



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS (BIOQUÍMICA)

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN
GÉNICA DE RUBISCO ACTIVASA
EN PLANTAS DE MAÍZ

T E S I S

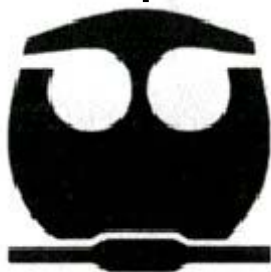
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS
(BIOQUÍMICA)

P R E S E N T A:

MARTIN P. VARGAS SUÁREZ

TUTORA: DRA. ESTELA SÁNCHEZ DE
JIMÉNEZ



MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Estela Sánchez de Jiménez, por todas sus enseñanzas y consejos inestimables. Por su oportuno apoyo, principalmente en la última etapa, para mantenerme firme en lograr mi meta.

A todos los miembros del jurado, por sus aportaciones críticas y valiosas a la presente tesis.

A la Dra. Irma Bernal Lugo y a la Dra. Herminia Loza Tavera, quienes en sus correspondientes cargos dentro del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, me permitieron generosamente continuar trabajando sobre mi proyecto, ya reincorporado a mi plaza.

A mis compañeros del laboratorio 103 con quienes conviví, por su importante ayuda diaria. En especial a Cesy, por sus palabras reconfortantes en los momentos más difíciles y por su amistad duradera.

A Itzhel y Jessica, por su esfuerzo este trabajo pudo ser concluído.

A Itzhel, Andréé, y César, por darme los ánimos y las fuerzas necesarias para continuar el proyecto cuando pasé del laboratorio 103 al 105.

A Erika, Rebe, Normita, Lulú y Richo, por escucharme siempre que lo necesité y alentarme constantemente.

A Carmen Parra y Elpidio García, por sus consejos y apoyo tan especiales.

Selina y Yola, sus palabras y compañía me dieron mucha energía.

A Caty, Viri, Denia, Alina, Mayra, Miguel, Alex y Agustín, por la ayuda recíproca en tantas dificultades en común.

A todos agradezco su insustituible amistad.

En memoria de Alfredo y Eric.

A Mochi, Mauchi y Nan, por su valiosa comprensión y sinfín de formas especiales de apoyo.....por todo el tiempo que les robé.

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección de la Dra. Estela Sánchez de Jiménez en el laboratorio L-103, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por el CONACYT para la realización de la presente tesis.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Estela Sánchez de Jiménez	Facultad de Química, UNAM
Dr. Víctor Valdés López	Facultad de Ciencias, UNAM
Dr. Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Herminia Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Patricia León Mejía	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Víctor Valdés López	Facultad de Ciencias, UNAM
Vocal	Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dr. Miguel Lara Flores	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. Ma. Amanda Gálvez Mariscal	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Eleazar Martínez Barajas	Facultad de Química, UNAM

ABREVIATURAS

ORF	Marco de lectura abierta (<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame).
<i>rca</i>	Gen de la Rubisco activasa.
RCA	Proteína Rubisco activasa.
RPP	Reducción de las pentosas fosfato.
Rubisco	Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa.
RuBP	Ribulosa 1,5-bifosfato.
UTR	Región no traducida (<u>u</u> n <u>t</u> ranslated <u>r</u> egion).

CONTENIDO

	Página
Agradecimientos	i
Jurado asignado	iii
Abreviaturas	iv
Resumen	v
Abstract	viii
I. Antecedentes	1
1.1 Fijación del CO ₂ atmosférico	1
1.2 Activación de la Rubisco	3
1.3 Actividad de la RCA	6
1.3.1 Activasa	6
1.3.2 Chaperona molecular	8
1.4 Organización génica de <i>rca</i>	12
1.5 Generación de los transcritos de <i>rca</i> y de las proteínas RCA	14
1.6 Regulación de la expresión de la RCA	19
1.6.1 Expresión durante el desarrollo	19
1.6.2 Expresión circadiana	21
1.6.3 Efectos de factores ambientales	24
1.7 Función de las dos isoformas de la RCA	26
II. Planteamiento del problema	31
Hipótesis	33
Objetivos	33
Diseño experimental	34
III. Resultados	35
3.1 Artículo # 1: “Rubisco activase chaperone activity is regulated	

by a post-translational mechanism in maize leaves”	35
3.1.1 Origen del polipéptido de RCA de 41 kDa	35
3.1.2 Regulación ambiental y por desarrollo de la acumulación de los polipéptidos de RCA	39
3.1.3 Actividad protectora de chaperona de la RCA	40
3.2 Artículo # 2: “In maize, two distinct ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase transcripts have different day/night patterns of expression”	42
3.2.1 Características del polipéptido codificado por los cDNAs de <i>rca</i>	42
3.2.2 Origen de los transcritos de <i>rca</i>	43
IV. Discusión	45
V. Conclusiones	55
VI. Direcciones futuras	56
Referencias bibliográficas	58

RESUMEN

La ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) activasa (RCA) es una chaperona molecular, codificada en el genoma nuclear, sintetizada en el citoplasma y transportada al cloroplasto. La RCA mantiene activa a la enzima Rubisco gracias a su actividad de chaperona caracterizada por desestabilizar y disociar los complejos inactivos Rubisco-azúcares fosfatados. La liberación de los azúcares fosfatados favorece la carbamilación de la Rubisco y la formación posterior del complejo ternario activo Rubisco- $\text{CO}_2\text{-Mg}^{2+}$. Este complejo ternario reacciona con una segunda molécula de CO_2 y con una molécula de ribulosa 1,5-bifosfato (RuBP), siendo entonces capaz de llevar a cabo su función de carboxilación.

En la mayoría de las plantas con metabolismo fotosintético de tipo C_3 se detectan dos polipéptidos para la RCA, uno grande llamado forma α y uno pequeño llamado forma β . Estos polipéptidos provienen de un único pre-mRNA que es procesado alternativamente o bien a partir de la transcripción de dos genes independientes. En maíz, una planta con metabolismo fotosintético de tipo C_4 , existen también dos genes de la RCA, el *rca1* y el *rca2*. Cada gen da origen a un transcrito. Ambos transcritos contienen en sus regiones 3' no traducidas (3'untranslated regions, 3'UTRs) secuencias de inestabilidad llamadas elementos "DST-like". El transcrito de *rca2* presenta un subdominio "DST-like" ausente en el transcrito de *rca1*, pero se desconoce la importancia de esta diferencia estructural. Además, maíz expresa dos polipéptidos: uno de 43 kDa, correspondiente al polipéptido β y otro más pequeño de 41 kDa. Sin embargo, los dos transcritos de *rca1* y 2 de maíz contienen un marco de lectura abierto (open reading frame, ORF) idéntico que codifica solamente al polipéptido β maduro, por lo que el origen del polipéptido de 41 kDa de RCA

es una interrogante. La RCA actúa como un complejo oligomérico formado por las subunidades α y β . La relación de estas dos subunidades cambia por factores ambientales y del desarrollo. Sin embargo, no se ha determinado la actividad de la RCA correspondiente a los diferentes grados de heterogeneidad en sus subunidades. Para contribuir al conocimiento de la expresión y actividad de la RCA de plantas C_4 se analizó si existe asociación entre los dominios “DST-like” y la abundancia de los transcritos de *rca*. Asimismo, se investigó el origen del polipéptido de 41 kDa de RCA de maíz así como la acumulación de los polipéptidos de 43 y 41 kDa de RCA con relación a varios factores ambientales y de desarrollo y se determinó su actividad de chaperona molecular en función de la composición de sus subunidades.

Para determinar si la diferente composición de los elementos “DST-like” guarda relación con la acumulación de los transcritos de *rca* de maíz, se llevaron a cabo análisis tipo northern blot con RNA polisomal extraído de hojas colectadas en diferentes momentos durante un ciclo de 24 horas, ya que se ha visto que el mRNA de *rca* muestra regulación de tipo circadiano. Se detectaron dos bandas de RNA: una de 1.8 kb que corresponde al transcrito de *rca2* y una de 1.4 que corresponde al transcrito de *rca1*. Los niveles de ambos transcritos muestran acumulación diferencial asociada al ciclo circadiano, siendo el de *rca2* el que presenta los cambios más pronunciados. Estos datos sugieren la participación de mecanismos post-transcripcionales mediados por los elementos “DST-like” en la abundancia de los transcritos de *rca* regulada por un ritmo circadiano.

Para definir el origen del polipéptido de 41 kDa de RCA de maíz, se tradujo *in vitro* mRNA poliA⁺ de hojas que contenían los dos transcritos de *rca*. Las proteínas sintetizadas se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-RCA de espinaca. Se encontró que sólo el

polipéptido de 43 kDa se sintetiza *de novo*. Utilizando anticuerpos específicos contra las regiones amino y carboxi terminales del polipéptido de 43 kDa de RCA de maíz, se detectó que ambos polipéptidos de RCA comparten la misma región carboxi-terminal y que la región amino-terminal del polipéptido de 43 kDa está ausente en el de 41 kDa. Los resultados indican que la producción de la forma de 41 kDa de RCA en maíz se genera por proteólisis limitada de la región amino-terminal de la forma β .

Para saber si existe una relación entre factores ambientales y fisiológicos con la acumulación de los polipéptidos de RCA se determinó la abundancia de ambas formas en diferentes etapas del desarrollo en dos estaciones del año, durante el ciclo de luz/obscuridad de 24 horas y bajo condiciones de estrés por luz y agua. Se observó que los niveles acumulados de las formas de 43 y 41 kDa de RCA no cambian sustancialmente a lo largo de un ciclo de 24 horas, aunque sí se encontró una acumulación diferencial dependiente de la etapa de desarrollo y del estrés al que se somete la planta. La relevancia de la relación de los polipéptidos de 43kDa/41kDa de RCA en el complejo funcional de chaperona se evidenció con ensayos de medición de la actividad protectora de chaperona de la RCA sobre la velocidad de la precipitación de la insulina reducida: dicha actividad es mayor a una relación de 1:2 que de 2:1.

ABSTRACT

Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) activase (RCA) is a nuclear-encoded molecular chaperone, synthesized in the cytoplasm and transported into the chloroplast. RCA maintains active Rubisco enzyme because of its chaperone activity by dissociating this protein from the inactive complexes Rubisco-sugar phosphates. Release of sugar phosphates favors Rubisco carbamylation and the formation of the full active ternary complex Rubisco-CO₂-Mg²⁺. To fulfill its carboxylation function, this ternary complex reacts with a second molecule of CO₂ and with a molecule of ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP).

Two RCA polypeptides are detected in most plants with C₃ photosynthetic metabolism, the large α form and the small β form. These polypeptides arise from a pre-mRNA via alternative splicing or from the transcription of two independent genes. In maize, a plant with C₄ photosynthetic metabolism, two genes of the RCA, the *rca1* and the *rca2*, also exist. Each gene gives rise to one transcript. Both transcripts contain in their 3' untranslated regions (3'UTRs) instability sequences designated DST-like elements. The *rca2* transcript shows a DST-like subdomain which is absent in the *rca1* transcript, but the significance of this structural difference is unknown. Also, maize expresses two polypeptides: one of 43 kDa, corresponding to the small β polypeptide and other smaller of 41 kDa. However, maize *rca1* and 2 transcripts contain an identical open reading frame (ORF) that only encodes the mature β polypeptide, leaving the origin of the 41 kDa RCA polypeptide an open question. RCA acts as an oligomeric complex formed by α and β subunits. The ratio of these subunits is dependent on environmental and developmental

factors. However, RCA activity corresponding to different extents of heterogeneity in its subunit types has not been determined. To contribute to the knowledge of RCA expression and RCA activity in C₄ plants, it was analyzed whether there is association between the DST-like domains and the *rca* transcripts abundance. Also the origin of the maize 41 kDa RCA polypeptide as well as the accumulation of the 43 and 41 kDa RCA polypeptides in relation to several environmental and developmental factors were investigated. The RCA molecular chaperone activity was measured in function of the composition of its subunits.

To determine whether particular sequences of the "DST-like" domains are associated with the maize *rca* transcripts accumulation, northern blot analysis with polyosomal RNA from leaves collected in different moments during a 24 hours cycle was carried out. This was based on the circadian regulation of *rca* mRNA accumulation. Two bands of 1.8 and 1.4 kb were detected which corresponded to the *rca2* and *rca1* transcript, respectively. The levels of both transcripts showed differential accumulation associated to the circadian cycle, being the most remarkable changes on the *rca2*. These data suggest the participation of post-transcriptional mechanisms, mediated by the "DST-like" elements, on the abundance of the *rca* transcripts regulated by a circadian rhythm.

To determine the origin of the maize 41 kDa RCA polypeptide, mRNA *poliA*⁺ from leaves containing both *rca* transcripts was *in vitro* translated. The synthesized proteins were immunoprecipitated by anti-spinach RCA antisera. Only the 43 kDa polypeptide was *de novo* synthesized. By using specific antibodies against either the amino or the carboxi terminal regions of the maize 43 kDa RCA polypeptide, both RCA polypeptides were found to share the same carboxi-terminal region, but the amino-terminal region of the 43 kDa polypeptide was missing in the 41 kDa polypeptide. The results indicate that the

production of the maize 41 kDa RCA isoform is generated by limited and specific proteolysis of the amino-terminal region of β isoform.

A possible relationship between environmental and physiological factors with RCA polypeptides accumulation was explored. To this end, the abundance of both RCA isoforms at different developmental stages, in two year seasons, during a 12/12 h light/dark cycle and under light and water stress conditions was determined. Accumulated levels of 43 and 41 kDa RCA isoforms did not change greatly within the 24 hours cycle, however, a differential accumulation, dependent on the developmental stage and induced-stress was found. The relevance of the 43kDa/41kDa RCA polypeptide ratio in the functional complex of chaperone was evident when measuring the RCA chaperone protector activity. This activity, which was determined on the reduced insulin precipitation rate showed to be higher at 1:2 than at 2:1 43kDa/41kDa RCA ratio.

I. ANTECEDENTES

1.1 Fijación del CO₂ atmosférico.

El carbono orgánico en organismos fotosintéticos deriva del CO₂ atmosférico a través de un proceso conocido como ciclo de reducción de las pentosas fosfato (ciclo RPP). En las plantas, el ciclo RPP se lleva a cabo en los cloroplastos a través de tres etapas principales: la de carboxilación, la de reducción y la de regeneración. En la primer etapa de este ciclo, la enzima ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa /oxigenasa (Rubisco) cataliza la unión de una molécula de CO₂ a una molécula del azúcar fosfato, ribulosa 1,5-bifosfato (RuBP), a concentraciones de CO₂ en el aire (0.03%). Esta reacción genera dos moléculas de fosfoglicerato (PGA). Por lo tanto, la fijación de tres moléculas de CO₂ produce seis moléculas de PGA, las cuales posteriormente se reducen a las triosas fosfato gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato, a expensas del NADPH. De las seis moléculas de triosa fosfato, una es la ganancia neta y sirve para sintetizar almidón y sacarosa, mientras que las cinco restantes se rearreglan para regenerar el aceptor de CO₂, la RuBP (Figura 1). Este tipo de metabolismo del carbono se lleva a cabo en los cloroplastos de las células del mesófilo y se conoce como la vía de fijación tipo C₃ dado que el compuesto generado por la carboxilación de la RuBP es un compuesto de 3 átomos de carbono, el PGA. Las plantas que fijan el CO₂ a través de esta vía se denominan plantas C₃ (revisado en Robinson and Walker, 1981).

