se lavó dos veces con 3 ml de etanol al 70 % y después de secarla, se disolvió en 200  $\mu\text{l}$  de agua.

#### **V.14. GELES DE AGAROSA (Sambrook et al., 1989).**

Para el análisis del ADN, 40 µg de ADN de maíz, espinaca o *Arabidopsis* fueron cortados con EcoR1 y Hind III de acuerdo con las especificaciones del fabricante (GIBCO, BRL) y se analizaron en un gel de agarosa al 0.8% hecho con 1X TAE (50X TAE: 242 g Tris base, 57.1 ml ácido acético y 100 ml EDTA 0.5 M aforado a 1l).

Para el análisis del ARN, se utilizaron 30 µg que fueron desnaturalizados (1M glixol, 50% DMSO y 10 mM fosfato de sodio pH 7.0 por 1h a 50°C). La muestra tratada se analizó en un gel de agarosa al 0.8 % en amortiguador de fosfatos (10 mM pH 7.0). Para la electroforesis se usó el mismo amortiguador y se utilizó un sistema de recirculación para evitar diferencias en el pH. Se tiñó con bromuro de etidio (5 µg/ml) y se destiñó con agua bidestilada estéril.

#### **V.15. TRANSFERENCIA DE ACIDOS NUCLEICOS A MEMBRANAS (Sambrook et al., 1989).**

Tanto el ADN como el ARN fueron transferidos a membranas de nylon (GeneScreen, NEN). Los geles con ADN antes de ser transferidos, recibieron un tratamiento previo consistente en una depurinación (incubando 2 veces de 10 min cada una en HCl 0.25 M). Después de enjuagar con agua, el ADN se desnaturalizó incubando 15 min en una solución de 0.5 N NaOH y 1.5 M NaCl seguido de un enjuague con abundante agua. Por último, el gel se neutralizó incubándolo 20 min a temperatura ambiente en 0.5 M Tris-HCl pH 7.0 y 1.5 M NaCl. Finalmente, se incubó 15 min en la solución de transferencia (6X SSC. 20X SSC= 175.3 g NaCl y 88.2 g Citrato de Sodio pH 7.0 aforado a 1 l).

La transferencia de los ácidos nucleicos a la membrana se hizo por capilaridad.

Los geles con ARN no fueron depurinados ni desnaturalizados, sólo se equilibraron en la solución de transferencia. Después de ser transferidos de la manera ya descrita, tanto el ADN como el ARN fueron fijados a la membrana incubando 2 h a 80°C al vacío.

#### **V.16. MARCADO DE LA SONDA E HIBRIDACION EN LAS MEMBRANAS.**

Para la detección se utilizó el ADNc de la Rubisco activasa de espinaca subclonado en el sitio Eco R1 del plásmido pTZ18U (es básicamente el mismo que pUC18) el cual fue generosamente proporcionado por el Dr. W. L. Ogren de la Universidad de Illinois.

Para el análisis del ADN la sonda se marcó uniformemente utilizando un método no radioactivo (Boehringer) consistente en la incorporación de dUTP acoplado a digoxigenina. El revelado se llevó a cabo utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra digoxigenina y con actividad de fosfatasa alcalina

En el análisis del ARN, se utilizó la misma sonda, sólo que en este caso, se marcó con ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dCTP utilizando el sistema de "random primer" (NEN) y se obtuvo una actividad específica de 10<sup>8</sup> dpm/µg ADN.

Tanto la prehibridación como la hibridación de las membranas con ADN y ARN se hicieron a 65°C. La mezcla de prehibridación que se utilizó en ambos casos se preparó con 6X SSC, 10X Denhardt ( 50X Denhardt: 5g Ficoll 400, 5g PVP, 5g albúmina y aforar a 500 ml), 1% SDS y 50 µg/ml ADN de esperma de salmón desnaturalizado y en ambos casos se usó en una relación de 100 µl/cm<sup>2</sup>. Tanto para la hibridación de ADN como de ARN se utilizó una mezcla compuesta por: 6X SSC, 1% SDS, 10% sulfato de dextrán y 50 µg/ml ADN de esperma de salmón desnaturalizado en una relación de 250 µl/cm<sup>2</sup>.

Los lavados en ambos casos se hicieron de la siguiente forma: 2 lavados de 15 min a temperatura ambiente con una solución 2X SSC, posteriormente 4 lavados de 10 min cada uno a temperatura ambiente con una solución 1.5X SSC y 0.1% SDS, finalmente 4 lavados de 10 min cada uno a 65°C en una solución 0.1X SSC y 0.1% SDS. Después de lo anterior, las membranas quedaron listas para ser reveladas mediante la exposición a películas X-OMAT (Kodak).

## VI. RESULTADOS.

### VI.1. Artículo 1:

"Regulation of Rubisco activity during grain fill: possible role of Rubisco activase".

**REGULATION OF RUBISCO ACTIVITY DURING GRAIN FILL: POSSIBLE ROLE OF  
RUBISCO ACTIVASE.**

E. Martínez-Barajas, J. Molina Galán and E. Sánchez de Jiménez

**ELEAZAR MARTINEZ-BARAJAS AND ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ<sup>1</sup>**  
Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. México, D.F. 04510

AND

**JOSE MOLINA GALAN**  
Centro de Genética , Colegio de Posgraduados, Montecillo, Edo. México. MEXICO.

<sup>1</sup> Author to whom all correspondence should be sent:

Estela Sánchez de Jiménez  
Departamento de Bioquímica  
Facultad de Química  
Universidad Nacional Autónoma de México  
México, D.F. 04510  
Phone: (525) 622-5278  
Telex: 1774523 UNAMME  
Fax: 6225329

**ABSTRACT**

Ribulose biphosphate carboxylase (Rubisco, E.C. 4.1.1.39) activity in leaves above the ear was compared during the grain filling period in two related maize (*Zea mays* L.) populations (Z0 and Z20) presenting large differences in grain production. Leaves were sampled weekly and chlorophyll, soluble protein and Rubisco activity were measured. Chlorophyll and soluble protein contents were found to slowly decrease during this period, the former faster than the latter, in both populations. During the first 40 days, Rubisco activity was significantly larger in the high yielding population, although, Western blot analysis of Rubisco-large subunit showed similar values for both populations within this period. The same analysis for Rubisco activase indicated larger contents of this protein in the higher yielding population (Z20) during the first 12 days of the grain filling period than the original one (Z0). Inhibited Rubisco activity obtained by RuBP addition to desalted leaf extracts was recuperated by CO<sub>2</sub> and Mg<sup>+2</sup> addition up to 50% its original value but to 100% after Rubisco activase treatment. Furthermore, extracts from old leaves increased their Rubisco activity up to approximately 300% by Rubisco activase treatment. It is suggested that Rubisco activase plays a relevant role in the regulation of Rubisco activity during maize grain filling.

**Key words:** grain filling, maize, Rubisco activase Rubisco activity regulation.

## INTRODUCTION

A strong photosynthate demand occurs in plants during the grain filling period. The upper leaves of the maize plant satisfy this requirement by increasing photosynthesis rate and photosynthate translocation (Tanaka and Yamaguchi, 1972). In C4 plants like maize, the carbon fixation process operates through the cooperative action of the phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase) and Rubisco. It has been suggested that PEPCase is not rate limiting to photosynthesis due to the high extractable specific activity of this enzyme (Seemann et al., 1984; Baer and Schrader, 1985). However, enzymes such as Rubisco and pyruvate Pi dikinase, which have specific activities similar to CO<sub>2</sub> exchange rates have been considered as a possible rate limiting steps in C4 photosynthesis (Baer and Schrader, 1985). Some of the strategies for improving efficiency of plant productivity by manipulating photosynthesis are: a) increase of CO<sub>2</sub> fixation rate during flowering and grain fill, and b) increase on the length that leaves maintain photosynthesis during the grain filling period (Crafts-Brandner and Poneleit, 1987). In maize it has been observed that high productive hybrids might differ on the length of maintaining anabolic activity late in the grain filling period. These differences may in some cases be related to larger kernels and a longer effective filling period (Crafts-Brandner and Poneleit, 1987). Similarly, significant differences of Rubisco activity have been observed in maize populations differing in grain yield (Loza-Tavera et al., 1987).

Rubisco is a complex protein (550 Kd) (Andrews and Lorimer, 1987). To become catalytically competent, Rubisco must first be activated by carbamylation of a lysine residue on the large subunit of the enzyme (Lorimer et al., 1976). Rubisco activity is regulated at different levels and by different effectors (Mc Curry et al., 1981; Seemann et al., 1985). Among these, specific inhibitors: CA1P (Seemann et al., 1985) and RuBP (Jordan and Chollet, 1983), the activation by Rubisco activase in an ATP dependent manner (Salvucci et al., 1987) are the most relevant. Furthermore, it has been observed that changes in photosynthetic rates in response to environmental parameters such as light occurs not by substrate limitation but by changes in the Rubisco activation state (Salvucci et al., 1986). The mechanisms regulating enzyme activity in field grown plants during stages of strong photosynthate demand are, however, not known in depth. It is of great interest to cover this area of knowledge since plant productivity might depend, among other factors, on the efficiency of the plant to fulfill the increasing photosynthate demand generated by ear growth. The present research focuses on elucidating the possible role of Rubisco activase in the regulation of Rubisco activity during the grain filling period.

Abbreviations.- BTP, bis tris propane; CA1P, carboxyarabinitol 1-phosphate; DAA, days after anthesis; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediamine tetraacetate; LS, Rubisco large subunit; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; RuBP, Ribulose 1,5 biphosphate; SDS, sodium dodecyl sulphate; SS, Rubisco small subunit.



## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Plants of *Zea mays* L. var *Zacatecas 58*, were used in these studies. Two populations of the same variety were tested: *Z<sub>0</sub>*, original crop and *Z<sub>20</sub>*, an improved population selected for high grain yield after 20 cycles of selection (60-70 % grain yield increase per plant). The plants were grown under irrigation (April to September) in an experimental plot at 19° 53'N and 98° 53'W, 2245 m altitude, Montecillo, State of México. For experiments in figures 5 and 6, the *Z<sub>0</sub>* population was grown in the same place but different agronomic cycle were used. Leaf samples were obtained by mixing five leaves above the ear from different plants. The middle part of each leaf was used for the mixture. Three leaf pools were made for each of nine different developmental stages from 8 days after anthesis (male flowering) to 61 days later (grain maturation). The samples were collected approximately at the same hour in the morning every week. Each leaf pool was frozen in liquid nitrogen and stored at -70 °C until use. Extraction was made by homogenizing the sampled leaves under liquid N<sub>2</sub> with mortar and pestle; 2 ml of extraction buffer (0.1 M Tricine-NaOH pH 8.1, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM DTT and 0.5 mM PMSF) per gram of tissue was added and the slurry was centrifuged 10 min at 12,000 g and 4°C. The supernatant was labeled "leaf extract" and used for RUBISCO assay, soluble protein, and western blots analysis. All measurements were made in triplicate.

### Chlorophyll and soluble protein determinations

Chlorophyll was measured according to Bruinsma (1963) in 1 g leaf samples. Soluble protein was determined as described by Peterson (1977). Dry weight was determined with 1.0 g of leaves placed in vacuum oven at 60 °C until constant weight.

### Rubisco assa

Rubisco activity was measured in the leaf extracts by a protocol modified after Loza-Tavera et al., (1990). The assay mixture contained: 60 µl assay buffer (83 mM Tricine-NaOH pH 8.1, 16.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 4.16 mM DTT), 1.66 mM Ribulose-1,5-bisphosphate tetrasodium salt, 41.6 mM NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> (100 µCi/mmol, Amersham, Co.), and 5 µl of leaf extract in a final volume of 65 µl. For RUBISCO activation, leaf extracts were pre-incubated in 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 15 mM NaHCO<sub>3</sub> at 4 °C for 9.5 min just before use for RUBISCO activity determinations. Initial velocity was measured from four determinations at 0, 20, 40 and 60 s made for each sample. The radioactivity incorporated in acid stable product was quantified with a Packard Liquid Scintillation Counter (Mimaxi B serie S400).

### Activation of maize Rubisco by spinach Rubisco activase.

Ativase assay was performed after Robinson et al., (1988) as follows: maize leaf extract was desalted in a G-50 sephadex filtration column equilibrated with 100 mM Tricine-NaOH (pH 8.0), further inhibited by 2 mM RuBP and incubated at 0°C for 30 min. After this treatment 100 µl (corresponding at 150 µg of soluble protein) from RuBP inhibited extract were mixed with the reactivation assay mixture that contain the next finals concentrations: 100 mM tricine-NaOH (pH 8.0), varying concentration of NaHCO<sub>3</sub>, (0 to 50 mM), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 4 mM RuBP, 3 mM creatine phosphate 20 u/ml creatine kinase. For the experiments with Rubisco activase, one min later, 100 µl (corresponding to 150 µg of protein) of purified spinach Rubisco activase were added to a set of tubes with the same reaction mixture in a final volume of 500 µl. The reaction was carried at 25 °C and Rubisco activity was measured 15 min later.

For the experiments designed to determine Rubisco activase effect under activated Rubisco leaf extracts, 30 µl (corresponding to 50 µg of soluble protein) of activated leaf extract (leaf extract in 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 mM NaHCO<sub>3</sub> incubated for 15 min at 4°C) and varying amounts of spinach Rubisco activase were used in a final volume of 160 µl. RuBP was omitted from the assay mixture and the concentration of NaHCO<sub>3</sub> was fixed at 10mM. The rest of the experiment was performed as above.

### Spinach Rubisco activase purification

Approximately 100 g spinach leaves were ground under liquid nitrogen in a chilled mortar and the powder was further homogenized with 200 ml of extraction buffer (50 mM BTP pH 7.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.4 mM ATP, 15 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 mM benzamidine and 0.01 mM leupeptin). Rubisco activase was purified as described by Robinson et al., (1988).

### Rubisco antibody preparation

Spinach Rubisco protein was purified according to Wishnick and Lane (1971). The holoenzyme purity was tested by electrophoresis under native and denaturing conditions. Only one (550 Kd) and two bands (55 and 14 Kd respectively) were observed in native and SDS-gels stained with coomassie blue. Electroelution of the LS subunit was performed in an electrophoretic concentrator (LKB 2014 EXTRAPHOR) and this protein was used to raise antibodies in young rabbits.

### Western blot analysis

Leaf extracts were subjected to SDS-electrophoresis according to Laemmli (1970), using the same amount of protein from all leaf extracts for each run. After electrophoresis proteins were blotted onto nitrocellulose (pore size 0.2  $\mu$ m) at 100 mA for 1 h, then 200 mA for 3.5 h using a Hoefer Scientific electroblotting apparatus.

After electrotransfer gels were stained with coomassie blue in order to verify complete protein transfer. Nitrocellulose blots were then processed as reported (Beisiegel, 1986). Either anti-spinach LS RUBISCO antibody (1:1500) or R-A antibody (1:300) (kindly donated by Dr. William L. Ogren, University of Illinois) was used for the assay coupled with second-stage antibody-peroxidase conjugate (Sigma Co.). The blots were developed by immersion in developer solution (10 mg 4-chloro-1-naphtol, 3.3 ml methanol, 17 ml water and 10  $\mu$ l 30% hydrogen peroxide) until colored bands were observed. Relative densitometric quantification was performed in blots at non saturated color level intensities using a Hoefer Scientific GS 300 Scanning Densitometer.

## RESULTS

During the grain filling period dry to fresh weight ratios showed only small changes, indicating that loss of dry matter in either population during this period was not important (Fig. 1A). Chlorophyll content in both populations showed maximum values at approximately 19 DAA followed by steady decrease for the rest of the analyzed period (Fig. 1B). Soluble protein was relatively constant during the grain filling period. Toward the end, however, it diminished about 30% from its initial value (Fig. 1C). These data suggest that leaf senescence began around 19 DAA.

Rubisco activity was determined in leaf extracts from both populations during the grain filling period. A slight increase probably due to leaf maturation was observed for the Zo population with maximum values between 12 to 26 DAA (Fig. 2A). The Z<sub>20</sub> population showed larger Rubisco activity values than Zo with a maximum around the 12 DAA (Fig. 2B). Activity decreased linearly through the remaining of the experiment. The maximum difference between the two populations was about 3 fold.

Rubisco protein was measured in all samples collected during grain filling both by the rocket immunoelectrophoresis method (data not shown) and by Western blot analysis of the Rubisco LS (Fig. 3A). The two populations showed very similar profiles for this protein during the entire grain filling period by both methods. The densitometric analysis of the western blots showed that the amount of Rubisco protein remained approximately constant for the first 5 samples and declined thereafter (Fig. 3B). No significant differences were observed between the two populations. The same band pattern was also observed in the blots of both populations: only one band of 55 Kd for the first 5 samples (until 40 DAA) and two bands thereafter up to 61 DAA (2nd band of 51 Kd) (Fig. 3A), due probably to protein

hydrolysis in the senescent leaves.

To detect the Rubisco activase protein in maize leaves during the grain filling period Western-blot analysis of electrophoresed leaf extracts was performed. Spinach leaf extract was also included as a control (Fig. 4A). This analysis showed the 43 and 45 Kd bands reported for spinach Rubisco activase (Salvucci et al., 1987). On the other hand, the nine maize samples tested revealed only one cross-reacting band against the spinach Rubisco activase antibody corresponding to 43 Kd (Fig. 4A). Densitometric analysis of this band showed similar Rubisco activase concentrations in both populations except for the two fist samples in that a significantly and consistently larger amount of Rubisco activase was observed in Z<sub>20</sub> than in Z<sub>0</sub>. The amount of Rubisco LS was checked in the same membrane by Western blot analysis and the result was similar for all samples as shown in figure 3. It is interesting to mention that the same type of experiment performed with maize seedlings leaves showed the two Rubisco activase expected bands of 43 and 45 Kd (data not shown).

CO<sub>2</sub> concentration dependency of *in vitro* Rubisco activation was analyzed in the Rubisco-RuBP inactivated leaf extracts. Residual Rubisco activity was < 10% its original value. Aliquots of the RuBP inactivated extracts were then incubated for 15 min in 10 mM MgCl<sub>2</sub> and increasing concentrations of CO<sub>2</sub> (up to 50 mM NaHCO<sub>3</sub>). In parallel, another set of similarly treated samples received further purified spinach Rubisco activase and ATP generating system. Both sets of samples were incubated for 15 min at 25°C. At the end of this period, Rubisco activity was measured as described before. Rubisco activity was recuperated by CO<sub>2</sub>, Mg<sup>+2</sup> treatment up to 50% its original value when determined at the largest CO<sub>2</sub> concentration, while addition of spinach Rubisco activase caused Rubisco activity to increase slightly over the leaf extract original value (Fig. 5). When ATP generating system was omitted no stimulation of Rubisco activity was observed eventhough the spinach Rubisco activase was present, neither if only ATP generating system was added to the extracts without the exogenous Rubisco activase (data not shown). It should be noted that at 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, Rubisco activation reached only 20% of the original value, while at the same CO<sub>2</sub> concentration plus the Rubisco activase and the ATP system, almost maximum recovery of Rubisco activity was obtained (Fig. 5).

Rubisco activation by Rubisco activase was further studied using an approach based on the assumption that part of the Rubisco present in the leaves was in a CO<sub>2</sub> and Mg<sup>+2</sup> non-activable form, i.e. in the Rubisco-RuBP inactive complex, or a similar Rubisco-ion inactive complex (Portis, 1992). To this end, CO<sub>2</sub>-Mg<sup>+2</sup> activated maize leaf extracts from the original (Z<sub>0</sub>) taken near at the end of the filling period, were treated with varying concentrations of purified spinach Rubisco activase and ATP generating system. After 15 min of incubation, Rubisco activity was measured. Results in figure 6 show Rubisco activity significant increments induced by Rubisco activase treatment, larger as Rubisco activase was increased in the leaf extract, indicating that Rubisco activase was limiting in the system.

## DISCUSSION

Results presented here showed that Rubisco activity in the maize leaf above the ear was significantly larger in the improved (Z<sub>20</sub>) that in the original (Z<sub>0</sub>) population mainly during the early part of the grain filling period (Fig. 2). This result confirms previous data obtained in Z<sub>13</sub> and Z<sub>18</sub> populations vs. Z<sub>0</sub> of the same variety (Loza-Tavera et al., 1987; Martínez-Barajas et al., 1992). In the present case, however, the magnitude of the difference between the two populations was larger than in the previous study probably due to differences in environmental conditions (Martínez-Barajas et al., 1992) and/or further gain in yield in the advanced selection used.

