

DEPARTAMENTO BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

REGULACIÓN REDOX DE LA RUBISCO: CONTRIBUCIÓN  
ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL PAR DE RESIDUOS  
CONSERVADOS Cys172 Y Cys192

MARÍA JESÚS GARCÍA MURRIA

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 6 d'Abril de 2006 davant un tribunal format per:

- D. Juan Carbonell Gisbert
- D. Francisco Javier Florencio Bellido
- D. Luis Alfonso del Río Legazpi
- D. Vicente Rubio Zamora
- D<sup>a</sup>. María Luisa Salvador Alcober

Va ser dirigida per:

D. Joaquín Moreno Mariño

 Copyright: Servei de Publicacions  
María Jesús García Murria

---

Dep sit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6590-8

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**Regulación redox de la Rubisco: Contribución  
estructural y funcional del par de residuos conservados  
Cys172 y Cys192**

Memoria presentada por  
**María Jesús García Murria**  
Para optar al grado de  
**Doctora en Bioquímica**

Director:  
**Dr. Joaquín Moreno Mariño**



**JOAQUÍN MORENO MARIÑO**, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València,

CERTIFICA que el trabajo titulado “Regulación redox de la Rubisco: Contribución estructural y funcional del par de residuos conservados Cys172 y Cys192” ha sido realizado bajo su dirección por **MARÍA JESÚS GARCÍA MURRIA** en el citado departamento, como tesis doctoral para optar al título de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular.

Para que así conste, firma el presente certificado en Burjassot, a 2 de febrero de 2006

Fdo. Joaquín Moreno Mariño



*“Son aquellas pequeñas cosas...”*

J.M.Serrat



Como diría Sabina: “y después de tanto ruido por fin llegó el final...”. Por último me queda la parte más emotiva de la tesis: recordar y dar las gracias con mayúsculas a todos los que han estado a mi lado en este largo periodo.

En primer lugar quisiera agradecer a Chimo el haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo, de aprender tanto, de viajar; haberme animado a hacer las estancias y llevar a cabo el proyecto de cristalografía.

A los *profes* del laboratorio de Plantas: a Marisa por su interés, permitirme viajes, congresos y... ganar el premio a la mejor canción (jee!); a Carlos por ayudarme en toda la docencia; a Lola por su amabilidad y simpatía; a Pedro por tener ese don de aparecer en el lab cuando hay comida (y muchísimas gracias por dejarme usar tu impresora).

A los compañeros del lab que han hecho que valiera la pena volver al día siguiente: los que ya se fueron, M.C, Raúl, Eavan, Sonia...; a Vicente por esas largas conversaciones y seguir estando ahí a pesar de la distancia y dejadez de e-mails; a Paco, uff! por sacarme de tantos apuros, uff! uff! y entender mi pasión por los perros. A Jorge perquè sempre ens provocava el somriure que tant necessitàvem. A Loreto por su apoyo y empatía “*arigato gozaimasu!*”. A Mayte, Nuria, Ana Cris, M. Ángeles, Quique, Toni, Sergi... por animarme y fomentar el buen ambiente en el lab. Por último, a la persona a quien debo muchísimo de esta tesis: a Julia. Por todo, porque me ha enseñado miles de cosas, por su apoyo incondicional tanto en el lab como en lo personal, porque ha sido un gustazo trabajar a tu lado y... no pararía. De verdad Julia, ¡¡¡mil gracias!!! como me gustaría que estuvieras aquí esta última etapa.

A mis compañeros de batalla: a Bárbara por intentar contagiarme su vitalidad y actitud ante la vida; a Lorena, Ana R. y Gemma por su apoyo y

fomentar las relaciones “extra-departamentales”; a Ana S. por los encuentros en el pasillo y aquella noche dormitando por los cajeros de Zaragoza; a Dunja por el *¿cómo vas?*; al laboratorio de ciclo de celular y sus visitas al Coulter; a Ana Carrasco por su saber escuchar; als meus companys de valencià: Paco T., M. Àngels i Ana P.; a Juan por esos piropos a mitad pasillo y a Mayte Pastor que tanto nos ayudó con la puesta a punto del HPLC.

También a aquellas personas que sin darse cuenta contribuyeron en mi bienestar: a Emilia Matallana que nos contagió en sus clases la pasión por la bioquímica; al mañoso de J.R. que tantas veces me cambió la punta del sonicador y aparecía a arreglar el aparato que se estropeara; a María por ser tan eficaz con los papeleos; a Paqui y Amparo, por esa alegría infinita con la que te animan el día (ya es hora que nos contéis vuestro secreto). Y, en general a todos los del departamento que han estado dispuestos a ayudarme, compartir experiencias y hacer mejor el día a día.

A los que hicieron posible mi trabajo en Uppsala, *tack så mycket!*. A Inger Andersson por haberme aceptado en su laboratorio y su entorno. A la paciencia de mi *profe* particular de cristalografía, Saeid Karkehabadi, al que alboroté su plácido mundo y aun así personalmente siempre estaba dispuesto a ayudarme. A la gente del BMC que compartió mi estancia, a los hispanos (Jorge Llanos, Isma, Adrián, Hugo), a la simpatía de Janos y a la amabilidad de Anke y Karen. Sin olvidar a *mi* Rusé, el ángel de la guarda que se me apareció en el mejor momento e hizo tan agradable el tiempo que compartimos. A Helena, Marçal i Arnau por hacerme más cálida la estancia en la fría Uppsala.

A mis *compis* de máster por su apoyo e interés.

A mis *compis* de carrera: Maica, M<sup>a</sup> Carmen Herranz y Lidia, por compartir anécdotas, miedos, decisiones....

A los pinochos “Sus Jodís”, por permitirme desconectar completamente de la tesis, lab, etc., y a pesar de lo poco que voy a visitarlos, tengo la suerte de que aún siguen ahí.

A los Pérez Pardo por su apoyo y “prestarme” a su niño.

A mi pequeña Paila que todos los días me ha obligado a desconectar un momento u otro y solo tener ojos y manos para sus huesos y pelotas.

A mi tía Conchín y familia por preocuparse tanto de mí y ayudarme cuando lo he necesitado.

A mis hermanos Javi y Miguel, por “¿me llevas?” y aunque fueran las 6-7 de la mañana se levantaban para llevar a su hermana a no se qué que quería hacer ese día en el lab. A mis cocineros particulares, Javi, mamá y ahora J.A. por alimentarme tan bien. A Ana y cia. por la merienda de los domingos. A mis padres por respetar mis decisiones, por contagiarme su capacidad de trabajo y quererme tanto.

A este pequeñajo que va creciendo dentro de mí y ha hecho que afronte este último periodo con asombrosa tranquilidad.

Y, por último, a la persona que siempre ha confiado en que sería capaz de acabar esta tesis y ha puesto todo su empeño para que así fuera, y vaya! tenías razón, lo he conseguido. Muchísimas gracias por todo y un besazo, guapetón.

A todos MUCHAS GRACIAS,

MJ



A Juan Antonio

A mis padres y a mis hermanos



## ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	19
<hr/>	
<i>INTRODUCCIÓN</i>	
<u>1. VISIÓN HISTÓRICA</u>	23
<u>2. FUNCIÓN DE LA RUBISCO</u>	24
2.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	24
2.2. ALMACEN DE NUTRIENTES	26
2.3. OTRAS FUNCIONES	27
<u>3. CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE LA RUBISCO</u>	29
3.1. LA RUBISCO FORMA I Y II	29
3.2. LA RUBISCO FORMA III	31
3.3. LA RUBISCO FORMA IV	33
<u>4. ORGANIZACIÓN GÉNICA, SÍNTESIS Y ENSAMBLAJE DE LA RUBISCO</u>	
4.1 ORGANIZACIÓN DE LOS GENES DE LA RUBISCO	35
4.2. BIOSÍNTESIS DE LA RUBISCO	37
4.3. ENSAMBLAJE DE LAS SUBUNIDADES PEQUEÑAS Y GRANDES. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES	38
<u>5. ESTRUCTURA DE LA RUBISCO</u>	39
5.1. CARACTERÍSTICAS CRISTALOGRÁFICAS DE LA RUBISCO	40
5.2. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y CARACTERÍSTICAS DEL SITIO CATALÍTICO	40
5.3. ESTRUCTURA DE LA SUBUNIDAD PEQUEÑA	47
	13

<i>5.4. ESTUDIOS CRISTALOGRAFICOS DE CAMBIOS CONFORMACIONALES</i>	51
<b><u>5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</u></b>	53
<i>5.1. ACTIVACIÓN</i>	53
<i>5.2. MECANISMO CATALÍTICO</i>	55
<i>5.3. FACTOR DE ESPECIFICIDAD RELATIVA</i>	58
<i>5.4. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD</i>	60
<b><u>6. CATABOLISMO DE LA RUBISCO</u></b>	61
<i>6.1. REGULACIÓN REDOX EN EL CLOROPLASTO</i>	62
<i>6.2. MODIFICACIONES DE LA RUBISCO QUE MARCAN SU DEGRADACIÓN ESPECÍFICA</i>	65
<i>6.3. PROTEOLISIS DE LA RUBISCO</i>	69
<i>6.4. PAPEL DE LAS CISTEÍNAS EN EL CATABOLISMO DE LA RUBISCO</i>	71
<hr/> <b><i>OBJETIVOS</i></b>	75
<hr/> <b><i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i></b>	79
<hr/> <b>CAPÍTULO I: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS RUBISCOS MUTANTES C172S, C192S Y C172S/C192S</b>	
<b><u>1. OBTENCIÓN DE MUTANTES EN RESIDUOS CONSERVADOS DE CISTEÍNAS</u></b>	83

---

<i>1.1. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE GEN <i>rbcL</i></i>	83
<i>1.2. TRANSFORMACIÓN DEL CLOROPLASTO DE <i>C.reinhardtii</i></i>	84
<i>1.3. CARACTERIZACIÓN PREVIA DE LAS CEPAS MUTANTES C192S Y C172S/C192S</i>	88
<b><u>2. CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS RUBISCOS MUTANTES C172S, C192S Y C172S/C192S</u></b>	89
<i>2.1. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS RUBISCOS</i>	89
<i>2.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS</i>	91
<i>2.3. ESTUDIO DE LA TERMOSENSIBILIDAD DE LOS ENZIMAS MUTANTES</i>	93
<i>2.4. COMPORTAMIENTO ELECTROFORÉTICO EN GELES NATIVOS</i>	96
<i>2.5. MODULACIÓN REDOX DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</i>	97
<i>2.5.1. <u>Inactivación en tampones redox</u></i>	97
<i>2.5.2. <u>Efecto de agentes modificadores de cisteínas</u></i>	100
<i>2.5.3. <u>Hipótesis de la modulación redox de la actividad enzimática a través del par Cys172-Cys192</u></i>	107
<i>2.6. MODULACIÓN REDOX DE LA SUSCEPTIBILIDAD PROTEOLITICA</i>	110
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	118

---

**CAPÍTULO II: DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LAS  
RUBISCOS C172S Y C192S POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X**

<u>1. OBTENCIÓN DE CRISTALES DE RUBISCO</u>	125
<u>2. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS MUTANTES C172S Y C192S</u>	126
<u>DISCUSIÓN</u>	133

---

**CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LOS MUTANTES A  
DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS**

<u>1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LOS MUTANTES SOMETIDOS A ESTRÉS SALINO</u>	143
<u>2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LOS MUTANTES SOMETIDOS A ESTRÉS INDUCIDO POR DIAMIDA</u>	146
<u>3. MEDIDA DE LA FIJACIÓN FOTOSINTÉTICA DE CARBONO EN PRESENCIA DE DIAMIDA</u>	151
<u>DISCUSIÓN</u>	153

---

<i>CONCLUSIONES</i>	157
---------------------	-----

---

<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	161
-----------------------------	-----

---

<u>1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE <i>C.reinhardtii</i></u>	163
<u>2. OBTENCIÓN DE MUTANTES DE <i>C. reinhardtii</i></u>	165
2.1. <i>MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DEL GEN rbcL DE C.reinhardtii</i>	165
2.1.1. <i>Diseño de los oligonucleótidos</i>	165
2.1.2. <i>Mutagénesis dirigida</i>	166
2.1.3. <i>Transformación de células competentes de E. coli</i>	167
2.1.4. <i>Extracción y purificación de plásmidos de E. coli</i>	168
2.2. <i>TRANSFORMACIÓN DEL CLOROPLASTO DE C. reinhardtii</i>	169
2.2.1. <i>Procedimiento de transformación</i>	169
2.2.2. <i>Purificación de DNA de C.reinhardtii y caracterización de la mutación</i>	171
<u>3. PURIFICACIÓN DE LA RUBISCO DE <i>C. reinhardtii</i></u>	173
<u>4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CARBOXILASA</u>	176
4.1. <i>DETERMINACIÓN ACTIVIDAD CARBOXILASA</i>	176
4.2. <i>TRATAMIENTO DE LA RUBISCO CON DIFERENTES AGENTES OXIDANTES Y REDUCTORES</i>	177
4.3. <i>DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE ESPECIFICIDAD Y DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LA RUBISCO</i>	178
4.4. <i>DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CARBOXILASA EN EXTRACTOS CRUDOS</i>	180
<u>5. PROTEOLISIS DE LA RUBISCO</u>	181
5.1. <i>ENSAYO DE PROTEOLISIS</i>	181
5.2. <i>AJUSTE AL MODELO DE PROTEOLISIS</i>	181

<u>6. ELECTROFORESIS (SDS-PAGE Y PAGE), TRANSFERENCIA A MEMBRANAS E INMUNOREVELADO DE LA RUBISCO</u>	182
<u>7. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES DE <i>C. reinhardtii</i></u>	183
7.1. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE <i>C. reinhardtii</i>	183
7.1.1 <u>Determinación del contenido en clorofilas</u>	183
7.1.2. <u>Determinación de la cantidad de proteínas</u>	183
7.2. SEGUIMIENTO DEL CONTENIDO EN RUBISCO, PROTEÍNAS TOTALES Y CLOROFILA DURANTE LOS ESTRESSES	184
7.3. ENSAYO DE FIJACIÓN DE CO <sub>2</sub> IN VIVO DURANTE EL ESTRÉS	185
<u>8. CRISTALIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA RUBISCO DE LOS MUTANTES</u>	186
8.1. CRISTALIZACIÓN	186
8.2. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA RUBISCO	187
8.2.1. <u>Obtención de los datos y procesamiento</u>	187
8.2.2. <u>Obtención de las fases, construcción del modelo y refinamiento</u>	187
<hr/> <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	191

**ABREVIATURAS**

Acetil CoA	Acetil CoenzimaA
CABP	2-carboxi-D-arabinitol 1,5 bisfosfato
CA1P	2-carboxi-D-arabinitol 1-fosfato
CSH	cisteamina (2-mercaptoetilamina)
CSSC	cistamina (disulfuro de cisteamina)
DK-MTP-1-P enolasa	2,3-dicetometil-tiopentil-1-fosfato enolasa
DTNB	ditionitrobenzoato
EDTA	etilendiaminotetraacetato sódico
$\beta$ -EtSH	2- mercaptoetanol,
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
IAA	ácido yodoacético
IAM	yodoacetamida
NEM	n-etil maleimida
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PGA	3-fosfoglicerato
PMSF	fluoruro de metilfenilsufonilo
POPOP	1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil) benceno
PPO	2,5- difeniloxazol
PRPP	5-fosfoD-ribosa 1-pirofosfato
r	relación disulfuro/tiol [CSSC/CSH]
ROS	especies reactivas de oxígeno
Rubisco	Ribulosa 1,5- bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
RuBP	Ribulosa 1,5- bisfosfato

<b>SDS</b>	dodecil sulfato sódico
<b>SNC</b>	simetría no cristalográfica
<b>UTR</b>	región no traducible
<b>XuBP</b>	Xilulosa 1,5- bisfosfato
<b><math>\Omega</math></b>	coeficiente de especificidad relativa

---

## *INTRODUCCIÓN*



## 1. VISIÓN HISTÓRICA

La Ribulosa bifsosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco, EC 4.1.1.39), responsable de la mayor parte de la conversión de CO<sub>2</sub> inorgánico en carbono orgánico, es probablemente la proteína más abundante de la Tierra (Ellis, 1979). La Rubisco es un enzima básico para el mantenimiento de la vida. Prácticamente todo el carbono del cuerpo humano, como también el presente en la comida, carburantes y ropa ha pasado alguna vez por el centro activo del enzima.