Existe otro tipo de fijación del carbono conocido como la vía de fijación C₄ (Edwards and Huber, 1981). Esta vía consiste en la fijación del CO₂ atmosférico al fosfoenol piruvato (PEP) por la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa), para originar un ácido dicarboxílico de cuatro carbonos como el producto primario de dicha fijación (oxaloacetato, malato o aspartato). En la descarboxilación del ácido dicarboxílico

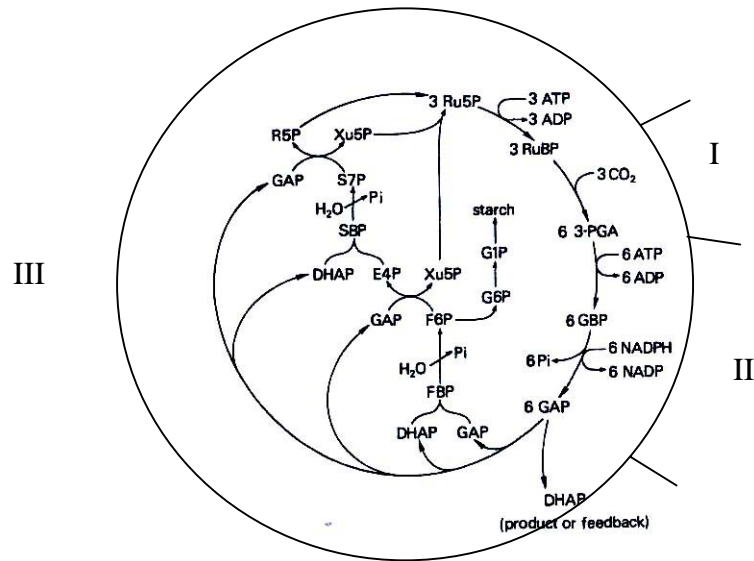


Figura 1. Ciclo RPP. Se indican las tres fases de este ciclo: I, la carboxilación; II, la reducción; III, la regeneración. RuBP: ribulosa 1,5-bifosfato; 3-PGA: 3-fosfoglicerato; GBP: glicerato 1,3-bifosfato; GAP: gliceraldehído 3-fosfato; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; FBP: fructosa 1,6-bifosfato; F6P: fructosa 6-fosfato; G6P: glucosa 6-fosfato; G1P: glucosa 1-fosfato; Xu5P: xilulosa 5-fosfato; E4P: eritrosa 4-fosfato; SBP: sedoheptulosa 1,7-bifosfato; S7P: sedoheptulosa 7-fosfato; R5P: ribosa 5-fosfato; Ru5P: ribulosa 5-fosfato (Robinson and Walker, 1981).

para generar CO_2 que se incorpora al ciclo RPP y piruvato que regenera el PEP. Finalmente, en la fijación del CO_2 por la Rubisco (Edwards and Huber, 1981). La vía C_4 se lleva a cabo de forma cooperativa entre dos tipos celulares distintos: las células del mesófilo y las células de la vaina. La fijación del CO_2 por la PEP carboxilasa y la del CO_2 por la Rubisco ocurre en las células del mesófilo y en las células de la vaina, respectivamente (revisado en Edwards and Huber, 1981) (Figura 2). Debido a la descarboxilación del oxaloacetato, del malato o del aspartato en las células de la vaina, la concentración del CO_2 en el sitio de carboxilación de la Rubisco en este tipo de metabolismo aumenta considerablemente con respecto a la concentración del CO_2 en el aire, opuesto a lo que ocurre en las plantas C_3

(Hatch, 1987). Las plantas que fijan el CO_2 a través de este metabolismo se denominan plantas C_4 (Edwards *et al.*, 1985).

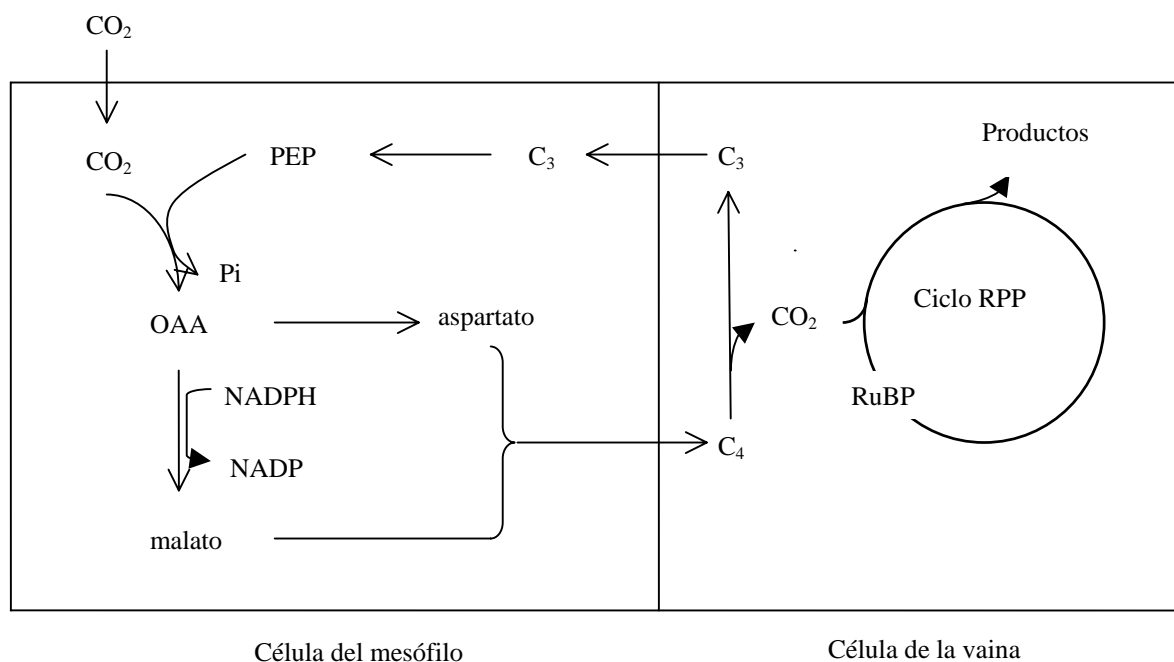


Figura 2. Ciclo C_4 . Existen tres variantes bioquímicas del ciclo C_4 . Cada variante se caracteriza por el transporte específico tanto de un ácido C_4 como de un ácido C_3 entre las células del mesófilo y las células de la vaina. Las variaciones del ciclo C_4 están ligadas a diferencias en la fotoquímica, la anatomía de la hoja y la taxonomía de las plantas que las presentan. PEP: fosfoenol piruvato; OAA: oxaloacetato (Edwards and Huber, 1981).

1.2 Activación de la Rubisco.

La Rubisco es una enzima oligomérica conformada por dos tipos de subunidades: la subunidad grande (LS), de 50-55 kDa y la subunidad pequeña (SS), de 12-18 kDa. Las LS están arregladas como una estructura central de cuatro dímeros, flanqueada, por un lado, por cuatro SS y por el lado opuesto de la molécula por otras cuatro SS, formando así la enzima completa hexadecamérica de aproximadamente 550 kDa (Figura 3). Los sitios

catalíticos se encuentran en la LS, pero se requiere la presencia de la SS para que tengan actividad (Robinson and Walker, 1981).

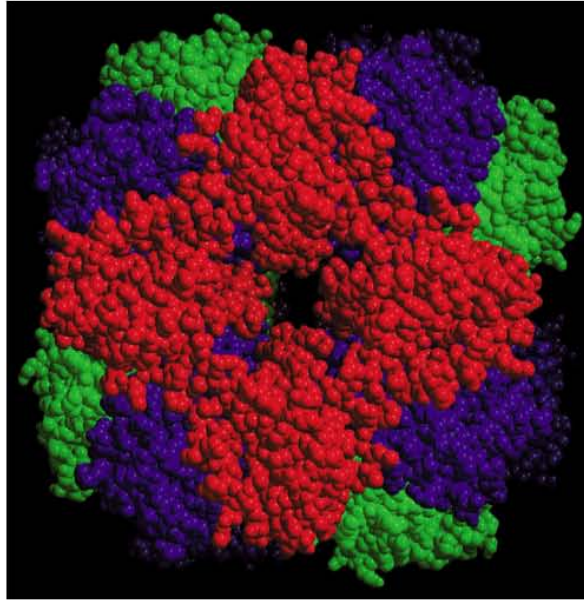


Figura 3. Modelo de la estructura de la Rubisco de cloroplastos de plantas superiores. Las subunidades pequeñas de la Rubisco aparecen en rojo (solo se ven cuatro de las ocho subunidades) y las subunidades grandes en azul y verde para mostrar las uniones de los cuatro dímeros (Malkin and Niyogi 2000).

Para fijar el CO_2 , la Rubisco primero se debe activar a través de la carbamilación del grupo ϵ -amino de una lisina que se encuentra en el sitio activo en la LS (la lisina 201 en Rubisco de espinaca). El carbamato resultante es una especie aniónica capaz de unir Mg^{2+} . El complejo ternario Rubisco- CO_2 - Mg^{2+} es la forma de la enzima que es completamente activa (Figura 4). Cuando una segunda molécula de CO_2 reacciona con la enzima en el sitio activo, entonces la RuBP unida al complejo activo se carboxila (Andrews and Lorimer, 1987). Debido a la existencia de un gradiente de concentración de CO_2 , del aire al cloroplasto de las células del mesófilo, la activación de la Rubisco en las plantas C_3 ocurre a

concentraciones de CO₂ muy bajas (aproximadamente 11 μM), cercanas a la km (CO₂) de 12 μM de la Rubisco, lo cual es apenas suficiente para carbamilar parcialmente todas las moléculas de la enzima. (Jordan and Ogren, 1984).

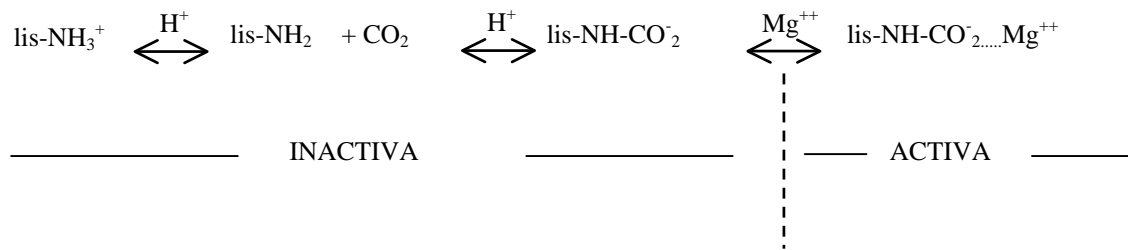


Figura 4. Formación de la Rubisco catalíticamente competente. La activación involucra la carbamilación reversible del grupo ε-amino de la lisina 201. La unión del Mg⁺⁺ al carbamato de la Rubisco crea un complejo ternario activo capaz de reaccionar con una segunda molécula de CO₂ (Andrews and Lorimer, 1987).

La Rubisco puede unir azúcares fosfatados antes o después de carbamilarse, previo a la formación del complejo activo Rubisco-CO₂-Mg²⁺. En su estado no carbamylado, la Rubisco puede unir fuertemente a la RuBP, la cual puede encontrarse en altas concentraciones en condiciones de iluminación, evitando así la carbamilación (Jordan and Chollet, 1983). Otros azúcares fosfatados como la xilulosa bifosfato (Edmonson *et al.*, 1990) y el carboxiarabinitol 1-fosfato (Gutteridge *et al.*, 1986), el cual se acumula en grandes cantidades en las plantas C₃ durante la obscuridad (Servaites, 1985), se unen fuertemente al sitio activo carbamylado de la Rubisco, compitiendo entonces contra la RuBP. En ambos casos el resultado neto es el mismo: la acumulación de una forma inactiva de la Rubisco (Salvucci and Ogren, 1996; Portis, 2003).

1.3 Actividad de la RCA.

1.3.1 Activasa.

Dadas las condiciones que prevalecen en los cloroplastos de las células del mesófilo de las plantas C_3 , la actividad catalítica de la Rubisco debería estar reducida a un nivel muy bajo (Salvucci and Ogren, 1996), resultando difícil considerar cómo es que la Rubisco podría funcionar *in vivo* si su activación por carbamilación ocurriera espontáneamente. No obstante, las velocidades de fijación de CO_2 a intensidades de irradiación saturante indican que la Rubisco funciona regularmente entre un 70 a 100% de su capacidad máxima (Salvucci and Ogren, 1996). La respuesta a esta paradoja es la participación de una proteína soluble del cloroplasto llamada Rubisco activasa (RCA), la cual activa a la Rubisco (Salvucci *et al.*, 1985). Se sabe que la ausencia de la proteína RCA en mutantes *rca* de *Arabidopsis* de esta enzima provoca un fenotipo de requerimiento de alto CO_2 (Somerville *et al.*, 1982). Estudios de la actividad de la Rubisco en esta mutante mostraron que esta enzima por sí misma no puede alcanzar y mantener un nivel adecuado de actividad para soportar el crecimiento de la planta a concentraciones de CO_2 ambientales, lo que demuestra que la RCA es necesaria para este fin (Salvucci *et al.*, 1986).

Se sabe que la RCA promueve la activación de la Rubisco a través de la disociación de los complejos inhibitorios Rubisco-azúcares fosfatados, posibilitando la carbamilación de la enzima y la unión de la RuBP al complejo activo Rubisco- CO_2 - Mg^{2+} (Figura 5) (Salvucci and Ogren, 1996; Portis, 2003). La transición de los complejos inactivos Rubisco-azúcares fosfatados a la forma libre de la Rubisco, implica movimientos concertados entre las subunidades de la Rubisco y las de la RCA, dependientes de la hidrólisis del ATP (Portis, 2003), actividad que es ejercida por la RCA (Robinson and Portis, 1989). Dado que cuando la RCA y el ATP están presentes promueven un aumento

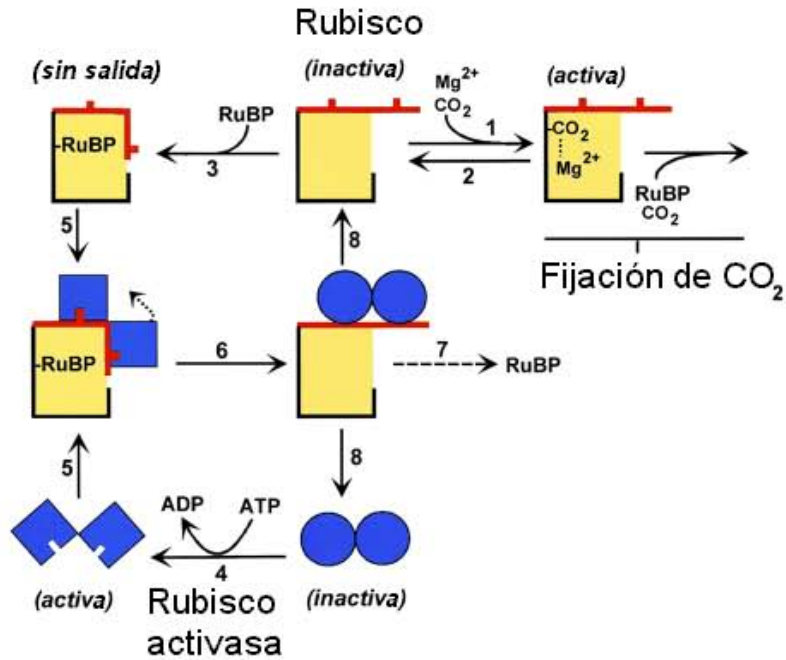


Figura 5. Interacción de la Rubisco (en amarillo) con la Rubisco activasa (en azul). Un sitio activo de la Rubisco que ha perdido el CO₂, quedando descarbamilado (paso 2), une a la RuBP (paso 3) produciendo un complejo inactivo Rubisco-RuBP. La interacción física de la RCA con la Rubisco (paso 5) cambia la conformación de la Rubisco (paso 6) de manera dependiente de la hidrólisis del ATP (paso 4). A causa de una menor afinidad, la RuBP se disocia del sitio activo de la Rubisco (paso 7), liberando así los sitios para una subsecuente carbamilación (paso 1) o una nueva unión de la RuBP (paso 3), después de la disociación de la activasa (paso 8) (Jensen, 2000).

en la carbamilación, la actividad de la Rubisco ya no se inhibe por la RuBP. Así, la RCA anula la inhibición de la actividad enzimática de la Rubisco, facilitando su carbamilación en presencia de la RuBP y por lo tanto mejorando su actividad (Portis *et al.*, 1986). La RCA también anula la inhibición causada por la fuerte unión de azúcares fosfatados a la Rubisco carbamilada (Robinson and Portis, 1988).

La disociación de la RuBP de la Rubisco, facilitada por la RCA, disminuye la k_{act} (CO₂) para la carbamilación a aproximadamente 4 μ M, lo que permite, en consecuencia, la carbamilación de un 70-90% de los sitios de Rubisco a concentraciones de CO₂ en el aire.

Este nivel de carbamilación es suficientemente alto para explicar las velocidades de fijación de CO₂ observadas a irradiación saturante (Portis *et al.*, 1986).