The main finding of this research was the large difference in Rubisco activity between populations which was not correlated with leaf Rubisco protein content during the grain filling period (Figs. 2 and 3). The densitometric analysis of the LS Rubisco peptide showed that this protein remained almost constant in the first five samples for both populations (Fig. 3B), while Rubisco activity showed

differences up to 3 to 4 fold between Z0 and Z20 (Fig. 2). Previous reports, however, have shown a close correlation between Rubisco activity and Rubisco protein increments during maize leaf development at the seedling stage (Loza-Tavera et al., 1990). The main difference between that system and the one studied here is that at the seedling stage leaves are expanding while during the grain filling period a net sink-source demand is established. Further, during seedling growth the leaf displays active Rubisco synthesis supported by net increments of LS and SS transcripts (Loza-Tavera et al., 1990) while at the grain filling period leaf expansion has ceased, the amount of SS transcript is almost negligible and only slight Rubisco synthesis is detected (data not shown). Such biochemical differences between vegetative and reproductive growth suggest that Rubisco activity might be regulated by different mechanisms at these two different physiological stages of the plant.

Several means for Rubisco activity regulation have been described in different species (Portis, 1992), such as the effect of stromal pH, internal CO<sub>2</sub> and Mg<sup>+2</sup> concentrations, tightly bound inhibitors or ligands for both the carbamylated (Portis, 1990) and decarbamylated Rubisco forms (Robinson and Portis, 1988), as well as posttranslational modifications of LS and SS peptides (Ferreira and Davies, 1989; Edmonson et al., 1990; Houtz et al., 1992) all of which seem to be part of an overall system for *in situ* Rubisco activity regulation. A mechanism for Rubisco activity regulation by Rubisco activase has also been suggested (Robinson et al., 1988). This mechanism proposes that Rubisco activase releases RuBP and/or other tightly bound inhibitors or ligands from inactive Rubisco complexes, leading to the CO<sub>2</sub>-Mg<sup>+2</sup> activable Rubisco form. The experimental data obtained in the present work lend support to this mechanism, and provides an explanation for the differences on Rubisco specific activities found in two maize populations which contain similar amounts of Rubisco protein during most of the grain filling period (Fig 3B), about 3 fold differences in Rubisco activity between them (Figs. 2). On the other hand, Rubisco activase levels were larger for Z20 than for Z0 particularly within the first part of the filling period (Fig. 4B) when the differences observed in Rubisco activity were most noticeable between the populations, suggesting that the Rubisco activase concentration might be the limiting factor for Rubisco activation in the leaf. This interpretation is further supported by the results obtained for Z0 leaf activated extracts supplemented by different Rubisco activase concentrations and ATP generating system (Fig 6). At late stages of the filling period Rubisco activity in the leaves has declined (Fig. 2), exogenous addition of Rubisco activase and ATP generating system, however, induced significant increments of Rubisco activity (Fig. 6). Since the samples used in this experiment were previously activated by CO<sub>2</sub> and Mg<sup>+2</sup>, these data seem to indicate that the inactive Rubisco protein present in maize leaves might be still activable depending on the availability of Rubisco activase and ATP in the system.

Base on the above data we conclude that Rubisco activase might play a relevant role in the leaves of maize plants during the filling period, where its concentration could be a limiting factor for full expression of Rubisco activity.

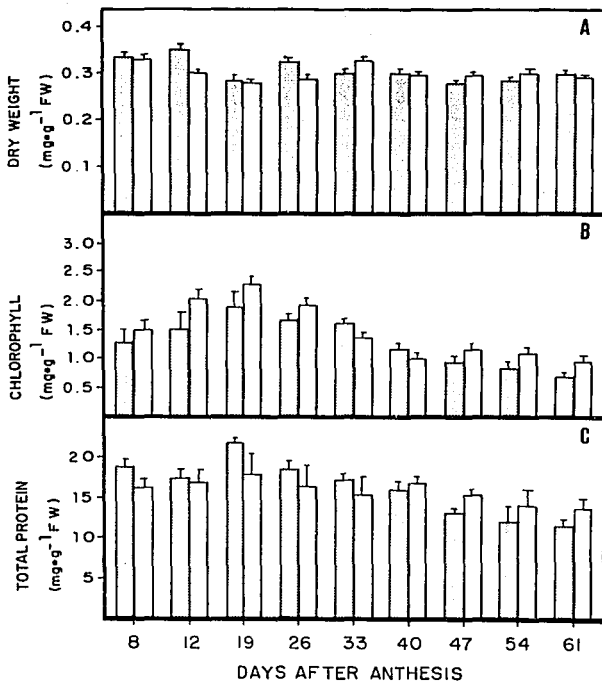
#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. Jorge Sarquís, for English revision of the manuscript and Guillermo González for helping to format it. E.M.B. gratefully acknowledges CONACYT for graduate scholarship during the development of this study. This work was partially supported by UNAM, DGAPA Program: grant No. IN-205389.

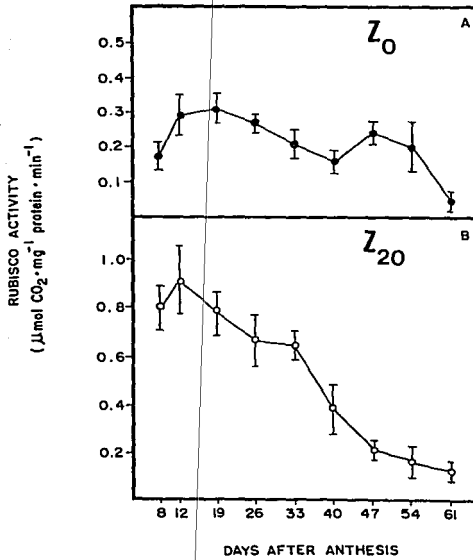
## REFERENCES

- Andrews, T.J., Lorimer, G.H. 1987: structure, mechanisms, and prospects for improvement. In *The Biochemistry of Plants*, Edited by M.D. Hatch and N.K. Boardman, Academic Press, London. Vol. 10, pp. 131-218. ISBN 0-12-675410-1
- Baer, G.R., Schrader, L.E. 1985. Relationships between CO<sub>2</sub> exchange rates and activities of pyruvate, Pi dikinase and ribulose biphosphate carboxylase, chlorophyll concentrations and cell volume in maize leaves. *Plant Physiol.* 77: 612-616.
- Beisiegel, U. 1986. Review: Protein blotting. *Electrophoresis* 7: 7-18.
- Bruinsma, J. 1963. The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. *Phytochem. and Phytobiol.* 2: 241-249.
- Crafts-Brandner, S.J., Poneleit, C.G. 1987. Carbon dioxide exchange rates, ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities, and kernel growth characteristics of maize. *Plant Physiol.* 84: 255-260.
- Ferreira, B.R., Davies, D.D. 1989. Conversion of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase to an acidic and catalytically inactive form by extracts of osmotically stressed Lemna minor fronds. *Planta* 179: 448-455.
- Houtz, R.L., Poneleit, L., Jones, S.B., Royer, N., Stultz, J.T. 1992. Posttranslational modifications in the amino-terminal region of the large subunit of Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase from several plant species. *Plant Physiol.* 98: 1170-1174.
- Jordan, D.B., Chollet, R. 1983. Inhibition of Ribulose biphosphate carboxylase by substrate Ribulose-1,5-biphosphate. *J. Biol. Chem.* 258(22): 13752-13758.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of phage T4 head. *Nature* 227: 680-685.
- Lorimer, G.H., Badger, M.R., Andrews, T.J. 1976. The inactivation of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism and physiological implications. *Biochemistry* 15: 415-442.
- Loza-Tavera, H., Serrano, B., Molina, J.D., Ortega-Delgado, M.L., Sánchez-de-Jiménez, E. 1987. CO<sub>2</sub>-fixation enzymes in maize (Zea mays) and grain yield. *Can. J. Bot.* 65: 607-611.
- Loza-Tavera, H., Martínez-Barajas, E., Sánchez-de-Jiménez, E. 1990. Regulation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase expression in second leaves of maize seedlings from low and high yield populations. *Plant Physiol.* 93: 541-548.
- Martínez-Barajas, E., Villanueva-Verduzco, C., Molina-Galán, J., Loza-Tavera, H., Sánchez de Jiménez, E. 1992. Relation of RUBISCO to grain yield improvement of maize. Effect of water restriction. *Crop. Science* 32: 718-722.
- Mc Curry, S.D., Pierce, J., Tolbert, N.E., Orme-Johnson, W.H. 1981. On the mechanism of effector-mediated activation of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *J. Biol. Chem.* 256: 6623-6628.
- Peterson, G.L.A. 1977. Simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 82: 967-971.

- Portis, A.R. Jr 1992. Regulation of Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 415-437.
- Portis, A.R. Jr 1990. Rubisco activase. *Biochem. Biophys. Acta* 1015: 655-659.
- Robinson, S.P., Portis, A.R. Jr 1988. Release of the nocturnal inhibitor, carboxyarabinitol-1-phosphate, from ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase by Rubisco activase. *FEBS Lett.* 233: 413-416.
- Robinson, S.P., Streusand, J.V., Chatfield, J.M., Portis, R.A. Jr 1988. Purification and assay of Rubisco activase from leaves. *Plant Physiol.* 58: 1008-1014.
- Salvucci, M.E., Werneke, J.M., Ogren, W.L., Portis, A.R. Jr 1987. Purification and species distribution of Rubisco Activase. *Plant Physiol.* 84: 930-936.
- Salvucci, M.E., Portis, A.R. Jr, Ogren, W.L. 1986. Light and CO<sub>2</sub> response of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 80: 655-659.
- Seemann, J.R., Berry, J.A., Freas, S.M., Krump, M.A. 1985. Regulation of ribulose bisphosphate carboxylase activity *in vivo* by a light-modulated inhibitor of catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 8024-8028.
- Seemann, J.R., Badger, M.R., Barry, J.A. 1984. Variations in the specific activity of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase between species utilizing different photosynthetic pathways. *Plant Physiol.* 74: 791-794.
- Tanaka, A., Yamaguchi, J. 1972. Dry matter production, yield components and grain yield of the maize plant. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ* 57: 71-132.
- Wishnick, M., Lane, D.M. 1971. Ribulose biphosphate carboxylase from spinach leaves. In: *Methods in Enzymology*. Vol. XXIII, Edited by A San Pietro, Academic Press, pp. 570-577

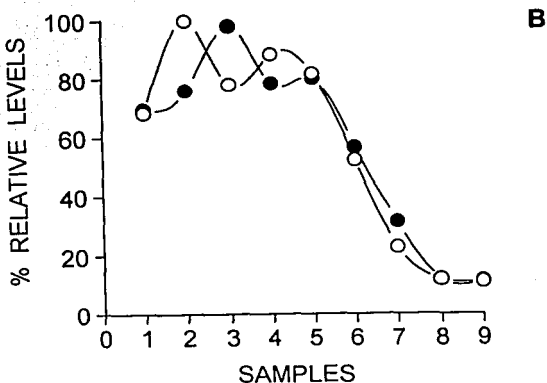
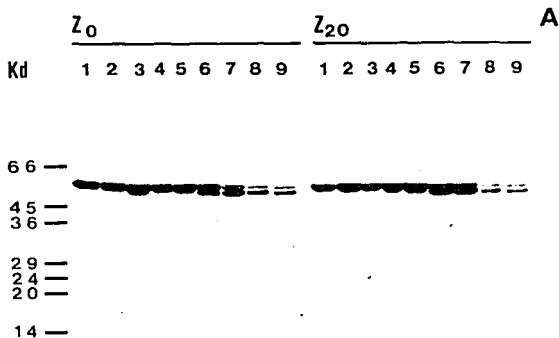


**Figure 1.** Basic physiological parameters of maize leaves. A) Dry weight, B) chlorophyll and C) total protein of leaf above the ear. Samples were taken weekly between 8 and 61 days after anthesis. Chlorophyll and protein were measured as indicated (see Materials and Methods). Each bar represents the mean of three different experiments (■) Zo population; (□) Z20 population. Bars indicate standard deviation.

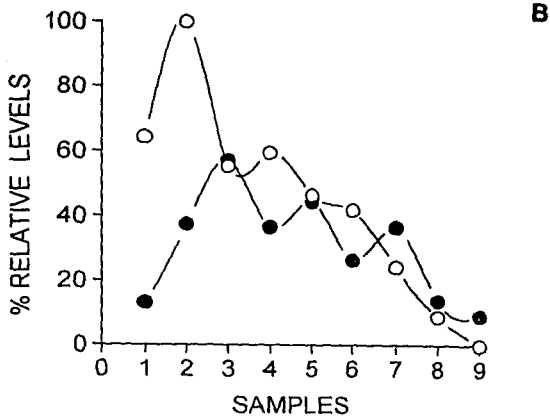
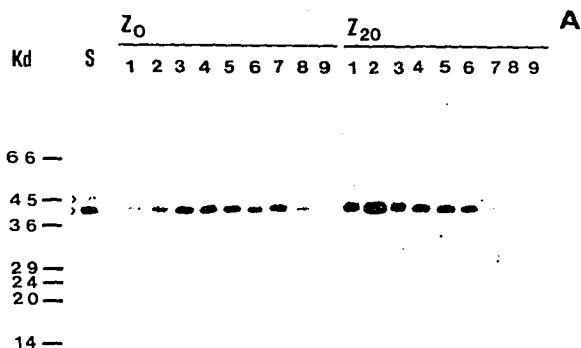


**Figure 2. Rubisco activity of the leaf above the ear of maize plants during the grain filling period.** Rubisco activity was measured after leaf extract activation with CO<sub>2</sub> and Mg<sup>+2</sup> from both populations (A - Z<sub>0</sub> and B - Z<sub>20</sub>). Values are  $\mu\text{mol CO}_2$  fixed per min per mg of soluble protein. Each point represents the average of three independent experiments and bars indicate standard deviation.

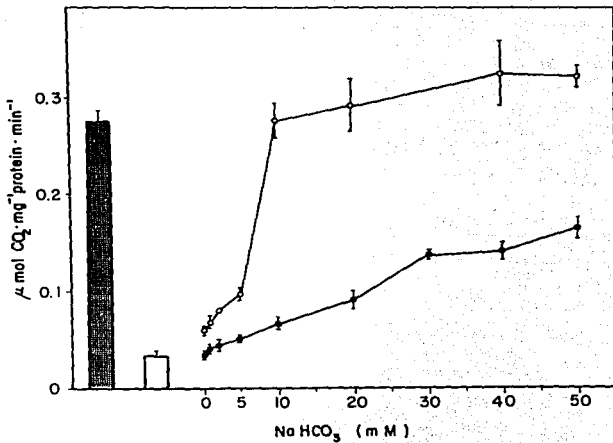




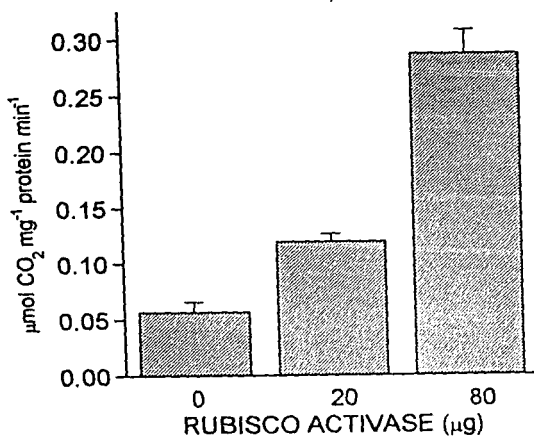
**Figure 3. Western-blot analysis for Rubisco-LS in maize leaf extracts.** A) Maize leaf extracts were sampled weekly during the grain filling period: from 8 DAA (1) to 61 DAA (9). Extracts (35  $\mu$ g of soluble protein) were gel electrophoresed, blotted and tested vs spinach LS Rubisco antibody and revealed by peroxidase conjugated second antibody. B) Densitometric quantifications of Rubisco-LS. The blots were scanned by a densitometer and the estimation was made taken as 100% the darker spot for both populations. (●)  $Z_0$  population; (○)  $Z_{20}$  population. For the last four samples only the correct molecular weight band (55 Kd) was considered.



**Figure 4. Western-blot analysis for Rubisco activase in maize leaf extracts.** A) Maize leaf extracts were sampled weekly during the grain filling period: from 8 DAA (1) to 61 DAA (9). Extracts (35  $\mu$ g of soluble protein) were blotted onto nitrocellulose membranes and Western blot analysis was performed using spinach Rubisco activase antibodies. Second antibody peroxidase conjugate was used to develop the cross-reacting bands. S-spinach leaf extract (control). Arrows indicate the two bands of spinach Rubisco activase. B) Densitometric quantifications of maize Rubisco activase. The blots were scanned by a densitometer and the estimation was made taken as 100% the darker spot for both populations. (●)  $Z_0$  population; (○)  $Z_{20}$  population.



**Figure 5. Recuperation of Rubisco activity from Rubisco-RuBP inactive complex.** Rubisco activity was measured in CO<sub>2</sub>-Mg<sup>+2</sup> activated maize leaf extract before (▨) and after RuBP inhibition (□). Rubisco activity recuperation from leaf extract RuBP inactivated from Z<sub>0</sub> population was determined after reactivation with different CO<sub>2</sub> concentrations in presence (○) or absence (●) of spinach Rubisco activase. All samples contained 10 mM Mg<sup>+2</sup> (see Methods). Values correspond to average of at least 3 independent determinations. Vertical bars stand for standar deviations.



**Figure 6. Rubisco activation in maize leaf extracts by Rubisco activase and ATP generating system.** Leaf extracts from Z<sub>0</sub> populations at late stage of the filling period were activated by 10 mM NaHCO<sub>3</sub> and 10 mM Mg<sup>+2</sup> and further treated the ATP generating system and varying concentrations of Rubisco activase. Rubisco activity was determined in the samples as indicated in Methods. Values correspond to average of at least 3 independent determinations. Vertical bars stand for standar deviations.

VI.2. Artículo 2:

"Rubisco activase, possible new member of the molecular chaperone family".

**RUBISCO-ACTIVASE, POSSIBLE NEW MEMBER OF THE MOLECULAR CHAPERONE  
FAMILY**

Estela Sánchez de Jiménez\*, Luis Medrano#, Eleazar Martínez-Barajas\*. Departamento de Bioquímica\*, Facultad de Química, and Departamento de Biología#, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, 04510, D.F. México.

**To whom reprint request should be addressed:** Estela Sánchez de Jiménez, Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Lab. 103, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, 04510, D.F. México.  
Phone 622-53-33. Fax 622-53-29.

**Running title:** Rubisco-activase as molecular chaperone.

**Key words:** Heat-inactivated Rubisco, Molecular chaperone, Protein assembly, Rubisco-activase.

## SUMMARY

The present research addresses the question of whether Rubisco-activase (R-A), the enzyme reported to activate Rubisco, is actually a molecular chaperone, rather than a conventional enzyme.

Several biochemical characteristics known to be distinctive of molecular chaperones were also tested for R-A with positive results. They were: a) activation of Rubisco by an R-A ATP-hydrolysis dependent process, b) R-A preferential binding to no-native Rubisco protein and release from it after ATP addition, and c) increase of R-A content by heat shock. Further, addition of R-A and energy source to heat-inactivated Rubisco resulted in a large recovery of Rubisco activity. We concluded that R-A characteristics closely resemble molecular chaperones. The possible relevance of R-A in the maintenance of Rubisco activity *in vivo* is discussed.

## INTRODUCTION.

The concept of molecular chaperone has been established as a result of advances on protein assembly research (Ellis and van der Vies, 1991). This term is functional and has been applied to a class of unrelated families of protein that assist the correct non-covalent assembly of many other polypeptides, but which are not components of these assembled structures when they are performing their normal biological function (Rothman and Kornberg 1989; Gatenby and Ellis, 1990, Ellis, 1993). The term assembly also includes changes in the degree of either folding or association that may occur when proteins carry out their functions, are transported across membranes, or are destroyed after stresses such as heat shock (Ellis, 1993). The discovery that Rubisco large subunit-binding protein (LSbp) is homologous to the prokaryotic GroEL heat shock protein (Hemmingsen *et al.*, 1988) led to the definition of a distinct group of molecular chaperones, named chaperonins. These proteins are widely represented in bacteria, mitochondria, and plastids (Martelet *et al.*, 1990; Gatenby, 1992). The relevance of chaperonins in Rubisco assembly was demonstrated in engineered bacterial systems where the expression of prokaryotic Rubisco genes produced active enzyme only when over-expression of GroEL and GroES chaperonins occurred (Goloubinoff *et al.*, 1989 a and b). However, fully active plant Rubisco enzyme has not been efficiently accomplished in bacterial cells, even though the products of both genes are expressed in the prokaryotic system (Gatenby *et al.*, 1987). This might be due to the absence of the correspondent plant chaperonin in the prokaryotic cells.