Alrededor del 1954, Melvin Calvin y Andrew A. Benson identificaron cada una de las reacciones del ciclo de fijación fotosintética de CO<sub>2</sub> (Bassham, 2003). Este descubrimiento, merecedor del premio Nobel, llevó a los grupos de Bernad L. Horecker y Arthur Weissbach en 1956 a buscar el enzima responsable del primer paso del Ciclo de Calvin capaz de catalizar la combinación del CO<sub>2</sub> con ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) y su posterior dismutación en dos moléculas de 3-fosfogliceraldehído (Benson, 2002). Trabajando en hojas de espinaca encontraron un enzima con dicha actividad que tenía un coeficiente de sedimentación de 18S (Weissbach *et al.*, 1956). Este trabajo coincidió con la observación de una proteína mayoritaria que constituía el 50% del contenido proteico soluble en extractos crudos de hoja de espinaca y poseía un coeficiente de sedimentación de 18S (Singer *et al.*, 1952; Wildman, 2002). La identidad de esta proteína (denominada Fracción I) con el enzima que carboxila RuBP fue establecida por el grupo de Robert Dorner y Albert Kahn (Dorner *et al.*, 1957), y el enzima se rebautizó como “carboxidismutasa”.

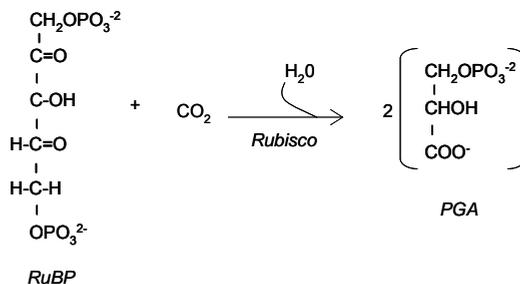
Entre los años 50 y 60 la investigación se centró en la purificación y caracterización catalítica del enzima. Su nombre fue evolucionando desde 1956 hasta 1979. Se llamo carboxidismutasa, ribulosa difosfato o RuDP

carboxilasa, ribulosa bisfosfato o RuBP carboxilasa, incluso se llamó 3-fosfo-D-glicerato carboxilasa (dimerizadora) (Wildman, 2002). En 1971 Ogren y Bowes encontraron que el enzima también era capaz de oxigenar RuBP para dar 2-fosfoglicolato (a la vez que 3-fosfoglicerato), la primera reacción de la vía fotorrespiratoria (Bowes *et al.*, 1971). Por tanto, se le cambió el nombre a ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa. Y fue en un congreso en 1971 cuando David Eisenberg inventó la abreviatura “Rubisco” procedente de **ri**bulosa-1,5-**bi**sfosfato **ca**rboxilasa/**ox**igenasa.

## 2. FUNCIÓN DE LA RUBISCO

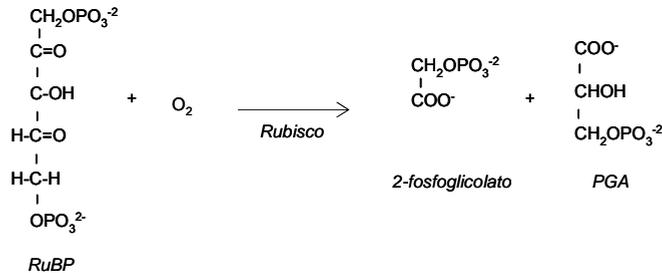
### 2.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El enzima cataliza la primera reacción del ciclo de Calvin (fig.1), el paso inicial de la **asimilación fotosintética**, y por tanto de la ruta responsable de la incorporación de carbono en la biosfera (Ferreira *et al.*, 2000). La Rubisco carboxila RuBP (azúcar de 5 C) con CO<sub>2</sub> de la atmósfera para producir 2 moléculas de un ácido carboxílico de 3 C [3-fosfoglicerato(PGA)] (Calvin, 1956):



Este ácido carboxílico se reduce para formar carbohidratos y una parte del esqueleto carbonado se usa para regenerar RuBP.

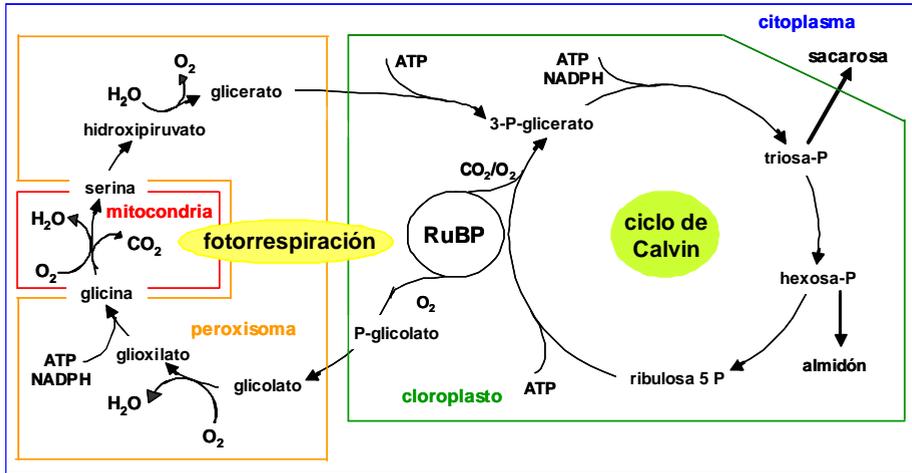
Además de la carboxilación, la Rubisco también es capaz de catalizar la oxigenación de RuBP:



que genera una molécula de PGA que se metaboliza a través del ciclo de Calvin, y una de 2-fosfoglicolato que por la ruta del glicolato, mediante consumo de ATP y poder reductor unido a la pérdida de  $\text{CO}_2$ , se reconvierte parcialmente en PGA que retorna al ciclo de Calvin (Bowes *et al.*, 1971). Este proceso se conoce como **fotorrespiración** (fig.1). El balance neto de esta vía es la pérdida de más del 30% del  $\text{CO}_2$  fijado durante la fotosíntesis (Ogren, 1984). La reacción de oxigenación compromete la eficiencia de la fijación fotosintética de carbono y constituye probablemente la restricción más importante para la acumulación de biomasa de las plantas. Aunque se ha propuesto que esta vía podría participar en otros procesos metabólicos (Leegood *et al.*, 1995) no hay evidencias concluyentes de que la función de esta ruta sea otra que la de metabolizar el fosfoglicolato y recuperar así parte del carbono.

El nivel de fotorrespiración depende de la relación de carboxilación respecto a la oxigenación, y de las concentraciones relativas de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  en el ambiente de la Rubisco. Muchos organismos fotosintéticos han desarrollado estrategias para potenciar la fijación de  $\text{CO}_2$  sobre la vía fotorrespiratoria, bien incrementado localmente la concentración de  $\text{CO}_2$ , o bien aumentando

la capacidad de discriminación entre los dos sustratos del enzima (la cual se mide mediante el llamado coeficiente de especificidad ( $\Omega$ )).



**Fig.1. Metabolismo de la RuBP.** La Rubisco cataliza tanto la reacción de carboxilación como la de oxigenación de la RuBP, siendo el punto de partida de dos procesos opuestos: la fotosíntesis y la fotorrespiración. Tomado de (Marín-Navarro, 2004).

## 2.2. ALMACEN DE NUTRIENTES

Los organismos han de invertir una parte importante de su contenido de nitrógeno, carbono y azufre para sintetizar grandes cantidades de Rubisco y así compensar la escasa eficiencia del enzima y su lentitud catalítica. Así, por ejemplo, en hojas de plantas superiores, la Rubisco llega a suponer un 50% del contenido proteico total, y contiene una cierta parte del nitrógeno total invertido en dichos órganos (Evans y Seeman, 1989). Por tanto, la degradación específica de la Rubisco, la movilización de sus aminoácidos y la consecuente reutilización de sus elementos durante la senescencia natural o inducida por estrés juegan un papel fundamental en el balance nutricional de

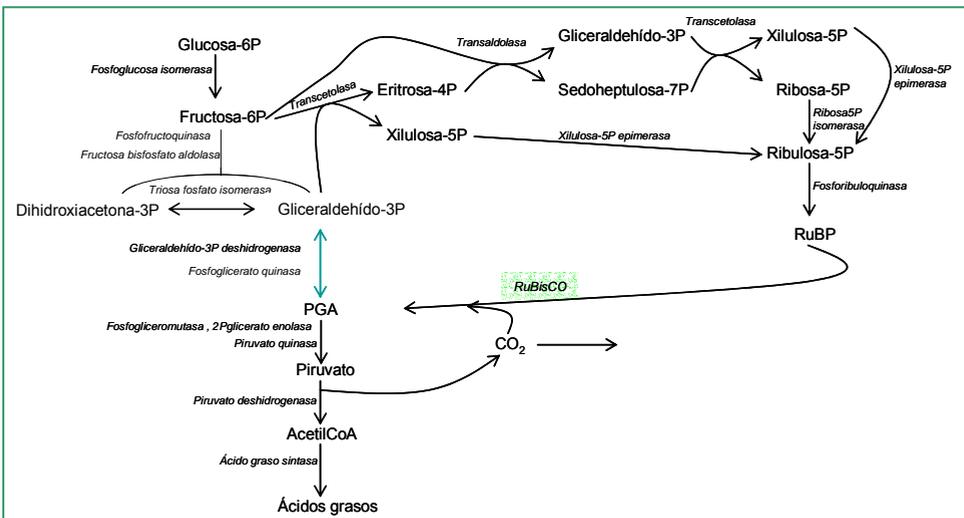
las plantas (Ferreira *et al.*, 2000). Se ha observado repetidamente que cuando los organismos fotosintéticos se enfrentan a condiciones adversas pueden degradar parte de su contenido de Rubisco y utilizar su contenido de carbono, nitrógeno y azufre para la síntesis rápida de un complemento enzimático u otros componentes esenciales para superar el estrés. Por otra parte, en la senescencia natural de órganos verdes de plantas superiores, los nutrientes no utilizados de la Rubisco suponen una fracción importante del aporte nutritivo a los nuevos órganos en crecimiento.

### ***2.3. OTRAS FUNCIONES***

Además de las funciones citadas, se ha propuesto que la Rubisco podría tener otras funciones especializadas. Así, en el estroma de los cloroplastos de algas y plantas superiores, se ha descrito que la Rubisco podría actuar como **tampón metabólico**. Debido a la alta concentración de la Rubisco y a que su centro activo también reconoce otros componentes del ciclo de Calvin, como fosfatos de azúcar, fosfatos de adenosina y NADPH, se ha postulado que la unión de estos compuestos a la Rubisco podría tener una función fisiológica modulando la concentración disponible de estos metabolitos en forma libre (Ashton, 1982).

Por otra parte, en semillas oleaginosas se ha descrito la **participación de la Rubisco en una ruta metabólica que aumenta la eficiencia del uso del carbono durante la síntesis de ácidos grasos** (fig.2). En las semillas verdes de *Brassica napus*, la Rubisco es activa fijando CO<sub>2</sub> por la reacción de carboxilación normal pero no como parte del ciclo del Calvin, que no es funcional, sino que participa en una ruta recientemente descrita que convierte carbohidratos en ácidos grasos de reserva (fig.2) (Schwender *et al.*,

2004). Primero, las hexosas fosfatos se convierten en RuBP por reacciones de la ruta oxidativa de las fosfato pentosas y por acción de la fosforibulokinasa. Después, la **Rubisco** combina RuBP con CO<sub>2</sub> produciendo PGA, que se convierte a piruvato y posteriormente a ácidos grasos. Esta ruta permite la conversión de carbohidratos en un 20% más de Acetil CoA y, por tanto, de aceites que la ruta glicolítica, y evita la pérdida del 40% de carbono que se liberaría en forma de CO<sub>2</sub>.



**Fig.2. Transformación metabólica de azúcares en ácidos grasos.** En primer lugar se da la conversión de hexosas fosfato a pentosas fosfato a través de los pasos no oxidativos de la ruta de las fosfatos pentosas. Después la Rubisco cataliza la formación de PGA reciclando la mitad del CO<sub>2</sub> liberado por la Piruvato deshidrogenasa. El PGA se procesa a piruvato, AcetilCoA y finalmente a ácidos grasos.

Además, se ha descrito que una proteína homóloga a la Rubisco de la bacteria *Bacillus subtilis* funciona como una 2,3-dicetometil-tiopentil-1-fosfato enolasa (DK-MTP-1-P enolasa) en la **ruta de salvamento de la metionina** en este organismo (Ashida *et al.*, 2003; Sekowska *et al.*, 2004).

Aunque esta proteína no es capaz de llevar a cabo la carboxilación y oxigenación característica de la Rubisco (Ashida *et al.*, 2003), el fenotipo asociado a la eliminación de esta actividad puede ser revertido por la transformación con el gen de una Rubisco de un procarionta fotosintético (Ashida *et al.*, 2003).