Dada la alta concentración de CO₂ que existe en el cloroplasto de las células de la vaina, sería sensato considerar que en las plantas C₄ la carbamilación de la Rubisco ocurriera espontáneamente. Además, el requerimiento de la RCA en este grupo de plantas sería cuestionable ya que no todas las especies C₄ muestran variaciones en la carbamilación de la Rubisco, asociadas a la unión del carboxiarabinitol 1-fosfato, moduladas por la luz. (Sage and Seemann, 1993). De hecho, en algunas plantas C₄ el grado de inactivación de la Rubisco en la obscuridad es mucho menor que el correspondiente en plantas C₃ (Usuda, 1985). No obstante, los resultados de diversas investigaciones muestran que la RCA sí se expresa en las plantas C₄ (Hudson *et al.*, 1992; Martínez-Barajas *et al.*, 1997; Wyrich *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 1999; Crafts-Brandner and Salvucci, 2002; von Caemmerer *et al.*, 2005). Para definir la función de la RCA en este tipo de plantas, von Caemmerer y col. (2005) generaron plantas de *Flaveria bidentis* con bajos niveles de la RCA, utilizando un RNA antisentido (secuencia nucleotídica complementaria a una secuencia de un mRNA, evitando su traducción). La progenie de las transformantes primarias muestra muy bajos niveles de la RCA, velocidades de asimilación de CO₂ muy bajas, así como un escaso porcentaje de sitios de Rubisco carbamilados, en condiciones de alta luz y concentraciones ambientales de CO₂, por lo que los autores concluyeron que la actividad de la RCA también es esencial para el funcionamiento de la vía C₄.

1.3.2 Chaperona molecular.

Se denominan chaperonas moleculares a proteínas cuyo papel es ayudar al plegamiento funcional de otras proteínas o, en algunos casos, a su ensamblaje en

estructuras oligoméricas activas, pero que no son componentes de esas estructuras finales. Las chaperonas actúan en forma dependiente de ATP (Ellis and van der Vies, 1991) y algunas de ellas aumentan su concentración después de que las células reciben un estrés de calor (Jaenicke and Creighton, 1993). En términos generales, las chaperonas moleculares actúan como grandes complejos formados por diferentes subunidades (Sigler *et al.*, 1998).

Hace diez años se propuso que la RCA podría actuar como una chaperona molecular, dado que presenta algunas propiedades características de proteínas pertenecientes a esta familia (Sánchez-de-Jiménez *et al.*, 1995) y no propiedades de una enzima, como se había catalogado anteriormente (Salvucci *et al.*, 1985). Los criterios que contribuyeron a definir a la RCA como chaperona son los siguientes: a) la activación de la Rubisco por la RCA es un proceso dependiente de la hidrólisis del ATP en el que la RCA es liberada intacta del complejo Rubisco-RCA; b) la RCA se une preferencialmente a la Rubisco no nativa que a la Rubisco nativa; c) durante estrés por calor la cantidad de la RCA aumenta, lo cual coincide con un aumento en la actividad de la Rubisco *in vivo*; d) la actividad de la Rubisco desnaturalizada se recupera al añadir la RCA y un sistema regenerador de ATP (Sánchez-de-Jiménez *et al.* 1995). El concepto de que la RCA es una chaperona molecular también está apoyado en la expresión de nuevas isoformas de la RCA (Law and Crafts-Brandner, 2001; Law *et al.* 2001) y en una localización subcelular diferente de la RCA preexistente, cuando las plantas son expuestas a estrés de calor (Rokka *et al.* 2001). Además, recientemente se reportó la expresión de la RCA en el estroma de cloroplastos de las células del mesófilo de maíz, donde la Rubisco no se expresa, sugiriendo que esta proteína podría actuar como chaperona de otras moléculas (Hong *et al.*, 2004).

La proteína RCA en su forma activa es probablemente un oligómero, como ocurre con otras chaperonas (Wang *et al.*, 1993). Sin embargo, hasta el momento no se ha podido

definir con precisión cuál es la masa molecular de la molécula funcional de la RCA ya que varía dependiendo de las condiciones y el método utilizado. Basados en análisis de filtración en gel a temperatura ambiente, se obtienen oligómeros muy grandes (>550 kDa) en presencia de ATP o ATP- γ -S y Mg^{2+} , pero en presencia de ADP se observan oligómeros menores (~340 kDa) (Wang *et al.*, 1993) y a 4 °C se obtienen oligómeros aun más pequeños. En ausencia de nucleótidos la masa molecular es de 280 kDa por cromatografía en Superosa-12 mientras que en Sephacryl S-300 es de tan solo 58 kDa. Se sugiere que la amplia variación de la masa molecular estimada para la RCA refleja su capacidad de auto-asociarse (Portis, 1990), así como posiblemente un proceso relativamente lento, el de la asociación y disociación de sus oligómeros (Salvucci, 1992).

Las subunidades de la RCA son altamente auto-asociativas. La actividad específica de la RCA incrementa hiperbólicamente en el intervalo de concentración de 0-100 μ g de proteína /ml (Salvucci, 1992; Wang *et al.*, 1993). Este tipo de dependencia de la actividad con respecto a la cantidad de proteína es indicativo de proteínas auto-asociativas cuyas actividades catalíticas varían con el grado de auto-asociación (Minton, 1981, citado por Salvucci, 1992). El polietilén glicol (PEG) es un polímero inerte que promueve asociación de proteínas (Minton, 1981, citado por Salvucci, 1992). La actividad de carboxilación de la Rubisco y la actividad de ATPasa de la RCA aumentan con la presencia de PEG (Salvucci, 1992). Además, la presencia de PEG aumenta la masa molecular aparente de la RCA nativa en gradientes de sacarosa (Salvucci, 1992). Asimismo, se ha demostrado que existe una dependencia de la actividad de hidrólisis del ATP por la RCA con respecto al estado de agregación de sus monómeros (Lilley and Portis, 1997), siendo las estructuras oligoméricas

más grandes de la RCA las que exhiben las actividades máximas de hidrólisis de ATP y de activación de la Rubisco (Wang *et al.*, 1993).

Existe una familia de proteínas denominadas AAA⁺ (ATPasas asociadas con diversas actividades celulares) que participan en diversos procesos celulares y que tienen actividad de ATPasa. Estas proteínas contienen una o más copias de los dominios conservados de ATPasas conocidos como módulos AAA⁺ y típicamente forman estructuras de anillo, donde la actividad de ATPasa parece actuar como un motor conductor de sus movimientos inter e intramoleculares (Ogura and Wilkinson, 2001). Las proteínas AAA⁺ constituyen un tipo nuevo de chaperonas moleculares las cuales actúan como factores desestabilizadores de estructuras moleculares o macromoleculares (Ogura and Wilkinson, 2001).

Además de ser una chaperona molecular, la RCA se ha clasificado como un miembro de la familia AAA⁺, con base en alineamientos múltiples de secuencias de proteína (Neuwald *et al.*, 1999). Aunque el módulo AAA⁺ es necesario para la actividad de las proteínas de esta familia, la actividad distintiva de cada una de ellas reside en otros dominios (Ogura and Wilkinson, 2001). Consistente con esta característica, algunos residuos de la RCA que parecen interactuar con la Rubisco, su sustrato, no están localizados en el módulo AAA⁺ sino en los extremos amino y carboxi de la proteína (van de Loo and Salvucci, 1996; Esau *et al.*, 1996). La participación de la RCA sobre los complejos Rubisco-azúcares fosfatados implica una fuerza desestabilizadora de estructuras moleculares que resulta en la disociación del complejo inactivo, semejante a como ocurre con otras proteínas AAA⁺ (Portis, 2003). En congruencia con la actividad de prevenir la agregación de proteínas desnaturalizadas o renaturalizar las ya desnaturalizadas por parte

de algunas de las proteínas AAA⁺ (Ogura and Wilkinson, 2001), la RCA restauró *in vitro* la actividad de la Rubisco inactivada por calor (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1995), aunque esta capacidad no ha podido ser confirmada por otros investigadores (Eckardt and Portis, 1997).

1.4 Organización génica de *rca*.

Se ha reportado un número específico de genes para *rca* de diferentes especies (Tabla I), con base en análisis de secuencias de clonas de cDNA, clonas genómicas de *rca*, patrones obtenidos por hibridaciones DNA:DNA con sondas de *rca* y ensayos de “PCR” con “primers” específicos para *rca* (técnica consistente en la amplificación de secuencias específicas de un DNA blanco, con una DNA polimerasa resistente al calor, desoxirribonucleósidos trifosfato y un par de oligonucleótidos sintéticos que hibridan selectivamente, en función de la temperatura, a secuencias que delimitan la región de interés por amplificar) (Werneke *et al.*, 1988; Werneke *et al.*, 1989; Rundle and Zielinski, 1991a; Qian and Rodermel, 1993; To *et al.*, 1999; Law and Crafts-Brandner, 2001; Salvucci *et al.*, 2003; Ayala-Ochoa *et al.*, 2004). De los dos genomas de plantas completamente secuenciados, arroz y *Arabidopsis*, el de arroz muestra un solo gen para *rca*, como había sido propuesto previamente por otros estudios (To *et al.*, 1999), pero en contradicción con la sugerencia de la presencia de dos genes (Zhang and Komatsu, 2000). El análisis del genoma de *Arabidopsis* muestra dos genes para RCA, lo que resulta contrario a la propuesta inicial de un solo gen (Werneke *et al.*, 1989). Además, el análisis de la secuencia de una clona de cDNA de RCA (número de acceso al banco de genes (GeneBank): X14212) sugiere la existencia de otro gen diferente a los dos anteriores. Dentro del grupo de plantas dicotiledóneas, además de *Arabidopsis*, también se han

Tabla I. Genes para *rca* y mecanismos de origen de los polipéptidos de RCA en diferentes plantas.

Planta	Genes	Forma α	Forma β	Mecanismo	Referencia
Espinaca	1	45 kDa	41 kDa	P.A.	Werneke <i>et al.</i> , 1988
<i>Arabidopsis</i>	1 1 1	47 kDa 47 kDa	44 kDa 44 kDa	P.A. N.D. N.D.	Werneke <i>et al.</i> , 1989
Arroz	1	45 kDa	41 kDa	P.A.	To <i>et al.</i> , 1999
Cebada	<i>RcaA</i> <i>RcaB</i>	46 kDa	42 kDa 42 kDa	P.A. T.	Rundle and Zielinski, 1991a
Algodón	1 1	47 kDa	43 kDa	T. T.	Salvucci <i>et al.</i> , 2003
Trigo	1 1	46 kDa	42 kDa	N.D. N.D.	Law and Crafts-Brandner, 2001
Tabaco	3	N.E.	42 kDa	N.D.	Qian and Rodermel, 1993
Maíz	2	N.E.	43 kDa 41 kDa	T. ¿?	Ayala-Ochoa <i>et al.</i> , 2004

N.D., no determinado; N.E., no existe; P.A., procesamiento alternativo; T, transcripcional.

analizado los genes para *rca* de espinaca (Werneke *et al.*, 1988), *Nicotiana tabacum* (Qian and Rodermel, 1993) y algodón (Salvucci *et al.*, 2003), para las cuales se ha definido un gen, una familia multigénica de al menos tres miembros y dos genes, respectivamente. En el caso de plantas monocotiledóneas, además de arroz, se proponen dos genes para *rca* en cebada –*RcaA* y *RcaB*– (Rundle and Zielinski, 1991a), dos en maíz (Ayala-Ochoa *et al.*, 2004) y uno en trigo (Law and Crafts-Brandner, 2001), aunque diferencias en las secuencias de dos clonas de cDNA de *rca* de esta planta (números de acceso al GeneBank: AF251264 y AY206372), indican la existencia de dos genes.

1.5 Generación de los transcritos de *rca* y de las proteínas RCA.

La mayoría de las plantas hasta ahora analizadas presenta dos polipéptidos maduros de RCA, llamados formas α y β , cuyas masas moleculares están alrededor de 47 y 41 kDa, respectivamente (Salvucci *et al.*, 1987). Estos polipéptidos se sintetizan en el citoplasma como precursores y posteriormente se procesan a su forma madura por la remoción del péptido de tránsito durante su importe al cloroplasto (Werneke *et al.*, 1988). El mecanismo por el cual se generan dos polipéptidos de RCA a partir de un solo gen en espinaca, *Arabidopsis*, cebada y arroz, es un procesamiento alternativo del intrón más cercano al extremo 3' durante el proceso de maduración del transcrito primario, generando dos mRNAs para *rca* (Werneke *et al.*, 1988; Werneke *et al.*, 1989; Rundle and Zielinski, 1991a; To *et al.*, 1999).

En espinaca se usan dos sitios de procesamiento alternativo localizados en el extremo 5' del último intrón, el cual tiene una longitud de 137 nucleótidos (nt). Este intrón puede removerse parcial o completamente (Figura 6). En el primer caso, todos los nucleótidos del intrón se eliminan excepto los primeros veintidós. Esta secuencia de

polipéptido de 44 kDa (forma β), idéntico al de 47 kDa (forma α), excepto por la ausencia de 28 aminoácidos en el extremo carboxi-terminal (Werneke *et al.*, 1989). Un segundo gen, registrado en la base de datos de genomas de plantas en el NCBI (“National Center for Biotechnology Information”, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), TIGR (“The Institutue for Genomic Research”, <http://www.tigr.org/>) y TAIR (“The Arabidopsis Information for Resource”, <http://www.arabidopsis.org/>), codifica para una supuesta proteína RCA correspondiente al precursor de una forma β madura. Una clona de cDNA de RCA de *Arabidopsis* (número de acceso al GeneBank: X14212) codifica a una forma α cuya secuencia deducida de aminoácidos difiere en seis aminoácidos de la secuencia deducida proveniente del gen, lo cual sugiere un origen transcripcional independiente de esta variante de la forma α . Además, las secuencias deducidas de aminoácidos de las variantes de las formas α y β , no sugieren un origen por procesamiento alternativo a partir de un mRNA común, sino más bien apoyan la existencia de un tercer gen para RCA.

En cebada el gen llamado *RcaB* es transcrito y produce un solo mRNA, el cual codifica un polipéptido maduro de 42 kDa (forma β). En contraste, un segundo gen denominado *RcaA* produce dos mRNAs que codifican para polipéptidos de 42 (forma β) y 46 kDa (forma α), a través de un mecanismo de procesamiento alternativo semejante al de espinaca, en el que también se incorpora un codón de término al mantener una secuencia de 50 nt del intrón más cercano al extremo 3' (Rundle and Zielinski, 1991a).

En el caso de arroz el último intrón tiene una longitud de 962 nt y contiene cuatro sitios involucrados en el procesamiento (Figura 7). Cuando se utilizan los sitios 1 y 4, se elimina el intrón completo, generándose un mRNA capaz de codificar para el polipéptido de 45 kDa (forma α). Cuando se utilizan los sitios de procesamiento 1-2 y 3-4, se elimina

parcialmente el intrón, quedando retenida una porción que se localiza entre los sitios 2 y 3. Estos eventos generan un mRNA capaz de codificar para el polipéptido de 41 kDa (forma β). Los cinco primeros tripletes de la región retenida del intrón en este mRNA maduro codifican cinco aminoácidos diferentes a los del polipéptido de 45 kDa y el sexto codifica un codón de terminación. Esto hace que los dos polipéptidos sean idénticos excepto por un cambio de 5 aminoácidos en el polipéptido de 41 kDa y la adición de 33 aminoácidos en el extremo carboxi-terminal del polipéptido de 45 kDa (To *et al.*, 1999).

Recientemente se reportó que las formas α y β de RCA de algodón están codificadas por dos genes independientes que no presentan procesamiento alternativo. En esta planta la forma α es de 47 kDa y la β es de 43 kDa. Esta diferencia en el tamaño entre ambos polipéptidos es el resultado de una extensión en el carboxi terminal de 39 aminoácidos en la forma α . Además, estos dos polipéptidos tienen, comparativamente entre sí, 4 aminoácidos diferentes en la región amino-terminal, 5 en la región carboxi-terminal y 13 entre ambas regiones (Salvucci *et al.*, 2003).

En maíz, la primera planta C_4 en la que se ha analizado la expresión génica de *rca*, se han reportado dos genes (*rca1* y *rca2*), dos transcritos y dos polipéptidos, uno de 43 kDa y otro de 41 kDa (Martínez-Barajas *et al.*, 1997; Morales *et al.*, 1999; Ayala-Ochoa *et al.*, 2004). El gen *rca1* da origen a un transcrito y el gen *rca2* a otro transcrito (Ayala-Ochoa *et al.*, 2004). Sin embargo, ambos transcritos contienen un marco de lectura abierto (open reading frame, ORF) idéntico que codifica para un polipéptido maduro de 43 kDa, el cual, por similitud de secuencia, corresponde al polipéptido β reportado de otras especies (Werneke *et al.*, 1988; Werneke *et al.*, 1989; Rundle and Zielinski 1991a; To *et al.*, 1999;

Salvucci *et al.*, 2003; Ayala-Ochoa *et al.*, 2004). Por lo tanto, es posible que el polipéptido de 41 kDa se genere a partir de la forma β .