On the other hand, a plant enzyme called Rubisco-activase (R-A) has recently been described. This protein is capable of restoring Rubisco activity from the inactive Rubisco-RuBP complex, releasing free Rubisco activable form and allowing Rubisco carbamylation (Robinson *et al.*, 1988). Certain aspects of the mode of action of this protein, however, lead us to consider the possibility that R-A might not be a conventional enzyme but a molecular chaperone. This postulate is based on the important Rubisco conformational changes reported to occur in the Rubisco molecule through its activation-inactivation process (Bowien and Gottschalk, 1992). It is also based on the observation that some characteristics of molecular chaperones (Ellis and van der Vies, 1991) seem to be shared by R-A, such as ATP requirement for display Rubisco activation and its large concentrations in leaves of green plants (Salvucci *et al.*, 1987). In addition, we have found that R-A does not follow conventional enzyme kinetics but must reach non-catalytic concentrations to perform Rubisco activation. In light of the above observations, we have designed an experimental approach to confirm that R-A as a molecular chaperone.

## RESULTS.

Binding of RuBP to Rubisco protein, before CO<sub>2</sub> activation inhibits its activity which can be restored by R-A and ATP generating system. Figure 1 shows how addition of RuBP to maize leaf extract causes 90 % inhibition of Rubisco activity. Addition of large amounts (up to 50 mM) of NaHCO<sub>3</sub> to the system can only partially recover Rubisco activity (Fig. 1A). On the other hand, the same inhibited leaf extract treated with R-A and ATP regenerating system in the presence of 10 mM NaHCO<sub>3</sub> fully recuperates the original Rubisco activity. These data suggest that R-A efficiently restores original Rubisco conformational active form by interacting with the Rubisco-RuBP inactive complex in an ATP hydrolysis dependent manner (Fig. 1B). This particular mode of R-A action resembles the chaperones behaviour rather than the behaviour of conventional enzyme. Following this rationale, several experiments were designed to test the possibility that R-A function as a molecular chaperone. Since many molecular chaperones are known to increase their concentration after cells have been heated maize seedlings were exposed to 45°C during 4 h followed by an 18 h recovery period at room temperature. *E. coli* culture received the heat shock treatment for 15 min. *E. coli* and leaf extracts, from different times within the experimental period, were analyzed by gel electrophoresis and Western blot. Recognition of heat shock proteins was performed in the leaf extracts by GroEL antibody and in the bacterial extract. The respond of *E. coli* was used as a control (Fig. 2A).



Increasing concentrations of cross reacting hsp proteins were found after 2 to 4 h of heat shock application followed by restoration of the original levels during the recovery period (Fig. 2A). Similarly, R-A cross reacting bands were revealed by spinach R-A antibodies in the same nitrocellulose sheets (Fig. 2B). The seedling leaf extracts, before heat shock treatment, showed one 41 kDa R-A cross reacting band. As heat shock progressed, this band increases and a second heavier R-A band (43 kDa) appeared. During the recovery period, the heavier R-A band slowly disappeared while the intensity of the 43 kDa R-A band decreased until basal levels were reached at 18 h of recovery (Fig. 2B). In parallel, Rubisco activity was measured on the same leaf samples tested for heat shock and R-A proteins. Rubisco activity was found to increase during the heat shock period in similar fashion as the R-A protein and also returned later to basal levels at the end of the recovery period (Fig. 3).

Proteins in unfolded or partially folded states can form stable binary complexes with chaperones. In order to verify the strength and specificity of the R-A:Rubisco complex, experiments were performed where interaction of either native or non-native (desalted and heat-inactivated) Rubisco with R-A was allowed. Antibodies against Rubisco were then added to the Rubisco:R-A mixture in presence or absence of ATP generating system and allowed to react for 15 min at 25°C. The immunoprecipitated proteins were separated by centrifugation with protein-A sepharose and analysed by Western blot, using R-A antibodies. The results showed that the two R-A bands coprecipitated with both native and non native Rubisco samples, although in less amount with the native sample, when ATP was not present in the mixture (lanes 4 and 5, Fig. 4B). On the other hand, the samples that received the ATP treatment showed only slight or non R-A coprecipitation, particularly the non-native sample (lanes 6 and 7, Fig. 4B). These data confirms the formation of a tight Rubisco:R-A complex formed when these two proteins are mixed. This complex, however, can be easily separated if ATP is generated in the system (Fig. 4B), similarly as has been documented for many molecular chaperones.

Finally, an experiment was performed to test the R-A capacity to restore Rubisco activity lost by alteration of the native protein conformation. To this end, purified spinach Rubisco was filtered through G-50 column (to devoid Rubisco of small molecules and ions:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{Mg}^{++}$ , RuBP, that stabilize the enzyme) and heat-inactivated at 55°C for one hour. Measurements of Rubisco activity in these samples indicated that after the treatment only approximately 35% of the original activity remained in the Rubisco samples.

To have an indication of the importance of the conformational changes caused by the desalting and heat treatment, the amount of titrable -SH residues in the protein was determined following the time course reaction of Rubisco with DTNB reagent. A clear diminution in -SH reactivity was observed in the treated sample as compare with the results from the native Rubisco sample (Fig. 5). This difference is an indication of net conformational change on the Rubisco protein caused by the desalting-heat treatment.

Another indication of structural alteration of the treated Rubisco protein was obtained by filtration of Rubisco samples through Ultrogel ACA-24 column. In this experiment both native Rubisco and heat-inactivated Rubisco showed different elution mobilities, being ahead the inactivated than the native sample (Fig. 6). The apparent molecular weight of the non-native sample was displaced from 550 up to approximately 700 kDa suggesting a change on protein structural conformation.

The role of molecular chaperones protein on restoring native protein structure -and therefore function-constitutes the main characteristic of these proteins. To test R-A function within this context, experiments on recuperation of Rubisco activity from heat-inactivated Rubisco sample were performed. To this end, Rubisco activity was determined in both native Rubisco (control) and inactivated Rubisco (after desalting and heat treatment), then the effect of increasing concentrations of  $\text{NaHCO}_3$  on Rubisco activity recuperation was tested. Rubisco activity remained low and no signs of recuperation were observed even at concentrations as high as 50 mM  $\text{NaHCO}_3$  (Fig. 7). On the other hand, the same Rubisco samples treated with ATP generating system and increasing R-A concentrations showed a clear Rubisco activity recuperation (Fig.8). As observed in this figure, Rubisco activity is recuperated as a function of R-A concentration. Recovery of activity up to 100% of the values obtained in the native sample was achieved.

## DISCUSSION.

The data presented here provide evidence that R-A shares functional characteristics with some of the previously reported molecular chaperones. As described above molecular chaperone comprises groups of unrelated protein families that assist other proteins in correct assembly (Ellis, 1993). In the present case, the complex regulatory process of Rubisco activity by its substrates involves important Rubisco conformational changes (Bowien and Gottschalk, 1992). Indeed, Rubisco acquires the active carbamylated form by allosteric interaction with CO<sub>2</sub> while the other substrate down regulates the enzyme through the formation of an inactive Rubisco-RuBP complex (Portis, 1986). Restoring Rubisco activity, and the consequently original conformational form, from this complex requires Rubisco activase (R-A) action through an ATP hydrolysis-dependent process (Fig.1) (Robinson *et al.*, 1988) in a manner that resembles the process of molecular chaperones assisting restoration of native protein conformation (Goloubinoff *et al.*, 1989b; Skowyrza *et al.*, 1990). Further support for this statement is provided by data in the literature and our own observations.

Both protein types, R-A and molecular chaperones, are widely distributed in large amounts in living organisms (Ellis and van der Vies, 1991). Some are constitutively expressed (Parsell and Lindquist, 1993) but many of them, including R-A, respond to heat shock induction (Jaenicke and Creighton 1993) (Fig. 2). In the latter case, it is interesting to note that Rubisco activity was protected and even increased in heat shocked plants concomitant to R-A increases. Moreover, recognition between molecular chaperones and their target proteins do not require precise amino acid sequences. Rather, it seems to be based on protein-protein interaction types (Rothman and Kornberg, 1989) that allow them to tightly associate with their target proteins for chaperone-assisted refolding (Ellis and van der Vies, 1991). Addition of an ATP generating system to these protein-complexes allows molecular chaperone release (Gatenby, 1992) and was similarly demonstrated to occur on the R-A: Rubisco complex (Fig. 4). Finally, the strongest evidence to define R-A as a molecular chaperone is provided by the experiment on Rubisco-restored activity from the heat-inactivated enzyme. Actually, purified Rubisco protein, altered in its conformational structure as well as in its activity by the desalting-heat treatment (Figs. 5 to 7), completely recovered its original activity after R-A and ATP treatment (Fig. 8), as has also been demonstrated for other molecular chaperones when restoring heat- or high salt-inactivated enzymes (Goloubinoff, 1989b; Skowyrza *et al.*, 1990). Full restoration of Rubisco activity after heat-inactivation was achieved, however, only after an excess concentration of R-A was reached (Fig. 8). If under this condition, R-A/Rubisco ratio is calculated in relation to the molecular weights for each of the involved proteins, it shows that approximately 30 R-As (41 to 43 kDa) per molecule of Rubisco (550 kDa) are required. This ratio is consistent with the mechanism reported for other molecular chaperones, which indicates that these proteins surround the chaperone-assisted protein in order to achieve the desired conformational structure (Saibil *et al.*, 1993).

It has recently been recognized that different types of chaperones seem to intervene at different steps of the refolding protein process. Some are involved in the initial steps of peptide folding while others might be closely related to final peptide assembly to accomplish tertiary or quaternary protein structure (Langer *et al.*, 1992). Within this context, chaperone function is now being considered not only related to folding nascent peptides and protein assembly, but also to stabilizing, protecting and repairing protein structures that have been disrupted during normal protein performance in living cells or by environmental stresses (Ellis, 1993; Chitnis and Nelson, 1991). Within this view, LS Rubisco binding protein and R-A could be seen as participant chaperones at early and late steps in Rubisco assembly. In particular, R-A might be required at the end of the assembly process for restoring Rubisco conformation altered by unfavorable environmental conditions and/or from an excess of endogenous RuBP. In this regard, it is worthwhile to mention results from previous studies performed during maize grain fill, which is a period of strong photosynthate demand. A significant increment of Rubisco activity was found in the leaf above the ear which was not associated to an increase in Rubisco protein but with the leaf R-A content (manuscript in preparation). During this period of very low Rubisco turn-over, lasting about 60 days, a chaperone-mediated step allowing re-naturation of Rubisco functional form might be of physiological relevance. Work is being performed in our laboratory to further test this hypothesis.

## METHODS.

**Biological material.** Maize seeds (*Zea mays* L. Cv Zacatecas 58, provided by Dr. J. Molina, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Edo. México) were grown in a greenhouse. The second fully expanded leaf 10 days after sowing was used. Frozen leaves (approximately 1g), were ground under liquid nitrogen in a chilled mortar and the powder was homogenized with 2 ml of extraction buffer (50 mM Tricine-NaOH (pH 7.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM ATP, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 mM benzamidine and 0.01 mM leupeptin). The extracts were clarified by centrifugation at 15,000g for 5 min at 4°C. The supernatant was saved and used for experimental measurements (leaf extract). For heat shock experiments the seedlings were treated at 45°C for 4 hours in a growth chamber (Labline Instruments, Inc.) at 90% relative humidity. For control experiments we used the *E. coli* culture (strain MC 1061) was grown in LB medium (GIBCO, BRL) at 27°C and exposed to 42°C for 15 min. Heated and non heated cultures were collected by centrifugation, washed and resuspended in a buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM glucose and 10 mM EDTA and lysed at 4°C by addition of 4 mg/ml lyzosome. Five minutes later, the lysate was diluted with the same volume in ice cooled buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 % SDS, 0.5 % DOC, 1 % NP40, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM DTT and 1mM PMSF), and centrifuged 10 min at 10,000g at 4°C. The supernatant was used as a control for the heat shock experiments.

**Rubisco and Rubisco activase purification.** Approximately 100 g of spinach leaves were ground under liquid nitrogen in a chilled mortar and the powder was homogenized with 200 ml of extraction buffer (100 mM BTP pH 7.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1.4 mM ATP, 15 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 mM benzamidine and 0.01 mM leupeptin). Rubisco and Rubisco activase were purified according to the procedure reported by Robinson *et al.*, (1988).

**Rubisco assay.** Rubisco carboxylase activity was measured by the <sup>14</sup>C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> fixation method: five ml aliquots of leaf extract were used as the source of enzyme, mixed with 60 ml of the assay mixture (100 mM Tricine-NaOH (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> (New England 100 mCi/mmol, 1 Ci = 37 GBq), and 0.5 mM RuBP). The assay was run for 0, 20, 40 and 60 seconds at 25°C, stopped by addition of 200 ml 3N HCl in methanol, and dried at 65°C. The incorporation of <sup>14</sup>C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> into acid-stable products was determined by liquid scintillation spectrometry (Packard instruments). The total activity was calculated from the slope of the reaction values.

**Rubisco activase assay.** This assay was performed by reactivation of the inactive Rubisco-RuBP complex reaction (Werneke and Ogren, 1988). Maize leaf extract was desalted by gel filtration in a sephadex G-25 column (20x0.5 cm) equilibrated with 50 mM tricine-NaOH (pH 8.0). For the formation of Rubisco-RuBP complex, the filtered enzyme (1mg/ml) was incubated in 1.5 mM RuBP as a final concentration for 30 min at 4°C. The Rubisco reactivation assay mixture (100 ml) contained 50 mM tricine-KOH (pH 8.0), 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM RuBP, 1 mM ATP, 3 mM creatine phosphate, 20 u/ml creatine kinase and 1 mg/ml BSA, 64.5 mg Rubisco-RuBP complex and 15 mg of purified spinach R-A. R-A was added 1 min before initiating the reaction at 25°C with Rubisco-RuBP complex and Rubisco activity was measured 15 min later.

**Reactivation of heat inactivated Rubisco by R-A.** Purified spinach Rubisco was desalted through G-50 column (20 x 0.5 cm) equilibrated with 50 mM Tricine-NaOH (pH 8.0) and the solution (2 mg/ml) was heated for 1h at 55°C. After this treatment Rubisco lost about 65% of the original activity. For restoring Rubisco activity, 20 mg of this Rubisco sample was mixed with varying amounts of R-A in a reactivation mixture contained 50 mM tricine-NaOH (pH 8.0), 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 3 mM creatine phosphate, 20 u/ml creatine kinase and 1 mg/ml BSA. R-A was added 1 min before initiating the reaction at 25°C, and 15 min later, Rubisco activity was measured.

**Interaction between Rubisco and R-A e immunoprecipitation.** Purified spinach Rubisco samples (either heat-inactivated or native) were mixed with R-A and incubated in the reaction mixture described above for R-A reactivation of heat-inactivated Rubisco. For some samples ATP was omitted from the mixture. The reaction was stopped with 200 ml of buffer A (10 mM tricine pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% NP40, 1 mM PMSF and 15 mM leupeptine) and addition of 30 ml of polyclonal Rubisco antibodies. The

mixture was allowed to stand overnight at 4°C. Then the samples were supplemented with 20 ml of protein A-sepharose, incubated for two more hours at 25°C and the immunoprecipitate was collected by centrifugation, dissolved in 20 ml of sample loading buffer and analyzed by SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The gel was stained with Coomassie blue. Other gels were immunoblotted onto nitrocellulose sheets for Western blot analysis and revealed by R-A antibodies.

**Modification of sulfhydryl groups with DTNB.** Native and heat-denatured Rubisco samples were used to measure enzyme sulfhydryl groups modification with DTNB reagent according to Chollet and Anderson (1977). Increase in absorbance at 412 nm of 2-nitro-5-thiobenzoate liberated ( $E=13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) was followed spectrophotometrically. The assay tubes contained 50 mM Tris (pH 7.4), 67 mM NaCl, 1.1 mg of purified Rubisco, 100 mM DTNB in a final volume of 1.0 ml. Following 5 min preincubation at 25°C, the reaction was initiated with DTNB addition and  $\Delta A_{412}$  was monitored over a 30 min period. Controls without DTNB were also performed.

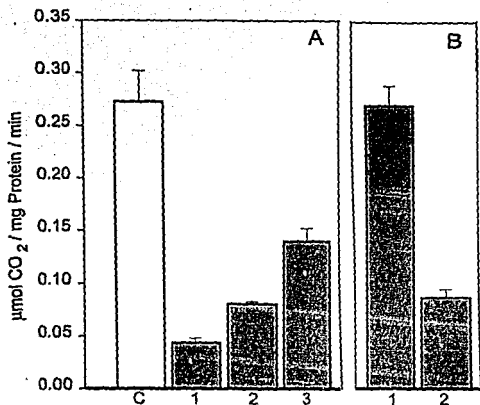
**Immunoblotting.** Protein samples were immunoblotted onto nitrocellulose sheets at 50 mA for 2.5 h using a semi-dry blotting apparatus (LKB, Bromma, Sweden). After protein transfer, the blots were processed according to Ferreira and Shaw (1989). The membranes were probed with anti-spinach R-A mouse antibody (kindly donated by Dr. W.L. Ogren, University of Illinois, USA) and rabbit anti-GroEL 1:1200 (kindly donated by Dr. David Gobezensky, Weizmann Institute of Science, Israel). Antibody peroxidase-conjugate was diluted 1:400 for R-A and 1:1500 for GroEL was applied as second antibody. The blots were developed with the ECL system (Amersham).

**Other Procedures.** Molecular weight was estimated in an Ultrogel ACA-24 column (90x0.5 cm) equilibrated with Tricine 50 mM (pH 8.0). Protein determinations were made by the Bradford method (1976) using BSA as standard. SDS-PAGE was performed in 10 % acrylamide gels according to Laemmli's method (1970) and stained with Coomassie blue.

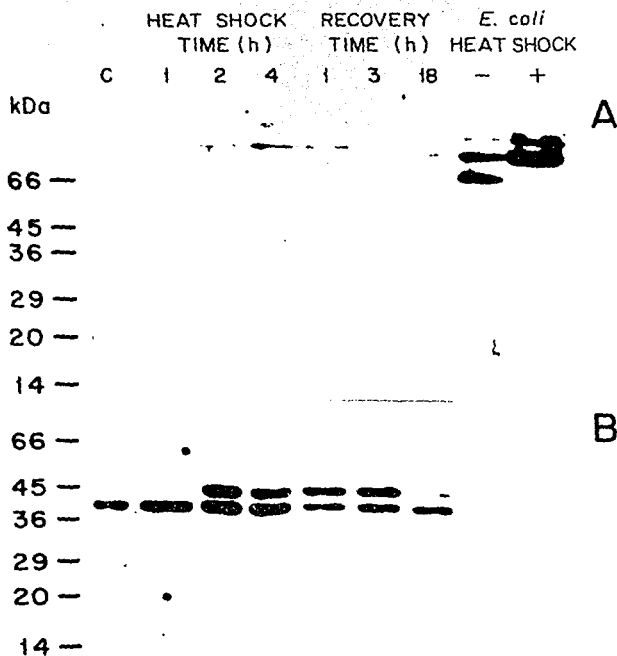
## REFERENCES

- Bowien, B. and Gottschalk, E.-M. (1992). Influence of the sedimentation properties of Ribulose biphosphate from *Alcaligenes eutropus*. *J. Biol. Chem.* **257**: 11845-11847.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 246-254.
- Chitnis, P.R. and Nelson, N. (1991) molecular cloning of the genes encoding two chaperone proteins of the *Cyanobacterium synechocystis* sp PCC6803. *J. Biol. Chem.* **266**(1): 58-65.
- Chollet, R. and Anderson, L.L. (1977) Conformational changes associated with the reversible cold inactivation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase *Biochim. Biophys. Acta* **482**: 228-240.
- Ellis, R.J. (1993) The general concept of molecular chaperones. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.* **339**(1289): 257-261.
- Ellis, R.J. and van der Vies, S.M. (1991) Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 321-347.
- Ferreira, B.R. and Shaw, M.N. (1989) Effect of osmotic stress on protein turnover in *Lemna minor* fronds. *Planta* **179**, 456-465.
- Gatenby, A.A. (1992) Protein folding and chaperonins. *Plant Mol. Biol.* **19**, 677-687.
- Gatenby, A.A. and Ellis, R.J. (1990). Chaperone function; the assembly of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *Annu Rev. Cell Biol.* **6**, 125-149.
- Goloubinoff, P., Gatenby, A.A. and Lorimer, G.H. (1989a) GroE heat shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomerase in *Escherichia coli*. *Nature* **337**, 44-47.
- Goloubinoff, P., Christeller, J.T., Gatenby, A.A. and Lorimer, G.H. (1989b) Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* **342**, 884-889.
- Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W. and Ellis, R.J. (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* **333**, 330-334.
- Jaenicke, R. and Creighton, E.T. (1993). Junior chaperones. *Curr. Biol.* **3**, 234-235.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, K.M. and Hartl, U.F. (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**, 683-689.
- Martel, R., Cloney, L.P., Pelcher, L.E. and Hemmingsen, S.M. (1990) Unique compositional of plastid chaperonin-60: a and b polypeptide encoding genes are highly divergent. *Gene* **94**: 181-187.
- Portis, A.R. Jr., Salvucci, M.E. and Ogren, W.L. (1986) Activation of Ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase at physiological CO<sub>2</sub> and Ribulose bisphosphate concentrations by Rubisco activase. *Plant Physiol.* **82**, 967-971.