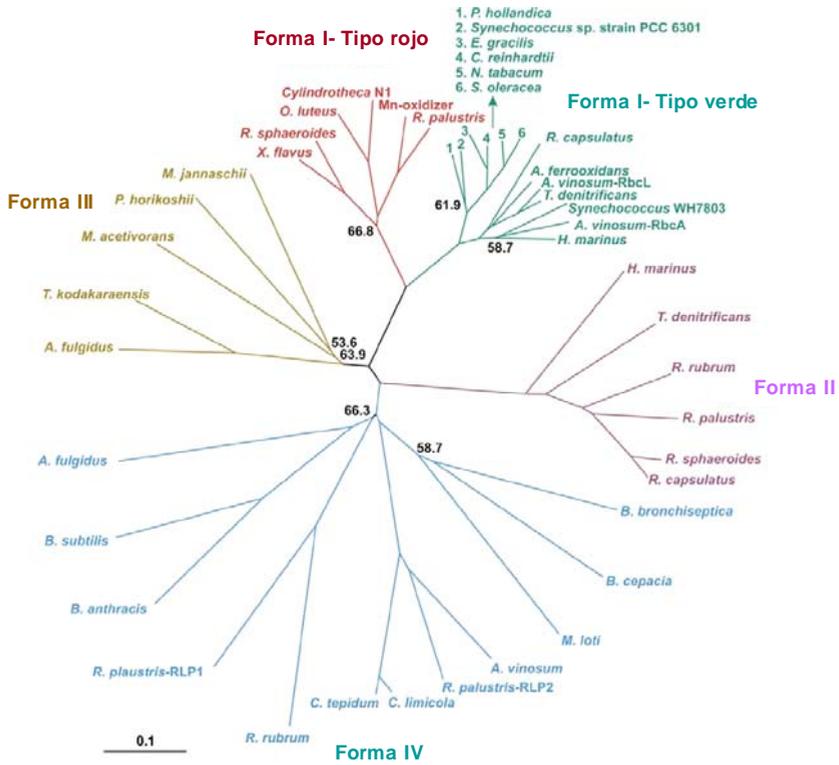
### 3. CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE LA RUBISCO

La Rubisco se encuentra en la naturaleza en diversas formas estructurales. En todos los enzimas activos, la unidad catalítica está constituida por un homodímero de un polipéptido de unos 50-55kDa conocido como “subunidad grande”. El árbol filogenético construido usando secuencias de aminoácidos de subunidades grandes de la Rubisco (fig.3) muestra agrupamientos característicos entre enzimas de diferentes especies (Hanson y Tabita, 2003). En base a estos agrupamientos se han clasificado las las Rubiscos en cuatro formas fundamentales: la Rubisco Forma I, Forma II, Forma III y Forma IV.

#### **3.1. LA RUBISCO FORMA I Y II**

La Rubisco de plantas superiores, cianobacterias y algas es un enzima compuesto por 8 subunidades grandes (L) (55kDa), y 8 subunidades pequeñas (S) (15kDa). Este tipo de enzima hexadecamérico se conoce como la Rubisco **Forma I**. Algunos procariontas y dinoflagelados tienen una Rubisco **Forma II** que consiste en solo subunidades grandes organizadas en forma de dímeros, tetrameros o incluso oligómeros mayores ( Schneider *et al.*, 1986; Schneider *et al.*, 1990b; Whitney *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2005). La principal diferencia

entre la Forma I y la Forma II es la ausencia de subunidades pequeñas en ésta última.



	Forma I	Forma II	Forma III	Forma IV
<b>Estructura</b>	$L_3S_8$	$(L_2)_n$	$L_{10} \text{ o } L_2$	$L_2$
<b>Actividad carboxilasa/oxigenasa depdte de RuBP</b>	SÍ	SÍ	SÍ	NO
<b>Función</b>	Ciclo de Calvin	Ciclo de Calvin	??	Según proteína Ruta salvamento metionina / metabolismo azufre...

**Fig.3. Árbol filogenético construido usando secuencias de aminoácidos de subunidades grandes de la Rubisco** (Hanson y Tabita, 2003). En la tabla se muestran las características de cada grupo.

Las Rubiscos Forma I se pueden dividir en dos tipos principales “verde” y “roja” (Watson y Tabita, 1997). La Rubisco “verde” se encuentra en cianobacterias, plantas superiores, algas verdes y un grupo de bacterias púrpuras. Por otro lado, la Rubisco “roja” se encuentra en bacterias púrpuras y algas no verdes. Por último, las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  proteobacterias se dividen entre los tipos verde y roja. Algunas de estas clasificaciones no coinciden con aquellas filogenias basadas en otros genes, lo que parece indicar que el gen de la subunidad grande de la Rubisco ha sufrido múltiples procesos de transferencia horizontal y duplicación génica en diferentes linajes (Delwiche y Palmer, 1996).

### **3.2. LA RUBISCO FORMA III**

Algunas arqueobacterias contienen también secuencias de Rubisco (las llamadas **Forma III**) (fig.3) que presentan notables diferencias con las de las Formas I y II, aunque los residuos esenciales del centro activo están muy conservados. Las Rubiscos Forma III son muy diferentes entre sí con respecto a sus propiedades catalíticas y estructurales. Por ejemplo, la Rubisco Forma III se ha encontrado en los anaerobios estrictos que crecen a altas temperaturas *Methanococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996) y *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk *et al.*, 1997) y en algunos metanógenos heterotróficos mesófilos (Finn y Tabita, 2003). En todos estos casos la Rubisco se presenta en forma de homodímero L<sub>2</sub>. Por otro lado, en la Rubisco Forma III purificada de la arqueobacteria hipertermófila *Thermococcus* (antes *Pyrococcus*) *kodakarensis* (Ezaki *et al.*, 1999) los dímeros de subunidad grande se organizan en una estructura pentamérica (L<sub>2</sub>)<sub>5</sub>.

Se ha demostrado que estos enzimas son capaces de catalizar la fijación de CO<sub>2</sub> dependiente de RuBP *in vitro* (Watson *et al.*, 1999) y que son

activos *in vivo* (Finn y Tabita, 2003). Estos enzimas difieren entre ellos en su actividad dependiente de la temperatura, como también de su sensibilidad por el O<sub>2</sub> (Finn y Tabita, 2003). Por ejemplo, las Rubiscos de *M. jannaschii* y *A. fulgidus* se inhiben por el O<sub>2</sub> de manera reversible, mientras que el enzima mesófilo de *M. acetivorans* no se consigue recuperar de la inhibición. En la Rubisco Forma I y II, el O<sub>2</sub> es un inhibidor competitivo con respecto el CO<sub>2</sub>, pero no se había observado una inhibición total de la actividad en condiciones normales con CO<sub>2</sub> saturante como ocurre en la Rubisco Forma III.

Recientemente se ha resuelto la paradoja de que estas arqueobacterias anaeróbicas contuvieran Rubisco catalíticamente competente pero no se hubiera encontrado ninguna ruta que produjera su sustrato aceptor de CO<sub>2</sub>. En estos organismos se ha descrito una vía diferente de síntesis de RuBP a partir de PRPP (5-fosfo-D-ribosa 1-pirofosfato) (Finn y Tabita, 2004). Esta nueva vía parece constituir un enlace evolutivo entre la vía del reciclaje de las purinas y el ciclo de Calvin, ya que PRPP es un metabolito central que une las dos vías (Finn y Tabita, 2004).

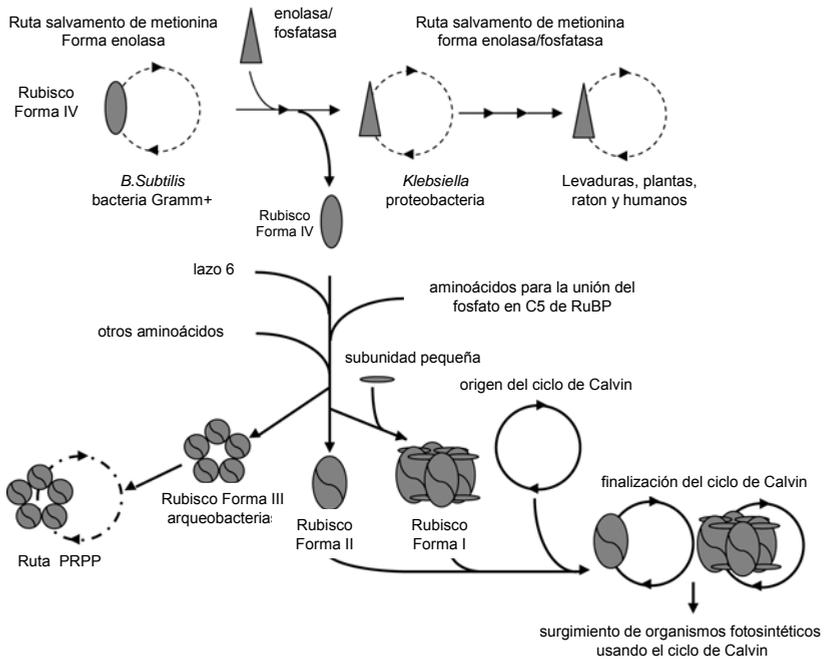
El estudio de estas Rubiscos Forma III presenta varios puntos adicionales de interés. Por un lado, el estudio comparado de las Rubiscos de especies aeróbicas podría permitir entender los cambios evolutivos asociados al incremento de la presencia del O<sub>2</sub>. Por otro lado, la capacidad de catalizar la reacción a temperaturas extremas es un indicador de una adaptación estructural única, lo que podría proporcionar información de la relación estructura-función en las moléculas de Rubisco (Finn y Tabita, 2003).

### 3.3. LA RUBISCO FORMA IV

También se han identificado genes que codifican secuencias con homología a Rubisco en otros organismos sin ciclo de Calvin, como la bacteria Gramm positiva *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.*, 1997), en la bacteria verde azufrada *Chlorobium tepidum* (Hanson y Tabita, 2001), en la bacteria púrpura no fototrófica azufrada *Rhodospseudomonas palustris* (Larimer *et al.*, 2004) y en la arqueobacteria extremofílica que metaboliza azufre *Archeoglobus fulgidus* (Klenk *et al.*, 1997). Debido a diferencias características de secuencia se les clasifica como Rubisco **Forma IV** (fig.3). Estas proteínas carecen de algunos residuos esenciales del centro activo y no son capaces de catalizar la fijación de CO<sub>2</sub> u O<sub>2</sub> dependiente de RuBP (Hanson y Tabita, 2001; Ashida *et al.*, 2003), por lo que se denominan **proteínas similares a Rubisco**. Entre ellas presentan poca homología de secuencia, lo que podría indicar que diferentes Rubiscos Forma IV tengan diferentes papeles fisiológicos. De hecho, se ha demostrado que la proteína similar a Rubisco de *B. subtilis* cataliza una reacción de enolización (DK-MTP-1-P enolasa) en la ruta de salvamento de la metionina (Sekowska y Danchin, 2002). Los genes que codifican para proteínas de esta ruta se encuentran juntos en varios operones, uno de los cuales incluye el gen para la Rubisco (mtn *W*). Por otra parte, la Rubisco de *C. tepidum* no cumple esta función, sino que parece estar implicada en el metabolismo del azufre y/o en respuesta a estrés oxidativo (Hanson y Tabita, 2001; Hanson y Tabita, 2003). Se ha propuesto que esta Rubisco Forma IV ha coevolucionado con los enzimas de la ruta de biosíntesis de la bacterioclorofila, y podría estar implicado en procesos relacionados con la fotosíntesis (Li *et al.*, 2005). Por último, el genoma de *R. palustris* codifica tanto para dos Rubiscos Forma IV

(RLP1 y RLP2) como también para Rubiscos Forma I y II (Larimer *et al.*, 2004). Estas dos Rubiscos Forma IV pertenecen a diferentes grupos, indicando que podrían tener diferentes funciones (Hanson y Tabita, 2003). RLP2 es el ortólogo de la Rubisco Forma IV de *C.tepidum* y RLP1, que está débilmente relacionada con las Formas I y II, parece haber divergido funcionalmente del proceso fotosintético y jugar un papel en otro proceso metabólico (Hanson y Tabita, 2003).

Curiosamente, la Rubisco fotosintéticamente activa de *R. rubrum* (Forma II) puede complementar una cepa deficiente en la Rubisco Forma IV y funcionar como una enolasa en la ruta de salvamento de metionina en *B. subtilis* (Ashida *et al.*, 2003). Esto sugiere que el centro activo de la Rubisco puede acomodar un rango relativamente amplio de sustratos, y así, la Rubisco sería potencialmente capaz de evolucionar a nuevas actividades catalíticas (Li *et al.*, 2005). De hecho, las desventajas de la Rubisco como catalizador podrían reflejar la evolución y posible multifuncionalidad de la proteína ancestral. No se ha identificado el gen ancestral de la Rubisco pero las Rubiscos Forma IV podrían ser el enlace evolutivo hacia la forma catalíticamente activa y por tanto, la investigación de la función de éstas, desde punto de vista bioinformático, estructural y funcional, podría clarificar la evolución de la Rubisco y sus funciones (Hanson y Tabita, 2001; Li *et al.*, 2005). Recientemente se ha planteado una hipótesis en la que se propone que una Rubisco similar a la de la Forma IV de *B. subtilis* sería el origen de la Rubisco de arqueobacterias y de organismos fotosintéticos (fig.4) (Ashida *et al.*, 2005).



**Fig.4. Hipótesis de la evolución molecular de la Rubisco fotosintética a partir de la Rubisco Forma IV similar a la de *B. subtilis*.** Se propone que uno de los duplicados de la proteína similar a la Rubisco de *B. subtilis* perdería su actividad en la ruta de salvamento de la metionina permitiéndole evolucionar hacia la Rubisco activa como RuBP carboxilasa. Posteriormente aparecería en paralelo una actividad enolasa/fosfatasa que sustituiría a la reacción catalizada por esta Rubisco Forma IV y se establecería en el resto de organismos que comparten esta ruta. Por su parte, esta Rubisco Forma IV evolucionaría a la Rubisco fotosintética y de arqueobacterias mediante la adquisición de los residuos necesarios para la unión de un grupo fosfato en C5 de RuBP, del lazo6 y otros. De esta manera, el ciclo de Calvin se completaría con la aparición de esta Rubisco fotosintética. A continuación aparecerían las bacterias quimioautotróficas y fotosintéticas que utilizan el ciclo de Calvin para la fijación de CO<sub>2</sub>, y así los organismos fotosintéticos pudieron prosperar en la Tierra. Adaptado de (Ashida *et al.*, 2005).

## 4. ORGANIZACIÓN GÉNICA, SÍNTESIS Y ENSAMBLAJE DE LA RUBISCO

### 4.1 ORGANIZACIÓN DE LOS GENES DE LA RUBISCO

En la **Rubisco Forma I**, la subunidad grande está codificada por el gen *rbcl*, mientras que el gen *rbcS* codifica para la subunidad pequeña. En plantas superiores y algas verdes, hay solo una copia del gen *rbcl* en el genoma del

cloroplasto aunque el número de copias del gen por célula puede ser de varios miles debido a la poliploidía natural del DNA cloroplástico y al elevado número de cloroplastos por célula (Bedbrook *et al.*, 1979). Con raras excepciones, *rbcL* carece de intrones y codifica para un polipéptido de unos 475 aminoácidos (Gutteridge y Gatenby, 1995). Por otro lado, el gen *rbcS* está codificado por una familia multigénica (Dean *et al.*, 1989; Clegg *et al.*, 1997) que oscila entre 2 y 22 miembros (Ferreira *et al.*, 2000) o más en el caso del trigo (Sasanuma, 2001). En *Chlamydomonas reinhardtii*, el genoma nuclear contiene 2 genes *rbcS* (Goldschmidt-Clermont y Rahire, 1986). Casi todos los genes *rbcS* poseen intrones en posiciones altamente conservadas (Spreitzer, 2003) y codifican para un polipéptido de 123 residuos. Las subunidades pequeñas dentro de cada familia difieren a lo sumo en 5 residuos (Spreitzer, 2003). Durante el desarrollo de la planta, se ha observado que las subunidades pequeñas, producto de los distintos genes de la familia *rbcS*, se expresan de una manera diferencial aunque no se conoce su efecto en la función de la Rubisco (Spreitzer, 1999).