En trigo se expresan dos polipéptidos de RCA, uno de 46 kDa (forma α) y otro de 42 kDa (forma β) (Law and Crafts-Brandner, 2001). Parece posible un origen transcripcional independiente de estos dos polipéptidos ya que las secuencias deducidas de aminoácidos correspondientes a dos clonas de cDNA de *rca* (números de acceso al NCBI: AY206372 y AF251264), las cuales codifican a las formas α y β , respectivamente, difieren entre sí en veinticuatro aminoácidos localizados a lo largo de toda la secuencia. En el caso de tabaco (Qian and Rodermel, 1993), los tres genes para *rca* codifican al mismo polipéptido de 42 kDa, correspondiente a la forma β .

1.6 Regulación de la expresión de la RCA.

1.6.1 Expresión durante el desarrollo.

La abundancia de la proteína RCA puede variar durante el desarrollo según las características fisiológicas de la planta. Por ejemplo, en el caso del gradiente de diferenciación celular que se da durante el desarrollo de la hoja en plantas de cebada, la proteína RCA se acumula progresivamente de la base a la punta de la hoja, aunque sus niveles disminuyen en los segmentos más distales. Además, existe una acumulación diferencial entre los niveles de cada una de las formas de RCA a lo largo de toda la hoja, siendo los de la forma β más abundantes que los de la forma α (Zielinski *et al.*, 1989). En cuanto a la influencia de la edad de la hoja sobre la cantidad de la RCA presente en plantas de arroz, se encontró que la relación del polipéptido α con respecto al polipéptido β permanece constante desde la hoja 1 hasta la hoja 7 y que la forma β siempre es más

abundante que la forma α (Zhang and Komatsu, 2000). En un estudio relativo al proceso fisiológico del llenado de grano de la mazorca de maíz, se determinaron los niveles de la RCA de la parte media de la hoja que se localiza inmediatamente arriba de la mazorca y que aporta fotosintatos a este fruto en desarrollo. Durante todo el periodo de llenado de grano, sólo se detecta al polipéptido de 43 kDa cuyos niveles aumentan hasta un máximo durante el primer tercio de dicho periodo y posteriormente disminuyen paulatinamente hasta niveles casi indetectables (Martínez-Barajas *et al.*, 1997; Morales *et al.*, 1999).

La regulación de la expresión de la RCA parece involucrar tanto mecanismos transcripcionales como post-transcripcionales en el caso del desarrollo de la hoja en cebada (Rundle and Zielinski, 1991b). En esta planta existe una acumulación diferencial de los tres mRNAs de *Rca* a lo largo de la hoja: mientras que el de *RcaB* alcanza su mayor nivel en los extremos de las hojas, los de *RcaA* total (*RcaA1* + *RcaA2*) muestran su máximo en la parte media. La diferencia en acumulación entre los transcritos de *RcaA* y de *RcaB* en la región media de la hoja se debe en gran medida a diferencias en las velocidades de transcripción de sus genes correspondientes. Sin embargo, el nivel de los transcritos de *RcaA1* y de *RcaA2* en esa misma zona es diferente entre sí, lo cual es debido posiblemente a sus velocidades particulares de recambio o a cambios en el procesamiento alternativo del pre-mRNA que los origina (Rundle and Zielinski, 1991b). En cualquier caso, los niveles de los mRNAs no coinciden con los correspondientes a las proteínas (Zielinski *et al.*, 1989). No se puede definir el tipo de regulación de la expresión de la RCA en el sistema de desarrollo referente a la edad de la hoja en arroz. En este sistema se determinaron tanto los niveles acumulados de mRNA total de *rca* como los de la proteína RCA. El patrón correspondiente al mRNA muestra una disminución a medida que las hojas senescen (hoja 2 a hoja 7), por

lo que difiere del patrón de niveles constantes correspondiente a dicha proteína. Además, no se determinó por separado el nivel de cada uno de los dos mensajes de *rca* de esta planta (Zhang and Komatsu, 2000). Respecto al sistema de desarrollo asociado a la madurez de la planta y formación del fruto, todavía no se han realizado estudios sobre la abundancia de los transcritos de *rca* (Martínez-Barajas *et al.*, 1997).

1.6.2 Expresión circadiana.

Los análisis de la expresión temporal de los transcritos totales de *rca* de cebada muestran una acumulación diferencial durante un ciclo de luz:oscuridad. Estos transcritos se acumulan en niveles altos al inicio del periodo de luz, alcanzando su máxima acumulación al mediodía y disminuyen después gradualmente hasta el inicio del periodo de oscuridad, para posteriormente volver a aumentar al inicio del nuevo ciclo de luz (Rundle and Zielinski 1991b). Por otra parte, se encontró que en un ciclo de luz:oscuridad, la síntesis *de novo* de la proteína total RCA de tomate aumenta previo al inicio del periodo de luz y comienza a declinar antes del inicio del periodo de oscuridad (Martino-Catt and Ort, 1992), por lo que los autores sugirieron que esos cambios son controlados por un ritmo circadiano.

Gracias al análisis de los niveles de los transcritos de *rca* en plantas cultivadas en condiciones de luz/oscuridad por 24 horas y posteriormente por dos o más ciclos en oscuridad o luz continua, actualmente se ha corroborado que la acumulación de los transcritos de *rca* se regula de manera circadiana en tomate (Martino-Catt and Ort, 1992), *Arabidopsis* (Pilgrim and McClung 1993), manzano (Watillon *et al.* 1993) y arroz (To *et al.* 1999). Lo anterior es probablemente cierto también para cebada (Rundle and Zielinski 1991b) y maíz (Ayala-Ochoa *et al.*, 2004). Aunque tanto los aumentos como las

disminuciones en los niveles de los transcritos de *rca* ocurren en diferentes horas de los ciclos de luz/obscuridad según la planta analizada, el patrón general de comportamiento consiste en una acumulación máxima alrededor del inicio del periodo de luz (entre tres horas antes y tres horas después), posteriormente una disminución gradual y una acumulación mínima alrededor del inicio del periodo de obscuridad (entre una hora antes y tres horas después).

La acumulación de tipo circadiano de los transcritos de *rca* involucra regulación tanto a nivel transcripcional como de estabilidad. Ensayos de “run-on” (consistentes en determinar las velocidades relativas de transcripción de genes a partir de los niveles de sus mRNAs sintetizados en núcleos aislados, en presencia de [³²P]-UTP, los cuales se determinan por hibridación con sondas específicas de genes) muestran que en *Arabidopsis* las oscilaciones circadianas en el nivel de mRNA de *RCA* se deben al menos en parte a cambios en la velocidad de su síntesis (Pilgrim and McClung, 1993) y, de hecho, en la región 5' no traducida (5'untranslated region, 5'UTR) del gen *RCA* también de *Arabidopsis*, se localizan dos regiones que regulan su transcripción de una manera circadiana, una confiriendo una respuesta de baja amplitud y otra una respuesta de alta amplitud (Liu *et al.*, 1996). La regulación post-transcripcional de *rca*, por otra parte, involucra la participación de elementos del 3'UTR. Originalmente se identificaron tres subdominios altamente conservados, separados por dos secuencias variables, en el 3'UTR de mRNAs pequeños, regulados por auxinas (small auxin-up RNA (SAUR) transcripts), llamados subdominios I, II y III o de forma genérica, elementos downstream (DST) (McClure *et al.*, 1989). Los elementos DST son determinantes de la inestabilidad de los mRNAs, según lo demuestran las vidas medias de transcritos reporteros que contienen dichos elementos en sus 3'UTRs (Newman *et al.*, 1993). La mutante *dst1* de *Arabidopsis*, la

cual tiene alterada la vía de degradación de mRNAs mediada por DSTs, muestra un aumento tanto en la vida media como en la abundancia de los transcritos-DST correspondientes a los transgenes higromicina fosfotransferasa y β -glucuronidasa y al gen endógeno SAUR-AC1 (Pérez-Amador *et al.*, 2001). En un estudio por análisis de “DNA microarray” utilizando la mutante *dst1*, se encontró que un grupo de genes con niveles de expresión alterados contiene elementos semejantes a los DST (“DST-like”), caracterizados por presentar una mínima variación en la secuencia de los motivos DST así como diferente número de los mismos (Pérez-Amador *et al.*, 2001). Además, de manera interesante, se identificó en la mutante *dst1* a otro grupo de transcritos también con elementos DST y acumulación alterada, cuya abundancia es regulada de una manera circadiana, sugiriendo la participación de mecanismos de control post-transcripcional en la expresión de genes regulados circadianamente (Pérez-Amador *et al.*, 2001). Nuevamente utilizando la mutante *dst1* y midiendo las velocidades de decaimiento de mRNAs en condiciones de transcripción inhibida, recientemente se demostró que la regulación de la estabilidad de los transcritos *ccl* y *sen1* de *Arabidopsis*, los cuales tienen elementos “DST-like”, es importante para controlar su expresión de manera circadiana a través de una vía de decaimiento del mRNA, específica de la secuencia DST (Lidder *et al.*, 2005). En congruencia, los transcritos de *rca1* y *rca2* de maíz, cuyos niveles aparentemente se acumulan por regulación circadiana (Ayala-Ochoa *et al.*, 2004), tienen elementos “DST-like” en su región 3’UTR (Ayala-Ochoa *et al.*, 2004). Además, para el gen *rca* se identificó al transcrito correspondiente como miembro de un grupo de transcritos inestables que tiene una vida media particular de 57.5 min. (Gutiérrez *et al.*, 2002). Por otra parte, dado que el transcrito de *rca2*, pero no el de *rca1*, contiene el subdominio III de los elementos DST, los autores propusieron que la

presencia de ese subdominio podría ser un factor involucrado en generar diferentes velocidades de recambio de esos transcritos, lo cual sería la base para explicar su acumulación diferencial a lo largo de un ciclo de luz/obscuridad (Ayala-Ochoa *et al.*, 2004).

No es posible afirmar a la fecha si existe una coordinación entre la acumulación de la proteína RCA y la acumulación de su transcrito correspondiente durante ciclos de día/noche, ya que no se ha determinado en un mismo trabajo tanto la velocidad de transcripción del gen *rca* como la síntesis *de novo* de la proteína RCA, o los niveles totales tanto de la proteína RCA y de su transcrito correspondiente (Rundle and Zielinski 1991b; Martino-Catt and Ort, 1992; Pilgrim and McClung 1993; Watillon *et al.* 1993; To *et al.* 1999; Ayala-Ochoa *et al.*, 2004).

1.6.3 Efecto de factores ambientales.

La exposición de las plantas a altas temperaturas ha sido el factor ambiental más analizado en la expresión de la RCA. En plántulas de maíz expuestas a 44° C por 4 horas aparece una forma de RCA de 43 kDa, mayor a la preexistente de 41 kDa. (Sánchez-de-Jiménez *et al.*, 1995). En trigo expuesto a 38° C hasta por 48 horas aparece una nueva forma de RCA de 41 kDa, menor a las ya expresadas de 46 y 42 kDa (Law and Crafts-Brandner, 2001). En este segundo caso, los niveles de los transcritos de *rca* se reducen con el estrés de calor, aunque la síntesis *de novo* de esta proteína aumenta. Un estrés de temperatura a 41° C induce la síntesis de una forma de RCA de 46 kDa en algodón, en el que normalmente se expresan las formas de 47 y 43 kDa. Sin embargo, en esta planta la expresión de las formas de 47, 46 y 43 kDa aumenta ligeramente después de 24 horas de estrés y en particular la nueva forma de 46 kDa comprende sólo el 5% del total, a diferencia

de lo que ocurre en trigo en el que la forma inducida representa 20% del total. Sin embargo, el significado de los cambios en la expresión de diferentes formas de la RCA no ha podido ser precisado a la fecha, pero se especula pueda ser importante para la aclimatación de la fotosíntesis (Law *et al.* 2001).

Por otra parte, el estrés por calor también puede provocar un cambio en la localización subcelular de la RCA. En hojas de plantas de espinaca sometidas a 44 °C, principalmente el polipéptido de 41 kDa se localiza asociado a la fracción membranal de los tilacoides. En este trabajo se ha propuesto que la relevancia de la RCA estribaría más bien en su papel como chaperona de moléculas diferentes a la Rubisco (Rokka *et al.* 2001).

Contrariamente, una exposición a bajas temperaturas (4° C) por 16 horas causa en tomate un desfase del ciclo circadiano de los transcritos de *rca*. Se encontró una disminución de la actividad transcripcional del gen *rca*, lo que sería parte de la base de dicho desfase (Martino-Catt and Ort, 1992).

A través de un análisis proteómico se encontró que en hojas de arroz que no fueron regadas durante 23 días, la expresión de las dos formas de RCA aumenta y que después de 10 días de volver a ser regadas los niveles regresan a valores basales (Salekdeh, 2002).

La expresión de la RCA es afectada por la luz. En cebada (Zielinski *et al.*, 1989) y en manzano (Watillon *et al.* 1993) la exposición a la luz de plantas etioladas induce un aumento de 50-100 veces en los niveles de los transcritos de *rca*. Estos cambios son acompañados por cambios en la cantidad de la proteína RCA, si bien los niveles encontrados en plantas etioladas son el 75% del máximo acumulado en la luz. Sin embargo, cuando se cultivan plantas en condiciones de iluminación cada vez mayor, hay un aumento proporcional tanto en los niveles de mRNA como de proteína (Rundle and Zielinski, 1991a).

1.7 Función de las dos isoformas de RCA.

Ya que el significado funcional de la expresión de las isoformas α y β de la RCA está relacionado con la regulación de su actividad por la luz (Zhang and Portis, 1999), es necesario mencionar que la actividad de varias enzimas del ciclo RPP también se regula por este factor (Robinson and Walker, 1981), a través de reacciones de óxido-reducción (redox) acopladas al transporte de electrones fotosintético (Scheibe, 1991). La base de este mecanismo es la siguiente: en la luz, los fotones transfieren su energía a los electrones de las moléculas de clorofila, provocando su excitación. La energía de excitación de dichos electrones se transfiere a dos complejos moleculares de clorofilas independientes, denominados centros de reacción P700 y P680, los cuales constituyen el fotosistema I (FSI) y el fotosistema II (FSII), respectivamente, caracterizados por reducir a un aceptor de electrones y oxidar a un donador de electrones (Avron, 1981). A partir de los centros de reacción de ambos fotosistemas se transportan electrones a través de una serie de proteínas localizadas en la membrana tilacoidal del cloroplasto. El flujo de electrones va en la siguiente dirección: FSII \rightarrow FSI \rightarrow ferredoxina \rightarrow tiorredoxina y de ésta, a enzimas blanco para reducir determinados enlaces disulfuro de estas proteínas a grupos sulfidrilos, modificando así su actividad catalítica. Los residuos de cisteína involucrados están sujetos a cambios redox reversibles (Robinson and Walker, 1981).

La RCA tiene actividad de ATPasa y se necesita para la activación de la Rubisco. La hidrólisis del ATP por la RCA produce ADP. El ADP inhibe la propia reacción de hidrólisis del ATP y tiene un efecto negativo sobre la activación de la Rubisco (Robinson and Portis, 1989). La relación de ADP/ATP en el estroma de cloroplastos es tres veces mayor en condiciones de obscuridad que de luz (Stitt *et al.*, 1982). Por lo tanto, la

activación de la Rubisco por la RCA es dependiente de dicha relación y de la luz. De manera interesante, la isoforma α es más sensible que la isoforma β a la inhibición por ADP, sugiriendo un papel regulatorio para esta isoforma específica en la actividad de la RCA (Shen *et al.*, 1991). Una diferencia importante en la estructura primaria de la región carboxi-terminal de las isoformas α y β de la RCA es la presencia de dos residuos de cisteína en la isoforma α (Werneke *et al.*, 1989), lo que constituye un requisito bioquímico para la regulación redox (Scheibe, 1991). Con base en estos antecedentes y considerando que no se tenía evidencia de que Rubisco se activara por este tipo de regulación (Salvucci *et al.*, 1986) a pesar de que su actividad variaba con la intensidad luminosa en plantas C_3 (Brooks and Portis, 1988), Zhang and Portis (1999) decidieron investigar si la actividad de la RCA sí podría ser regulada por cambios redox en las cisteínas presentes en la región carboxi-terminal de la isoforma α y la relación de este mecanismo con la inhibición por ADP.