- Robinson S.P., and Portis A.R. Jr. (1989) Adenosine triphosphate hydrolysis by purified Rubisco activase. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**: 93-99.
- Robinson, S.P., Streusand, V.J., Chatfield, J.M. and Portis, A.R. Jr. (1988) Purification and assay of Rubisco activase from leaves. *Plant Physiol.* **88**, 1008-1014.
- Rothman E.J. and Kornberg R.D. (1989) Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell* **59**, 591-601.
- Saibil H.R., Zheng D., Roseman A.M., Hunter A.S., Watson G.M.F., Chen S., auf der Mauer A., O'Hara B.P., Wood S.P., Mann N.H., Barnett L.K. and Ellis R.J. (1993) ATP induces large quaternary reagements in a cage-like chaperonin structure. *Curr. Biol.* **3**: 265-273.
- Salvucci, M.E., Werneke, J.M., Ogren, W.L. and Portis, A.R. Jr. (1987) Purification and species distribution of Rubisco activase. *Plant Physiol.* **84**, 930-936.
- Skowrya, D., Georgopoulos, C. and Zylicz, M. (1990) The *E. coli* DnaK gene product, the hsp 70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* **62**, 939-944.
- Werneke, J.M., Zielinski, R.E. and Ogren, W.L. (1988) Structure and expression of spinach leaf cDNA encoding ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase. *Procc. Nat. Acad. Sci. USA.* **85**, 787-791.

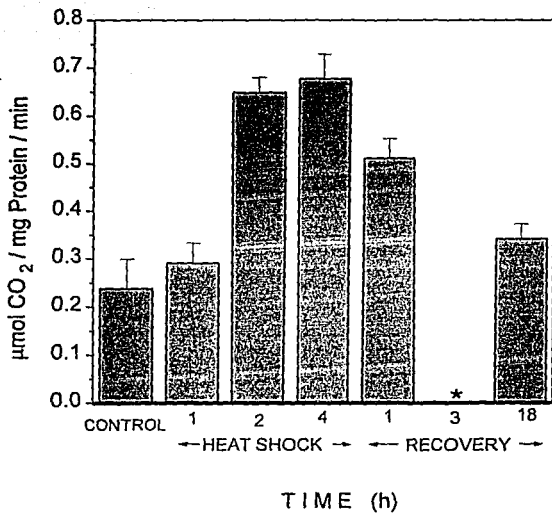


**Figure 1. Effect of R-A on inhibited Rubisco by RuBP.** Maize leaf extracts were inhibited by RuBP treatment (see Methods). Enzyme reactivation was measured either as a function of  $\text{NaHCO}_3$  addition (A) or of R-A treatment (B). Panel A: lane C, Rubisco activity in leaf extracts (control); lane 1, remaining Rubisco activity after RuBP inhibition; lanes 2 and 3, Rubisco reactivation after incubation with 10 mM or 50 mM  $\text{NaHCO}_3$ , respectively. Panel B: Rubisco activity after addition of purified spinach R-A and 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  in the presence (lane 1) or absence (lane 2) of ATP generating system. Each value represents the mean of three independent experiments. Vertical lines represent standard deviations.

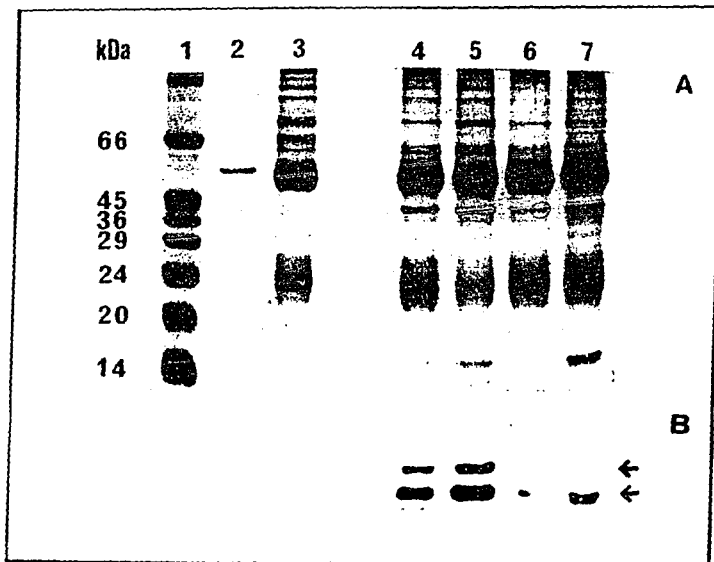


**Figure 2. Heat shock effect on GroEL-like proteins and Rubisco-activase .** Soluble protein from maize leaf and *E. coli* extracts, before and after heat shock treatment, were SDS-PAGE resolved and blotted as indicated in Methods. Antibody raised against either GroEL (A) or spinach Rubisco-activase (B) were used in the western blot. Periods of leaf heat shock: 1, 2 and 4 h at 45°C and recovery: 1, 3 and 18 h are indicated for both blots. C stands for leaf control. *E. coli* (control), before and after heat shock is also included in (A). This panel is representative of three independent repetitions.

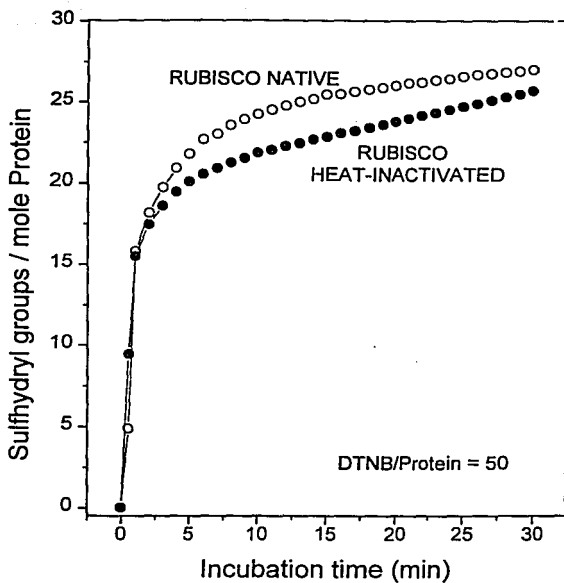




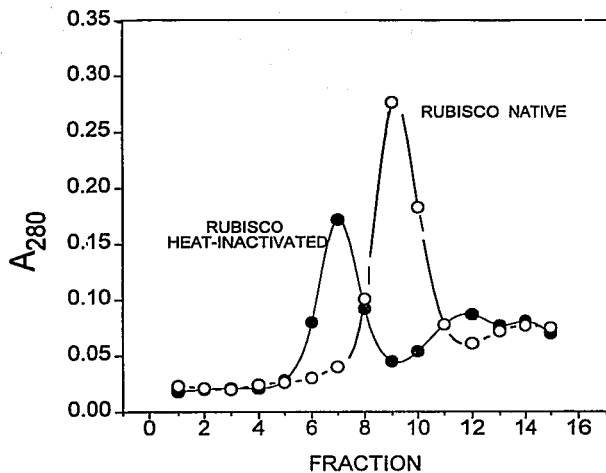
**Figure 3. Maize leaf Rubisco activity during heat shock and recovery period.** Rubisco activity measurements were performed in leaf extracts before heat shock (control), during 45°C heat shock treatment for 1, 2, 4 h and during the recovery period for 1, and 18 h. Each value represents the mean of three independent experiments. Vertical lines represent standard deviations. \* Non-determined value.



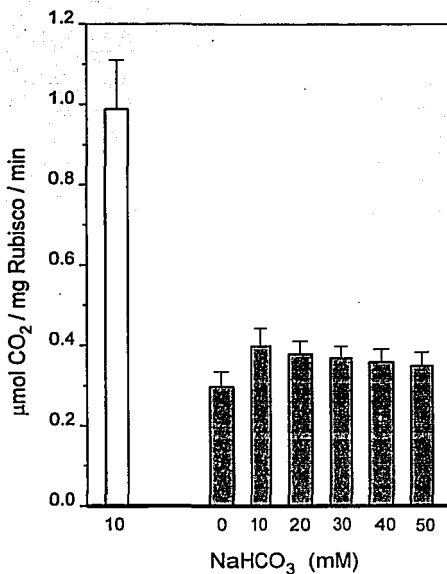
**Figure 4. Immunoprecipitation of R-A associated to Rubisco.** Either native or heat-inactivated spinach Rubisco was mixed with R-A (20mg each), and immunoprecipitated with antibodies against Rubisco. The precipitates were analysed by gel electrophoresis and stained by Coomassie blue (A) or transferred to nitrocellulose membranes for Western blot analysis using antibodies against R-A (B). Lane 1, molecular markers; lane 2, native spinach Rubisco sample; lane 3, Rubisco antibody; lanes 4-7, immunoprecipitated proteins by Rubisco antibody; lanes 4 and 6, native Rubisco and R-A mixture; lanes 5 and 7, heat-inactivated Rubisco and R-A mixture. ATP and ATP-generating system was included only in lanes 6 and 7. Arrows point to 41 and 43 kDa R-A forms (B). This plate is representative of three independent experiments.



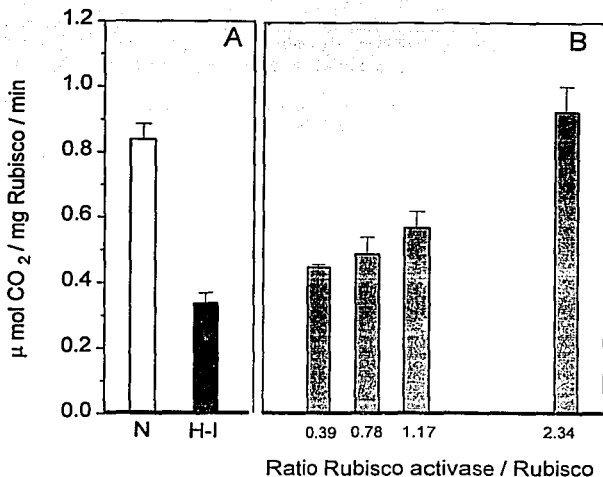
**Figure 5. Sulphydryl groups reactivity with DTNB.** Reaction of either native (○) or heat inactivated (●) purified spinach Rubisco with DTNB at 25°C. The cuvettes contained 50 mM Tris (pH 7.4), 67 mM NaCl, 1.1 mg Rubisco and 100 mM DTNB in a final volume of 1.0 ml. The reaction was initiated with DTNB and the  $D_{412nm}$  determined over a 30 min period.



**Figure 6. Filtration profile of native and heat-inactivated Rubisco.** Five mg of native (○) or heat inactivated (●) spinach Rubisco were filtered through an Ultrogel ACA-24 filtration column (see Methods). Rubisco elution was performed with 50 mM Tricine-NaOH (pH 8.0) at an effluent rate of 0.25 ml/min. Apparent molecular weights calculated from the protein mobility were 700 kDa for heat-inactivated Rubisco and 550 kDa for the native sample. This profile illustrates a representative result from three independent repetitions.



**Figure 7. Effect of CO<sub>2</sub> on heat-inactivated Rubisco activity.** Native spinach Rubisco was desalted and heat-inactivated (see Methods) and incubated for 15 min at 4°C with increasing NaHCO<sub>3</sub> concentrations. Rubisco activity was measured by the <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-fixation procedure (see methods). Native Rubisco (control □), heat-inactivated (▨). Each value represents the mean of three independent experiments. Vertical lines represent standard deviations.



**Figure 8. Reactivation of heat-inactivated Rubisco mediated by R-A.** Native spinach Rubisco (N) was filtered through a sephadex G-50 column (20 x 0.5 cm) equilibrated with 50 mM tricine-NaOH (pH 8.0) to be deionized and then heat-inactivated at 55°C for one hour (H-I). An aliquot of 20 mg of heat-inactivated Rubisco was titrated with varying R-A concentrations and 1mM ATP plus ATP regenerating system (see Methods) in a final volume of 100 ml (B). For N and H-I (controls), R-A was omitted. The reactivation assay was measured by the <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fixation method. Each value represents the mean of three independent measurements. Vertical lines represent standard deviations.

### VI.3. EL PAPEL DE LA RUBISCO ACTIVASA EN LA REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO.

Los resultados que a continuación se presentan corresponden a experimentos tendientes a establecer bajo que condiciones ocurre la inhibición de la actividad de la Rubisco por RuBP y al mismo tiempo, analizar la relevancia fisiológica de que el azúcar sea eliminado por la Rubisco activasa.

En la figura 2 se observa que los extractos de maíz después de ser desalados son fuertemente inhibidos por RuBP. El grado de inhibición es proporcional a la actividad que se logra cuando la enzima inhibida con cada una de las concentraciones señaladas de RuBP es activada con 10 mM NaHCO<sub>3</sub> y 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Como puede observarse, 1.0 mM de RuBP es suficiente para que en estas condiciones la Rubisco se inhiba en un 60%.

Se ha reportado que para la inhibición de Rubisco por RuBP se requiere la eliminación del CO<sub>2</sub> y el Mg<sup>2+</sup> (Robinson *et al.*, 1988). En la figura 3 se muestra que si la inhibición se realiza poniendo simultáneamente 1.5 mM RuBP, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 mM de NaHCO<sub>3</sub> (idénticos resultados se obtuvieron superiores de NaHCO<sub>3</sub>), este último tiene un efecto protector muy pequeño.

Si el mismo experimento se realiza en presencia de Rubisco activasa y del sistema regenerador de energía, la inhibición no ocurre (figura 3).

En este experimento sin embargo, no es posible distinguir si la ausencia de inhibición se debe a que la Rubisco activasa evita la formación del complejo Rubisco-RuBP, o bien si la Rubisco activasa disminuye la vida media del mismo.

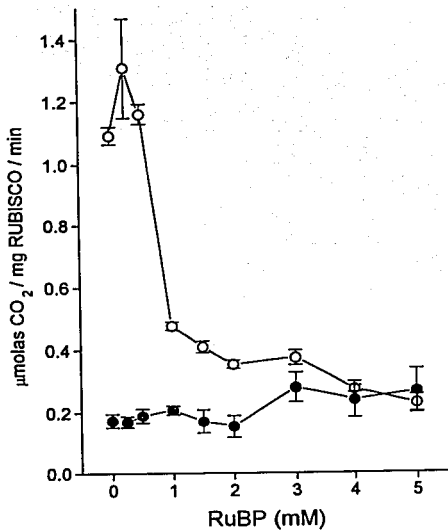
En el experimento que se presenta en la figura 4, la inhibición de la Rubisco por RuBP se hizo tanto en ausencia como en presencia de Rubisco activasa. Como puede observarse en la barra 6, no hay reactivación cuando esta se hace a partir de la Rubisco activasa endógena. En cambio, cuando la reactivación se hace agregando Rubisco activasa purificada de espinaca (barra 11), la recuperación es completa. Por otro lado, en la barra 10 se observa que la adición previa de Rubisco activasa, por sí sola, no es suficiente para evitar la inhibición de la Rubisco por RuBP.

### VI.4. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DE LA RUBISCO ACTIVASA.

El artículo 1 se aboca a establecer la importancia de la Rubisco activasa en relación a las diferencias que se observan en la regulación de la actividad de la Rubisco durante el período de llenado de los granos. Estos experimentos se llevaron a cabo con dos poblaciones genéticamente relacionadas, pero con diferencias muy importantes en su rendimiento de grano (la población original (Z<sub>0</sub>) y otra obtenida después de 20 ciclos de selección masal para aumentar el rendimiento de grano (Z<sub>20</sub>)). Algunos de los resultados que se presentan allí, son los siguientes:

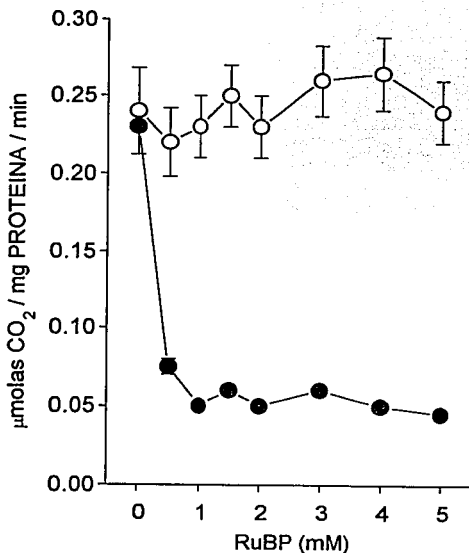
En la figura 2 se observa que durante el período estudiado la actividad de Rubisco en la población mejorada es significativamente superior a la de la población original. La figura 3 muestra que no hay grandes cambios en la concentración de la enzima. Por otro lado, en la figura 4 se presenta el análisis de los cambios en la concentración de Rubisco activasa, y como puede observarse, en los primeros dos muestreos en donde las diferencias en la actividad de ambas poblaciones son mayores, la población mejorada tiene también una concentración superior de Rubisco activasa.

La figura 5 del mismo artículo muestra que cuando la Rubisco está inhibida por RuBP el tratamiento con 10 mM NaHCO<sub>3</sub> y 10 mM MgCl<sub>2</sub> no es suficiente para activar a toda la enzima. En este experimento una alícuota del extracto fué inhibida con 1.5 mM de RuBP y después fué reactivado con diferentes concentraciones de NaHCO<sub>3</sub>. Puede observarse que cuando no hay Rubisco activasa la recuperación de la actividad es parcial y se requiere 50 mM de NaHCO<sub>3</sub> para que apenas se alcance el 50% de la actividad original. En la misma figura se observa que si en ese mismo sistema se agrega Rubisco activasa purificada de espinaca (la cual según Wang *et al.*, 1992, puede reactivar eficientemente los complejos que forma la Rubisco de maíz con la RuBP),

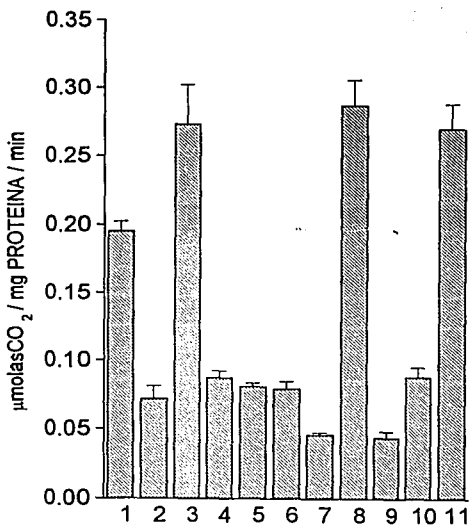


**Figura 2. Inhibición de la actividad de Rubisco por RuBP.** La enzima desionizada, fué inhibida por las concentraciones de RuBP que se indican (●), y posteriormente fué reactivada con 10 mM NaHCO<sub>3</sub> y 10 mM MgCl<sub>2</sub> (○). Cada punto es promedio de tres mediciones independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.





**Figura 3. Efecto de CO<sub>2</sub> y Rubisco activasa sobre la inhibición de la actividad de Rubisco por RuBP.** La enzima desionizada fué inhibida con diferentes concentraciones de RuBP en presencia de 10 mM NaHCO<sub>3</sub> y 10 mM MgCl<sub>2</sub> con (o) y sin Rubisco activasa (•). Cada punto es promedio de tres mediciones independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.



**Figura 4. Inhibición de la actividad de Rubisco por RuBP en extractos crudos.** Extractos de plántulas de maíz fueron desionizados y en ausencia (2-6) y en presencia (7-11) de Rubisco activasa fueron inhibidos con RuBP: 1 extracto crudo; 2, 7 extracto filtrado; 3, 8 extracto filtrado y activado con 10 mM NaHCO<sub>3</sub> y 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 4, 9 extracto filtrado e inhibido con 1.5 mM de RuBP; 5, 10 extracto filtrado, inhibido con 1.5 mM de RuBP y activado con 10 mM NaHCO<sub>3</sub> y 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 6, 11 extracto filtrado, inhibido con 1.5 mM de RuBP y activado con 10 mM NaHCO<sub>3</sub> y 10 mM MgCl<sub>2</sub> en presencia del sistema regenerador de ATP. Cada punto es promedio de tres mediciones independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.

y existe un sistema generador de ATP, basta 10 mM de  $\text{NaHCO}_3$  para que la recuperación sea total.