Por otra parte en cianobacterias, proteobacterias y en el cloroplasto de algas no verdes (con Rubisco “roja”) los genes para las subunidades grandes y pequeñas se localizan juntos como parte de un mismo operón bajo el control de un único promotor (Tabita, 1999). En este operón se encuentran muchos de los enzimas implicados en el ciclo de Calvin. En este caso los genes se conocen como *cbbL* y *cbbS* (Tabita, 1999).

La Rubisco Forma II solo tiene subunidades grandes codificadas por el gen *rbcM* (Somerville y Somerville, 1984).

## ***4.2. BIOSÍNTESIS DE LA RUBISCO***

La biosíntesis de las subunidades grandes y pequeñas se lleva a cabo de una manera regulada. En condiciones naturales, la regulación de la biosíntesis de la Rubisco se lleva a cabo a nivel **de control de la transcripción**. Por otro lado, también existe un control a nivel de **estabilidad de los RNA mensajeros cloroplásticos**. Los transcritos de *rbcL* sufren una regulación redox dependiente de los periodos de luz/oscuridad. Así, en presencia de luz se promueve la degradación del mensajero de *rbcL*, y la inhibición del funcionamiento de la cadena fotosintética aumenta la estabilidad del mensajero (Salvador y Klein, 1999). Parece ser que la región inicial 5'UTR con estructura secundaria es responsable de parte de esta regulación (Salvador *et al.*, 2004; Suay *et al.*, 2005). Sin embargo, la transición de oscuridad a luz provoca la activación de factores de elongación (Kim y Mullet, 2003) y el gradiente de protones actúa sobre los polisomas unidos a la membrana tilacoidal (Muhlbauer y Eichacker, 1999) produciendo un aumento en la **síntesis de la Rubisco**.

Además, la biosíntesis de las subunidades se lleva a cabo de una manera coordinada. La estequiometría entre éstas se ajusta en respuesta a la acumulación de las subunidades no ensambladas (Spreitzer, 1999). Esta integración ocurre por dos mecanismos principales. Un exceso de subunidades grandes (como en un mutante *rbcS* antisentido) reprime su propia síntesis a nivel de inicio de la traducción (Khrebtukova y Spreitzer, 1996; Rodermel *et al.*, 1996). Un exceso de subunidades pequeñas (como en los mutantes que no acumulan su subunidad grande o en condiciones de estrés oxidativo) se regula a nivel de su degradación proteica en el cloroplasto (Rodermel, 1999; Cohen *et al.*, 2005).

### **4.3. ENSAMBLAJE DE LAS SUBUNIDADES PEQUEÑAS Y GRANDES. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES**

En eucariotas fotosintéticos el holoenzima de Rubisco está localizado en el cloroplasto. Las subunidades pequeñas se sintetizan en el citoplasma y se importan al cloroplasto por un complejo traslocón dependiente de ATP (Andrews y Lorimer, 1987). El péptido de tránsito se corta en el estroma por una metalendopeptidasa (Oblong y Lamppa, 1992; Robinson y Ellis, 1984a; Robinson y Ellis, 1984b; Su *et al.*, 1999) y la subunidad procesada se metila en el grupo  $\alpha$ -amino del extremo N-terminal (Grimm *et al.*, 1997). Tras estas modificaciones la subunidad pequeña está lista para ensamblarse con la subunidad grande sintetizada en el cloroplasto (Ostrem *et al.*, 1989).

Para que se produzca el correcto plegamiento y ensamblaje de las subunidades pequeñas y grandes, éstas han de interactuar con chaperonas moleculares. El mecanismo de plegamiento y ensamblaje se conoce mejor en organismos procariotas, donde se han identificado las chaperonas DnaJ, DnaK y GrpE que interactúan con las proteínas recién sintetizadas de forma secuencial, antes del ensamblaje final por las chaperonas GroEL/GroES (Boston *et al.*, 1996). Se han descrito los homólogos cloroplásticos de GroEL(cpn60) (Dickson *et al.*, 2000), GroES (cpn10)(Baneyx *et al.*, 1995; Bertsch *et al.*, 1992), DnaK (Hsp70) (Drzymalla *et al.*, 1996; Schroda *et al.*, 1999) DnaJ (Schlicher y Soll, 1997) y GrpE (Schlicher y Soll, 1997; Schroda *et al.*, 2001), y se ha demostrado que el péptido de transición de la subunidad pequeña interactúa directamente con Hsp70 (Ivey, III *et al.*, 2000; Ivey, III y Bruce, 2000). Para la Rubisco desplegada de *R. rubrum* se ha descrito que el sistema completo GroEL/GroES/Mg<sup>+2</sup>-ATP funciona promoviendo ciclos sucesivos de desplegamiento parcial y liberación de la proteína, permitiendo

así en cada ciclo que los segmentos atrapados en estructuras no nativas adquirieran el plegamiento correcto (Shtilerman *et al.*, 1999).

También se ha sugerido que otros enzimas como la disulfuro isomerasa (Kim y Mullet, 2003; Lang y Schmid, 1988) y la peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (Lang *et al.*, 1987; Lang y Schmid, 1988) podrían estar implicadas en el correcto plegamiento de la Rubisco.

La subunidad grande de la Rubisco de plantas superiores, algas y cianobacterias sufre **modificaciones post-traduccionales** como acetilación, N-metilación, fosforilación y posibles transglutaminaciones (Hartman y Harpel, 1994). En el caso concreto de *C. reinhardtii*, se observa en la estructura de rayos X la metilación de las cisteínas 256 y 369, y la hidroxilación de las prolinas 104 y 151 (Taylor *et al.*, 2001; Mizohata *et al.*, 2002). No se conoce la función de estas modificaciones post-traduccionales, pero podrían estar implicadas en la regulación de interacciones del enzima con otras proteínas o manteniendo la estabilidad del enzima (Houtz y Portis, 2003).

## **5. ESTRUCTURA DE LA RUBISCO**

Las características funcionales del enzima dependen directa o indirectamente de su estructura. La cristalografía de rayos X es una herramienta ideal para elucidar la estructura de la Rubisco y, combinada con otras técnicas, se ha usado para deducir el papel de varios residuos del centro activo, estudiar el mecanismo de carboxilación y determinar cambios estructurales en mutantes.

### ***5.1. CARACTERÍSTICAS CRISTALOGRÁFICAS DE LA RUBISCO***

La primera cristalización de la Rubisco se describió en 1971 (Kawashima y Wildman, 1971), pero no fue hasta 15 años después cuando se describió la primera estructura. El problema de la Rubisco es el de ser una proteína inusualmente grande y complicada. Los primeros cristales contenían 80% de disolvente y no difractaban bien, otros sufrieron anomalías de empaquetamiento y “maclado” (dos o más cristales creciendo entrelazados en diferentes orientaciones).

El principal escollo en el proceso de cristalografía de rayos X de la Rubisco, como en la mayoría de proteínas, es la dificultad de obtener cristales simples que difracten bien. Al ser una proteína tan grande, produce cristales con celdas unidad muy grandes y, por tanto, cristales que difractan débilmente. La introducción de la radiación de alta intensidad procedente del sincrotrón mejoró mucho la calidad y resolución de los datos obtenidos por rayos X. El desarrollo de nuevos detectores CCD ha mejorado la sensibilidad para detectar difracción débil y la velocidad de la toma de datos. La técnica criogénica para la conservación de los cristales ha reducido el daño sufrido por la radiación y la vida media de los cristales. La velocidad computacional y el almacenamiento de los ordenadores, así como el desarrollo de algoritmos complejos para el refinamiento de los datos basado en un tratamiento de probabilidad máxima, mejoran la calidad del modelo final (Andersson y Taylor, 2003).

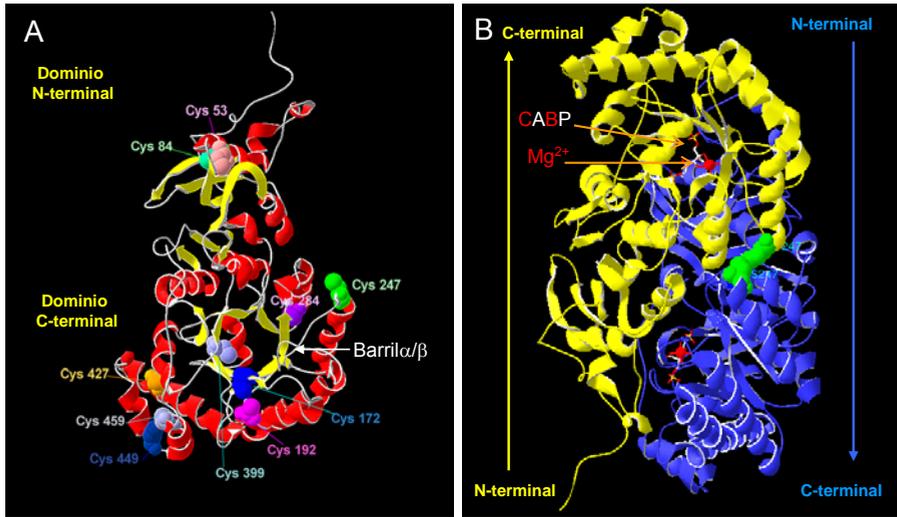
### ***5.2. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL Y CARACTERÍSTICAS DEL SITIO CATALÍTICO***

La primera estructura de rayos X de Rubisco se determinó para el enzima dimérico de *R. rubrum* (Somerville y Somerville, 1984; Schneider *et al.*, 1986) a 2,9Å de resolución. Las estructuras de los enzimas de espinaca

(Andersson *et al.*, 1989; Knight *et al.*, 1989; Knight *et al.*, 1990), tabaco (Curmi *et al.*, 1992; Schreuder *et al.*, 1993a; Schreuder *et al.*, 1993b) y *Synechococcus* (Newman *et al.*, 1993; Newman y Gutteridge, 1993; Newman y Gutteridge, 1994) se resolvieron poco después permitiendo la visión de la organización del enzima hexadecamérico.

Las estructuras de los monómeros y dímeros de las cuatro formas de la Rubisco están muy conservadas a pesar de que la identidad de secuencia de aminoácidos de la subunidad grande de estas proteínas sea relativamente baja (25-30%). Las Formas I, II y III tienen regiones que están altamente conservadas, como son los residuos del centro activo (Knight *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 2001), y solo presentan pequeñas diferencias estructurales en otras zonas (Schneider *et al.*, 1992).

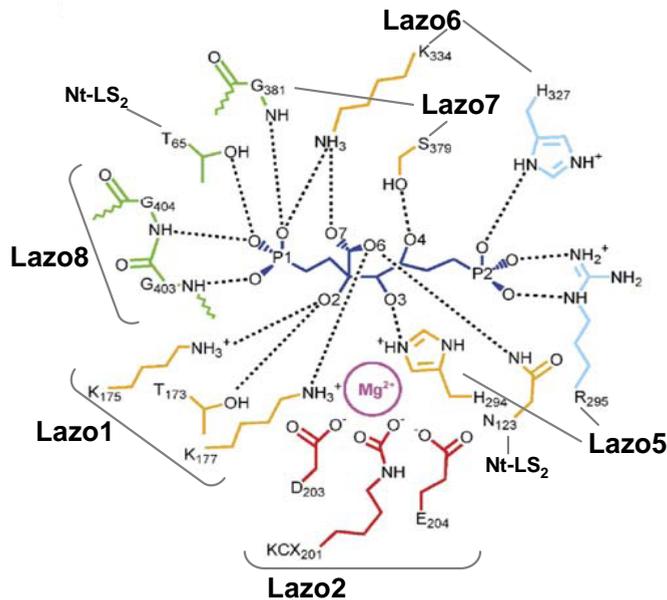
En la **subunidad grande** se puede distinguir un dominio N-terminal, que comprende los residuos 1-150, y un dominio C-terminal mayor, que consiste en los residuos 151-475 (fig.5A). El **dominio N-terminal** consta de 5 hebras  $\beta$  con 2 hélices  $\alpha$  a cada lado, mientras que el **dominio C-terminal** consta de un segmento final C-terminal y de 8 unidades  $\alpha/\beta$  consecutivas que forman un barril  $\alpha/\beta$ , con 8 hélices  $\alpha$  rodeando a las 8 hebras  $\beta$  (Knight *et al.*, 1990). Los primeros residuos del extremo N-terminal se encuentran muy desordenados y no se les puede asignar una posición determinada ni siquiera en estructuras obtenidas con una resolución de 1,4 Å (Taylor *et al.*, 2001). La región que comprende los residuos 86-96 interacciona con el enzima auxiliar Rubisco activasa que cataliza el proceso de activación (Schreuder *et al.*, 1993b; Larson *et al.*, 1997; Ott *et al.*, 2000). Esta región está expuesta al disolvente y es relativamente flexible, con una conformación diferente en los enzimas de diferentes especies.



**Fig.5. Plegamiento de la subunidad grande de la Rubisco de *C. reinhardtii*.** A. En amarillo se muestran las hebras  $\beta$  y en rojo las hélices  $\alpha$ . Cada subunidad se compone de un dominio pequeño N-terminal, y un dominio mayor C-terminal. Se indica la posición de algunos residuos de cisteínas. B. Unidad estructural del enzima, formado por un dímero de subunidades grandes organizadas antiparalelamente. El centro activo se localiza en la entrada del barril  $\alpha/\beta$  localizado en el dominio C-terminal, y con residuos del dominio N-terminal de la otra subunidad. Cada subunidad se muestra de un color. Se indican el CABP y  $Mg^{2+}$  unidos al centro activo. En verde se resaltan las Cys247 que mantienen el dímero unido mediante un puente disulfuro. Figuras realizadas con el programa Swiss PDB viewer a partir de los datos del protein data bank (código acceso: [1IR2](https://www.rcsb.org/entry/1IR2)).

La unidad estructural y catalítica del enzima es un dímero ( $L_2$ ) de subunidades grandes (fig.5B). El **centro activo** está localizado en la interfaz entre el dominio C-terminal de una subunidad y el dominio N-terminal de la otra subunidad (fig.5B). Los residuos que forman el centro activo están muy conservados en todas las Rubiscos Forma I, II y III. Para determinar las interacciones relevantes en el centro activo se utiliza el CABP, que mimetiza el intermediario de seis carbonos de la reacción de carboxilación y forma un complejo resistente al intercambio. Los residuos implicados en la unión del CABP se pueden dividir en cuatro grupos (fig.6): tres de ellos implicados en la formación de puentes de hidrógeno con el fosfato1 (sitio P1), con el fosfato2

(sitio P2) y con el esqueleto carbonado, y un cuarto implicado en la coordinación del ion metálico (Knight *et al.*, 1990). El sitio de unión **P1** implica residuos de los lazos 7 (Gly381) y 8 (Gly403, Gly404) del extremo C-terminal y algunos residuos del dominio N-terminal (Thr65) de la subunidad adyacente. El segundo sitio de unión de fosfato (**P2**) lo forman residuos de los lazos 5 (Arg295) y 6 (His327) del dominio C-terminal (Knight *et al.*, 1990). El  $Mg^{+2}$  es esencial para la catálisis y está coordinado por el grupo carboxilo de la Lys201 carbamilada y los grupos hidroxilo de Asp203 y Glu204 (lazo2). Los restantes sitios de coordinación están ocupados por moléculas de agua y por los grupos hidroxilo de C2 y C3 de los fosfatos de azúcar unidos (Knight *et al.*, 1990).