Los resultados correspondientes a la hipótesis arriba señalada muestran que a una relación de ADP/ATP de 0.33, la isoforma α recombinante de RCA de *Arabidopsis* tiene actividad baja de ATPasa y de activación sobre la Rubisco, en comparación con la isoforma β recombinante (Zhang and Portis, 1999). Una relación de ADP/ATP de 0.33 corresponde a un valor característico para el estroma en condiciones de luz (Stitt *et al.*, 1982). Bajo estas condiciones y utilizando una serie de versiones recombinantes de la isoforma α de RCA, se analizó el efecto de agentes reductores, ya que las enzimas del cloroplasto que son activadas por la luz también se pueden activar *in vitro* por agentes reductores tales como el ditiotreitól (DTT) (Robinson and Walker, 1981). Dichas versiones recombinantes consistieron en cambios en la región carboxi con diferente número de aminoácidos

eliminados o con sustituciones de una alanina (A) por una cisteína (C) en particular (C → A), por ejemplo la cisteína correspondiente al residuo 392 de la cadena polipeptídica (C392A). La incubación de la versión original de la isoforma α con DTT y tioredoxina aumenta la actividad de ATPasa y de activación de Rubisco, la cual se revierte por condiciones oxidantes (Zhang and Portis, 1999). Estos efectos no se observan al añadir únicamente la isoforma β recombinante o las versiones recombinantes C392A y C411A, pero sí cuando ambas isoformas originales son combinadas, lo que indica que la alteración de la actividad de la isoforma α es reversible y suficiente para regular la actividad de ambas isoformas cuando están juntas y que dichos residuos de Cis muy probablemente forman el enlace disulfuro crítico de la isoforma α que es reducido por la tioredoxina (Zhang and Portis, 1999). Usando las mismas versiones recombinantes de la isoforma α , también se demostró que la presencia de los residuos Cis 392 y Cis 411 es esencial para mantener la mayor sensibilidad al ADP de esta isoforma (Zhang and Portis, 1999). En condiciones oxidantes, estos residuos de Cis forman un puente disulfuro entre sí favoreciendo una interacción de la región carboxi con el dominio de unión a nucleótidos tanto de la propia isoforma α como con el dominio correspondiente de la isoforma β . En condiciones reductoras se elimina dicha interacción, permitiendo la unión de ATP a ambos dominios y disminuyendo la capacidad del ADP para inhibir la actividad de ATPasa de la RCA (Zhang *et al.*, 2001).

En un estudio posterior se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan solamente la isoforma β de RCA (transformantes β), solo la isoforma α (transformantes α), ambas isoformas (progenie de la cruce entre las transformantes de las formas α y β) o las isoformas α C411A o α C411A + C392A cuyos residuos de Cis

sustituídos son los sensibles a redox. Los resultados muestran que la regulación por la luz del estado de activación de la Rubisco se pierde en las transformantes β mientras que en las transformantes α la activación es semejante, aunque más baja, que la de las plantas silvestres. La cruce de las transformantes α y β restablece los valores originales de activación de la Rubisco de las plantas silvestres, como era esperado. Las transformantes de sustitución dan valores semejantes a los de las transformantes β . Estos hallazgos muestran que la regulación redox de los dos residuos de Cis en la región carboxi de la isoforma α de la RCA es la base para la activación luminosa de la Rubisco *in vivo* (Zhang *et al.*, 2002).

Los resultados mencionados también indican que si bien la isoforma β no es regulada por condiciones redox, su presencia es necesaria para que junto con la de la isoforma α se observe un efecto completo sobre la activación de la Rubisco (Zhang *et al.*, 2002). La actividad de la Rubisco se regula por la luz en tabaco (Salvucci and Anderson, 1987), aunque esta planta solamente expresa la isoforma β de la RCA (Salvucci *et al.*, 1987). Desde luego, los ensayos de adición de reductores y oxidantes a la proteína nativa de RCA aislada de tabaco no muestran cambio alguno de la actividad basal de ATPasa, sugiriendo que la isoforma β no media estos cambios (Zhang and Portis, 1999), por lo que se ha especulado que la regulación redox de la Rubisco en tabaco puede ser mediada por otra proteína que contenga un dominio homólogo a la región carboxi de la isoforma α (Zhang *et al.*, 2002). En maíz, la intensidad luminosa no modula la actividad de la Rubisco (Sage and Seemann, 1993), lo cual es consistente con la presencia en esta planta de la isoforma β de 43 kDa y la ausencia de la isoforma α (Salvucci *et al.*, 1987; Ayala-Ochoa *et al.*, 2004). Sin embargo, como en las plantas en las que la actividad de la Rubisco se regula por la luz, en maíz también se expresa una segunda isoforma, pero ésta es más pequeña aun

que la propia isoforma β (Martínez-Barajas *et al.*, 1997). Otras especies como calabaza, frijol mungo, frijol común y *Chlamydomonas* probablemente tienen sólo la isoforma β de la RCA (Portis, 2003) y no existe información respecto a si en estas plantas la Rubisco es regulada por la luz. Se desconoce el porqué de la expresión de una sola isoforma de RCA en vez de dos en estas especies (Portis, 2003).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Maíz es una planta C_4 que expresa dos polipéptidos de RCA de 43 y 41 kDa (Martínez-Barajas *et al.*, 1997; Morales *et al.*, 1999). Los análisis de tipo Southern blot sugieren la existencia de dos genes para *rca* en el genoma de maíz en tanto que por northern blot se reconocen dos transcritos de *rca*: el de *rca1* y el de *rca2* (Ayala-Ochoa *et al.*, 2004). El origen de estos dos transcritos, los cuales no muestran sitios canónicos de procesamiento en sus regiones 3', parece ser la expresión independiente de cada uno de los dos genes para *rca*, de acuerdo a los resultados de experimentos de PCR utilizando DNA genómico y “primers” específicos para los transcritos de *rca1* y *rca2* (Ayala-Ochoa *et al.*, 2004). Tanto el ORF del *rca1* como del *rca2* son idénticos entre sí y codifican únicamente al polipéptido maduro de 43 kDa (Ayala-Ochoa *et al.*, 2004), por lo que el mecanismo de origen del polipéptido de 41 kDa de RCA de maíz sería diferente al reportado para generar los dos polipéptidos de RCA en plantas C_3 y constituye, por lo tanto, una pregunta por resolver.

La RCA actúa como un complejo oligomérico formado por las subunidades α y β (Wang *et al.*, 1993). La relación de estas dos subunidades cambia durante el desarrollo (Rundle and Zielinski, 1991b), en condiciones de estrés hídrico (Salekdeh *et al.*, 2002) y de estrés por calor (Sánchez-de-Jiménez *et al.*, 1995; Crafts-Brandner and Salvucci, 2002). Se ha especulado que cambios en la abundancia de dichas subunidades, originados por procesamiento alternativo, pueden ser regulados por factores ambientales (Crafts-Brandner *et al.*, 1997). Sin embargo, no se ha evaluado la actividad de chaperona molecular de la RCA en relación a diferentes grados de heterogeneidad de sus subunidades. En este contexto resulta particularmente interesante determinar la importancia funcional del

polipéptido de 41 kDa de RCA de maíz, el cual constituye una subunidad más pequeña que la subunidad ortodoxa menor, la β , y que se expresa tanto en presencia como en ausencia de condiciones de estrés.

Dado este panorama, se planteó investigar el origen del polipéptido de 41 kDa de RCA de maíz, su acumulación, así como la del polipéptido de 43 kDa, con relación a varios factores ambientales y del desarrollo, y determinar su actividad de chaperona molecular en función de la composición de sus subunidades. Este análisis es con el objeto de contribuir al conocimiento de la expresión y actividad de la RCA, particularmente de plantas C_4 .

HIPÓTESIS

Dado que en maíz los dos transcritos presentes de *rca* parecen codificar únicamente el polipéptido de 43 kDa, éste debe dar origen al polipéptido de 41 kDa a través de un procesamiento post-traducciona. La relación de ambos polipéptidos de RCA resultante de este mecanismo podrá cambiar por efecto de condiciones fisiológicas y ambientales contrastantes y su relevancia se verá reflejada en la actividad de chaperona molecular de la RCA.

OBJETIVOS GENERALES

1. Investigar el mecanismo de generación de la expresión de los dos polipéptidos de 43 y 41 kDa de RCA en maíz.
2. Determinar la relevancia de la relación de estos dos polipéptidos en el complejo funcional de la RCA, en cuanto a la actividad de chaperona molecular.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evidenciar si el polipéptido de 43 kDa de RCA es procesado post-traduccionalmente para dar origen al polipéptido de 41 kDa de RCA.
2. Investigar si la acumulación de cada forma de RCA se regula diferencialmente por factores del desarrollo y/o ambientales.
3. Mostrar si la relación de los polipéptidos 43 kDa/41 kDa tiene algún efecto sobre la actividad de chaperona molecular de la RCA.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados, se trazó el siguiente diseño experimental:

1. Determinar por autorradiografía, a partir de inmunoprecipitaciones con anticuerpos anti-RCA de espinaca, el número de polipéptidos de RCA sintetizados *in vitro*, utilizando el extracto de germen de trigo como sistema de traducción *in vitro*, en presencia de [³⁵S]-metionina y mRNA poliA⁺ aislado de hojas de maíz en condiciones ambientales en que los dos transcritos de *rca* se expresen.
2. Determinar si el polipéptido de 41 kDa de RCA de maíz carece de la región amino o carboxi-terminal del polipéptido de 43 kDa de RCA, a través del uso de anticuerpos policlonales contra RCA de espinaca y anticuerpos dirigidos contra péptidos sintéticos que representen los extremos amino y carboxi del polipéptido de 43 kDa.
3. Determinar por experimentos de pulso-caza en hojas aisladas, si el polipéptido de 41 kDa de RCA es generado a partir del polipéptido de 43 kDa de RCA.
4. Determinar por western blot los patrones de acumulación de los dos polipéptidos de RCA en hojas de maíz, muestreadas durante un ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad, así como en dos estaciones diferentes del año y en condiciones de baja luminosidad o sequía. Realizar este análisis utilizando anticuerpos policlonales anti-RCA de espinaca.
5. Medir la actividad de chaperona molecular de la RCA de maíz a diferentes relaciones de los polipéptidos purificados de 43 kDa/41 kDa, evaluada por su capacidad para retrasar la precipitación de insulina al desnaturalizarse después de la reducción de sus puentes disulfuro por DTT.

III. RESULTADOS

Mi trabajo de doctorado está incluido en dos publicaciones. En la que contiene la mayoría de mis resultados aparezco como primer autor, mientras que en la otra publicación, la cual contiene el resto de ellos y todos los resultados de otro estudiante de doctorado, aparezco como coautor. Ambos trabajos de investigación formaron parte de un proyecto global sobre el análisis de la expresión de la RCA en maíz y se presentan a continuación como los artículos # 1 y 2, respectivamente.

3.1 Artículo # 1: Vargas-Suárez M., Ayala-Ochoa A., Lozano-Franco J, García-Torres I, Díaz-Quiñonez A, Ortiz-Navarrete VF, Sánchez-de-Jiménez E. 2004. Rubisco activase chaperone activity is regulated by a post-translational mechanism in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*. 55: 2533-2539.

Este artículo demuestra que sólo se sintetiza el polipéptido de 43 kDa, el cual por proteólisis específica en su región amino terminal da origen al polipéptido de 41 kDa. Este mecanismo que controla la relación de los polipéptidos 43/41 kDa resulta en cambios en la actividad protectora de chaperona de la RCA y es regulado por señales del desarrollo y ambientales.

3.1.1 Origen del polipéptido de RCA de 41 kDa.

Como parte de la estrategia para investigar el origen del polipéptido de RCA de 41 kDa de maíz, una muestra de mRNA poliA⁺ que contenía los dos transcritos de *rca* (Ayala-Ochoa *et al.*, 2004), aislado de hojas de maíz, se tradujo *in vitro* en un extracto de germen de trigo, en la presencia de [³⁵S]-metionina como precursor marcado. También se incluyó

una muestra control de mRNA poliA⁺ de hojas de espinaca. Después de una hora de reacción, las proteínas resultantes se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-RCA. Las proteínas del precipitado se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y se analizaron en un aparato PhosphorImager. Los resultados de la muestra control muestran dos polipéptidos radioactivos de RCA de 49 y 53 kDa (Fig. 1A, carril 2 del artículo 1). Ambos polipéptidos son los precursores (proteínas con los péptidos de tránsito hacia el cloroplasto) correspondientes de los polipéptidos maduros de 42 y 45 kDa, respectivamente, revelados por western blot (Fig. 1B, carril 2 del artículo 1). En contraste, los productos de traducción del mRNA poliA⁺ de maíz sólo muestran un polipéptido radioactivo de 49 kDa (Fig. 1A, carril 1 del artículo 1), correspondiente al tamaño del precursor de 43 kDa (Fig. 1B, carril 1 del artículo 1). Estos resultados indican que el polipéptido de RCA de 43 kDa es el único polipéptido de RCA que se sintetiza *de novo* en hojas de maíz.

La otra estrategia para investigar el origen del polipéptido de RCA de 41 kDa de maíz fue dirigida a encontrar evidencias para apoyar la hipótesis de un procesamiento post-traducciona del polipéptido de 43 kDa. Para este propósito, se sintetizaron dos péptidos de diez aminoácidos cada uno, conteniendo la secuencia de aminoácidos deducida del extremo 3' o del 5' del cDNA de *rca* de maíz (Ayala-Ochoa *et al.*, 1998). Posteriormente se originaron anticuerpos contra cada uno de estos péptidos. Estos anticuerpos se utilizaron para detectar los polipéptido de RCA de maíz por western blot. Usando los anticuerpos anti-RCA de espinaca o los anticuerpos contra el carboxi-terminal, tanto el polipéptido de 43 kDa como el de 41 kDa dan señal positiva (Fig. 2, carriles 1 y 2 del artículo 1, respectivamente), mientras que los anticuerpos contra el amino-terminal sólo revelan el

polipéptido de 43 kDa (Fig.2, carril 3 del artículo 1). Estos resultados indican que ambos polipéptidos de RCA de maíz difieren en su región amino-terminal pero no en la carboxi-terminal.

A partir de los resultados obtenidos utilizando las dos estrategias arriba señaladas, se concluyó que un procesamiento post-traducciona l en la región amino-terminal del polipéptido de RCA de 43 kDa es el responsable del origen del polipéptido de RCA de 41 kDa en hojas de maíz.