La figura 6 del artículo 1 muestra que *in vivo* el papel de la Rubisco activasa podría ser muy importante. En este caso a un extracto de palntas adultas con baja actividad de Rubisco se agregaron cantidades crecientes de Rubisco activasa y se observó una recuperación muy significativa de la actividad.

Un punto de gran interés es el relacionado a las diferencias en la actividad de Rubisco que durante el periodo de llenado del grano caracterizan a las poblaciones original ( $Z_0$ ) y mejorada ( $Z_{20}$ ). En la figura 5 del presente manuscrito, se observa que si la actividad de ambas se mide en ausencia de Rubisco activasa, la población mejorada presenta valores significativamente más altos. En todos los casos se observa que si la medición se hace después de agregar Rubisco activasa purificada de espinaca, la actividad se incrementa en forma significativa.

Es interesante hacer notar que si a la población original se le agrega un exceso de Rubisco activasa (cuatro veces mayor a la cantidad que se agregó a la población mejorada), la actividad de Rubisco en población original prácticamente iguala a la de la población mejorada.

Este hecho puede entenderse observando la figura 6 de este manuscrito en donde se aprecia que la concentración de Rubisco activasa en la población  $Z_{20}$  es considerablemente mayor a la presente en la población  $Z_0$ .

En plántulas se hizo un estudio similar. Se analizaron las etapas 4, 5 y 6 del desarrollo de la segunda hoja (figura 1) y los resultados son consistentes con lo observado en plantas adultas; es decir, las mediciones hechas agregando Rubisco activasa en todos los casos mostraron un incremento importante en la actividad de Rubisco, sin embargo, el efecto que la Rubisco activasa tiene sobre la actividad de la Rubisco se hace más claro en las etapas más avanzadas del desarrollo de la hoja (figura 7): aproximadamente 10% en la etapa 4 y 70% para las etapas 5 y 6.

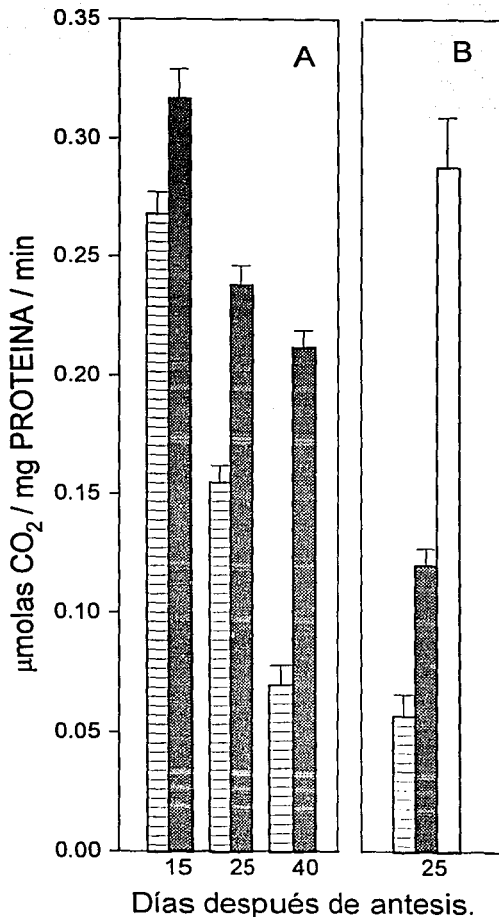
El análisis por western blot demostró que el mayor efecto de Rubisco activasa sobre la actividad de Rubisco está asociado a cambios en las características de la subunidad grande de la Rubisco (LS) y de la Rubisco activasa. La figura 8A muestra que los anticuerpos contra la LS reconocen complejos de peso molecular elevado, cuya concentración aumenta conforme avanza el desarrollo de las hojas. Paralelamente, en la figura 8B se observa que al mismo tiempo que se incrementa la concentración de Rubisco activasa, se hace evidente la banda de 43 kDa.

De igual forma, en la figura 8A se observa que hay incrementos importantes en la concentración de Rubisco, sin embargo, estos no se reflejan en la actividad medida sin Rubisco activasa, de hecho, la actividad es claramente menor en la etapa 6 que en la 4 (figura 7).

## VI.5. REGULACION DE LA EXPRESION DE RUBISCO ACTIVASA.

En la figura 9 se presenta un western blot de extractos de hojas preparados con muestras tomadas de hojas de plántulas y de plantas adultas. En el caso de las primeras, las muestras corresponden a las etapas 4, 5 y 6 del desarrollo de la segunda hoja (fig. 1); mientras que los extractos de plantas adultas fueron preparados de la hoja inmediatamente superior a la mazorca a diferentes momentos del periodo de llenado del grano. En plántulas se observa que los anticuerpos contra Rubisco activasa son capaces de reconocer dos bandas con pesos moleculares de 41 y 43 kDa cuyas proporciones entre si, están reguladas por el desarrollo de la planta. En el caso de las muestras preparadas con las hojas de las plantas adultas casi no aparece la banda de 43 kD, y en las etapas avanzadas, en donde la senectud de las plantas es evidente, pueden observarse bandas de peso aún más pequeño, las cuales podrían ser producidas por la degradación de las formas originales.

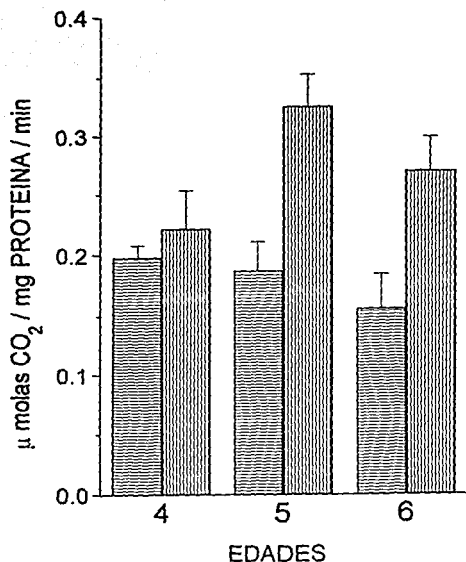
El análisis de la expresión de la Rubisco activasa durante el desarrollo de la segunda hoja se repitió varias veces. La figura 10B muestra que cuando las plantas crecen bajo condiciones de temperatura relativamente bajas (experimentos realizados durante el periodo comprendido entre los meses de octubre y enero), puede no aparecer la banda de 43 kDa, y los anticuerpos contra



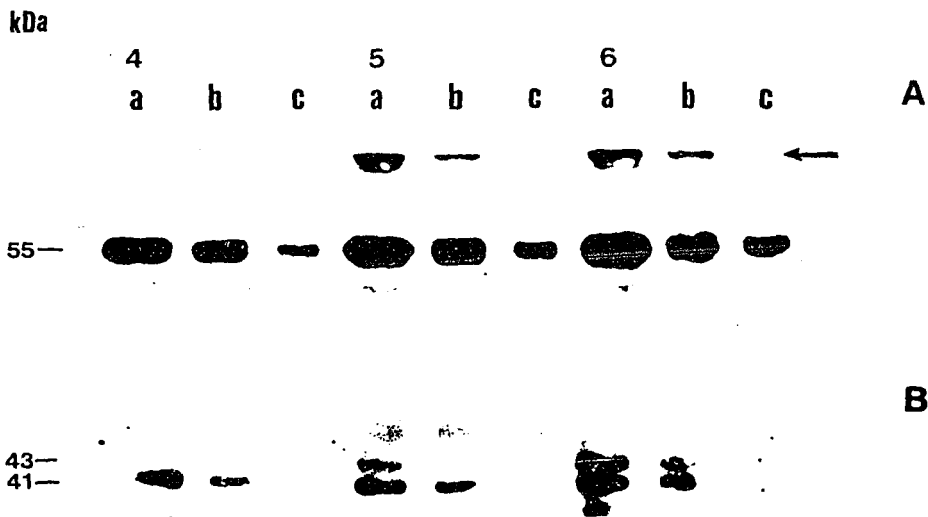
**Figura 5.** Efecto de Rubisco activasa purificada de espinaca sobre la actividad de Rubisco en extractos de plantas adultas. La actividad de Rubisco en la población Z20 (A) y original (B) a diferentes momentos después de iniciado el periodo de llenado de los granos, se midió después de activar los extractos (75 µg de proteína soluble) con 10 mM NaHCO<sub>3</sub> y 10 mM MgCl<sub>2</sub> en ausencia (□), y en presencia de 20 µg (▨) y 80 µg (■) de Rubisco activasa.



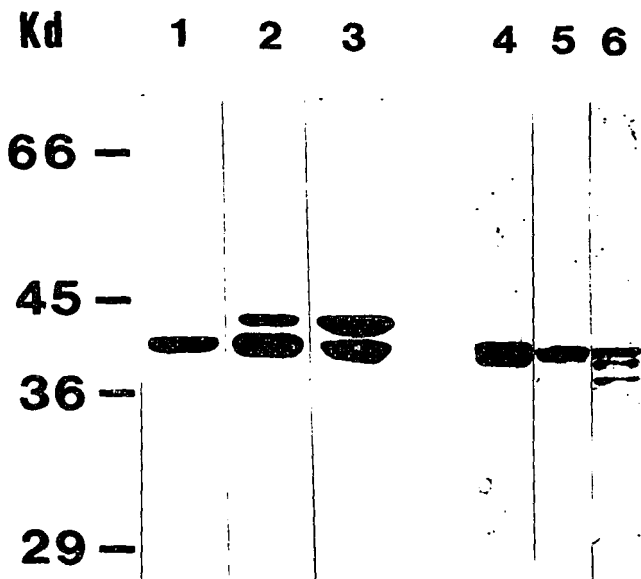
**Figura 6. Análisis por western blot de la concentración de Rubisco activasa en plantas adultas.** Se analizaron extractos crudos preparados con la hoja superior a la mazorca de las poblaciones Z<sub>20</sub> y Z<sub>0</sub> a los 25 días después de iniciado el período de llenado del grano. 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a 30, 20, 10, 5 y 2.5  $\mu$ g de proteína soluble por carril respectivamente.



**Figura 7. Efecto de Rubisco activasa sobre la actividad de Rubisco en extractos crudos de plántulas.** La actividad de Rubisco en extractos preparados en las etapas 4, 5 y 6 del desarrollo de la segunda hoja (figura 1), se midió después de ser activados con 10 mM NaHCO<sub>3</sub> y 10 mM MgCl<sub>2</sub> en ausencia (▨) y en presencia de Rubisco activasa (▧). Cada punto es promedio de tres mediciones independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.



**Figura 8. Efecto del desarrollo sobre la concentración de Rubisco (LS) y Rubisco activasa en plántulas.** La concentración de la subunidad grande de la Rubisco (A) y de la Rubisco activasa (B) se analizó por western blot en extractos crudos preparados con la segunda hoja en las etapas 4, 5 y 6 de su desarrollo (figura 1). a, b y c corresponden a 20, 10 y 5  $\mu$ g de proteína soluble respectivamente analizados en cada carril.  $\leftarrow$  Señala complejos de alto peso molecular reconocidos por los anticuerpos contra la LS de la Rubisco.



**Figura 9. Efecto del desarrollo sobre la expresión de Rubisco activasa.** La expresión de Rubisco activasa en extractos preparados a diferentes momentos del desarrollo de la planta de maíz se analizó por western blot. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a extractos crudos preparados en las etapas 4, 5 y 6 del desarrollo de la segunda hoja (figura 1). A su vez, en los carriles 4, 5 y 6 se analizaron muestras de la hoja superior a la mazorca a 15, 30 y 45 días después de iniciado el periodo de llenado del grano. Cada carril se cargó con 15  $\mu$ g de proteína soluble.



Rubisco activasa pueden reconocer otra banda de aproximadamente 70 kDa cuya intensidad disminuye a medida que la banda de 43 kDa de Rubisco activasa se incrementa.

La figura 11 es una repetición de lo anterior, en este caso las plantas se cultivaron a una temperatura ligeramente superior (experimentos realizados durante los meses de marzo a junio). Se observa que hay un gran parecido con el patrón mostrado en la figura anterior, la diferencia más importante es la que se refiere al último punto, en donde tenuemente se observa la banda de 43 kDa.

Estos resultados indican que la expresión de la Rubisco activasa está fuertemente controlada por el desarrollo de la planta, pero el programa original puede ser modificado por cambios en las condiciones ambientales.

Un aspecto sobre el cual es importante llamar la atención es que en ambos casos la acumulación de Rubisco activasa alcanza las concentraciones más altas en las etapas 4 y 5 del desarrollo de la segunda hoja, para luego disminuir en forma notable (figuras 10B y 11).

Otra manera de observar el efecto del desarrollo sobre la acumulación de Rubisco activasa fué analizando el gradiente que se presenta en la lámina de la 4a. hoja antes de que termine su crecimiento. La figura 12B muestra los cambios en la concentración de Rubisco activasa que presentan los fragmentos en que a partir de la base se dividió esta hoja. En términos generales se observa lo mismo que en el análisis de la segunda hoja; es decir, en las partes más jóvenes se acumula la banda de 41 kDa y sólo hasta después de que los tejidos han alcanzado cierta madurez, temporalmente aparece la banda de 43 kDa. Es interesante hacer notar que a diferencia de lo observado durante el desarrollo de la segunda hoja (figuras 10B y 11), en este caso no se observó la banda de 70 kDa.

En estos experimentos también se analizó la acumulación de Rubisco.

En las figuras 10A y 12A se observa que tanto durante las diferentes etapas del desarrollo de la segunda hoja así como durante la maduración de la 4a. hoja respectivamente, la Rubisco se acumula antes que la Rubisco activasa y que la relación entre ambas cambia significativamente durante las diferentes etapas.

Por otro lado, en los experimentos realizados para analizar la acumulación de la Rubisco activasa durante el desarrollo de la segunda hoja (figuras 10B y 11) pudo observarse que el ambiente tiene un papel muy importante.

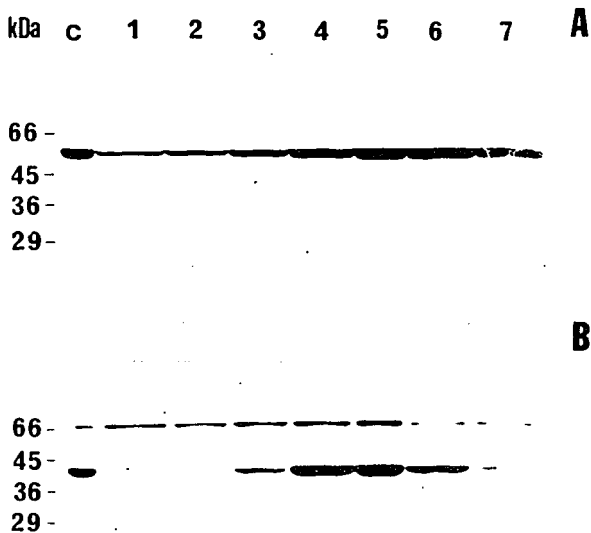
Sobre el particular, experimentos preliminares mostraron que temperaturas extremas (44 y 4°C) pueden modificar significativamente la acumulación de la Rubisco activasa.

Por limitaciones de tiempo, sólo se analizó con cierto detalle el efecto de la temperatura elevada.

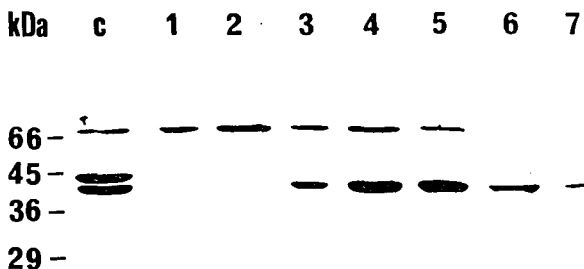
Las figuras 13 A, B y C muestran los cambios que sufrió la expresión de la Rubisco activasa durante las etapas 4, 5 y 6 del desarrollo de la segunda hoja (figura 1), cuando las plántulas completas se sometieron a un tratamiento de agobio por altas temperaturas. En el análisis por western blot se observó que la respuesta está controlada por el desarrollo: en las plantas de la etapa 4 (figura 13A) la Rubisco activasa inicialmente sólo mostró la banda de 41 kDa, pero 2h después de que la temperatura se elevó a 44°C, claramente se observó una acumulación de la banda de 43 kDa. En las plantas de la etapa 5 (figura 13B), la respuesta fué similar, es decir, el aumento en la temperatura también originó la acumulación de la banda de 43 kDa, solo que en este caso, la respuesta máxima se observó 4h después. Finalmente, en plantas de la etapa 6 (figura 13C), la respuesta implicó la desaparición temporal de la banda de 41 kDa, y al igual que en la etapa 5, el mayor efecto se observó 4h después de que se incrementó la temperatura.

En todos los casos los cambios en el contenido de Rubisco activasa fueron transitorios, es decir, una vez que pasó el estímulo, la concentración de esta proteína lentamente regresó a un estado muy similar al inicial. Es importante hacer notar que el aumento de la temperatura a 44°C indujo la acumulación temporal de GroEL, la cual es una proteína con respuesta típica a condiciones de agobio por altas temperaturas (figura 2 del artículo 2).

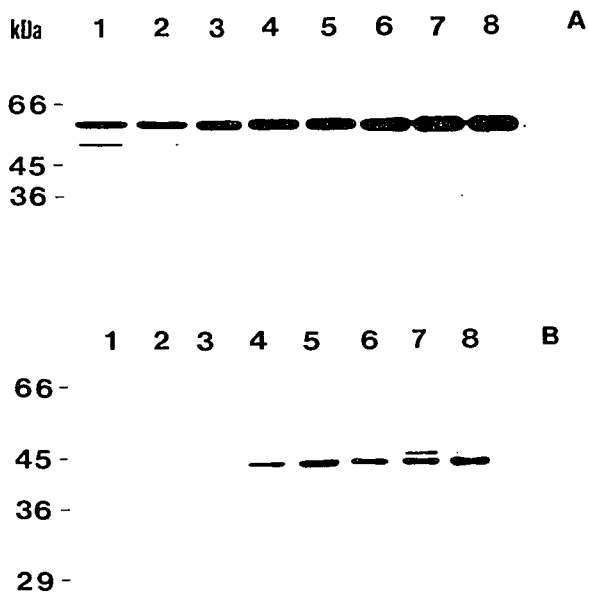
Las plantas que crecen bajo condiciones de campo tienen que enfrentar grandes cambios de temperatura; dada la importancia que este factor tiene sobre la expresión de la Rubisco activasa (figura 13), se decidió investigar si los cambios de concentración que esta proteína



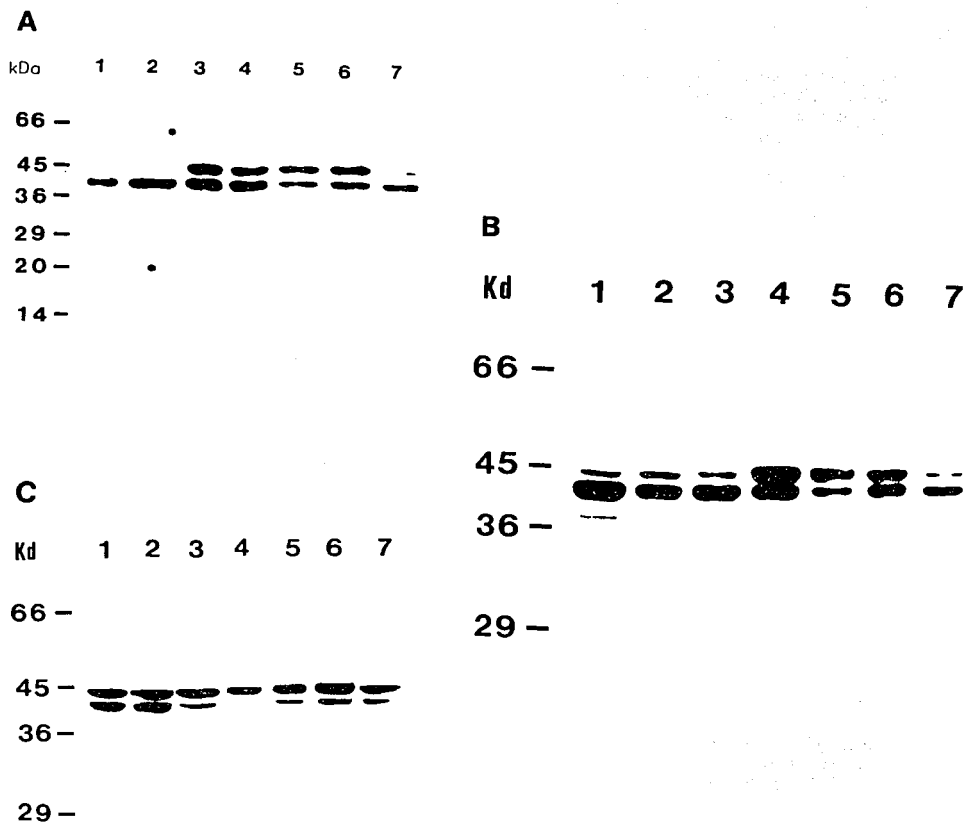
**Figura 10. Efecto del desarrollo de la segunda hoja sobre la expresión de Rubisco y de la Rubisco activasa.** Los cambios en la concentración de ambas proteínas durante el desarrollo de la segunda hoja se analizaron por western blot. Los carriles 1-7 corresponden a diferentes etapas del desarrollo de la segunda hoja (figura 1). En A se observa la acumulación de la subunidad grande de la Rubisco y en B se muestra la acumulación de Rubisco activasa. C corresponde a un control elaborado con extracto de espinaca. Cada carril se cargó con 15  $\mu\text{g}$  de proteína soluble.