**Fig.6. Centro activo de la Rubisco de espinaca.** Se representan los residuos que forman el centro activo y los puentes de hidrógeno con el CABP (en azul oscuro). Los residuos implicados en la unión del P1 se muestran en verde, los implicados en establecer puentes de hidrógeno con el esqueleto de CABP en amarillo, los residuos que coordinan el átomo de  $Mg^{+2}$  (en granate) se muestran en rojo, y los residuos implicados en la unión del P2 en azul claro. Los residuos del dominio N-terminal de la subunidad adyacente se indican como Nt LS<sub>2</sub>. Tomado de (Li *et al.*, 2005).

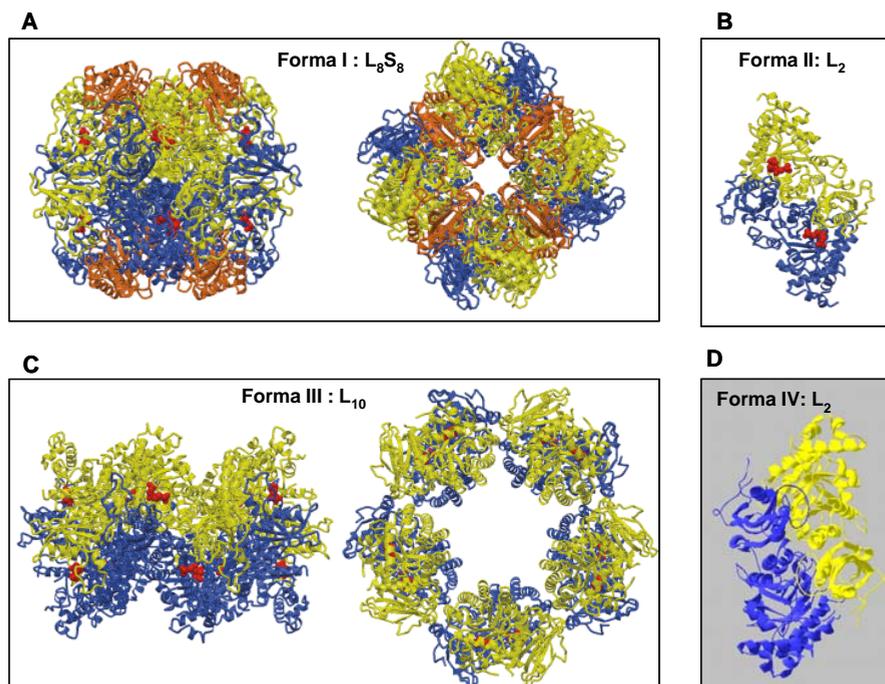
Por otro lado, aunque **los residuos de cisteína** no forman parte del centro activo del enzima (Hartman y Harpel, 1994) podrían jugar un papel estructural o de regulación. La Rubisco de *C. reinhardtii* tiene 10 residuos de cisteína en la subunidad grande (fig.5A) y 4 residuos en la subunidad pequeña. Los residuos Cys256 y Cys369 tienen sus grupos tiolicos metilados (Taylor *et al.*, 2001; Mizohata *et al.*, 2002). De los 14 residuos, la Cys172, Cys192, Cys247 y Cys459 de la subunidad grande están muy conservados en eucariotas (Knight *et al.*, 1990). Los residuos Cys449 y Cys459 están localizados en la superficie del enzima y, por lo general, en una orientación y distancia compatible (2Å) con el establecimiento de un puente disulfuro. El residuo 449 está sustituido por Thr en un grupo de especies de plantas superiores, como espinaca, de manera que en estos casos no es posible el enlace disulfuro con la Cys459 (Andersson, 1996). En condiciones oxidantes, la Cys247 forma un puente disulfuro con otra Cys247 de la subunidad adyacente estabilizando la interacción intradimérica pero sin afectar a los parámetros cinéticos del enzima (Ranty *et al.*, 1991). Por otro lado, los residuos Cys172 y Cys192 están situados en la hebra  $\beta$ 1 y hélice  $\alpha$ 1, respectivamente, del barril  $\alpha/\beta$  que forma el centro activo. El desplazamiento de estas cisteínas podría provocar un cambio en los residuos del centro activo que podría afectar a los parámetros cinéticos del enzima (Andersson *et al.*, 1989). Se ha descrito que la cisteínas 172 y 192 establecen un enlace disulfuro en las estructuras descritas para la Rubisco de tabaco no carbamilado (Curmi *et al.*, 1992). Sin embargo, análisis de difracción de rayos X de cristales de la Rubisco activada muestran que estos residuos solo se encuentran a distancia de Van der Waals y no tienen la orientación adecuada para formar un enlace disulfuro (Schreuder *et al.*, 1993b).

Las Rubiscos **Forma I (L<sub>8</sub>S<sub>8</sub>)** se organizan en cuatro dímeros de subunidad grande ((L<sub>2</sub>)<sub>4</sub>) dispuestos alrededor de un eje de simetría cuaternario (fig.7A). Las subunidades pequeñas se organizan en dos grupos de cuatro subunidades ((S<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) localizadas en los extremos de los dímeros L<sub>2</sub>. Una subunidad pequeña se asocia con cada subunidad grande, también obedeciendo a esta simetría binaria y cuaternaria, e interaccionan con 3 subunidades grandes (fig.7A). En el centro de la molécula hay un canal acuoso entre los dímeros de subunidades grandes que atraviesa la molécula en la dirección del eje de simetría cuaternario.

La estructura de la **Rubisco Forma III** de la arqueobacteria *T. kodakarensis* (Kitano *et al.*, 2001) consiste en un decámero (L<sub>10</sub>) con una disposición pentamérica de los dímeros (L<sub>2</sub>)<sub>5</sub> (fig.7C) mantenidos juntos por una red de puentes salinos. Esta disposición parece ser la responsable de la alta termoestabilidad del enzima (Maeda *et al.*, 2002). Las interfases de los dímeros son muy diferentes a las de la Forma I (Kitano *et al.*, 2001) aunque la estructura secundaria se parece más a la unidad L<sub>2</sub> del enzima Forma I que a la de la Forma II. Por otro lado, las estructuras de otras Rubiscos Forma III descritas son del tipo L<sub>2</sub> (Klenk *et al.*, 1997; Finn y Tabita, 2003).

Recientemente se ha publicado la estructura de la **Rubisco Forma IV** de *C. tepidum* (fig.7D) (Li *et al.*, 2005). En general la estructura es similar a las de las otras tres formas, y se presenta en forma L<sub>2</sub>. Sin embargo, el centro activo es diferente y sugiere que es capaz de catalizar la enolización, que se considera el primer paso del mecanismo catalítico de la carboxilación de la RuBP por la Rubisco, pero no la carboxilación. Además, la estructura presenta ciertas diferencias respecto a las otras Rubiscos: posee un centro activo más hidrofóbico; el potencial electrostático superficial es más negativo; presenta una inserción de un lazo (CD) en el extremo N-terminal

que podría participar en el posicionamiento del lazo6; y la horquilla  $\beta$  entre la hélice 6 y la hebra  $\beta 7$  del extremo C-terminal, que se encarga de mantener la orientación relativa de los dos dominios N- y C- terminal, está ausente.

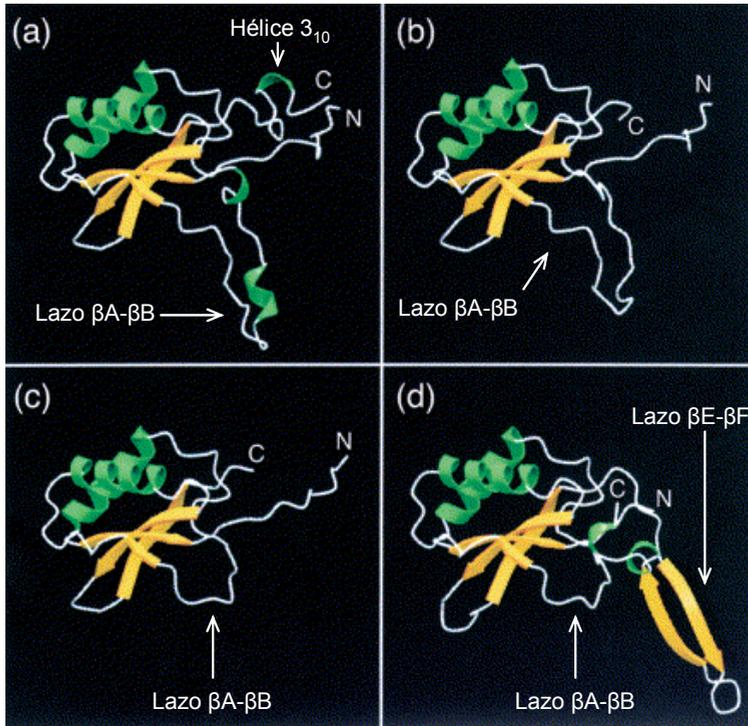


**Fig.7. Diferentes organizaciones de la estructura cuaternaria de la Rubisco.** (A) Hexadecámero (L<sub>8</sub>S<sub>8</sub>) correspondiente a la Rubisco de espinaca (Forma I) visto en dirección de los ejes de simetría binario (izquierda) y cuaternario (derecha). Las subunidades grandes se muestran en azul y amarillo y las subunidades pequeñas en naranja. (B) La Rubisco Forma II (L<sub>2</sub>) de *R. rubrum*. (C) La Rubisco Forma III (L<sub>10</sub>) de *T. kodakarensis* vista desde los ejes de simetría de orden 2 (izquierda) y 5 (derecha). En todos los casos la localización del centro activo se muestra resaltando la posición del sustrato bifosforilado en rojo. (Tomado de (Taylor *et al.*, 2001)). (D) Estructura de la Rubisco Forma IV de *C. tepidum*. Aunque el cristal fue obtenido en presencia de CABP y Mg<sup>+2</sup>, el enzima no fue capaz de complejarlos (Li *et al.*, 2005). La figura se ha realizado con el programa Swiss PDB Viewer a partir de los datos publicados en el Protein Data Bank (código acceso: 1YKW).

### **4.3. ESTRUCTURA DE LA SUBUNIDAD PEQUEÑA**

Las subunidades pequeñas son más divergentes que las subunidades grandes, tanto en secuencia como en estructura tridimensional (fig.8). La subunidad pequeña de la Rubisco de plantas superiores tiene 123 residuos, los cuales se organizan en 4 hebras  $\beta$  antiparalelas con 2 hélices  $\alpha$  a cada lado (Knight *et al.*, 1989). Un área de **variación estructural** principal es el **lazo que une las dos hebras  $\beta$   $\beta$ -A y  $\beta$ -B** el cual se extiende por el canal acuoso central e interacciona con dos subunidades pequeñas adyacentes y con tres subunidades grandes (Knight *et al.*, 1990). En plantas superiores, este lazo es de alrededor 22 residuos (fig.8b), mientras procariontas y algas no verdes tienen un lazo mucho más corto de solo 10 residuos (fig.8c y d) (Newman *et al.*, 1993). En algas verdes este lazo es más grande (28 residuos) (fig.8a), lo que provoca el estrechamiento del canal central del holoenzima aumentando así las interacciones (Spreitzer, 2003; Taylor *et al.*, 2001; Mizohata *et al.*, 2002). La extensión del lazo  $\beta$ A- $\beta$ B parece ser relativamente reciente, ya que solo aparece en plantas y algas verdes, quizá provocado por la presencia de un intrón en *rbcS* (Dean *et al.*, 1989; Wasmann *et al.*, 1989). Las Rubiscos que tienen un lazo  $\beta$ A- $\beta$ B mayor poseen generalmente valores de factor de especificidad superiores (Jordan y Ogren, 1981; Uemura *et al.*, 1997; Horken y Tabita, 1999). Estudios de mutaciones en el lazo  $\beta$ A- $\beta$ B (Flachmann y Bohnert, 1992; Wasmann *et al.*, 1989) sugieren que podría influir en la estabilidad del holoenzima y en la catálisis (Du *et al.*, 2000; Spreitzer *et al.*, 2001; Karkehabadi *et al.*, 2005b). Para entender mejor el papel estructural de la divergencia en el lazo  $\beta$ A- $\beta$ B, el lazo de *Chlamydomonas* se sustituyó por los lazos (más pequeños) de espinaca y *Synechococcus* (Karkehabadi *et al.*, 2005a). Las diferencias específicas de especies en los lazos no fueron esenciales para el ensamblaje del holoenzima. Sin embargo, ambas enzimas

mutantes tenían alteradas las propiedades catalíticas, y la introducción de lazo de *Synechococcus* causó una disminución del 11% del  $\Omega$ . A pesar de estos cambios en la catálisis, la estructura de rayos X indica que las estructuras del lazo  $\beta$ A- $\beta$ B de cianobacterias y plantas se conservaban en el ambiente de las subunidades grandes de algas verdes (Karkehabadi *et al.*, 2005a).



**Fig.8. Comparación de la estructura de las subunidad pequeña de (a) *C.reinhardtii* (alga verde), (b) espinaca (planta superior), (c) *Synechococcus* PCC6301 (cianobacteria), y (d) *Galdieria partita* (alga roja).** Las subunidades pequeñas se muestran desde el mismo ángulo e igual ampliación. Las hélices  $\alpha$  se muestran en verde y las hebras  $\beta$  en amarillo. Tomado de (Mizohata *et al.*, 2002).

Por otro lado, las Rubiscos tipo roja tienen subunidades pequeñas con un dominio **C-terminal** más largo (30 residuos más que el de plantas superiores) (fig.8d). Esta extensión forma 2 hebras  $\beta$  (E y F) adicionales que se

extienden en el canal acuoso, interaccionando con las subunidades grandes y ocupando el espacio dejado por el lazo  $\beta A-\beta B$  más pequeño (Sugawara *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 1999). Todas las subunidades pequeñas que forman el lazo  $\beta E-\beta F$  poseen menos residuos en el extremo N-terminal y dos residuos extras en el lazo  $\beta C-\beta D$  (Spreitzer, 2003). En algas verdes, el extremo C-terminal de la subunidad pequeña es también más largo que en plantas superiores, formando una corta hélice  $3_{10}$  (fig.8a). Estos residuos adicionales se sitúan en la superficie del holoenzima (Mizohata *et al.*, 2002) y no son esenciales para la función o ensamblaje de la Rubisco (Esquivel *et al.*, 2002).