Para confirmar la interpretación de que el polipéptido de 41 kDa de RCA se genera de un procesamiento post-traducciona l a partir del polipéptido de 43 kDa, se midió la síntesis *de novo* de la RCA en hojas completas de maíz, cortadas en su base y alimentadas por esta vía con [³⁵S]-metionina. A partir de extractos crudos de esas hojas se determinó por western blot el nivel acumulado de la RCA y también se tomaron alícuotas para inmunoprecipitar la RCA y analizarla por fluorografía. Los resultados muestran señal radioactiva en la banda de 43 kDa en los inmunoprecipitados de las hojas cosechadas en un intervalo de 24 horas, después de 4.5 horas de incubación en presencia de [³⁵S]-metionina; sin embargo, contrario a lo esperado, no se detecta señal radioactiva en la banda de 41 kDa, aun al final del periodo analizado (Fig. A, panel 1). Se encontró que en los extractos crudos de esas mismas hojas, los niveles acumulados del polipéptido de 43 kDa, determinados por western blot, muestran una disminución pronunciada a tiempos cada vez mayores de la cosecha por lo que no reflejan la síntesis *de novo* de este polipéptido. En cambio, los niveles correspondientes del polipéptido de 41 kDa, determinados de igual manera, permanecen aproximadamente constantes durante el mismo periodo, sugiriendo una estabilidad grande para este polipéptido (Fig. A, panel 2). Si bien estos resultados evidencian la síntesis *in vivo* del polipéptido de 43 kDa, no demuestran, sin embargo, que

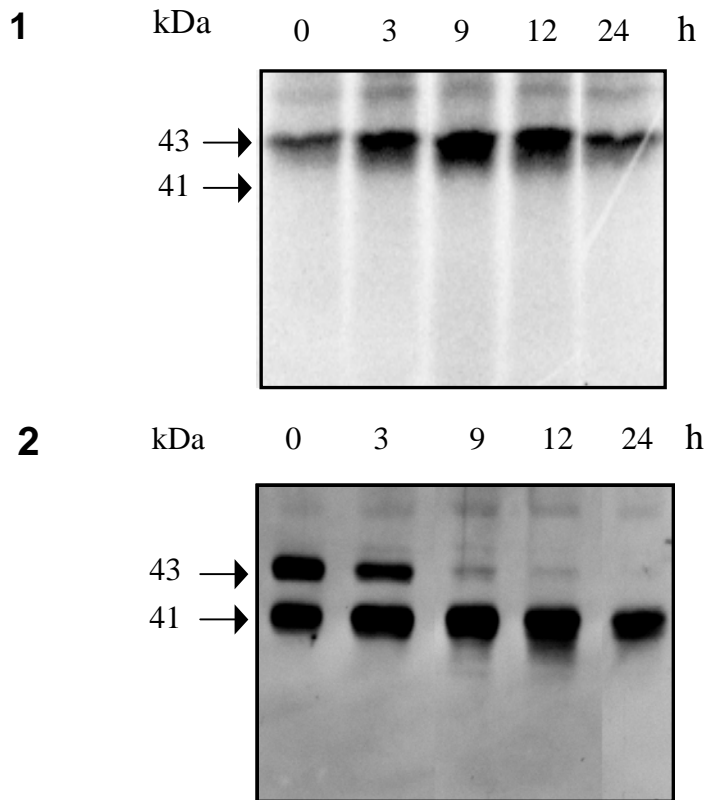


Figura A. Síntesis *de novo* de la RCA en hojas de maíz Se cortaron en su base quince hojas terceras en la etapa 4 del desarrollo y se mantuvieron en viales con buffer HEPES 25 mM, pH 7.4 que contenía 200 μ Ci de [35 S]-metionina (1175 Ci/mmol). Después de 4.5 horas de incubación a 25° C, se añadió un exceso de 200 veces de metionina fría (tiempo cero) y se colectaron tres hojas a cada uno de los siguientes tiempos: 0, 3, 9, 12 y 24 horas. Las muestras colectadas se mantuvieron a -70° C hasta su uso posterior. Se obtuvieron extractos crudos de cada grupo de tres hojas según Vargas-Suárez *et al.* (2004), a partir de los cuales se inmunoprecipitó la RCA con anticuerpos anti-RCA de espinaca. Los inmunoprecipitados después de ser resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se transfirieron a membrana PVDF y se analizaron en un PhosphorImager (1). La abundancia de la RCA en los extractos crudos de hoja (30 μ g de proteína), se analizó por western blot (2).

éste genere al polipéptido de 41 kDa.

3.1.2 Regulación ambiental y por desarrollo de la acumulación de los polipéptidos de RCA.

Para investigar sobre la regulación del procesamiento del polipéptido de RCA de 43 kDa de maíz, se determinó el nivel de los dos polipéptidos de RCA en tres condiciones: 1) plantas cultivadas en diferentes estaciones del año, analizadas en distintas etapas de desarrollo; 2) plantas analizadas durante un ciclo de luz/obscuridad; 3) plantas sometidas a condiciones ambientales adversas.

En relación a la primer condición, se determinó el nivel de la proteína RCA en extractos de hojas correspondientes a las etapas 4 a 7 del desarrollo (Fig. 3A del artículo 1) (Loza-Tavera *et al.*, 1990) de plantas cultivadas en verano o en invierno. En las plantas cultivadas en invierno, el polipéptido de 43 kDa es mucho más abundante que el de 41 kDa en todas las etapas del desarrollo analizadas (Fig. 3B del artículo 1), en tanto que en verano el polipéptido de 41 kDa es algo más abundante que el de 43 kDa (Fig. 3C del artículo 1). Sólo en el invierno hubo cambios asociados al desarrollo, caracterizados por una disminución del nivel del polipéptido de 41 kDa en las etapas más avanzadas. En cuanto a la segunda condición, la relación de los polipéptidos 43/41 kDa de RCA permanece aproximadamente constante durante el periodo de luz, pero aumenta al inicio del periodo de obscuridad (Fig. 4 del artículo 1), más por una reducción en el nivel del polipéptido de 41 kDa que por un aumento en el nivel del polipéptido de 43 kDa. Respecto a la última condición, los factores adversos que se probaron por separado fueron el efecto de una baja intensidad luminosa y de condiciones de sequía (Fig. 5 del artículo 1). La condición de baja intensidad luminosa produce el mayor cambio ya que la relación de los polipéptidos 43/41

kDa de RCA aumenta al doble o más del valor control, según la etapa de desarrollo analizada. La condición de sequía, en cambio, causa una disminución de aproximadamente el 50% en dicha relación, particularmente en hojas de las etapas cinco y seis. En conjunto, los resultados de las tres condiciones utilizados muestran que la relación de los polipéptidos 43/41 kDa de RCA de maíz es susceptible de regulación por factores asociados al desarrollo lo cual podría cambiar por influencia de procesos internos como el ciclo circadiano o por condiciones ambientales como longitud del periodo de luz, intensidad y calidad luminosa y temperatura.

3.1.3 Actividad protectora de chaperona de la RCA.

Para apoyar la propuesta de que los cambios en la relación de los polipéptidos 43/41 kDa de RCA tienen una relevancia biológica, se analizó la actividad de chaperona de la RCA con los polipéptidos purificados de 43 y 41 kDa, por separado o en combinación de dos veces la concentración del polipéptido de 43 kDa sobre el polipéptido de 41 kDa o del polipéptido de 41 kDa sobre el polipéptido de 43 kDa. En todos los casos la concentración total final de la RCA fue la misma. La actividad de chaperona se basa en la capacidad de la RCA de retrasar el inicio de la precipitación de la insulina, después de que ésta es reducida por DTT y tiorredoxina (Holmgren 1979). También se midió la actividad de chaperona de las proteínas GroEL y BSA como controles positivo y negativo, respectivamente. Como se observa en la Fig. 6 del artículo 1, la actividad del control positivo es evidente al compararla con la del control negativo: un retraso de 60 minutos en el inicio de la precipitación de la insulina con la Gro EL en el sistema, en relación al momento del inicio registrado, con la adición de la BSA. De hecho, la actividad detectada con y sin la BSA en el sistema es prácticamente la misma. El polipéptido de 43 kDa solo tuvo una actividad

moderada (10 minutos más que la BSA) pero ésta aumenta con la mezcla de ambos polipéptidos de RCA, resultando mayor cuando la concentración del polipéptido de 41 kDa es el doble que la del polipéptido de 43 kDa (40 minutos más que la BSA). Sin embargo, el polipéptido de 41 kDa solo, causa el retraso más largo (135 minutos más que la BSA), proporcionando así la mayor protección a la precipitación de la insulina. Estos resultados sugieren que efectivamente la relación de los polipéptidos 43/41 kDa de RCA puede tener una relevancia funcional.

Para determinar qué tan general podría ser el papel de la RCA como chaperona molecular, investigamos su presencia por western blot en extractos crudos de embriones maduros de maíz, trigo, amaranto, soya y chícharo, después de 24 horas de imbibición en agua. Como se observa en la Fig. B, se puede detectar una banda inmunoreactiva al anticuerpo policlonal anti-RCA de espinaca en todas las muestras analizadas, excepto en maíz que expresa dos. Esto indica que la expresión de la RCA no está circunscrita a los tejidos verdes que expresan a la Rubisco y se sugiere por lo tanto que la RCA podría actuar como chaperona sobre moléculas diferentes a la Rubisco.

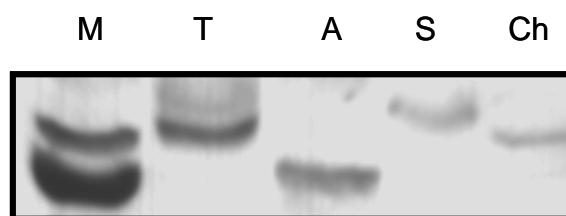


Figura B. Expresión de la RCA en embriones. Se embebieron semillas de maíz (M), trigo (T), amaranto (A), soya (S) y chícharo (Ch) en agua, por 24 horas a 30° C en oscuridad. Después de este período de incubación, se cosecharon las semillas enteras de amaranto y los embriones de las semillas de las otras plantas y se extrajeron las proteínas solubles totales igual que para tejidos foliares (Vargas-Suárez *et al.*, 2004). Se resolvieron 100 µg de proteína de cada muestra por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en un gel al 10%, se transfirieron a una membrana PVDF y se incubaron con anticuerpo anti-RCA de espinaca a una dilución 1:8,000. La inmunorreacción se detectó por ECL.

3.2 Artículo # 2: Ayala-Ochoa A, Vargas-Suárez M, Loza-Tavera H, León P, Jiménez-García L Felipe, Sánchez de Jiménez E. 2004. In maize, two distinct ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase transcripts have different day/night patterns of expression. *Biochimie* 86, 439-449.

En este artículo se muestran características específicas de la organización y expresión génica de *rca* de maíz. Se reporta la existencia de dos genes para *rca*, *rca1* y *rca2*, que codifican a un mismo polipéptido de 43 kDa, el cual es similar a la forma β de RCA de plantas C_3 . El transcrito de *rca1* (1.4 kb), y el de *rca2* (1.8 kb) contienen en sus 3'UTRs motivos de inestabilidad de los mRNAs, "DST-like". El transcrito de *rca2* presenta un tipo de motivo de inestabilidad extra al transcrito de *rca1*, repetido una vez. Ambos transcritos muestran acumulación diferencial asociada al ciclo circadiano.

Cabe señalar que los resultados correspondientes a la expresión de los transcritos de *rca* durante un ciclo de luz/obscuridad (Fig. 5) se generaron por el autor de la presente tesis y se incluyeron en este artículo # 2 por considerarlos de gran importancia para contribuir a la relevancia del resto de los resultados.

A continuación se describen brevemente los resultados del artículo # 2 que apoyan la hipótesis planteada en la presente tesis.

3.2.1 Características del polipéptido codificado por los cDNAs de *rca*.

Del gen *RCA* de *Arabidopsis* se usó como sonda la región más conservada de todos los genes *rca* reportados (Werneke *et al.*, 1988; Werneke *et al.*, 1989; Rundle and Zielinski, 1991a; To *et al.*, 1999; Salvucci *et al.*, 2003), para hacer un escrutinio de una biblioteca de cDNA de hoja de maíz. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a los ORF de todas

las clonas de *rca* aisladas resultaron ser idénticas. Las clonas comprenden un ORF de 1299 nt que corresponde a un polipéptido de 433 aminoácidos con una M_r predicha de 48,500 mientras que la proteína madura tendría 381 aminoácidos y una M_r de 42,700. La Fig. 1 muestra la comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de una de las clonas de *rca* de maíz con la secuencia correspondiente de otras plantas monocotiledóneas y se aprecia que la secuencia de aminoácidos de la RCA de maíz corresponde a la isoforma β de la RCA la cual no contiene los dos residuos de Cys sensibles a redox (Zhang and Portis, 1999).

3.2.2 Origen de los transcritos de *rca*.

Para aclarar si el origen de los dos transcritos de *rca* de maíz es un procesamiento alternativo o la expresión de dos genes independientes, se llevaron a cabo experimentos de PCR utilizando DNA genómico y “primers forward y reverse”. Los “primers reverse” fueron específicos para los extremos 3’ de los transcritos de *rca1* (R1) y *rca2* (R2), mientras que el “primer forward” (F) fue común para ambos transcritos y correspondió a una región del ORF relativamente cercana al codón de paro (Fig. 2A). Con el par de “primers F/R”¹ se obtiene un producto de aproximadamente 290 pb en tanto que con el par “F/R”² el producto obtenido es de alrededor de 630 pb (Fig. 2B). La secuencia de cada uno de los productos corresponde a la secuencia de las clonas *rca1* y *rca2* que se muestra en la Fig. 2A, indicando que el origen de ambos transcritos es la expresión de dos genes independientes para *rca* de maíz.

Los resultados de los experimentos de Southern blot demuestran que existen al menos dos genes para *rca* en el genoma de maíz. Para este análisis se utilizó la secuencia

completa de la clona *rca1* como sonda y DNA genómico de maíz, el cual fue digerido con las siguientes enzimas: *HindIII*, *BamHI*, *SacI* y *SstI*. Con *HindIII* se detectaron dos bandas, con *BamHI* tres, con *SacI* cuatro y con *SstI* dos (Fig. 3).

IV. DISCUSIÓN

La investigación descrita en esta tesis aporta contribuciones importantes en relación al mecanismo de generación de dos isoformas de RCA en maíz, y a su actividad de chaperona molecular. Estos dos aspectos y la expresión circadiana de los transcritos de *rca* se discuten a continuación.

La presencia de los subdominios DST en los transcritos de *rca1* y *rca2* y su relación con la expresión circadiana

En todas las especies de plantas C₃ hasta ahora analizadas se ha demostrado dependencia circadiana de *rca* a nivel de mRNA (Martino-Catt and Ort, 1992; Pilgrim and McClung 1993; Watillon *et al.* 1993; To *et al.* 1999). En estos estudios está incluida al menos una planta monocotiledónea, arroz (To *et al.* 1999). Por tanto, los resultados obtenidos del comportamiento de los transcritos de *rca1* y *rca2* durante un ciclo en condiciones de obscuridad y luz (Fig. 5, art. 2), sugieren que este patrón de los transcritos de *rca* de maíz, una planta C₄ monocotiledónea, es, en efecto, un patrón regulado de manera circadiana. Sin embargo, es necesario realizar más de un ciclo continuo de luz u obscuridad para confirmar que efectivamente se trata de una regulación circadiana (Pilgrim and McClung, 1993).

El comportamiento circadiano de los transcritos de *rca* de maíz podría involucrar regulación tanto a nivel transcripcional como de estabilidad de los transcritos, ya que las mediciones realizadas en el ciclo de 24 h de luz/obscuridad se basaron en las cantidades acumuladas de los mismos y no en las velocidades correspondientes de síntesis y de degradación. En apoyo a la regulación transcripcional, se puede citar el trabajo en *Arabidopsis* en el que ensayos “run-on” muestran un patrón de síntesis de transcritos de *rca*

semejante al de la acumulación de los mismos, aunque la amplitud de las oscilaciones de síntesis es más bien modesta (Pilgrim and McClung, 1993). De hecho, se ha localizado en el 5'UTR del gen *RCA* de *Arabidopsis* una secuencia que regula su transcripción de manera circadiana (Liu *et al.*, 1996). Por lo tanto, es factible considerar que tanto el gen *rca1* como el *rca2* de maíz tengan elementos en su promotor que sean responsables, al menos parcialmente, de las oscilaciones observadas en la abundancia de sus transcritos. Esta misma posibilidad fue propuesta para la acumulación diferencial de los mRNAs de *RcaA* y *RcaB* de cebada durante el desarrollo y en un ciclo circadiano (Rundle and Zielinski, 1991b).

El elemento DST es una secuencia determinante de la inestabilidad, presente en el 3'UTR de mRNAs rápidamente degradados (Newman *et al.*, 1993). Sin embargo, variaciones en la secuencia y organización de los dominios del elemento clásico DST no son raras (tabla 1, art. 2) y también afectan la vida media de los transcritos (Pérez-Amador *et al.*, 2001). Recientemente se demostró que la velocidad de recambio de los transcritos de *ccl* y de *sen*, los cuales contienen elementos "DST-like", es regulada de manera circadiana a través de una vía de degradación del mRNA específica de la secuencia DST (Lidder *et al.*, 2005). Lo anterior apoya la propuesta de que los subdominios "DST-like" presentes en el 3'UTR de los transcritos de *rca1* y *rca2* (Fig. 2, art. 2) podrían ser la base de un mecanismo post-transcripcional en la regulación de la expresión circadiana de los genes *rca* de maíz (Ayala-Ochoa *et al.*, 2004). Por otra parte, análisis realizados en nuestro laboratorio, del 3'UTR de los transcritos de *rca* de cebada, *Arabidopsis*, manzano y arroz, también revelaron la presencia de elementos "DST-like", lo cual permite hacer extensiva la propuesta arriba mencionada a los transcritos de *rca* de esas plantas. Además, se puede citar

que el transcrito de *RCA* de *Arabidopsis* tiene una vida media de 57.5 minutos (Gutiérrez *et al.*, 2002).