**Figura 11. Efecto del desarrollo de la segunda hoja sobre la expresión de Rubisco activasa.** La acumulación de Rubisco activasa durante el desarrollo de la segunda hoja se analizó por western blot. Los carriles 1-7 corresponden a las etapas del desarrollo de la segunda hoja que se muestran en la figura 1. C es un control elaborado con un extracto de plantas adultas. Cada carril se cargó con 15  $\mu\text{g}$  de proteína soluble.



**Figura 12. Análisis por western blot de la acumulación de la subunidad grande de la Rubisco (A) y Rubisco activasa (B) durante la maduración de la cuarta hoja. Los carriles 1-8 corresponden a segmentos de 2 cm de longitud en que a partir de la base se dividió la cuarta hoja antes de terminar su desarrollo. Cada carril se cargó con 15  $\mu$ g de proteína soluble.**



**Figura 13. Análisis por western blot del efecto de la incubación a 44°C sobre la expresión de la Rubisco activasa en la segunda hoja.** A, B y C corresponden respectivamente a las etapas 4, 5 y 6 del desarrollo de la segunda hoja (figura 1). 1 control, los carriles 2, 3 y 4 corresponden a 1, 2 y 4h de incubación a 44°C; y los carriles 5, 6 y 7 a 1, 3 y 18h de recuperación a 25°C respectivamente. Cada carril se cargó con 15  $\mu$ g de proteína soluble.

presenta durante el período de llenado del grano estaban relacionados con los cambios que a su vez experimentan otras proteínas cuya concentración también es afectada por el ambiente; como punto de comparación se utilizó GroEL. Las plantas analizadas fueron cultivadas en condiciones de campo, pero corresponden a un ciclo agronómico diferente al que se presentó en la figura 4 del artículo 1, por lo cual, los resultados no son totalmente comparables.

En la figura 14 se observa que en los extractos de estas hojas los anticuerpos contra Rubisco activasa fundamentalmente reconocieron a la banda de 41 kDa. Sin embargo, en el muestreo 5 apareció la de 43 kDa y en el sexto se observaron una serie de bandas de menor masa molecular, probablemente debidas a la degradación de las anteriores.

Como puede apreciarse, la cantidad de Rubisco activasa varió considerablemente a lo largo del período estudiado, y para investigar si tales cambios fueron debidos al ambiente, la membrana que se utilizó para el análisis de Rubisco activasa se lavó y se probó con anticuerpos contra GroEL. El resultado se presenta en la figura 15. Como puede observarse, al igual que con la Rubisco activasa hubo cambios en la intensidad de las bandas reconocidas por los anticuerpos contra GroEL, sin embargo, se aprecia que el ambiente afecta de manera diferente a las proteínas reconocidas con ambos anticuerpos. La falta de correlación probablemente se deba a que como se observó en la figura 2 del artículo 2, se requieren condiciones muy distintas para que la concentración de ambas proteínas sea afectada por temperaturas elevadas.

De cualquier manera, estos resultados hacen pensar que las fluctuaciones de temperatura a que normalmente están sometidas las plantas durante su crecimiento pueden ser lo suficientemente grandes como para alterar la acumulación de proteínas relacionadas con GroEL, y de acuerdo con lo presentado en la figura 2 del artículo 2, la Rubisco activasa podría haber sido afectada de manera similar.

Como ha podido observarse, la expresión de la Rubisco activasa es modificada por el ambiente; sin embargo, la magnitud de los cambios observados está a su vez determinada por el desarrollo del tejido en cuestión.

Esta situación planteó una serie de preguntas en relación a la información genética para Rubisco activasa y al control de su expresión.

En un análisis por Southern-blot, se observó que el ADN de maíz, al igual que espinaca y *Arabidopsis*, al ser cortado con diferentes enzimas de restricción (Eco RI y la combinación Eco RI-Hind III), e hibridado con el ADNc de la Rubisco activasa de espinaca, presenta un patrón simple, por lo que es probable que maíz al igual que las otras dos especies, tenga sólo un gen que codifique para Rubisco activasa (figura 16).

Este resultado está en aparentemente contradicción con el hecho de que las plantas de maíz dependiendo de la edad (figura 9) o de las condiciones ambientales (figura 13) pueden presentar uno o dos polipéptidos. Sin embargo, la generación de más de un producto protéico a partir de un solo gen puede tener varias explicaciones (incluso pueden producirse a partir de un solo polipéptido), sin embargo, también es probable que el método utilizado no sea lo suficientemente sensible como para detectar copias extras del gen.

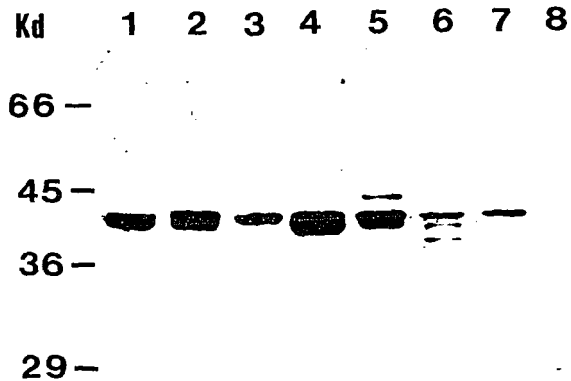
En espinaca se ha reportado un procesamiento alternativo que genera 2 mensajes funcionales (Werneke *et al.*, 1989). Para distinguir entre ambas posibilidades se decidió buscar la expresión del o de los mensajes que en maíz codifican para Rubisco activasa.

La sonda utilizada fue la del cADN para la forma de 43 kDa de Rubisco activasa de espinaca. A pesar de que hubo un buen reconocimiento del mensaje de Rubisco activasa en espinaca, no hubo éxito con el ARN de maíz (figura 17).

## VI.6. LA RUBISCO ACTIVASA COMO CHAPERONA MOLECULAR.

En el artículo 2 se presentan y discuten una serie de evidencias que apoyan la propuesta de que la Rubisco activasa tiene características de chaperona molecular y por lo mismo, la capacidad de realizar funciones diferentes a las que se esperaría en una enzima convencional.

Se ha establecido que las chaperonas moleculares presentan una serie de características que las distinguen (Ellis y van der Vies, 1991): a) forman agregados de alto peso molecular los

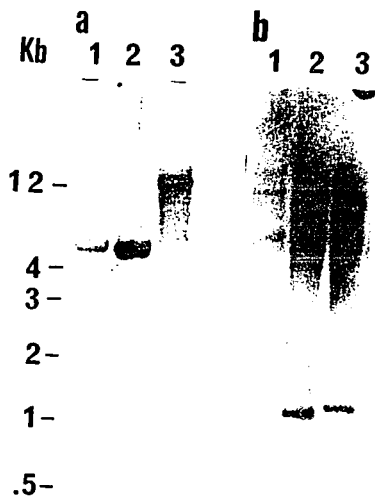


**Figura 14. Análisis por western blot de los cambios en la concentración de Rubisco activasa durante el periodo de llenado del grano. Los carriles 1-8 corresponden a extractos que se prepararon con la hoja superior a la mazorca de muestreos semanales hechos a partir de que inició el período de llenado del grano. Cada carril se cargó con 15  $\mu$ g de proteína soluble.**

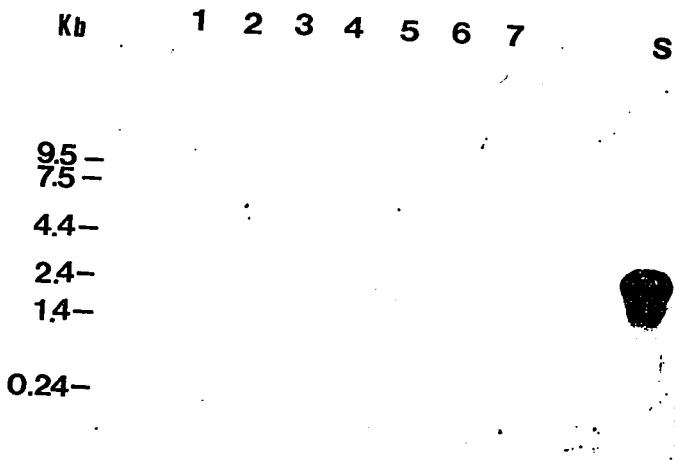


**Figura 15. Análisis por western blot de proteínas reconocidas por anticuerpos contra Gro EL.** Los carriles 1-8 corresponden a extractos que se prepararon con la hoja superior a la mazorca de muestreos semanales hechos a partir de que inició el período de llenado del grano. Cada carril se cargó con 15  $\mu$ g de proteína soluble.





**Figura 16. Análisis del ADN de *Arabidopsis* (1), espinaca (2) y maíz (3).** Cada carril se cargó con 30  $\mu$ g de ADN cortados con Eco R1 (a) y con Eco R1 y Hind III (b). La hibridación se hizo utilizando el ADNc de la Rubisco activasa de espinaca marcada uniformemente con digitonina.



**Figura 17. Análisis del ARN de espinaca (S) y maíz (1-7).** Las muestras de maíz corresponden a las etapas 1-7 del desarrollo de la segunda hoja que se presentan en la figura 1. En cada caso se utilizaron 30  $\mu$ g de ARN desnaturalizado con glioxal. La hibridación se hizo utilizando el ADNc de la Rubisco activasa de espinaca marcada con  $^{32}$ P dCTP.

cuales son necesarios para llevar a cabo su actividad, b) muchas de ellas incrementan su concentración como respuesta de los organismos a elevadas temperaturas, c) forman complejos con proteínas específicas parcialmente desnaturalizadas de las que posteriormente se dependen mediante la hidrólisis de ATP, y d) pueden ayudar a la reactivación de las proteínas que a consecuencia de condiciones ambientales adversas (incubación a altas temperaturas o en sales desnaturalizantes) se desnaturalizan parcialmente.

Es importante recalcar que las características funcionales son estrictamente dependientes de la hidrólisis de ATP.

Los resultados que a continuación se describen tienen por objeto demostrar que la Rubisco activasa reúne todas las características antes mencionadas.

La figura 18 muestra que cuando un extracto crudo de maíz se analiza en una columna de Sephacryl S-400 (90 cm de longitud y 0.6 cm de diámetro interior) la Rubisco activasa aparece en la fracción que corresponde a 250 kDa.

En la figura 2B del artículo 2 se muestra que cuando las plantas de maíz se someten a elevadas temperaturas (44°C) la Rubisco activasa al mismo tiempo que incrementa su concentración modifica su patrón de expresión: se mantiene la banda de 41 kDa y aparece otra de 43 kDa. Este tratamiento también induce cambios importantes en la concentración de GroEL (figura 2A del mismo artículo).

Desde un punto de vista funcional, algo que distingue a las chaperonas moleculares es la capacidad que tienen para interactuar con proteínas y en algunos casos ayudar a su ensamblaje o a la restructuración de proteínas parcialmente desnaturalizadas.

Con el fin de probar si efectivamente la Rubisco activasa tiene estas características se hicieron algunos experimentos tendientes a definir las condiciones adecuadas para mostrar este efecto sobre la Rubisco.

Inicialmente se buscó provocar modificaciones estructurales que disminuyeran la actividad específica de la Rubisco y que al mismo tiempo la reacción reversible no fuera espontánea.

En una primera etapa los extractos crudos fueron tratados con concentraciones variables de cloruro de guanidina y se observó que la actividad de la Rubisco disminuye significativamente (figura 19), sin embargo los resultados de los experimentos de reactivación con Rubisco activasa fueron poco consistentes (figura 20), por lo que se decidió buscar otra manera de modificar las características de la Rubisco.

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo con enzimas purificadas de espinaca.

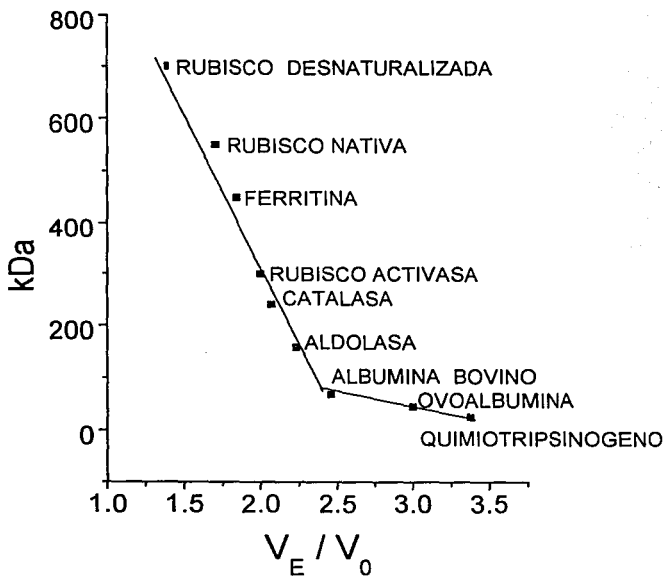
La purificación de Rubisco activasa de maíz presentó grandes problemas, sobre todo para separarla de la Rubisco. En espinaca por razones que no se conocen, la interacción entre Rubisco y Rubisco activasa no es tan fuerte por lo que la separación de ambas proteínas es relativamente fácil. Dado que la Rubisco activasa de espinaca puede reactivar eficientemente a la Rubisco de maíz (Wang *et al.*, 1992), los experimentos que a continuación se describen se realizaron usando Rubisco activasa de espinaca.

Las temperaturas elevadas son una condición a la que las plantas con frecuencia deben enfrentarse; su efecto puede ser fatal pues puede provocar la desnaturalización de las proteínas y la consecuente pérdida de funciones metabólicas.

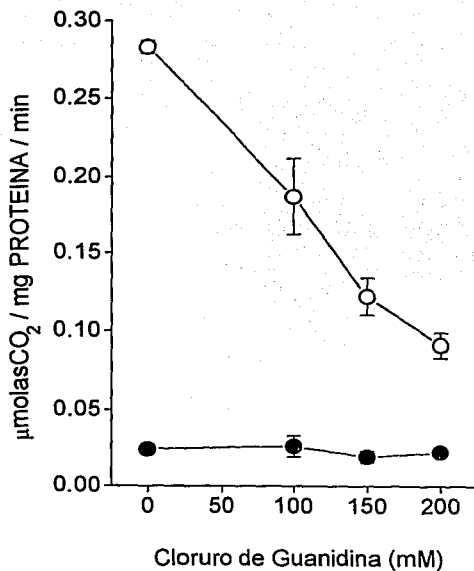
En ese sentido, la Rubisco disuelta en un medio que contenía 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  y 10 mM  $\text{MgCl}_2$  se incubó a 43°C por 7 h. Las mediciones de la actividad que se realizaron a lo largo del período señalado no mostraron cambios importantes (figura 21).

El siguiente paso fue incubarla en las mismas condiciones por 45 min a diferentes temperaturas y como puede observarse en la figura 22 aún cuando la temperatura se elevó a 55°C, tampoco hubo cambios en la actividad.

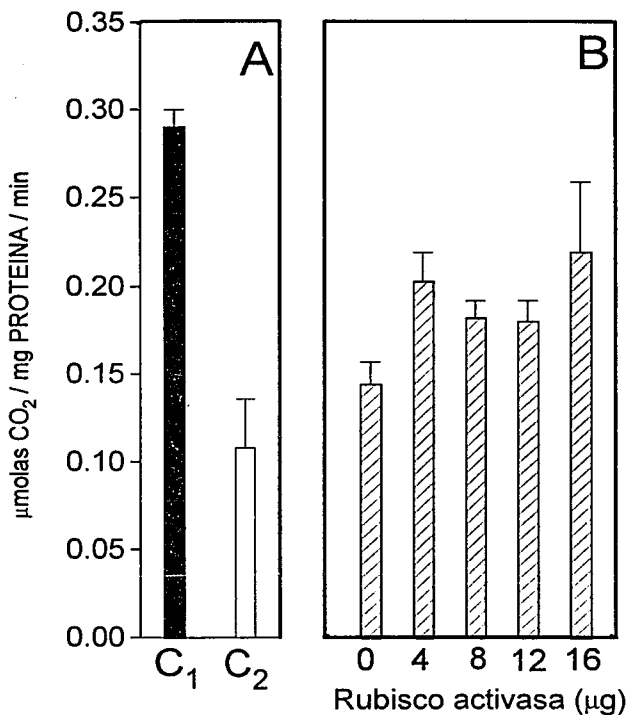
Tanto el  $\text{CO}_2$  como el  $\text{Mg}^{2+}$  juegan un papel muy importante en la adquisición y mantenimiento de la estructura funcional de la Rubisco. Por esta razón, en los siguientes experimentos de inactivación, la Rubisco primero se desionizó y luego se incubó a 55°C por 1 h. Controles en presencia de ambos iones y en ausencia de uno de ellos fueron hechos simultáneamente. El resultado se presenta en la figura 23 y como puede observarse, cuando falta



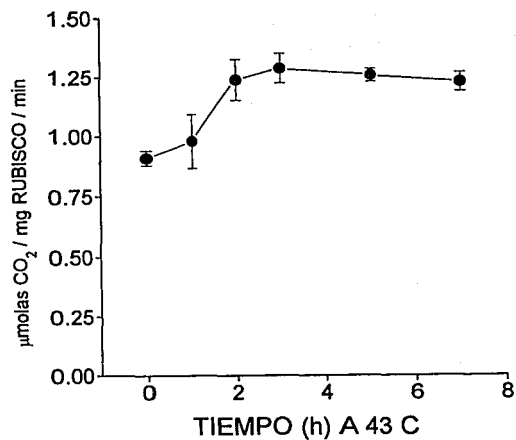
**Figura 18. Estimación del peso molecular.** Rubisco activasa, Rubisco nativa y Rubisco desnaturalizada por calentamiento a 55°C por 1h en ausencia de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{MgCl}_2$  se analizaron en una columna de Sephacryl S-400 calibrada con las proteínas señaladas.



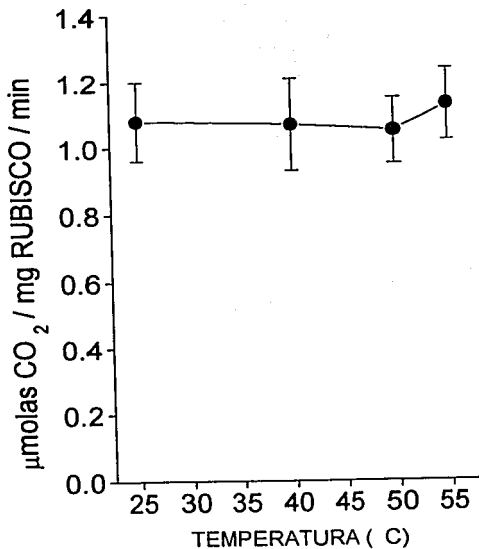
**Figura 19.** Efecto del cloruro de guanidina sobre la actividad de Rubisco en un extracto crudo de maíz. El extracto se desionizó y se trató con las concentraciones señaladas de cloruro de guanidina. La actividad de Rubisco se midió antes (●) y después de reactivar con 10 mM NaHCO<sub>3</sub> y 10 mM MgCl<sub>2</sub> (○). Cada punto es promedio de tres mediciones independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.



**Figura 20. Efecto de Rubisco activasa purificada de espinaca en la recuperación de la actividad de Rubisco en un extracto de maíz tratado con 150 mM de Cloruro de Guanidina. C<sub>1</sub> actividad de un extracto nativo. C<sub>2</sub> actividad sin Rubisco activasa de un extracto tratado con cloruro de guanidina. B Efecto de Rubisco activasa en la recuperación de la actividad de Rubisco de un extracto tratado con cloruro de guanidina. Cada punto es promedio de tres mediciones independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.**

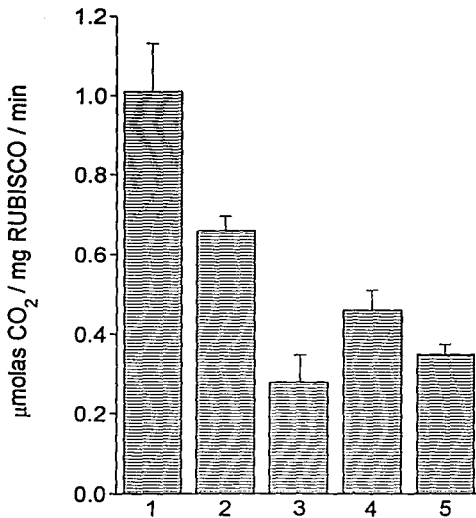


**Figura 21. Efecto de la incubación a 43°C sobre la actividad de Rubisco.** Rubisco purificada de espinaca se incubó a 43°C, y después de los tiempos señalados se midió la actividad de Rubisco. Cada punto es promedio de tres mediciones independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.



**Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la actividad de Rubisco.** La actividad de Rubisco purificada de espinaca fué medida después de incubarla 1h a las temperaturas señaladas. Cada punto es promedio de tres mediciones independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.





**Figura 23. Desnaturalización parcial de Rubisco.** Rubisco purificada de espinaca fué sometida aun tratamiento de calentamiento a 55°C por 1h después de lo cual se midió la actividad. 1, actividad de la enzima nativa. 2-5, actividad de la enzima desnaturalizada: 2, en presencia de 10 mM NaHCO<sub>3</sub> y 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 3, solo con 10 mM NaHCO<sub>3</sub>; 4, solo con 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 5, en ausencia de ambos iones. Cada punto es promedio de tres mediciones independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.

uno de los dos o los dos iones, la actividad de Rubisco disminuye en aproximadamente 50 %. Interesantemente, cuando falta  $Mg^{2+}$  la pérdida de actividad es aún más importante.

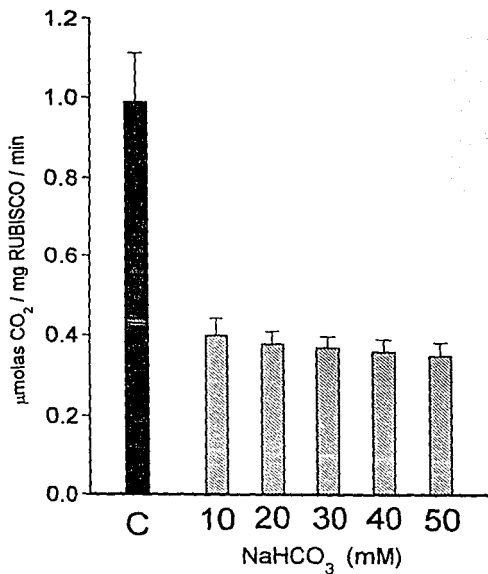
La actividad de la enzima inactivada por calentamiento en ausencia de iones no pudo recuperarse aún cuando la enzima se incubó en presencia de  $Mg^{2+}$  con cantidades elevadas de  $NaHCO_3$  (figura 24).

Es difícil establecer la naturaleza exacta de las modificaciones que este tratamiento origina en la estructura de la Rubisco; sin embargo la enzima inactivada al mismo tiempo que perdió su actividad catalítica, modificó su comportamiento cuando se pasó por una columna de Ultrogel ACA 22 (90 cm de longitud y 0.6 cm de diámetro interior) (figura 25). Una estimación del peso molecular señaló que a consecuencia del calentamiento la Rubisco incrementó su masa de 550 kDa a aproximadamente 700 kDa (figura 18). Al mismo tiempo, se observó que disminuyó la reactividad de los grupos -SH (figura 5 del artículo 2).

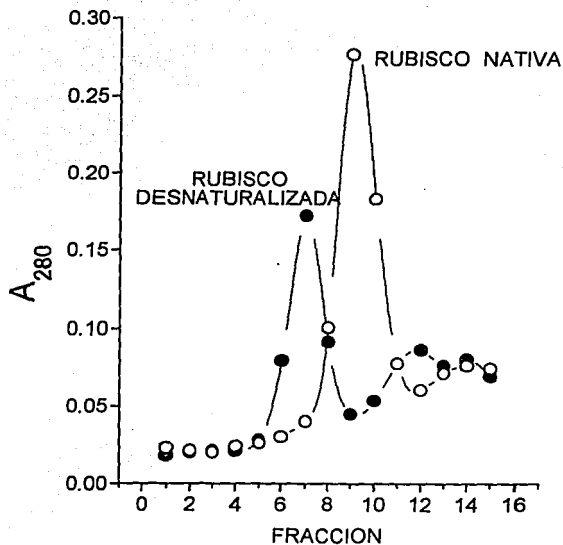
Por otro lado, en la figura 4 del artículo 2 se presenta un experimento de inmunoprecipitación y se observa que la Rubisco activasa interacciona con la Rubisco sobre todo cuando está desnaturalizada. Allí mismo se puede apreciar que la interacción cambia si hay generación de ATP en el sistema pues la cantidad de Rubisco activasa que es inmunoprecipitada por los anticuerpos contra Rubisco disminuye significativamente.

El experimento que se presenta en la figura 8 del artículo 2 muestra que la Rubisco cuando ha sido inactivada por el procedimiento antes mencionado pierde aproximadamente el 65% de la actividad; sin embargo, la Rubisco activasa es capaz de inducir una recuperación muy importante.

Estos resultados sugieren fuertemente que que la Rubisco activasa reúne una serie de características estructurales y funcionales propias de las chaperonas moleculares.



**Figura 24** Respuesta de Rubisco purificada de espinaca y desnaturalizada por calentamiento a 55°C en ausencia de iones al tratamiento de reactivación con 10 mM MgCl<sub>2</sub> y cantidades crecientes de NaHCO<sub>3</sub>. Actividad de la enzima nativa (■) y de la enzima desnaturalizada (▨). Cada punto es promedio de tres mediciones independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.



**Figura 25** Perfil de elución de Rubisco purificada de espinaca nativa y desnaturada. El perfil de elución tanto la enzima nativa como la desnaturada por calentamiento a 55°C en ausencia de iones (1h), fué obtenido en una columna de Ultrogel ACA-24.

## VII. DISCUSION.

Este trabajo forma parte de una línea de investigación establecida en nuestro laboratorio hace muchos años, y que tiene como objetivo entender desde un punto de vista bioquímico que es lo que sucede en las plantas de maíz durante el período de llenado de los granos. En esa etapa, el metabolismo de la planta se orienta a satisfacer los requerimientos de la mazorca en formación; lo cual es muy importante ya que la capacidad para modificar la distribución de los productos fotosintéticos, es un aspecto determinante en la capacidad para producir granos. Por esa razón, pensamos que trabajos como el presente pueden ofrecer criterios que en el futuro podrán ser utilizados para obtener plantas de maíz más eficientes.

En la primera fase de esta investigación se analizó la actividad de la Rubisco durante el período antes señalado, y se observó que la actividad presentaba cambios muy importantes, los cuales no tenían una buena correlación con las cantidades de la enzima (Martínez-Barajas, 1989). Este es un fenómeno que se ha observado consistentemente a lo largo de varios ciclos agrícolas y que podría tener importantes implicaciones prácticas, pues como puede observarse en la figura 2 del artículo 1, la actividad de la Rubisco parece una característica asociada con la capacidad de rendimiento de grano que tienen los genotipos estudiados.

Previamente, en nuestro laboratorio se había observado que durante el período de llenado del grano la síntesis de la proteína Rubisco se mantiene estable a un bajo nivel (Loza-Tavera; 1992), y por otro lado, no se encontraron compuestos activadores o inhibidores de la actividad, lo cual sugirió que los cambios observados en la actividad podrían estar ligados a cambios en la funcionalidad de la Rubisco presente (Martínez-Barajas, 1989).

Con estas ideas en mente, se planteó como objetivo fundamental de la presente investigación el ofrecer una explicación bioquímica a los cambios que presenta la actividad de la Rubisco durante el período en que las plantas de maíz llenan los granos. Para facilitar el análisis de los diferentes aspectos analizados, este capítulo se ha dividido en los siguientes apartados:

### VII.I. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO POR RUBISCO ACTIVASA.

Los valores de actividad de Rubisco que se muestran en la figura 2 del artículo 1 corresponden a determinaciones *in vitro* (después de activar a la enzima con  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{MgCl}_2$  a una concentración de 10 mM de cada uno de ellos), que durante el período de llenado del grano se hicieron en dos poblaciones genéticamente relacionadas pero con diferencias importantes en su rendimiento de grano. En la figura 3 del mismo artículo puede observarse que durante los primeros 5 muestreos, en ambas poblaciones no hay cambios importantes en la cantidad y/o calidad de Rubisco, aunque sí en la actividad de la enzima. Se ha reportado que la actividad de la Rubisco es proporcional a su estado de activación (Jordan y Chollet, 1983), por lo cual estos resultados sugieren que dependiendo del genotipo y del momento fisiológico en que se encuentre la planta, la Rubisco podría tener la capacidad de responder en mayor o menor medida al tratamiento de activación.

Con base en estos datos se propone la existencia de más de una forma de Rubisco:

$$\text{Rubisco total} = \text{Rubisco activable por } \text{CO}_2 + \text{Rubisco no activable por } \text{CO}_2.$$

Como ya se mencionó, durante el período de llenado del grano la síntesis y/o el recambio de la Rubisco son pequeños (Loza-Tavera, 1992), y aún así, la actividad de la Rubisco sufre cambios muy importantes (figura 2 del artículo 1), lo cual sugiere que ambas formas son interconvertibles. No sabemos nada acerca de la naturaleza de las modificaciones que pudiera sufrir la enzima ni de los factores que regulan este fenómeno.

Anteriormente se hicieron experimentos para investigar si los cambios que se observan en la actividad de Rubisco durante el período de llenado del grano se debían a la presencia de

compuestos activadores y/o inhibidores y el resultado fue negativo (Martínez-Barajas, 1989). Por otro lado, las mediciones de actividad de Rubisco a que se hace referencia en el párrafo anterior, fueron hechas en condiciones que han sido reportadas como suficientes para activar a toda la enzima presente (Lorimer, 1981), en consecuencia, es probable que los cambios que muestra la actividad de la Rubisco durante el período de llenado del grano se deban a la incapacidad de la enzima para ser eficientemente activada.

Se ha informado que la activación de la Rubisco puede ser eficientemente inhibida por 2 compuestos: su sustrato (RuBP) (Jordan y Chollet, 1983) y el 2 carboxiarabinitol 1-P (CA1P) (Gutteridge *et al.*, 1986). Ambos se encuentran en pequeñas cantidades e interaccionan fuertemente con la Rubisco por lo cual no es muy fácil detectarlos.

El CA1P es un compuesto que se sintetiza durante la noche (Gutteridge *et al.*, 1986) y a pesar de que las plantas de maíz son capaces de producirlo, en esta especie su efecto regulador es muy pequeño (Sage y Seemann, 1993). Por otro lado, el hecho de haber tomado las muestras a medio día, elimina casi por completo la posibilidad de que los cambios en la actividad de Rubisco se deban a la inhibición por CA1P.

En cambio, la probable inhibición por RuBP no puede ser eliminada. En la literatura existen reportes acerca de una enzima denominada Rubisco activasa, a la cual se considera un regulador importante de la actividad de la Rubisco (Portis *et al.*, 1986; Werneke *et al.*, 1988a). Sobre el mecanismo de acción de esta enzima se conoce muy poco, pero se ha propuesto que participa haciendo más eficiente el proceso de activación de la Rubisco, lo cual puede ser muy importante en plantas tipo C3 ya que al carecer de un mecanismo concentrador del CO<sub>2</sub>, la concentración de éste puede ser limitante (Portis *et al.*, 1986).

Resultados de experimentos hechos con Rubisco y Rubisco activasa puras o parcialmente purificadas demostraron que la Rubisco activasa puede reactivar los complejos Rubisco-RuBP mediante un proceso que es dependiente del consumo de ATP (Robinson *et al.*, 1988). Con base en esta información se ha propuesto que la inhibición de la actividad de la Rubisco por RuBP y/o CA1P es parte de un mecanismo que tienen las plantas para regular el flujo de carbono y de esa manera evitar desbalances metabólicos que podrían producirse al cambiar las condiciones ambientales (Salvucci, 1991).

En este contexto y a pesar de que el maíz es una planta tipo C4 (en donde la disponibilidad de CO<sub>2</sub> no parece ser un factor limitante de la actividad de la Rubisco), la Rubisco activasa se presentaba como un buen candidato para explicar las diferencias observadas en la actividad de la Rubisco durante el período de llenado del grano en maíz. Con esta idea en mente se utilizaron anticuerpos contra la Rubisco activasa de espinaca (generosamente donados por el Dr. William L. Ogren de la Universidad de Illinois) para analizar por western blot las muestras de hojas obtenidas a lo largo del período de llenado del grano. Como puede apreciarse en las figuras 2 y 4 del artículo 1, hay una correlación positiva entre la actividad de Rubisco y las concentraciones de Rubisco activasa, sin embargo, esto no demuestra que la Rubisco activasa sea la causa del fenómeno observado.

Cuando la actividad de Rubisco en extractos crudos de maíz se midió agregando Rubisco activasa purificada de espinaca, tanto en plántulas (figura 7), como en plantas adultas (figuras 5 del presente manuscrito y 6 del artículo 1), hubo un incremento notable, y pudo observarse que a causa de situaciones ligadas al desarrollo o al genotipo de los materiales utilizados, la concentración de Rubisco activasa puede ser limitante de la actividad de Rubisco: en los extractos preparados en las etapas 5 y 6 del desarrollo de la segunda hoja (figura 1) después de agregar Rubisco activasa la actividad de Rubisco se incrementó en 70%; mientras que en los extractos de la etapa 4 el mismo tratamiento produjo un aumento de solo 10% (figura 7). En plantas adultas la Rubisco activasa no solo incrementó la actividad de Rubisco sino que además, disminuyó la velocidad con que se pierde la actividad durante el envejecimiento de las hojas (figura 5), y en función de la cantidad de Rubisco activasa con que se complementaron los extractos de la población Original, su actividad se incrementó y prácticamente igualó la actividad de la población mejorada (figura 5).

Experimentos hechos para entender la regulación de la actividad de Rubisco por Rubisco activasa demostraron que cuando la Rubisco está inhibida por RuBP, la activación con CO<sub>2</sub> y

$Mg^{2+}$  no es totalmente efectiva, pues aún cuando se utilizaron cantidades elevadas de  $CO_2$  (50 mM  $NaHCO_3$ ), la actividad final fue apenas el 50% de la inicial (figura 5 del artículo 1). Sin embargo, cuando se agregó Rubisco activasa, bastó 10 mM de  $NaHCO_3$  para que la recuperación de la actividad fuera total.

Estos datos sugieren que las diferencias de actividad observadas tanto en plántulas como en plantas adultas puede deberse a la inhibición por RuBP; sin embargo, experimentos posteriores demostraron que la inhibición por RuBP se lleva a cabo bajo condiciones no necesariamente fisiológicas: en primer lugar, para que la inhibición sea efectiva se requiere que la Rubisco esté completamente desionizada (figura 2). Por otro lado, la activasa sola (en ausencia de ATP) no puede evitar la inhibición por RuBP (figura 4), tampoco lo puede hacer el  $CO_2$  (figura 3), pero bastó que hubiera Rubisco activasa y ATP para que aún cuando las cantidades de  $CO_2$  en el medio fueran muy pequeñas, la inhibición por RuBP no ocurriera o se revirtiera con una eficiencia tal que su efecto pasó inadvertido (figura 3). Todo ello indica que si los cambios de la actividad de la Rubisco durante el período de llenado del grano están regulados por la inhibición por RuBP, la proporción de Rubisco inhibida estaría determinada por la concentración de Rubisco activasa, por la disponibilidad de ATP, la concentración de ADP y desde luego, por los cambios en la concentración de RuBP que sucedan en el interior del cloroplasto. Sin embargo, se debe insistir en que las condiciones que se requieren para que la inhibición por RuBP sea eficiente, desde un punto de vista fisiológico parecen poco probables.

## VII.2. LA RUBISCO ACTIVASA COMO UNA CHAPERONA MOLECULAR.

A diferencia de las plantas C3, en las plantas tipo C4 no es fácil entender el papel fisiológico de la Rubisco activasa pues el mecanismo concentrador de  $CO_2$  les permite alcanzar concentraciones internas de hasta 1mM, lo cual, es suficiente para garantizar la activación de toda la Rubisco presente (Jenkins *et al.*, 1989).

En un sentido más estricto, los cambios que presenta la actividad de la Rubisco en maíz durante el período de llenado del grano (lo mismo que las diferencias entre poblaciones), también pueden deberse a otras causas cuyo efecto al igual que la inhibición por RuBP puede ser eficientemente revertido por el tratamiento con Rubisco activasa pero no por concentraciones elevadas de  $CO_2$  y  $Mg^{2+}$ .

Por otro lado, en plántulas el efecto de Rubisco activasa sobre la actividad de Rubisco es significativo solo después que los anticuerpos contra la subunidad grande de la Rubisco reconocen una banda de peso molecular elevado (probablemente formada por agregados de LS y/o LS+SS (figura 8)), esto sugiere que el efecto que la Rubisco activasa tiene sobre la actividad de la Rubisco está asociado a importantes cambios en las características de la enzima.

Este hecho debe resaltarse, pues en la literatura hay reportes que se refieren a modificaciones bioquímicas que puede sufrir la Rubisco durante el desarrollo o en respuesta a cambios en las condiciones ambientales. Algunas de las mejor estudiadas son: formación de puentes disulfuro entre subunidades grandes (Rintamäki, 1989; Mehta *et al.*, 1992), disminución en la cantidad de grupos SH titulables (Crafts-Brandner *et al.*, 1991), metilación (Houtz *et al.*, 1990) y la unión covalente de putrescina y cadaverina (Margosiak *et al.*, 1990), las cuales, pueden modificar las características fisicoquímicas de la Rubisco, haciéndola más hidrofílica (Weidner y Fehling, 1985) o más ácida (Ferreira y Davies, 1989). Ello puede cambiar su comportamiento intracelular (haciendo que se asocie a membranas) y repercutir notablemente tanto en su actividad como en su regulación (Crafts-Brandner *et al.*, 1991).

Por otra parte, el proceso de activación de la Rubisco involucra grandes cambios conformacionales (Bowien y Gottschalk, 1992), y los resultados presentados han puesto de manifiesto que los cambios que presenta la actividad de la Rubisco durante el período de llenado del grano probablemente se deben a la incapacidad de la enzima para ser activada (a pesar de que las concentraciones de  $CO_2$  y  $Mg^{2+}$  en el ensayo no sean limitantes); al mismo tiempo, se observó que la Rubisco activasa tanto en plantas adultas como en plántulas es capaz de revertir este fenómeno.

Todo ello hizo pensar que los cambios que muestra la actividad de la Rubisco durante las diferentes etapas del desarrollo de las plantas de maíz se deben a alteraciones estructurales que no le permiten alcanzar un mayor estado de activación y que la capacidad que tiene la Rubisco activasa para estimular la actividad de Rubisco se debe a que facilita las transiciones moleculares que se requieren en dicho proceso.

Se ha descrito que algunas chaperonas moleculares pueden facilitar cambios estructurales en otras proteínas (Ellis y van der Vies, 1991), y se ha demostrado que pueden ayudar a que proteínas desnaturalizadas *in vitro* por tratamiento con diversos agentes desnaturalizantes recuperen gran parte de la actividad perdida (Langer *et al.*, 1992; Gaitanaris *et al.*, 1990; Skowyrza *et al.*, 1990; Goloubinoff *et al.*, 1989). Pensando en que la Rubisco activasa tuviese la capacidad de actuar como chaperona molecular, es decir, que la estimulación de la actividad de la Rubisco por Rubisco activasa implicara cierta capacidad por parte de la Rubisco activasa para reestructurar a la Rubisco, se decidió investigar si la Rubisco activasa reunía algunas de las características propias de las chaperonas moleculares (Ellis y van der Vies, 1991):

Experimentos posteriores demostraron que la Rubisco activasa también comparte características funcionales con las chaperonas moleculares: a) forma agregados de alto peso molecular (figura 18) lo cual ha sido señalado como un prerrequisito para adquirir la estructura funcional; b) la reactivación por Rubisco activasa de la Rubisco inhibida por RuBP es dependiente de ATP (figura 4); c) su síntesis es transitoriamente estimulada por temperaturas elevadas (figura 13); d) forma complejos con la Rubisco desnaturalizada los cuales se hacen inestables cuando hay ATP en el medio (figura 4 del artículo 2), pero sobre todo, e) fué capaz de inducir una reactivación significativa de preparaciones de Rubisco que a causa de la incubación a 55°C en ausencia de iones habían perdido aparentemente de manera irreversible poco más del 60% de su actividad original (figura 8 del artículo 2).