No se ha encontrado una **función específica de las subunidades pequeñas** pero se sabe que influyen en varios aspectos del enzima. Las subunidades pequeñas no parecen ser **esenciales para la catálisis** ya que las Rubiscos Forma II y III carecen de ellas y son catalíticamente activas. De hecho, al eliminar la subunidad pequeña de la Rubisco Forma I de cianobacterias, la actividad se reduce pero no se elimina (Andrews, 1988; Morell *et al.*, 1997). Las subunidades pequeñas podrían haberse originado con el objeto de unir y **concentrar centros activos** de subunidades grandes. Se ha propuesto que las subunidades pequeñas evolucionaron a partir de proteínas implicadas en el ensamblaje del carboxisoma de cianobacterias, como la CcmM de *Synechococcus* (Kaplan *et al.*, 1989). Con una mayor concentración de Rubisco se obtendría un aumento en la fijación de  $CO_2$  neta. Sin embargo, la gran divergencia de estructuras entre procariotas, algas y plantas terrestres parece indicar que las subunidades pequeñas han adoptado funciones más especializadas.

Por otro lado, cambios en la forma de la subunidad pequeña podrían **influir la conformación del centro activo**, y por tanto afectar al mecanismo

catalítico. De hecho, la comparación de las estructuras L<sub>2</sub> y L<sub>8</sub>S<sub>8</sub> muestra diferencias en algunos elementos del barril  $\alpha/\beta$  que forman el centro activo (Andersson *et al.*, 1989; Schneider *et al.*, 1990a). La posición de las hélices  $\alpha 7$  y 8 y del lazo 8 donde está el sitio de unión P1 varían, pero todavía no está claro si estas diferencias afectan a la catálisis.

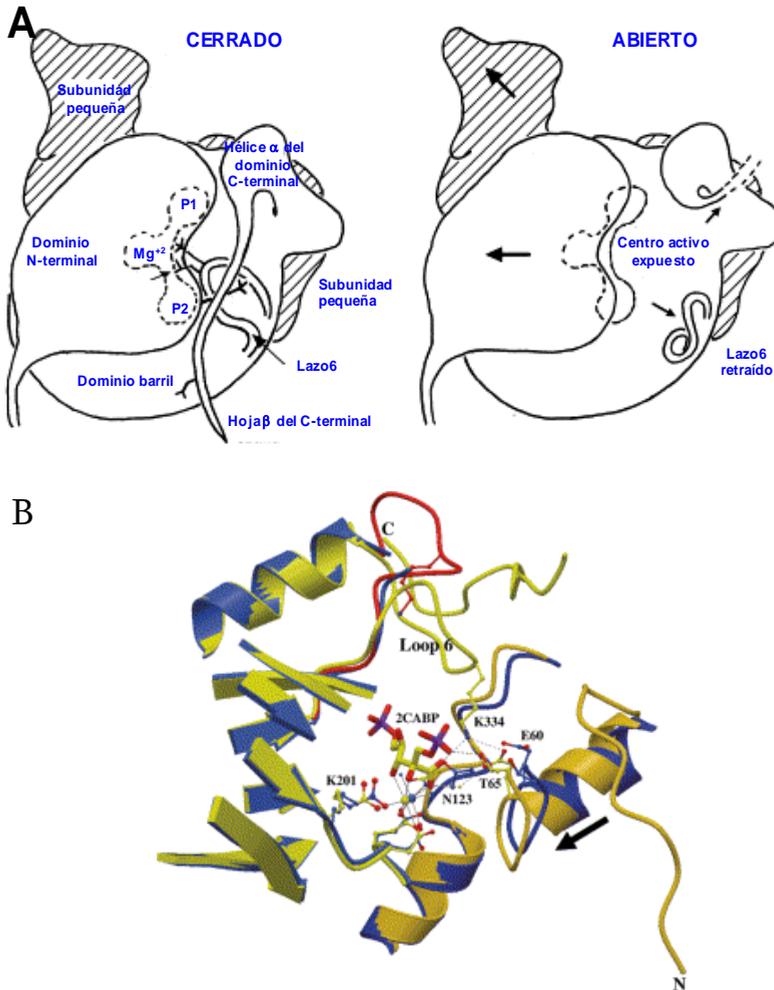
Las subunidades pequeñas también podrían ser responsables, en parte, de la mayor preferencia por el CO<sub>2</sub> respecto al O<sub>2</sub> de los enzimas Forma I. Éstos suelen tener un mayor factor de especificidad y un menor valor de la constante catalítica que los enzimas Forma II (sin subunidad pequeña) (Jordan y Ogren, 1981; Jordan y Ogren, 1983; Whitney y Andrews, 1998). Análisis de enzimas híbridos interespecíficos, compuestos por subunidades grandes de una especie y las pequeñas de otra, han mostrado que las subunidades pequeñas influyen en la **eficiencia catalítica y especificidad** de la Rubisco, pero no está claro de qué manera porque los resultados son contradictorios (Spreitzer, 2003). Se han recuperado enzimas quiméricos con un factor de especificidad similar al del holoenzima del que provenían las subunidades grandes (Andrews y Ballment, 1983; Andrews y Lorimer, 1985; Chiba *et al.*, 2003), o las pequeñas (Kanevski *et al.*, 1999), o con valores intermedios entre ambas (Read y Tabita, 1992).

Por tanto, las variaciones estructurales descritas en la subunidad pequeña podrían jugar un papel en la eficiencia catalítica, ensamblaje y estabilidad del holoenzima, y, además podrían complementar a la subunidad grande de una manera muy específica, ya que las interacciones entre las subunidades grandes y pequeñas no son las mismas en diferentes especies. Probablemente, ello refleja una coevolución de ambas subunidades para producir adaptaciones específicas.

#### **4.4. ESTUDIOS CRISTALOGRAFICOS DE CAMBIOS CONFORMACIONALES**

La cristalografía de rayos X ha proporcionado un mayor conocimiento sobre el funcionamiento de la Rubisco al permitir estudiar las estructuras del enzima unido a distintos ligandos. Esto incluye el **análogo del estado de transición CABP** (Lundqvist y Schneider, 1989b; Newman y Gutteridge, 1993; Schreuder *et al.*, 1993b; Zhang *et al.*, 1994; Shibata *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2001; Mizohata *et al.*, 2002), **su sustrato RuBP** (Lundqvist y Schneider, 1989a; Marcus *et al.*, 2003), **su producto PGA** (Lundqvist y Schneider, 1989a; Taylor y Andersson, 1997) y **el inhibidor XuBP** (Newman y Gutteridge, 1994; Taylor *et al.*, 1996).

La activación del enzima, que consiste en la carbamilación de la Lys201 y coordinación de  $Mg^{+2}$  al carbamato, causa pequeños cambios de conformación en el centro activo (Taylor y Andersson, 1996). Sin embargo, se observan mayores diferencias entre las estructuras de Rubisco libre o con un ligando unido (Schreuder *et al.*, 1993a). Una vez el ligando se une, el lazo6 del barril  $\alpha/\beta$  se cierra sobre el centro activo haciéndolo inaccesible al disolvente (fig.9). Este lazo6 (residuos 333-337) así como los residuos 464-475 del extremo C-terminal y los residuo 1-19 del N-terminal de la subunidad grande están normalmente desordenados en el enzima sin ligando (Schreuder *et al.*, 1993a; Taylor y Andersson, 1996). El cierre del lazo6 sobre el centro activo va acompañado de un reordenamiento de los residuos de los extremos C- y N-terminal, los cuales mantienen el lazo6 en posición cerrada. Este desplazamiento lleva a algunos residuos del lazo6 a una distancia adecuada para su unión con el ligando de manera que puedan participar en la catálisis.



**Fig. 9. Cambios conformacionales asociados a la catálisis.** **A.** Esquema visto desde el eje central del barril  $\alpha/\beta$ . El dominio N-terminal (1-150) de la subunidad grande adyacente cubre la mayoría de la superficie del barril. Dos subunidades pequeñas contactan de manera separada con los dominios que forman el centro activo. En el estado abierto el dominio N-terminal se mueve hacia la izquierda y su correspondiente subunidad pequeña se mueve hacia arriba y hacia la izquierda. En la **apertura**, el lazo6 se retrae para extender la hélice 6 en una configuración estable y el C-terminal se separa del centro activo y del barril  $\alpha/\beta$  adoptando una conformación desordenada. En el **estado cerrado**, el disolvente no puede acceder al sustrato. Se muestran los sitios de unión P1, P2 y el sitio de unión del metal en el centro activo. Tomado de (Duff *et al.*, 2000). **B.** Vista de una sección a través del centro activo de la Rubisco de espinaca sin ligando (azul) y complejo con 2CABP (amarillo). 2CABP se une de cara al barril  $\alpha/\beta$ . En rojo se muestra la conformación observada en el complejo  $\text{Ca}^{+2}$ -RuBP. Tomado de (Taylor *et al.*, 2001).

Por tanto, los movimientos del lazo están **inducidos por el ligando** y son independientes del estado de carbamilación y de la presencia del ion metálico divalente. Así, la unión de un ligando como **RuBP**, **XuBP** y **CABP** a la Rubisco no carbamilada también induce el **cierre del lazo<sub>6</sub>** sobre el centro activo. La única observación del cierre del lazo cuando no hay un componente bisfosfato presente es el de la Rubisco de *Galdieria partita* con un ion sulfato unido en el sitio P2 (Okano *et al.*, 2002). Por otro lado, la Rubisco activada **sin sustrato** unido o asociada a sus productos **fosfoglicerato** o **PGA**, tiene el lazo<sub>6</sub> desordenado. Esta **conformación abierta** permite la salida del producto y el acceso del disolvente al centro activo (Taylor y Andersson, 1997). Se ha observado que la distancia entre los fosfatos P1 y P2 influye en el cierre del centro activo. Cuando la distancia es menor de 9Å el centro activo se cierra, y si la distancia es mayor de 9Å permanece abierto (Curmi *et al.*, 1992; Duff *et al.*, 2000).

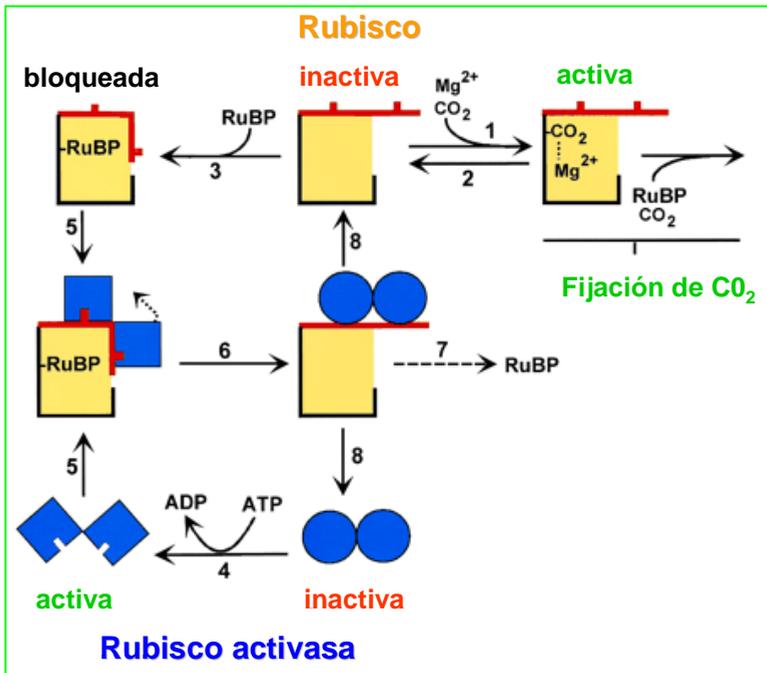
## **5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

### ***5.1. ACTIVACIÓN***

El primer paso obligatorio para alcanzar la competencia catalítica, es la activación del enzima. Esto implica la carbamilación del grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina presente en el centro activo (Lys-201 en la Rubisco de espinaca y *Chlamydomonas*) por CO<sub>2</sub> (Lorimer y Mizioroko, 1980). Esta molécula de CO<sub>2</sub> activadora es distinta a la de CO<sub>2</sub> sustrato que será fijada durante la catálisis (Mizioroko, 1979). La presencia del grupo carbamato en la proximidad de dos residuos ácidos adyacentes, Asp-203 y Glu-204 (fig.6), proporciona un sitio para la unión del ion esencial Mg<sup>2+</sup>, que estabiliza el carbamato anteriormente

formado y participa en la correcta orientación del sustrato en el centro activo (Gutteridge y Gatenby, 1995). El enzima carbamilado también puede acomodar otros cationes divalentes como  $\text{Co}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$  reteniendo algo de actividad (Christeller y Laing, 1979; Robison *et al.*, 1979), aunque otros como  $\text{Ca}^{2+}$  la suprimen totalmente (Barcena, 1983; Karkehabadi *et al.*, 2003). La sustitución del  $\text{Mg}^{2+}$  por  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  afecta a la especificidad por el  $\text{CO}_2$  en las Rubiscos de una gran variedad de especies (Jordan y Ogren, 1983; Andrews y Lorimer, 1987).

El proceso de activación está facilitado por un enzima auxiliar presente en plantas superiores, algas y algunas cianobacterias conocido como **Rubisco activasa** (Portis, 1992). Este enzima funciona como una chaperona, cambiando la conformación de la Rubisco mediante la hidrólisis de ATP (fig.10) permitiendo así la eliminación de RuBP fuertemente unida al enzima no carbamilado y la rápida activación de la Rubisco a bajos niveles de  $\text{CO}_2$  *in vivo* (Jordan y Chollet, 1983; Salvucci, 1989; Portis, 1990; Portis, 1992). Además, la activasa también puede interaccionar con la Rubisco carbamilada para liberarla de diferentes inhibidores como XuBP, CA1P o 3-cetoarabinitol-1,5-bisfosfato (Portis, 1992).



**Fig.10. Mecanismo de activación catalizado por la Rubisco activasa.** La Rubisco activasa (azul) cambia la Rubisco (amarillo) de una forma inactiva a activa por la liberación (dependiente de ATP) de azúcares fuertemente unidos, como RuBP. Solo la forma activa de la Rubisco es capaz de catalizar la fijación de  $\text{CO}_2$ . En el esquema, un centro activo de la Rubisco puede perder espontáneamente el  $\text{CO}_2$  (paso 2), y RuBP se une fuertemente (paso 3). Esta unión provoca un cambio conformacional que deja a la Rubisco bloqueada. La activasa interactúa físicamente con la Rubisco (paso 5) cambiando la conformación (paso 6) en la que RuBP se une menos fuertemente y se libera (paso 7). Ahora, la Rubisco puede activarse uniendo  $\text{CO}_2$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (paso 1) o bloquearse uniendo de nuevo RuBP, probablemente después de la disociación de la activasa (paso 8). Para que tengan lugar estos cambios conformacionales se requiere la hidrólisis de ATP por la activasa (paso 4). Adaptado de (Jensen, 2000).