Los transcritos de *rca1* y *rca2* se acumulan de manera diferencial a lo largo de un ciclo de luz/obscuridad, independientemente de si el análisis se hace con RNA total (resultados no mostrados) o con RNA poliA⁺ (Fig. 5, art.2). Ya que el transcrito de *rca2*, pero no el de *rca1*, contiene el subdominio III, la presencia de este subdominio podría ser un factor involucrado en generar diferentes velocidades de recambio de estos transcritos. Además, la intensidad de las bandas obtenidas en northern blot (Fig. 5, art. 2), incluida la de la banda de 1 kb así como la de los barridos observados hacia abajo y que corresponden a productos de degradación, son consistentes con un patrón de degradación variable. Con base en la integridad de los RNAs ribosomales de las muestras analizadas y en la observación de una sola señal correspondiente a una banda de 1.1 kb, al hibridar con una sonda del eIFiso4E de arroz sobre la misma membrana utilizada con la sonda de *rca*, puede afirmarse que la señal de la banda de 1 kb y el barrido asociado corresponden a productos de degradación específica de los transcritos de *rca* y no de toda la población de mRNAs. Además, como la banda de 1 kb se observó solamente en la hibridación con RNA total y no con RNA poliA⁺ y su longitud no es suficiente para codificar un ORF completo de *RCA*, es probable que corresponda a un fragmento estable de degradación, deadenilado de uno o ambos transcritos de *rca*.

Cambios en las velocidades de transcripción de los transcritos de *rca* asociados a diferentes promotores junto con diferencias en la estabilidad de los transcritos determinada por los elementos “DST-like”, podrían ser mecanismos para coordinar la expresión de la proteína *RCA* con determinadas vías fisiológicas controladas por un reloj circadiano

(Harmer *et al.*, 2000). Sin embargo, la acumulación diferencial de los transcritos de *rca1* y *rca2* también parece estar controlada por condiciones ambientales como luz y temperatura ya que muestras tomadas al mismo tiempo pero cultivadas en diferentes condiciones expresaron diferencialmente los dos transcritos de *rca* (compare la Fig. 5a (4 hs) art. 2, con la Fig. 6b, art. 2). Además, en dicha coordinación también podrían estar involucrados mecanismos de regulación traduccional o post-traduccional que actuaran en respuesta a señales ambientales, las cuales demandaran cambios rápidos en la actividad de la proteína. Por lo tanto, la abundancia de los transcritos de *rca* podría no corresponder con la de la proteína RCA, como se verá más adelante.

El origen del polipéptido de 41 kDa de RCA.

Se han reportado tres mecanismos para explicar la existencia de los polipéptidos α y β de RCA en plantas C_3 : a) Un procesamiento alternativo durante el proceso de maduración de un transcrito primario, generando así dos mRNAs de *rca* a partir de un transcrito común (Werneke *et al.*, 1988; Werneke *et al.*, 1989; To *et al.* 1999); b) Presencia de dos genes que expresan en forma independiente la forma grande (la α) o la forma chica (la β) (Salvucci *et al.*, 2003); c) una combinación de los mecanismos anteriores también se ha reportado en plantas con dos genes (Rundle and Zielinski, 1991a). En cuanto a plantas C_4 , todavía no existen resultados al respecto y los resultados presentados aquí muestran un mecanismo novedoso que opera en maíz. Esta planta C_4 tiene dos genes para *rca* (Figs. 2 y 3, art. 2) con idéntico ORF, el gen *rca1* y el gen *rca2* (Fig. 1, art. 2). Cada uno de estos dos genes expresa un transcrito; ambos transcritos codifican el mismo polipéptido β (43 kDa), pero difieren en la secuencia de sus regiones 3'UTR (Fig. 2, art. 2). En concordancia, los

experimentos de traducción *in vitro*, realizados con RNA poliA⁺ de hojas que expresan los transcritos de *rca1* y *rca2*, sólo revelan la síntesis de un único producto. Este producto es un polipéptido cuyo tamaño (49 kDa) corresponde al del precursor de la forma β (Fig. 1, art. 1). Más aún, los anticuerpos dirigidos contra la región amino terminal del polipéptido de 43 kDa no reaccionan con el polipéptido de 41 kDa, pero los anticuerpos contra la región carboxi terminal sí lo hacen (Fig. 2, art. 1), lo que indica que en el polipéptido de 41 kDa la región amino terminal del polipéptido de 43 kDa está ausente. Desafortunadamente, los resultados del experimento relativo a la síntesis *de novo* de la RCA en hojas cortadas de la planta, el cual fue realizado una sola vez, sólo muestran incorporación de [³⁵S]-metionina en el polipéptido de 43 kDa pero no en el de 41 kDa (Fig. A, panel 1), probablemente debido a la velocidad de recambio de la proteína RCA, misma que se especula ser del orden de horas (Law and Crafts-Brandner, 2001; Law *et al.*, 2001). Basándose únicamente en los resultados relativos a la traducción *in vitro* (Fig. 1, art. 1) y unión a los anticuerpos específicos contra las regiones amino y carboxi terminal (Fig. 2, art. 1), es sensato proponer que el polipéptido de 41 kDa de RCA es el producto de la proteólisis limitada y controlada del polipéptido de 43 kDa, en un sitio específico de su región amino. Esta propuesta está en concordancia con mecanismos post-traduccionales también reportados sobre la regulación de la expresión de otras proteínas durante el desarrollo de las plantas (Pipal *et al.*, 2003).

En las plantas que se expresan dos polipéptidos de RCA, la masa molecular del mayor (forma α) oscila entre 45 y 47 kDa y la del menor (forma β) entre 41 y 44 kDa (Qian and Rodermel, 1993; Werneke *et al.*, 1988; Werneke *et al.*, 1989; Rundle and Zielinski, 1991a; To *et al.*, 1999; Law and Crafts-Brandner, 2001; Salvucci *et al.*, 2003). El polipéptido mayor de RCA de maíz, el cual correspondió a la forma β (Fig. 1, art. 2), tiene

una masa molecular de 43 kDa. Considerando, por una parte, que el papel de la forma α de RCA es mediar la activación luminosa de la Rubisco a través de cambios en su estado redox (Zhang and Portis, 1999) y, por otra parte, que la Rubisco de maíz no se regula por la luz (Sage and Seemann, 1993), no es sorprendente que en esta planta no se encuentre una forma α de RCA. Por otra parte, se reportó que, en trigo, además de las formas α y β se induce un polipéptido de RCA de 41 kDa en condiciones de estrés por calor, probablemente regulado por eventos post-transcripcionales, pero no se investigó su función (Law and Crafts-Brandner, 2001). Por lo anterior, la presencia en maíz de un segundo polipéptido de RCA de 41 kDa, menor que la forma β de 43 kDa, tampoco es sorprendente y además es concordante con la forma de acción de las chaperonas moleculares en cuanto a caracterizarse por estar formadas por diferentes subunidades (Sigler *et al.*, 1998). El posible significado del polipéptido de 41 kDa de RCA de maíz se aborda más adelante.

Cambios en la relación de los polipéptidos 43/41 kDa de RCA de maíz y el papel de la RCA como chaperona molecular.

La relación de los polipéptidos de 43 kDa/41 kDa de RCA de maíz no es constante y varía en mayor o menor grado en función del desarrollo (Fig. 3, art. 1), ciclo circadiano (Fig. 4, art. 1), estrés por luz y estrés hídrico (Fig. 5, art. 1). Además, un estrés por calor también provoca cambios en esta relación en hojas de maíz (Sánchez-de-Jiménez *et al.*, 1995; Salvucci *et al.*, 2002). La relación de los polipéptidos α y β en plantas C_3 también cambia por efecto del desarrollo (Rundle and Zielinski, 1991b), del estrés hídrico (Salekdeh *et al.*, 2002) y del estrés por calor (Crafts-Brandner and Salvucci, 2002), indicando que los

mecanismos que controlan su acumulación en las plantas C₃ ó en las plantas C₄, responden a señales ambientales y del desarrollo.

El nivel al cual la luz parece ejercer un efecto sobre los niveles acumulados de la RCA total (forma α + forma β) en plantas de cebada es el traduccional, aunque no se descarta un mecanismo que regule la estabilidad de la proteína (Rundle and Zielinski, 1991b). Se ha especulado que el mecanismo de procesamiento alternativo en general, en plantas, puede ser regulado por factores ambientales y que, en particular, el procesamiento alternativo que genera las dos formas de RCA cambia en respuesta a la temperatura (Crafts-Brandner *et al.*, 1997). En el caso particular de maíz no se cuenta con los elementos necesarios para indicar a qué nivel se regula la acumulación de cada polipéptido de RCA, determinada en diferentes situaciones fisiológicas (Figs. 3-5, art.2). Sin embargo, se puede señalar que en el caso específico de la acumulación de los dos polipéptidos de RCA durante un ciclo de luz/obscuridad, existe un patrón poco variable (Fig. 4, art. 1), a diferencia de las oscilaciones claras para los transcritos de *rca* (Fig. 5, art. 2), en muestras provenientes de las mismas hojas para ambos análisis. Esto indica que no parece haber un control transcripcional decisivo durante un ciclo de luz/obscuridad. Dado que el análisis de los resultados de incorporación de marca radioactiva en la proteína RCA de hojas de maíz sugiere una mayor estabilidad del polipéptido de 41 kDa que del 43 kDa (Fig. A), probablemente entonces la velocidad de síntesis del polipéptido de 43 kDa es mayor que la del 41 kDa en condiciones de luz/obscuridad.

A pesar de que se sabe que las chaperonas moleculares actúan como complejos grandes formados por diferentes subunidades de polipéptidos (Sigler *et al.*, 1998) y que las estructuras oligoméricas más grandes de la RCA exhiben las actividades máximas de

hidrólisis de ATP y de activación de Rubisco (Wang *et al.*, 1993), se desconoce el grado de hetero-oligomerización de las subunidades α y β de la RCA *in vivo* para su función. Sin embargo, se podría esperar que la regulación del contenido y composición de dichas subunidades de la RCA sean importantes tanto para lograr un desempeño fotosintético óptimo, en calidad de activasa de la Rubisco, como para proteger a proteínas de fenómenos de desnaturalización, en calidad de chaperona clásica, particularmente bajo condiciones ambientales adversas. Se ha especulado que cambios en la abundancia de las dos subunidades de la RCA pueden regularse por factores ambientales (Crafts-Brandner *et al.*, 1997). El efecto protector de chaperona molecular de la RCA sobre la precipitación de la insulina dependió de la relación de los polipéptidos 43 kDa/41 kDa (Fig. 6, art. 1), lo cual sugiere que los cambios en la abundancia específica de los dos polipéptidos de RCA de maíz asociada con situaciones fisiológicas particulares (Figs. 3-5, art. 1), no son insignificantes. Por tanto, la relevancia de dichos cambios podría estar, al menos parcialmente, en relación con la actividad protectora de chaperona de la RCA, cuya especificidad de sustrato podría incluir otras moléculas además de la Rubisco. En efecto, se ha propuesto un papel alternativo para la RCA bajo condiciones de estrés por calor en el que el sustrato no sería Rubisco, más bien, la RCA se uniría a proteínas ribosomales o a cualquier otra de la maquinaria traduccional asociada a tilacoides, como se ha mostrado para varias proteínas al estrés por calor (HSPs) (Rokka *et al.*, 2001, referencias en artículo). Como en plántulas de maíz cultivadas en condiciones de sequía se promueve la expresión casi preferencial del polipéptido de 41 kDa (Fig. 5 art. 1) y la mayor actividad de chaperona corresponde a la presencia única de éste polipéptido (Fig. 6 art. 1), se podría especular, con base en lo anterior, que en esta situación la RCA tiene un papel relevante en proteger la

síntesis correcta de proteínas al promover plegamientos correctos durante este proceso, prevenir agregación de proteínas o coadyuvar en plegar proteínas desnaturalizadas.

Las chaperonas moleculares contribuyen a plegar una amplia variedad de proteínas no relacionadas estructural ni funcionalmente entre sí (Wang *et al.*, 2002). Como chaperona, entonces, la RCA podría actuar sobre moléculas diferentes a la Rubisco. Esta predicción fue sugerida al proponer que la RCA protegería a la maquinaria de síntesis de proteínas asociada a los tilacoides, contra la inactivación por calor (Rokka *et al.*, 2001). Nuestros resultados también sugieren la acción de la RCA sobre proteínas diferentes a la Rubisco ya que, como lo muestra la Fig. B, se detectan uno o dos polipéptidos de RCA, según la especie, en embriones maduros de diferentes plantas mono y dicotiledóneas, órgano en el cual la Rubisco no se expresa. ¿Cuál es el significado fisiológico de expresar la RCA en la semilla y cuál o cuáles son sus sustratos?, son preguntas muy interesantes por resolver. El reciente reporte de la expresión de la RCA en el estroma de cloroplastos de células del mesófilo de maíz (Hong *et al.*, 2004), donde no se expresa la Rubisco, está en concordancia con un papel alternativo para la RCA al de la activación de la Rubisco. Con base en esta observación, resulta atractivo considerar que la RCA pudiera jugar un papel importante en la protección al estrés hídrico y térmico durante la germinación, como ha sido demostrado para la HSP101 (Queitsch *et al.*, 2000). Al comparar el crecimiento y la fotosíntesis entre plantas de ambientes térmicos contrastantes (plantas de origen subtropical y plantas de origen templado), se observó que la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura y la estabilidad térmica de la RCA son mejores a temperaturas similares a las prevalecientes en sus ambientes naturales. Se concluyó que la respuesta de la fotosíntesis neta y la activación de la Rubisco a la temperatura guardan relación directa con las propiedades térmicas de la RCA (Salvucci and Crafts-Brandner, 2004). En condiciones de

estrés por calor, la RCA asociada a la membrana tilacoidal consta de un solo tipo de subunidad (Rokka *et al.*, 2001), por lo que la estructura completa de la RCA soluble cambia para actuar como chaperona de la maquinaria traduccional, asociada a la membrana tilacoidal. Por consiguiente, la participación de la RCA en la protección al proceso de la traducción por estrés térmico durante la germinación sería posible en semillas de plantas que normalmente crezcan a temperaturas menores que la del estrés térmico.

V. CONCLUSIONES

1. Los transcritos de *rca1* (1.4 kb), y *rca2* (1.8 kb) de maíz muestran acumulación diferencial asociada al ciclo circadiano, probablemente debido a los distintos motivos “DST-like” presentes en sus 3’UTRs.
2. El origen del polipéptido de 41 kDa de RCA de maíz es el procesamiento post-traducciona del polipéptido de 43 kDa en su región amino terminal. Este mecanismo es dependiente de señales de desarrollo y ambientales.
3. El polipéptido de 41 kDa de RCA de maíz, aunque menor que los polipéptidos β de RCA reportados, también presenta actividad.
4. Los cambios en la relación de los polipéptidos 43 kDa/41 kDa de RCA de maíz resultan en variaciones de la actividad protectora de chaperona molecular de la RCA *in vitro*, lo que sugiere una relevancia funcional de la regulación del procesamiento post-traducciona del polipéptido de 43 kDa.

VI. DIRECCIONES FUTURAS

Al término del presente trabajo surgen varios aspectos, relacionados con la regulación de la expresión de la RCA y la de su actividad, por ser investigados.

En relación a la regulación de la expresión de la RCA, se sugiere que ésta puede ocurrir tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Es necesario secuenciar las regiones 5'UTR de los transcritos de *rca1* y *rca2* para conocer los elementos propios de regulación de la expresión de cada uno de ellos y entender mejor cuál puede ser su significado biológico, considerando que ambos presentan idénticos ORFs. Desde luego la vida media de cada uno de los transcritos de *rca1* y *rca2* debería ser determinada y mapear la región que confiere la mayor estabilidad. Además, convendría analizar por un lado el patrón de expresión de dichos transcritos de *rca* en función de diferentes condiciones ambientales o de desarrollo para investigar si bajo alguna situación particular se requeriría la expresión única o mayoritaria del transcrito que es más estable y por otro lado determinar si paralelamente hay una mayor síntesis *de novo* de la proteína que se vea reflejada en la cantidad acumulada de cualquiera de los dos polipéptidos de RCA de maíz. La identificación y caracterización de la proteasa que procesa la región amino terminal del polipéptido de 43 kDa de RCA constituye un reto importante. Evitar dicho procesamiento será una herramienta útil para conocer la función de la forma de 41 kDa de RCA *in vivo*, lo que permitiría generar plantas con actividades óptimas de RCA, sea como activasa o como chaperona clásica.