Esta información hizo pensar que la Rubisco activasa es en realidad una chaperona molecular que interacciona con la Rubisco y provoca cambios conformacionales que facilitan la adquisición de una estructura más funcional. En ese sentido, la remoción de RuBP de los complejos Rubisco-RuBP podría ser una consecuencia de los cambios estructurales facilitados por la Rubisco activasa.

### VII.3. FACTORES QUE CONTROLAN LA EXPRESION DE LA RUBISCO ACTIVASA.

Para complementar el conocimiento sobre la Rubisco activasa se hicieron experimentos orientados a entender que factores controlan la expresión de la Rubisco activasa en maíz.

La figura 16 muestra que en maíz probablemente existe solo un gen que codifica para Rubisco activasa, lo cual contrasta con otras especies como tabaco en donde se han encontrado hasta 7 (Snyder y Ogren, 1993). En lo que a la proteína se refiere Salvucci *et al.*, (1987) trabajando también con maíz encontraron solo un polipéptido, en nuestro caso, resulta evidente que dependiendo de la edad del tejido la Rubisco activasa puede presentar hasta dos isoformas (figura 8). Sin embargo, es necesario hacer un análisis más detallado, pues en la figura 14 se observa que bajo ciertas condiciones la banda de 41 kDa puede ser en realidad una mezcla de proteínas con pesos moleculares muy cercanos.

Por otro lado, condiciones ambientales extremas (incubación a 44°C) aplicadas a plántulas de maíz indujeron cambios muy importantes aunque reversibles en las relaciones entre ambos polipéptidos. La figura 13 muestra claramente que la respuesta a este estímulo está controlada por el desarrollo.

En espinaca también hay dos isoformas de Rubisco activasa las cuales son constitutivas y aparentemente con la misma capacidad para reactivar Rubisco inhibida por RuBP (Werneke *et al.*, 1988a). Sin embargo, en maíz la expresión de esta proteína parece estar sometida a un control diferente y muy preciso, por lo que sería muy interesante establecer si con un enfoque más amplio (utilizando como criterios no solamente la reactivación de Rubisco inhibida por RuBP) puede establecerse alguna diferencia funcional entre ambas isoformas.



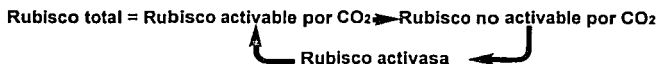
El efecto que el ambiente tiene sobre la expresión de Rubisco activasa es muy importante. Las figuras 10B y 11 demuestran que cambios en las condiciones en que normalmente se cultivan las plantas pueden modificar radicalmente el patrón de expresión de esta proteína; de hecho, puede no aparecer la banda de 43 kDa y al mismo tiempo, inducirse la síntesis de un polipéptido de aproximadamente 70 kDa que también es reconocido por los anticuerpos contra Rubisco activasa. Tanto las chaperonas moleculares como las proteínas estimuladas por temperaturas elevadas constituyen verdaderas familias funcionales que pueden o no estar estructuralmente relacionadas (Brodli, 1989; Ho y Sachs, 1989; Ellis y van der Vies, 1991), sin embargo, no pudo establecerse si entre la Rubisco activasa y la proteína de 70 kDa realmente existe alguna relación.

Zielinski *et al.* (1989) han señalado que las relaciones entre las isoformas de Rubisco activasa y la Rubisco son constantes durante todo el ciclo de vida de la planta. Los datos presentados en este trabajo (figuras 10, 11 y 12) demuestran que aún bajo condiciones consideradas como normales para el desarrollo de las plantas de maíz, se presentan cambios importantes en la cantidad y en las características de la Rubisco activasa. En el mismo período, la Rubisco también puede modificar sus características funcionales y estructurales (figuras 7 y 8). Desde un punto de vista fisiológico la relación entre Rubisco y Rubisco activasa podría ser muy importante sobre todo si la Rubisco se encuentra en condiciones en donde su actividad es dependiente de la concentración de Rubisco activasa.

Todos estos factores hacen que la comprensión del mecanismo de regulación de la actividad de Rubisco por Rubisco activasa requiera de mayor investigación.

#### VII.4. MODELO DE FUNCIONAMIENTO DE LA RUBISCO ACTIVASA.

Finalmente, con base en los resultados mostrados, se propone el siguiente modelo para explicar el papel de la Rubisco activasa en la regulación de la actividad de la Rubisco en maíz:



Se propone que dependiendo de la etapa fisiológica, la Rubisco puede existir en dos formas estructural y funcionalmente diferentes: una que responde eficientemente al tratamiento de activación por CO<sub>2</sub> y Mg<sup>2+</sup> y otra cuya respuesta es pobre. La diferencia entre ambas son modificaciones bioquímicas que la Rubisco acumula durante el desarrollo, por lo cual a medida que las hojas van madurando, una proporción cada vez más importante de enzima es incapaz de ser activada eficientemente por el tratamiento con CO<sub>2</sub> y Mg<sup>2+</sup>.

La Rubisco activasa tiene características de chaperona molecular que le permiten modificar el equilibrio mencionado y desplazarlo hacia la forma funcional más eficiente. Por esta razón en tejidos maduros en donde una parte muy importante de la enzima casi no responde al tratamiento con CO<sub>2</sub> y Mg<sup>2+</sup>, la actividad de Rubisco es dependiente de la cantidad de Rubisco activasa.

En maíz la concentración y las características de la Rubisco activasa están determinadas por el desarrollo, el ambiente y en plantas adultas por el genotipo de las plantas. Sin embargo, la importancia de tales cambios sobre la actividad de la Rubisco está determinada por las características de la Rubisco, es decir, su actividad es dependiente de la Rubisco activasa solo a partir del momento en que adquiere una estructura funcionalmente ineficiente (figuras 7 y 8).

Estos resultados no contradicen la propuesta de que la inhibición de la actividad de Rubisco por la RuBP sea un mecanismo para establecer un balance metabólico (Salvucci, 1991). Sin embargo, las propiedades de chaperona molecular que exhibe la Rubisco activasa, hacen

pensar que su importancia en la fisiología de las plantas tiene un ámbito mayor que la pura reactivación de los complejos formados entre la Rubisco y la RuBP.

#### VII.5. LA RUBISCO ACTIVASA COMO MACADOR DE PRODUCTIVIDAD EN MAIZ.

En este trabajo (fig. 2 del artículo 1) así como en otros realizados a lo largo de diferentes ciclos agrícolas, se ha observado que la actividad de Rubisco durante el período de llenado de los granos, es consistentemente superior en las poblaciones mejoradas (Martínez-Barajas, 1989). Cuando la comparación se realizó en la etapa de plántulas (Loza Tavera *et al.*, 1990), prácticamente no se observaron diferencias entre la población original y las que de ella se han derivado.

Con la Rubisco activasa sucedió algo similar: en la etapa de plántulas no se observaron diferencias significativas entre los materiales mejorados y la población original. Fué hasta la etapa de llenado del grano en que repetidamente las variedades mejoradas mostraron mayor cantidad de Rubisco activasa (figuras 4 del artículo 1 y 6 del presente documento).

Esto de ninguna manera quiere decir que las diferencias en la concentración de Rubisco activasa sean la causa de las diferencias en el rendimiento de grano que caracterizan a las poblaciones estudiadas, sin embargo, a juzgar por las propiedades que la Rubisco activasa exhibió, es probable que esta proteína tenga un papel importante.

## VIII. CONCLUSIONES.

El análisis de los resultados que se han presentado permite llegar a las siguientes conclusiones, las cuales por facilidad se han dividido en los siguientes aspectos:

### A).- RUBISCO.

1.- En maíz, la actividad específica (medida *in vitro*) de la Rubisco mostró cambios controlados por el desarrollo. Esas diferencias fueron especialmente visibles durante la primera mitad del periodo de llenado del grano, en donde consistentemente las plantas que han sido seleccionadas para mayor rendimiento de grano mostraron mayores valores de actividad.

2.- Los cambios que mostró la actividad de la Rubisco no necesariamente se deben a la inhibición por RuBP (u otros azúcares fosfatados), es muy probable que la enzima haya sufrido modificaciones bioquímicas que cambiaron su estructura y, como consecuencia, la respuesta a los elementos que normalmente la regulan.

### B).- RUBISCO ACTIVASA.

1.- La Rubisco activasa reúne características estructurales y funcionales que definen a las chaperona moleculares.

2.- La regulación de la expresión de la Rubisco activasa está fuertemente controlada por el desarrollo y por cambios en el ambiente.

3.- Las poblaciones con mayor capacidad de rendimiento de grano mostraron también mayor cantidad de Rubisco activasa.

### C).- INTERACCION RUBISCO-RUBISCO ACTIVASA.

1.- La Rubisco puede existir en 2 formas funcionales: una que responde eficientemente a la activación por  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y otra, cuya proporción crece con la edad de los tejidos y que solo se pone de manifiesto cuando la activación se realiza en presencia de Rubisco activasa y una fuente generadora de ATP.

2.- En etapas avanzadas del desarrollo de las hojas y sobre todo, durante el periodo de llenado del grano, la Rubisco presente no responde eficientemente al tratamiento de activación por  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Bajo esas condiciones la actividad de Rubisco es dependiente de la cantidad de Rubisco activasa presente.

3.- La Rubisco activasa tiene características funcionales y estructurales típicas de las chaperonas moleculares que le permiten reactivar a Rubisco parcialmente desnaturalizada. Es probable que el aumento en la actividad de Rubisco que se observa durante ciertas etapas fisiológicas (como podría ser el periodo de llenado del grano) se deba a que *in vivo* la Rubisco activasa puede desarrollar una función similar.

## IX. BIBLIOGRAFIA.

- Apuya, N.R. and J.L. Zimmerman. 1992.** Heat shock gene expression is controlled primarily at the translational level in carrot cells and somatic embryos. *The Plant Cell* 4: 657-665.
- Beator, J., E. Pötter and K. Klopstech. 1992.** the effect of heat shock on morphogenesis in barley. *Plant Physiol.* 100: 1780-1786.
- Belknap, W.R. and A.R. Portis. 1986.** exchange properties of the activator CO<sub>2</sub> of spinach Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Plant Physiol.* 80: 707-710.
- Berry, J.O., B.J. Nikolau, J.P. Carr and D.F. Klessing. 1986.** Translational regulation of light. Induced Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in amaranth. *Mol. and Cel. Biol.* 6(7): 2347-2353.
- Berry, J.O., J.P. Carr and D.F. Klessing. 1988.** mRNAs encoding Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase remain bound to polysomes but are not translated in amaranth seedlings transferred to darkness. *Pococ. Natl. Acad. Sci.* 85: 4190-4194.
- Bowien, B. and E.-M. Gottschalk. 1992.** Influence of the sedimentation properties of Ribulose bisphosphate from *Alcaligenes eutropus*. *J. Biol. Chem.* 257: 11845-11847.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brodli, M.R. 1989.** regulation of synthesis of normal proteins during heat shock. *Physiologia Plantarum* 75: 439-443.
- Crafts-Brandner, S.J.; M.E. Salvucci and D.B. Egli. 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
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1985.** Maize DNA mini preps. In *Molecular Biology of Plants. A laboratory course manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp 14-21. ISBN 0-87969-184-0
- Ellis, R.J. and S.M. van der Vlies. 1991.** Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 321-347.
- Ferreira, B.R. and D. Davies. 1989.** Conversion of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase to an acidic and catalytically inactive form by extracts of osmotically stressed *Lemna minor* fronds. *Planta* 179: 448-455.
- Ferreira, B.R. and M.N. Shaw. 1989.** Effect of osmotic stress on protein turnover in *Lemna minor* fronds. *Planta* 179: 456-465.
- Gaitanaris, G.A., G. Papavassilou, P. Rubock, S.J. Silverstein and M.E. Gottesman. 1990.** Renaturation of denatured  $\lambda$  repressor requires heat shock proteins. *Cell* 61: 1013-1020.
- Goloubinoff, P., T.J. Christeller, A.A. Gatenby and G.H. Lorimer. 1989.** Reconstitution of active dimeric Ribulose bisphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* 342: 884-889.
- Gutteridge, S., M.A.J. Parry, S. Burton, A.J. Reys, A. Mudd, J. Feeney, J. Servaites and J. Pierce. 1986.** A nocturnal inhibitor of carboxylation in leaves. *Nature* 324: 274-276.
- Ho, T-H D. and M.M. Sachs. 1989.** Stress-induced proteins: Characterization and regulation of their synthesis. *The Biochemistry of Plants.* Vol. 15.
- Houtz, R.L., Stufts, T.J., Mulligan, R.M. and Tolbert, N.E. 1990.** Posttranslational modifications in the large subunit of Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:1055-1059.
- Hudson, G.S., R.E. Dengler, P.W. Hattersley and N.G. Dengler. 1992.** Cell-specific expression of Rubisco small subunit and Rubisco activase genes in C3 and C4 species of *Atriplex*. *Aust. J. Plant Physiol.* 19: 89-96.
- Jenkins, C.L.D., R.T. Furbank and M.D. Hatch. 1989.** Inorganic carbon diffusion between C4 mesophyll and bundle sheath cells. *Plant Physiol.* 91: 1356-1363.
- Jensen, R. G. and T. J. Bahr. 1977.** Ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28: 379-400.

- Jordan, D.B. and R. Chollet. 1983. Inhibition of Ribulose bisphosphate carboxylase by substrate Ribulose -1,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **258**(22): 13752-13758
- Kuhlemier, C., P.J. Green and N.-H. Chua. 1987. Regulation of gene expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **38**: 221-257.
- Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Langer, T., C. Lu, H. Echols, J. Flanagan, M.K. Hayer and F.U. Hartl. 1992. Successive action of DnaK DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**: 683-689.
- Lorimer, G.H. 1981. The carboxylation and oxygenation of Ribulose-1,5-bisphosphate: The primary events in photosynthesis and photorespiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**: 344-383.
- Loza-Tavera, H. 1992. Regulación de la expresión de los genes que codifican la Ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa durante el desarrollo de maíz. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM.
- Loza-Tavera, H., E. Martínez-Barajas and E. Sánchez de Jiménez. 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.
- Margosiak, S.A., D. Dharma, M.K. Bruce-Carver, A.P. Gonzales, D. Louise and G.D. Kuehn. 1990. Identification of the large subunit of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase as a substrate for transglutaminase in *Medicago sativa* (Alfalfa). *Plant Physiol.* **92**: 88-96.
- Martínez-Barajas, J.E. 1989. Análisis de la regulación de la actividad de la Ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa en maíz. Tesis de maestría en Ciencias Químicas, Fac. de Química, UNAM.
- Mehta, R.A., T.W. Fawcett, D. Porath and A.K. Mattoo. 1992. Oxidative stress causes rapid membrane translocation and *in vivo* degradation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* **267**(4): 2810-2816.
- Miernyk, J.A., N.B. Duck, R.G. Shatters and W.R. Folk. 1992. The 70-kilodalton heat shock cognate can act as a molecular chaperone during the membrane translocation of a plant secretory protein precursor. *the Plant Cell.* **4**: 821-829.
- Moore, Bd., J. Kobza and J.R. Seemann. 1991. Measurement of 2 carboxyarabinitol 1-phosphate in plant leaves by isotope dilution. *Plant Physiol.* **96**: 208-213.
- Preneta, Z.A. 1989. Separation on the basis size: gel permeation chromatography. In protein purification methods. A practical approach. edited by E.L.V. Harris and S. Angal. IRL Press. Oxford. pp. 293-306 ISBN 1852211121.
- Portis, A.R., M.E. Salvucci and W.L. Ogren. 1986. Activation of Ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase at physiological CO<sub>2</sub> and Ribulosebisphosphate concentrations by Rubisco activase. *Plant Physiol.* **82**: 967-971.
- Portis, A.R. 1990. Rubisco activase. *Biochim. Biophys. Acta* **1015**: 15-28.
- Rees, C.A.B., N.C. Hogan, D.B. Walden and B.G. Atkinson. 1986. Identification of mRNAs encoding low molecular mass heat-shock proteins in maize (*Zea mays* L.). *Can. J. Genet. Cytol.* **28**: 1106-1114.
- Robinson, S.P. and A.R. Portis. 1988. Involvement of stromal ATP in the light activation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in intact isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* **86**: 293-298.
- Robinson, S.P., V.J. Streusand, J.M. Chatfield and A.R. Portis. 1988. Purification and assay of Rubisco activase from leaves. *Plant Physiol.* **88**: 1008-1014.
- Robinson, S.P. and A.R. Portis. 1989a. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase protein prevents the *in vitro* decline in activity of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol.* **90**: 968-971.
- Robinson, S.P. and A.R. Portis. 1989b. Adenosine triphosphate hydrolysis by purified Rubisco activase. *Archives of Biochem. and Biophysics.* **268**(1): 93-99.

- Roesler, K.R. and W.L. Ogren. 1990. Primary structure of *Chlamydomonas reinhardtii* Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase and evidence for a single polypeptide. *Plant Physiol.* 94: 1837-1841.
- Roscher, E. and K. Zetsche. 1986. The effects of light quality and intensity on the synthesis of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and its mRNAs in the alga *Chlorogonium elongatum*. *Planta* 167: 528-586.
- Roy, H. 1989. Rubisco assembly: a model system for studying the mechanism of chaperon action. *The Plant Cell.* 1: 1035-1042.
- Rundle, S.J. and R.E. Zielinski. 1991. Organization and expression of two tandemly oriented genes encoding ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase in barley. *J.Biol. Chem.* 266(8): 4677-4685.
- Sage, R.F. and J.R. Seemann. 1993. Regulation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity in response to reduced light intensity in C4 plants. *Plant Physiol.* 102: 21-28.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning* I. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- Salvucci, M.E., A.R. Portis and W.L. Ogren. 1985. A soluble chloroplast protein catalyzes ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase *in vivo*. *Photosynthesis Research.* 7: 193-201.
- Salvucci, M.E., J.M. Werneke, W.L. Ogren and A.R. Portis. 1987. Purification and species distribution of Rubisco activase. *Plant Physiol.* 84: 930-936.
- Salvucci, M.E. 1989. Regulation of Rubisco activity *in vivo*. *Physiol. Plant.* 77: 164-171.
- Seemann, J.R., J. Kozba and B.D. Moore. 1990. Metabolism of 2-carboxyarabinitol 1-phosphate and regulation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity. *Photosynthesis Res.* 23: 119-130.
- Skowrya, D., C. Georgopoulos and M. Zyllicz. 1990. The *E. coli* DnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell.* 62: 639-644.
- Somerville, C.R., A.R. Portis and W.L. Ogren. 1982. A mutant of *Arabidopsis thaliana* which lacks activation of RuBP carboxylase *in vivo*. *Plant Physiol.* 70: 381-387.
- Snyder, G. and W.L. Ogren. 1993. A comparison of Rubisco activase in *Nicotiana tabacum*, *N. silvestris* and *N. tomentosiformis*. *Plant Physiol.* 102(1): 370.
- Streusand, V. J. and A.R. Portis. 1987. Rubisco activase mediates ATP-dependent activation of Ribulose bisphosphate carboxylase. *Plant Physiol.* 85: 152-154.
- Viitanen, P.V., A.A. Gabtenby and G.H. Lorimer. 1992. Purified chaperonin 60 (groE) interacts with the nonnative states of a multitude of *Escherichia coli* proteins. *Protein Sci.* 1: 363-369.
- Wang, Z.Y., G. W. Snyder, B.D. Esau, A.R. Portis and W.L. Ogren. 1992. Species-dependent variation in the interaction of substrate-bound Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) and Rubisco activase. *Plant Physiol.* 100: 1858-1862.
- Weidner, M. and E. Fehling. 1985. Heat modification of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by temperature pretreatment of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Planta* 166:117-127.
- Werneke, J.M., J.M. Chatfield and W.L. Ogren. 1988a. Catalysis of Ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation by the product of a Rubisco activase cDNA clone expressed in *Escherichia coli*. *Plant Physiol.* 87: 917-920.
- Werneke, J.M., R.E. Zielinski and W.L. Ogren. 1988b. Structure and expression of spinach cDNA encoding Ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 787-791.
- Werneke, J.M., J.M. Chatfield and W.L. Ogren. 1989. Alternative mRNA splicing generates the two Ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and *Arabidopsis*. *The Plant Cell.* 1: 815-825.

- Wilkinson, M. 1991.** Purification of RNA. In *Essential Molecular Biology. A practical approach.* The Practical approach series. Edited by T.A. Brown. Oxford University Press. ISBN 0-19-963110-7.
- Wishnick, M. and Lane, D.M. 1971.** Ribulose biphosphate carboxylase from spinach leaves. In: A. San Pietro Eds. *Methods in Enzymology*. Vol. XXIII, Academic Press, pp 570-577.
- Zielinski, R.E., J.M. Werneke and M.E. Jenkins. 1989.** Coordinate expression of Rubisco activase and Rubisco during barley leaf cell development: *Plant Physiol.* **90**: 516-521.