## 5.2. MECANISMO CATALÍTICO

El mecanismo catalítico de la **carboxilación** de RuBP por la Rubisco activada tiene lugar en cinco pasos (fig.11) (Pierce *et al.*, 1986; Cleland *et al.*, 1998). En el primer paso se **une el sustrato RuBP** al sitio activo del enzima y

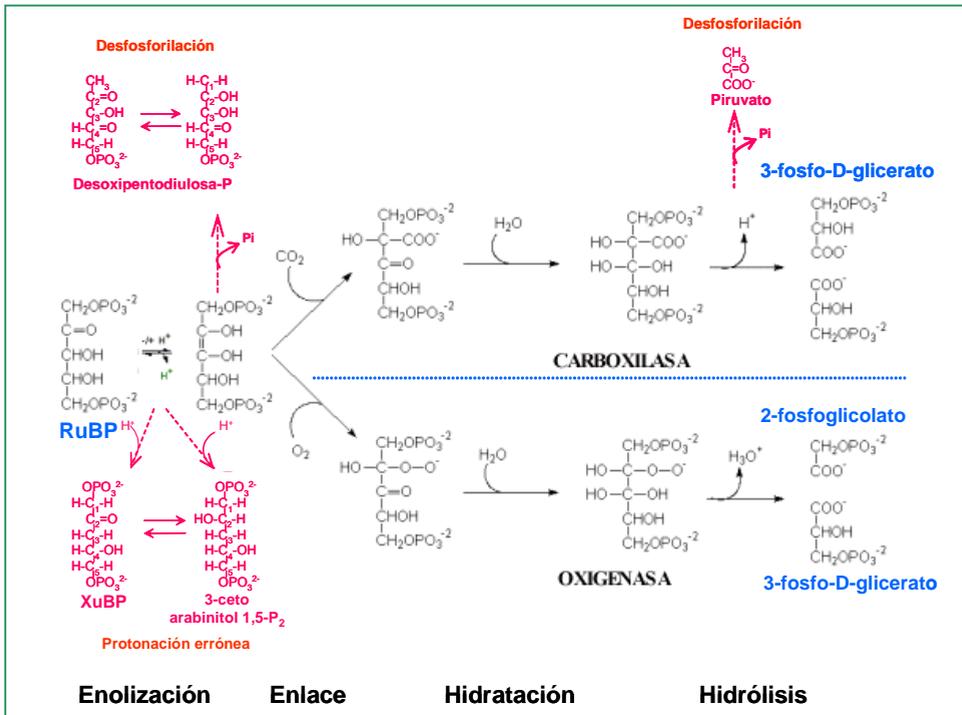
se **forma un intermediario 2,3-enodiol** por desprotonación del C3. Entonces el C2 del enodiol sufre un **ataque nucleofílico del CO<sub>2</sub>**, dando lugar a un intermediario de 6 átomos de carbono (2-carboxi-3-cetoarabinitol). A continuación, se produce la **hidratación en el C3** y, por último la **desprotonación a nivel del C3-O**, que inicia la **ruptura del enlace C2-C3** dando lugar a dos moléculas de 3-fosfoglicerato tras una re-protonación estereoespecífica. La reacción incorpora el carbono en forma de 3-fosfoglicerato, el cual se convierte en azúcares a través del ciclo de Calvin (fig.1).

La forma enodiol intermedia de RuBP también es susceptible de ser atacada por una **molécula de O<sub>2</sub>** (fig.11) formando un derivado peroxicetona que sigue una vía similar a la de carboxilación, y se rompe en una molécula de 3-fosfoglicerato (3C) (que se incorpora al ciclo de Calvin) y una de 2-fosfoglicolato (2C) (que entra en la ruta fotorespiratoria) (fig.1).

El enzima no contiene sitios de unión para el CO<sub>2</sub> u O<sub>2</sub> (Bainbridge *et al.*, 1995) ni hay evidencia de la unión de éstos en ausencia de RuBP (Mauser *et al.*, 2001), por lo que la preferencia por una u otra vía parece venir condicionada por características estructurales particulares de cada Rubisco.

Además de la oxigenación, también podrían ocurrir otras **reacciones secundarias** menos frecuentes (fig.11). La protonación errónea del intermediario enodiol formado en la primeros estadios de la reacción produce XuBP, el epímero C3 del sustrato RuBP, o 3-cetoarabinitol-1,5-bisfosfato (Edmonson *et al.*, 1990; Zhu y Jensen, 1991a). Ambos compuestos son formados por Rubiscos de plantas superiores aproximadamente cada 400 recambios. Estos productos bloquean el centro activo y son una de las posibles causas de la pérdida progresiva de la actividad carboxilasa con el tiempo en ensayos *in vitro* (lo que se conoce como “fallover”) (Zhu y Jensen,

1991a; Zhu y Jensen, 1991b; McCurry y Tolbert, 1977). Por otra parte, la desfosforilación antes de la carboxilación conduce a la formación de un di-ceto monofosfato (Jaworowski *et al.*, 1984), mientras que la reacción de desfosforilación después de la rotura del enlace carbono-carbono produce la liberación de piruvato (Andrews y Kane, 1991).



**Fig.11. Mecanismo catalítico propuesto para la carboxilación y oxigenación de RuBP catalizado por la Rubisco.** Después de la unión de RuBP a la forma activada de la Rubisco, el enzima induce la formación de un intermediario endiol. Este puede reaccionar tanto con CO<sub>2</sub> como con O<sub>2</sub>. También se muestran otros productos provenientes de reacciones secundarias de la Rubisco. (Adaptado y modificado de (Taylor *et al.*, 1996)).

### **5.3. FACTOR DE ESPECIFICIDAD RELATIVA**

La relación de velocidades de carboxilación respecto a la de oxigenación a igual concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> es una constante llamada **factor de especificidad ( $\Omega$ )** ( Jordan y Ogren, 1981; Pierce, 1988). El valor de  $\Omega$  depende de diversos factores como la temperatura, el ion divalente que se une al sitio carbamilado y la fuente del enzima. A mayor **temperatura**, menor valor de  $\Omega$  (Jordan y Ogren, 1984). La sustitución de Mg<sup>2+</sup> por otro **ion divalente** disminuye considerablemente el valor de  $\Omega$  (Andrews y Lorimer, 1987; Hartman y Harpel, 1994). El valor de  $\Omega$  varía de unas **especies** a otras desde 15 para las Rubiscos Forma II (Whitney y Andrews, 1998), 80 para plantas superiores (Spreitzer, 1999) y hasta 300 para algunas Rubiscos Forma III de procariotas (Ezaki *et al.*, 1999). Esta diversidad en  $\Omega$  se puede explicar por pequeñas diferencias en las energías libres de los estados de transición para la adición del CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> al 2,3-enodiol (Chen y Spreitzer, 1991; Lorimer *et al.*, 1993). Se puede calcular que entre la especificidad de la Rubisco de *R. rubrum* ( $\Omega=10,8$ ) y la de espinaca ( $\Omega=80$ ), solo hay 1,2 kcal·mol<sup>-1</sup> de diferencia en la estabilización diferencial de los dos estados de transición, energía comparable a la que contribuye un único puente de hidrógeno (Lorimer *et al.*, 1993).

Se han propuesto diversas explicaciones para entender el origen o significado fisiológico de la actividad de oxigenación. La explicación más plausible es que la oxigenación es una actividad inevitable, consecuencia del impacto del oxígeno en un mecanismo catalítico primitivo, evolutivamente desarrollado y establecido en condiciones anoxigénicas (Andrews y Lorimer, 1978). La fijación de CO<sub>2</sub> fotosintética apareció en la atmósfera primitiva hace 3,2Ga en condiciones anoxigénicas (Kasting, 1993). Sólo 1,7 Ga después, cuando se realizó la transición a condiciones aerobias, el O<sub>2</sub> se convirtió en

un sustrato frecuente atacando al intermediario enodiol y disminuyendo de forma notable la eficiencia de la vía de fijación de CO<sub>2</sub>. A partir de este momento la presión evolutiva comenzó a favorecer un incremento en la especificidad del enzima a favor de CO<sub>2</sub> frente al O<sub>2</sub>, entre otros mecanismos protectores.

En un principio se esperaba que los análisis de difracción de rayos X de los cristales de diferentes Rubiscos permitiera la comprensión de las diferencias de especificidad. Sin embargo, a pesar de la diferencia en la estructura primaria, la estructura tridimensional es prácticamente idéntica, sobre todo el centro activo, indicando que las diferencias estructurales que provocan la variación en la química catalítica no se hallan en el centro activo (Andersson y Taylor, 2003).

Si se lograran establecer las bases estructurales de las variaciones en  $\Omega$ , los resultados de estos estudios se podrían aplicar para aumentar el factor de especificidad de la Rubisco por medios biotecnológicos, lo que plausiblemente mejoraría la productividad de la planta. Para ello, se han estudiado mutantes naturales de la Rubisco y otros obtenidos mediante mutagénesis dirigida analizando el efecto de cambios sencillos en  $\Omega$  y en las constantes cinéticas ( $V_c$ ,  $V_o$ ,  $K_o$ ) pero aún no se ha obtenido una Rubisco mejorada (Spreitzer y Salvucci, 2002; Parry *et al.*, 2003). Es posible que se requieran varias sustituciones de residuos para mejorar los parámetros cinéticos (Spreitzer, 1999). Sin embargo, se ha logrado recuperar la capacidad fotosintética de un mutante termosensible (L290F) que tenía disminuido su  $\Omega$  con la mutación de otro residuo (L290F-A222T) (Du y Spreitzer, 2000; Du *et al.*, 2000) que restablece las interacciones entre la subunidad grande y pequeña (Karkehabadi *et al.*, 2005b).

#### **5.4. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD**

La actividad de la Rubisco *in vivo* muestra una marcada dependencia de la presencia de luz. Por un lado, se ha demostrado que la iluminación de los cloroplastos produce el incremento de una unidad de **pH** y el aumento de la concentración de **Mg<sup>2+</sup>** en el estroma, lo que contribuye a la activación de la Rubisco al favorecer la formación del complejo carbamato-Mg<sup>2+</sup> (Lorimer y Mizioroko, 1980). Por otro lado, la **Rubisco activasa** está sometida a regulación redox ligada a los ciclos de luz/oscuridad (Mott y Woodrow, 1993). Se ha descrito la interacción de la tiorredoxina con una de las isoformas de la Rubisco activasa (Zhang y Portis, 1999; Motohashi *et al.*, 2001; Balmer *et al.*, 2003; Balmer *et al.*, 2004a), presente en algunas especies (como *Arabidopsis*, espinaca, algodón) (Werneke *et al.*, 1989; Salvucci *et al.*, 2003) pero no en otras (como tabaco) (Salvucci *et al.*, 1987). Esta interacción es la responsable de la regulación redox de la actividad de la Rubisco en condiciones limitantes de luz (Zhang *et al.*, 2002). En oscuridad, la activasa está fuertemente inhibida por ADP y, por tanto, la Rubisco permanece inactiva por la unión de RuBP al enzima no carbamilado. En presencia de luz, la activasa se activa y permite la liberación de RuBP, favoreciendo la activación de la Rubisco.

Además, la actividad *in vivo* también está regulada por el **inhibidor natural carboxiarabinitol 1-fosfato** (CA1P), análogo al intermediario de la reacción de carboxilación, que en oscuridad se une fuertemente al enzima carbamilado inhibiendo su actividad y en presencia de luz no puede actuar porque se degrada completamente al ser desfosforilado (Salvucci, 1989; Seemann *et al.*, 1985; Heo y Holbrook, 1999). La Rubisco activasa desplaza el CA1P del centro activo (Portis, 1992). La concentración de CA1P varía entre diferentes especies, desde las que no lo sintetizan, pasando por aquellas que acumulan una concentración equivalente al 50% de sitios activos de la

Rubisco, hasta aquellas en las que la concentración de inhibidor sobrepasa a la de centros activos (Salvucci, 1989; Vu *et al.*, 1984). Además, al CA1P se le ha asignado un papel **regulador de la unión de metabolitos** a la Rubisco en oscuridad (Salvucci, 1989) ya que en estas condiciones la concentración de RuBP es menor, y por tanto, la unión de CA1P evitaría la unión de diferentes azúcares al centro activo de la Rubisco. A su vez CA1P podría influir en la cantidad de la Rubisco disponible para la asimilación del CO<sub>2</sub> fotosintético ya que el CA1P **evita la degradación *in vitro*** de la Rubisco por proteasas endógenas y exógenas (Khan *et al.*, 1999) y la fragmentación por especies reactivas de oxígeno (Ishida *et al.*, 1999).

## 6. CATABOLISMO DE LA RUBISCO

En plantas superiores, la Rubisco se acumula en los cloroplastos de forma prácticamente continua durante el crecimiento y expansión de los órganos fotosintéticos sin sufrir apenas recambio. Sin embargo, durante la senescencia o bajo diferentes estreses ambientales, la Rubisco sufre una degradación rápida y específica favoreciendo la movilización de nitrógeno hacia tejidos de reserva u órganos en crecimiento (Ferreira *et al.*, 2000; Ferreira y Teixeira, 1992). Este comportamiento se ha observado en distintos organismos eucarióticos desde protistas fotosintéticos a plantas superiores. En el caso de organismos unicelulares, la degradación específica de la Rubisco permite prolongar el crecimiento (y la supervivencia) en condiciones de estrés (García-Ferris y Moreno, 1994). Este cambio abrupto en la velocidad catabólica podría ser debido a la síntesis de nuevas actividades proteolíticas y/o a la sensibilización de las proteínas a proteasa/s preexistentes a través de un marcaje selectivo.

### **6.1. REGULACIÓN REDOX EN EL CLOROPLASTO**

La regulación redox interviene en el control de múltiples procesos funcionales y en casi todos los estadios del desarrollo de las plantas (Buchanan y Balmer, 2004). En el cloroplasto, donde se lleva a cabo el transporte fotosintético de electrones, la mayor parte de procesos se hallan controlados directa o indirectamente por el ambiente redox. La regulación está mediada por una serie de efectores tales como la tiorredoxina (proteína reguladora con ditioles altamente reactivos transmisores de señal redox) y ROS (especies reactivas de oxígeno). El intercambio ditiol/disulfuro mediado por la **tiorredoxina** es responsable de la regulación luz/oscuridad en el cloroplasto de plantas superiores y algas. La ferredoxina recibe los equivalentes de reducción de la cadena de transporte electrónico en presencia de luz y reduce las formas cloroplásticas de tiorredoxina (Trx *f*, *m*, *x* e *y*) por medio de la ferredoxina-tiorredoxina reductasa. Las tiorredoxinas, por su parte, convierten disulfuros a ditioles en sus respectivos enzimas diana modulando así su actividad. Además, la tiorredoxina también puede actuar de regulador en presencia de luz al inactivar transitoriamente la asimilación fotosintética de CO<sub>2</sub> en respuesta a oxidantes recién formados, y promover su reactivación al retornar las condiciones reductoras (Balmer *et al.*, 2003). Por otro lado, las **ROS** son un producto inevitable del funcionamiento de la cadena de transporte fotosintética en condiciones de estrés o senescencia. El O<sub>2</sub> generado a través del fotosistema II puede funcionar como aceptor de electrones alternativo al NADP<sup>+</sup> y generar las ROS (radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo). En condiciones de senescencia y estrés, las ROS aumentan superando la capacidad de los **sistemas antioxidantes** del cloroplasto como son la superóxido dismutasa (que transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno) y el sistema

ascorbato peroxidasa/glutación reductasa (que reduce el peróxido de hidrógeno a agua). Los radicales hidroxilos formados por la reacción de Fenton (Pfannschmidt, 2003) son especialmente reactivos y provocan daños oxidativos iniciando la peroxidación de lípidos de las membranas (Gutteridge y Halliwell, 1990) y la oxidación de proteínas (Stadtman, 1990). A pesar de su efecto nocivo, las ROS también juegan un papel señalizador en condiciones adversas. Es probable que la actividad de los enzimas regulados por intercambio tiol-disulfuro se afecte por la producción de ROS, bien directamente porque un oxidante puede inducir la formación de un enlace disulfuro regulador, o indirectamente, a través del cambio en la relación de tiorredoxina reducida y oxidada (u otros agentes reductores).