En cuanto a la regulación de la actividad de la RCA de maíz, dada la alta actividad protectora de chaperona detectada para el polipéptido de 41 kDa, resulta importante definir con qué otras moléculas diferentes a la Rubisco interacciona este polipéptido de RCA tanto en la hoja como en la semilla. Asimismo, con el objeto de contribuir al mejor

entendimiento del porqué de la expresión de determinadas isoformas de la RCA en diferentes especies, podría resultar útil determinar también la actividad protectora de chaperona de las formas α y β de la RCA de plantas que expresan estos dos polipéptidos y de la forma β de plantas que sólo expresan un polipéptido de la RCA. Desde luego, también resta por analizar las actividades de ATPasa y de activación sobre la Rubisco de las formas de 43 y de 41 kDa de RCA de maíz, juntas y por separado, para determinar el requerimiento de las mismas en estas actividades ortodoxas de la RCA

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Andrews TJ, Lorimer GH.** 1987. Rubisco: structure, mechanisms, and prospects for improvement. In: Hatch MD, Boardman, NK, eds. The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise. Vol. 10. Photosynthesis. Academic Press. New York. pp: 131-218.
- Avron, M.** 1981. Photosynthetic electron transport and photophosphorylation. In: Hatch MD, Boardman, NK, eds. The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise. Vol. 8. Photosynthesis. Academic Press. New York. pp: 163-191.
- Ayala-Ochoa A, Loza-Tavera H, Sánchez de Jiménez E.** 1998. A cDNA from maize encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase (accession no. AF084478) (PGR98-207). Plant Physiology. 118, 1535.
- Ayala-Ochoa A, Vargas-Suárez M, Loza-Tavera H, León P, Jiménez-García L Felipe, Sánchez de Jiménez E.** 2004. In maize, two distinct ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase transcripts have different day/night patterns of expression. Biochimie. 86, 439-449.
- Brooks A, Portis AR Jr.** 1988. Protein-bound ribulosebisphosphate correlates with deactivation of ribulosebisphosphate carboxylase in leaves. Plant Physiology. 87, 244-249.
- Crafts-Brandner SJ, Salvucci M.** 2002. Sensitivity of photosynthesis in a C4 plant, maize, to heat stress. Plant Physiology. 129, 1773-1780.
- Eckardt NT, Portis AR Jr.** 1997. Heat denaturation profiles of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) and Rubisco activase and the inability of Rubisco activase to restore activity of heat-denatured Rubisco. Plant Physiology. 113, 243-248.
- Edmondson DL, Kane HJ, Andrews TJ.** 1990. Substrate isomerization inhibits ribulosebisphosphate carboxylase-oxygenase during catalysis. FEBS Letters. 260, 62-66.

Edwards GE, Huber SC. 1981. The C₄ pathway. In: Hatch MD, Boardman, NK, eds. The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise. Vol. 8. Photosynthesis. Academic Press. New York. pp: 237-281.

Edwards GE, Ku MSB, Monsosn RK. 1985. C₄ photosynthesis and its regulation. In: Barber J, Barker NR, eds. Photosynthetic mechanisms and the environment. The Netherlands: Elsevier Science. pp: 287-327.

Ellis RJ, van der Vies SM. 1991. Molecular chaperones. Annual Review of Biochemistry. 60, 321-347.

Esau BD, Snyder GW, Portis AR Jr. 1996. Differential effects of N- and C-terminal deletions on the two activities of rubisco activase. Archives of Biochemistry and Biophysics. 326, 100-105.

Gutteridge S, Parry MAJ, Burton S, Keys AJ, Mudd A, Feeney J, Servaites JC, Pierce J. 1986. A nocturnal inhibitor of carboxylation in leaves. Nature. 324, 274-276.

Gutiérrez RA, Ewing RM, Cherry JM, Green PJ. 2002. Identification of unstable transcripts in *Arabidopsis* by cDNA microarray analysis: rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 99, 11513-11518.

Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA. 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. Science. 290, 2110-2113.

Hatch MD. 1987. C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. Biochemistry Biophysics Acta. 895, 81-106.

Holmgren A. 1979. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. Journal of Biological Chemistry. 254, 9627-9632.

- Hong J, Wang WB, Jiang DA, Hu DW.** 2004. The immunogold localization of Rubisco and its activase in chloroplasts of barley and maize leaves. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao.* 30, 561-568.
- Hudson GS, Dengler RE, Hattersley PW, Dengler N.** 1992. Cell-specific expression of Rubisco small subunit and rubisco activase genes in C₃ and C₄ species of *Atriplex*. *Australian Journal Plant Physiology.* 19, 89-96.
- Jaenicke R, Creighton ET.** 1993. Junior chaperones. *Current Biology.* 3, 234-235.
- Jensen RG.** 2000. Activation of Rubisco regulates photosynthesis at high temperature and CO₂. *Proceedings of the National Academic of Sciences.* 97, 12937-12938.
- Jordan DB, Chollet R.** 1983. Inhibition of ribulose biphosphate carboxylase by substrate ribulose-1,5-biphosphate. *Journal of Biological Chemistry.* 258, 13752-13758.
- Jordan DB, Ogren WL.** 1984. The CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase /oxygenase. *Planta.* 161, 308-313.
- Law RD, Crafts-Brandner SJ.** 2001. High temperature stress increases the expression of wheat leaf ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activase protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 386, 261-267.
- Law RD, Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME.** 2001. Heat stress induces the synthesis of a new form of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activase in cotton leaves. *Planta.* 21, 117-125.
- Lidder P, Gutiérrez RA, Salome PA, McClung CR, Green PJ.** 2005. Circadian control of messenger RNA stability. Association with a sequence-specific messenger RNA decay pathway. *Plant Physiology.* 138, 2374-2385.

- Lilley RM and Portis AR Jr.** 1997. ATP hydrolysis activity and polymerization state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase activase (do the effects of Mg²⁺, K, and activase concentrations indicate a functional similarity to actin?). *Plant Physiology*. 114, 605-613.
- Liu Z, Taub CC, McClung CR.** 1996. Identification of an *Arabidopsis thaliana* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase (RCA) minimal promoter regulated by light and the circadian clock. *Plant Physiology*. 112, 43-51.
- Loza-Tavera H, Martínez-Barajas E, Sánchez de Jiménez E.** 1990. Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase expression in second leaves of maize seedlings from low and high yield populations. *Plant Physiology*. 93, 541-548.
- Malkin R, Niyogi K.** 2000. Photosynthesis. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, pp: 568–628.
- Martínez-Barajas E, Molina-Galán J, Sánchez de Jiménez E.** 1997. Regulation of Rubisco activity during grain-fill in maize: possible role of Rubisco activase. *The Journal of Agricultural Sciences*. 128, 155-161.
- Martino Catt S, Ort DR.** 1992. Low temperature interrupts circadian regulation of transcriptional activity in chilling-sensitive plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 89, 3731-3735.
- McClure BA, Hagen G, Brown CS, Gee MA, Guilfoyle T.** 1989. Transcription, organization, and sequence of an auxin-regulated gene cluster in soybean. *Plant Cell*. 1, 229-239.

- Morales A, Ortega-Delgado ML, Molina-Galán J, Sánchez de Jiménez E.** 1999. Importance of Rubisco activase in maize productivity based on mass selection procedures. *Journal of Experimental Botany*. 50, 823-829.
- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV.** 1999. AAA⁺: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and assembly of protein complexes. *Genome Research*. 9, 27-43.
- Newman TC, Ohme-Takagi M, Taylor CB, Green PJ.** 1993. DST sequences, highly conserved among plant SAUR genes, target reporter transcripts for rapid decay in tobacco. *Plant Cell*. 5, 701-714.
- Ogura T, Wilkinson AJ.** 2001. AAA⁺ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes Cells*. 6, 575-597.
- Qian J, Rodermeil SR.** 1993. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase cDNAs from *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology*. 102, 683-684.
- Perez-Amador MA, Lidder P, Johnson MA, Landgraf J, Wisman E, Green PJ.** 2001. New molecular phenotypes in the dst mutants of Arabidopsis revealed by DNA microarray analysis. *Plant Cell*. 13, 2703-2717.
- Pilgrim ML, McClung CR.** 1993. Differential Involvement of the Circadian Clock in the Expression of Genes Required for Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Synthesis, Assembly, and Activation in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology*. 103, 553-564.
- Pipal A, Goralik-Schramel M, Lusser A, Lanzasova C, Sarg B, Loidl A, Lindner H, Rossi V, Loidl P.** 2003. Regulation and processing of maize histone deacetylase Hda1 by limited proteolysis. *Plant Cell*. 15, 1904-1917.

- Portis AR Jr.** 1990. Rubisco activase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1015, 15-28.
- Portis AR Jr, Salvucci ME, Ogren WL.** 1986. Activation of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase at physiological CO₂ and ribulosebiphosphate concentrations by Rubisco activase. *Plant Physiology*. 82, 967-971.
- Portis AR Jr.** 2003. Rubisco activase – Rubisco’s catalytic chaperone. *Photosynthesis Research*. 75, 11-27.
- Queitsch C, Hong SW, Vierling E, Lindquist S.** 2000. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*. 12, 457-460.
- Qian J, Rodermel SR.** 1993. Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activase cDNAs from *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology*. 102, 683-684.
- Robinson SP, Walker DA.** 1981. Photosynthetic carbon reduction cycle. In: Hatch MD, Boardman, NK, eds. *The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise*. Vol. 8. Photosynthesis. Academic Press. New York. pp: 193-236.
- Robinson SP, Portis AR Jr.** 1988. Release of the nocturnal inhibitor carboxyarabinitol-1-phosphate, from ribulose biphosphat carboxylase/oxygenase by Rubisco activase. *FEBS Letters*. 233, 413-416.
- Robinson SP, Portis AR Jr.** 1989. Adenosine triphosphate hydrolysis by purified Rubisco activase. *Archives of Biochemistry and Biophysycs*. 268, 93-99.
- Rokka A, Zhang L, Aro Eva-Mari.** 2001. Rubisco activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function? *Plant Cell*. 25, 463-471.
- Rundle SJ, Zielinski RE.** 1991a. Organization and expression of two tandemly oriented genes encoding ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase in barley. *Journal of Biological Chemistry*. 266, 4677-4685.

Rundle SJ, Zielinski RE. 1991*b*. Alterations in barley ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase gene expression during development and in response to illumination. *Journal of Biological Chemistry*. 266, 14802-14807.

Sage RF, Seemann JR. 1993. Regulation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activity in Response to Reduced Light Intensity in C4 Plants. *Plant Physiology*. 102, 21-28.

Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B., Bennett J. 2002. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*. 2: 1131-1145.

Salvucci ME. 1992. Subunit interactions of Rubisco activase: Polyethylene glycol promotes self-association, stimulates ATPase and activation activities and enhances interactions with Rubisco. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 298, 688-696.

Salvucci ME, Anderson JC. 1987. Factors affecting the activation state and the level of total activity of ribulose bisphosphate carboxylase in tobacco protoplasts. *Plant Physiology*. 85, 66-71.

Salvucci ME, Crafts-Brandner SJ. 2004. Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiology*. 134, 1460-1470.

Salvucci ME, Ogren W. 1996. The mechanism of Rubisco activase: Insights from studies of the properties and structure of the enzyme. *Photosynthesis Research*. 47, 1-11.

Salvucci ME, Portis AR Jr, Ogren WL. 1985. A soluble chloroplast protein catalyzes ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation in vivo. *Photosynthesis Research*. 7, 193-201.

- Salvucci ME, Portis AR Jr, Ogren WL.** 1986. Light and CO₂ response of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*. 80, 655-659.
- Salvucci ME, van de Loo FJ, Stecher D.** 2003. Two isoforms of rubisco activase in cotton, the products of separate genes not alternative splicing. *Planta*. 216, 736-744.
- Salvucci ME, Werneke JM, Ogren WL, Portis AR Jr.** 1987. Purification and species distribution of Rubisco activase. *Plant Physiology*. 84, 930-936.
- Sánchez de Jiménez E, Medrano L, Martínez-Barajas E.** 1995. Rubisco activase, possible new member of the molecular chaperone family. *Biochemistry*. 34, 2826-2831.
- Scheibe, R.** 1991. Redox-modulation of chloroplast enzymes. *Plant Physiology*. 96, 1-3.
- Servaites JC.** 1985. Binding of a phosphorylated inhibitor to ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase during the night. *Plant Physiology*. 78, 839-843.
- Shen JB, Orozco EM Jr, Ogren WL.** 1991. Expression of the two isoforms of spinach ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase activase and essentiality of the conserved lysine in the consensus nucleotide-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*. 266, 8963-8968.
- Sigler PB, Xu Z, Rye HS, Burston GS, Fenton WA, Horwich AL.** 1998. Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annual Review of Biochemistry*. 67, 581-508.
- Somerville, CR, Portis AR Jr, Ogren, WL.** 1982. A mutant of *Arabidopsis thaliana* which lacks activation of RuBP carboxylase in vivo. *Plant Physiology*. 70, 381-387.
- Stitt M., Lilley RM, Heldt HW.** 1982. Adenine nucleotide levels in the cytosol, chloroplasts, and mitochondria of wheat leaf protoplasts. *Plant Physiology*. 70, 971-977.
- To KY, Suen DF, Chen SCG.** 1999. Molecular characterization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in rice leaves. *Planta*. 209, 66-76.

Usuda H. 1985. The activation state of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in maize leaves in dark and light. *Plant Cell Physiology*. 26, 1455-1463.

van de Loo FJ, Salvucci ME. 1996. Activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) involves Rubisco activase Trp16. *Biochemistry*. 35, 8143-8148.

Vargas-Suárez M, Ayala-Ochoa A, Lozano-Franco J, García-Torres I, Díaz-Quñones A, Ortiz-Navarrete VF, Sánchez de Jiménez E. 2004. Rubisco activase chaperone activity is regulated by a post-translational mechanism in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*. 55, 2533-2539.

von Caemmerer S, Hendrickson L, Quinn V, Vella N, Millgate AG, Furbank RT. 2005. Reductions of Rubisco activase by antisense RNA in the C4 plant *Flaveria bidentis* reduces Rubisco carbamylation and leaf photosynthesis. *Plant Physiology*. 13, 747-755.

Wang JD, Herman C, Tipton KA, Gross CA, Weissman JS. 2002. Directed evolution of substrate-optimized GroEl/S chaperonins. *Cell*. 111, 1027-1039.

Wang ZY, Ramage RT, Portis AR Jr. 1993. Mg and ATP or adenosine 5'-[thio]-triphosphate (ATP γ S) enhances intrinsic fluorescence and induces aggregation which increases the activity of spinach Rubisco activase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1202: 47-55.

Watillon B, Kettmann R, Boxus P, Burny A. 1993. Developmental and circadian pattern of rubisco activase mRNA accumulation in apple plants. *Plant Molecular Biology*. 23, 501-509.

Werneke JM, Chatfield JM, Ogren W. 1989. Alternative mRNA splicing generates the two Ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 1, 815-825.

Werneke JM, Zielinski RE, Ogren WL. 1988. Structure and expression of spinach leaf cDNA encoding ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 85, 787-791.

Wyrich R, Dressen U, Brockmann S, Streubel M, Chang C, Qiang D, Paterson AH, Westhoff, P. 1998. The molecular basis of C4 photosynthesis in sorghum: isolation, characterization and RFLP mapping of mesophyll- and bundle-sheath-specific cDNAs obtained by differential screening. *Plant Molecular Biology*. 37, 319-335.

Zhang Z, Komatsu S. 2000. Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding two isoforms of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in rice (*Oryza sativa* L). *Journal of Biochemistry*. 128, 383-389.

Zhang N, Portis AR Jr. 1999. Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-*f*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 96, 9438-9443.

Zhang N, Schürmann P, Portis AR Jr. 2001. Characterization of the regulatory function of the 46-kDa isoform of Rubisco activase from *Arabidopsis*. *Photosynthesis Research*. 68, 29-37.

Zhang N, Kallis RP, Ewy RG, Portis AR Jr. 2002. Light modulation of Rubisco in *Arabidopsis* requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 99, 3330-3334.

Zielinski RE, Werneke JW, Jenkins ME. 1989. Coordinate expression of rubisco a
activase and rubisco during barley leaf cell development. *Plant Physiology*. 90, 516-521.