Una de las principales vías de regulación redox es la mediada por la **modificación de los grupos tioles** (-SH) de cisteínas de las proteínas. Estos grupos pueden oxidarse de manera reversible formando un enlace disulfuro interno o disulfuros mixtos (S-tiolación). La formación de un **enlace disulfuro** interno en una proteína puede tener un papel puramente estructural aumentando la estabilidad de la proteína, pero además, puede ser reversiblemente oxidado y reducido, lo que podría resultar en un cambio catalítico o regulador (Hogg, 2003). La formación de **disulfuros mixtos**, al reaccionar con tioles de bajo peso molecular, podría por un lado prevenir la oxidación irreversible de grupos -SH y la degradación posterior de la proteína (Buchanan y Balmer, 2004) o acelerarla (Offermann *et al.*, 1984) según el caso. Además, los grupos tioles (-SH) pueden modificarse por ROS para dar derivados reversibles de ácido sulfénico (-SOH) y ácido sulfínico (-SO<sub>2</sub>H) (Biteau *et al.*, 2003) que podría fácilmente ser oxidados a **formas (de oxidación) irreversibles** como ácido sulfónico (-SO<sub>3</sub>H) (Giustarini *et al.*, 2004).

El **estado redox** en el interior del cloroplasto, dado por el balance de las actividades oxidantes y reductoras en un momento dado, se refleja en su estado funcional, modulando la expresión y actividad de diversas proteínas cloroplásticas a distintos niveles. En **condiciones normales**, la oscilación del balance de condiciones reductoras/oxidantes, mediado por los ciclos luz/oscuridad a través de la cadena de transporte electrónica, ejerce un control sobre la **expresión de genes** (Pfannschmidt *et al.*, 1999); sobre la **estabilidad de los RNA mensajeros cloroplásticos** (Salvador y Klein, 1999); sobre la **traducción** mediada por la activación de factores de elongación (Kim y Mullet, 2003); sobre la **regulación de procesos** como algunas enzimas claves del ciclo de Calvin controlados por el sistema ferredoxina /tioredoxina (Buchanan *et al.*, 1994); e incluso sobre la regulación de la **transcripción de genes nucleares** (Pfannschmidt, 2003).

En **condiciones de senescencia y estrés** se han descrito que se producen cambios en el estado redox del cloroplasto que pueden modular la actividad, síntesis y estabilidad de las proteínas. Por ejemplo, una luz muy intensa provoca un aumento en los niveles de ROS y de la relación de glutatión oxidado a reducido. En estas condiciones oxidantes, la traducción de *rbCL* se detiene (Irihimovitch y Shapira, 2000). Se ha propuesto que la oxidación de la subunidad grande de la Rubisco provocaría un cambio de conformación que haría accesible una región con capacidad de unión inespecífica a RNA (Yosef *et al.*, 2004). De esta manera la Rubisco oxidada mediaría la **detención de la traducción** al unirse a su propio mensajero (Yosef *et al.*, 2004). Además, la parada de la traducción está coordinada con el **cese del ensamblaje** de la Rubisco (Cohen *et al.*, 2005). Parece ser que la oxidación de los grupos tioles en las cadenas nascentes de la subunidad grande dificultaría la asociación con las chaperonas (Cohen *et al.*, 2005).

## **6.2. MODIFICACIONES DE LA RUBISCO QUE MARCAN SU DEGRADACIÓN ESPECÍFICA**

Muchos estudios indican que la **susceptibilidad proteolítica** de la Rubisco nativa *in vitro* depende del estado redox de sus cisteínas (Peñarrubia y Moreno, 1990; García-Ferris y Moreno, 1993; Kellog y Juliano, 1997; Moreno y Spreitzer, 1999; Marín-Navarro y Moreno, 2003). Así, cuando la Rubisco de diferentes especies (*C. reinhardtii*, *Euglena gracilis*, espinaca, morera y arroz) se somete a diferentes modificaciones de cisteínas (por disulfuros, agentes alquilantes o arsenito) e incluso a tratamientos oxidativos menos específicos, como el  $\text{Cu}^{2+}$ , su susceptibilidad proteolítica aumenta. Esto sugiere que los sensores redox responsables del cambio conformacional y la susceptibilización proteolítica de la Rubisco inducidos por oxidación deben encontrarse entre las cisteínas conservadas en estas especies (Marín-Navarro, 2004). Se han identificado dos regiones en la subunidad grande de la Rubisco susceptibles a la hidrólisis por proteasas de baja especificidad. Una está localizado en el extremo N-terminal desestructurado (hasta la Lys18) (Gutteridge *et al.*, 1986). El corte proteolítico en esta zona no depende del estado redox de las cisteínas de la Rubisco. La otra región es un lazo conservado entre los residuos Ser61 y Thr68 cuya sensibilidad proteolítica muestra, por el contrario, una dependencia clara y gradual de la oxidación de las cisteínas de la Rubisco (Marín-Navarro y Moreno, 2003).

La modificación de la Rubisco por **ROS** facilita su degradación por proteasas (Desimone *et al.*, 1996; Desimone *et al.*, 1998). Se sabe que algunos de los estreses que conducen a la pérdida de la Rubisco (radiación ultravioleta, ozono, limitaciones nutricionales, estrés osmótico o fotooxidativo) generan ROS en el cloroplasto (McRae y Thompson, 1983). Asimismo, la oxidación por ROS de los grupos tioles en las cadenas nacientes

de la subunidad grande de la Rubisco dificulta la asociación con las chaperonas lo que impide el ensamblaje de la Rubisco (Cohen *et al.*, 2005). La modificación por ROS, además de contribuir a la **degradación selectiva** y **cese del ensamblaje**, también pueden provocar la **rotura del enzima en sitios específicos** (Ishida *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 1998; Ishida *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2002). Estos mecanismos de degradación mediados por radicales de oxígeno podrían tener lugar dentro del cloroplasto al agotarse las defensas contra las ROS.

Además de la oxidación de cisteínas, también se han observado otras modificaciones oxidativas de la Rubisco. Por ejemplo, en *Lemna minor*, distintos estreses que causan daños en la membrana inducen la **formación de un dímero (p65)** generado por el entrecruzamiento entre una subunidad grande y una subunidad pequeña a través de un enlace covalente no disulfuro. La formación de p65 y **posterior polimerización** está mediada por un sistema conocido como la Rubisco oxidasa (Ferreira y Teixeira, 1992; Franco *et al.*, 1992). Esta Rubisco oxidada y polimerizada es más sensible a proteasas endógenas y exógenas (Albuquerque *et al.*, 2001). Al irradiar con luz ultravioleta también se ha observado la formación de p65 seguida de una polimerización en agregados de alto peso molecular, tanto *in vivo* (Wilson *et al.*, 1995) como *in vitro* (Ferreira *et al.*, 1996). En este caso se ha implicado la fotólisis de un residuo de Trp (Gerhardt *et al.*, 1999) como la responsable de la unión covalente no disulfuro de la subunidad grande y pequeña.

Por otro lado, el tratamiento con ozono provoca la inactivación oxidativa de la Rubisco *in vitro* y promueve su degradación *in vivo*, lo que va acompañado en ambos casos de la formación de **derivados carbonilo** a partir de cadenas laterales de residuos de la subunidad grande y pequeña (Eckardt y Pell, 1995; Junqua *et al.*, 2000). También se ha descrito que la subunidad

grande de la Rubisco y ambas formas de la Rubisco activasa sufren carbonilación específica a lo largo del ciclo de vida y durante la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* (Johansson *et al.*, 2004; Job *et al.*, 2005). La **carbonilación de las proteínas** se puede llevar a cabo por el ataque oxidativo directo en Lys, Arg, Pro y Thr o por reacciones secundarias de carbohidratos y lípidos reactivos en Cys, His y Lys (Johansson *et al.*, 2004). Además también se ha relacionado la carbonilación con la agregación covalente de la Rubisco (Landry y Pell, 1993; Eckardt y Pell, 1995). El mecanismo de entrecruzamiento en este caso podría ser por formación de una base de Schiff entre el derivado carbonilo y el grupo  $\epsilon$ -amino de una Lys de otra cadena polipeptídica (Stadtman, 1990).

La **glicación** (formación de un aducto covalente con grupos amino) de residuos de la Rubisco por ácido ascórbico también se ha propuesto como un mecanismo candidato para la regulación de la actividad y recambio de la Rubisco (Yamauchi *et al.*, 2002). Asimismo, se ha visto que el ascorbato es capaz de provocar la polimerización de la Rubisco *in vitro* mediante la formación de aductos entre Lys y Arg de diferentes cadenas polipeptídicas (Yamauchi *et al.*, 2002).

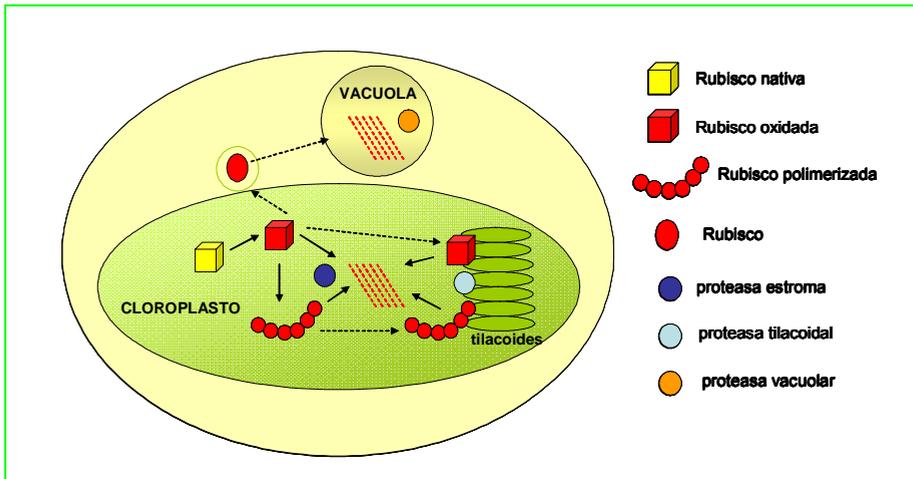
Por último, diversas estrategias proteómicas han descrito la interacción *in vitro* de **tioredoxina** con la subunidad pequeña (Motohashi *et al.*, 2001; Broin *et al.*, 2002; Balmer *et al.*, 2003; Balmer *et al.*, 2004a; Balmer *et al.*, 2004b; Lemaire *et al.*, 2004; Rey *et al.*, 2005) y grande (Broin *et al.*, 2002; Lindahl y Florencio, 2003; Balmer *et al.*, 2004a; Lemaire *et al.*, 2004) de la Rubisco de varias especies. Se ha propuesto que la inactivación por frío de la Rubisco purificada (Tenaud y Jacquot, 1987) pueda ser debida a la oxidación de la subunidad pequeña del enzima, que podría reactivarse por

acción de la tiorredoxina, como ocurre con DTT (Balmer *et al.*, 2003), aunque no se ha confirmado dicha interacción *in vivo* (Rey *et al.*, 2005).

*In vivo*, se ha confirmado la presencia de **formas oxidadas de la Rubisco** en **diversos organismos**, desde protistas y algas unicelulares a plantas superiores, y en **diferentes condiciones de estrés**, bajo choque osmótico (Ferreira y Davies, 1989), estrés oxidativo (Mehta *et al.*, 1992; Landry y Pell, 1993), privación de nitrógeno (García-Ferris y Moreno, 1994), estrés salino (Marín-Navarro, 2004) y estrés fotooxidativo (Cohen *et al.*, 2005). Por otro lado, también se ha detectado *in vivo* **el entrecruzamiento intercatenario** de la Rubisco a través de enlaces disulfuro u otros enlaces covalentes en respuesta a diferentes tipos de estrés como privación de nitrógeno (García-Ferris y Moreno, 1994), tratamiento con  $\text{Cu}^{2+}$  (Mehta *et al.*, 1992), estrés salino (Marín-Navarro, 2004) y estrés fotooxidativo (Knopf y Shapira, 2005). Se ha propuesto que la degradación de la subunidad grande de la Rubisco, provoca que las subunidades pequeñas recién sintetizadas se degraden rápidamente (Cohen *et al.*, 2005), y esto a su vez provoca la agregación de la Rubisco, momento a partir del cual la viabilidad de las células de *C. reinhardtii* expuestas a estrés oxidativo se ve afectada (Knopf y Shapira, 2005). Además, se ha descrito que determinadas situaciones de senescencia inducida por estrés promueven la **asociación** de una fracción de la Rubisco **con las membranas del cloroplasto** (Mehta *et al.*, 1992; García-Ferris y Moreno, 1994; Hilbrand *et al.*, 1994; Desimone *et al.*, 1996; Marín-Navarro, 2004).

Estos resultados han permitido describir una secuencia de eventos para la degradación de la Rubisco (fig.12): después de que la Rubisco se oxide dando lugar a una forma catalíticamente inactiva, se polimeriza formando agregados de alto peso molecular (Ferreira y Shaw, 1989) y se asocia con la

membrana del cloroplasto (Mehta *et al.*, 1992). Todo esto parece llevar al enzima, de forma regulada, a la degradación final (Ferreira *et al.*, 2000). Cada paso supone un avance en el marcado de la Rubisco para la degradación, facilitando la accesibilidad proteolítica del enzima.



**Fig.12. Modelo para la degradación selectiva de la Rubisco.** En condiciones adversas la Rubisco nativa se oxida, se polimeriza en agregados de alto peso molecular y se asocia con las membranas cloroplásticas. En cualquiera de estos estados la Rubisco es susceptible a ser degradada por proteasas cloroplásticas o vacuolares.

### 6.3. PROTEOLISIS DE LA RUBISCO

Se ha propuesto que la degradación proteolítica de la Rubisco se puede llevar a cabo en la **vacuola** y/o en el **cloroplasto** (fig.12). Por un lado, hay datos que apuntan que la Rubisco pueda ser degradada por **enzimas cloroplásticas**, como la proteasa EP1 del estroma (Bushnell *et al.*, 1993), una endoproteinasa ácida asociada a la membrana tilacoidal (Casano *et al.*, 1990), y/o una serinproteasa cloroplástica Lon (Desimone *et al.*, 1996; Adam *et al.*, 2001; Adam y Clarke, 2002), aunque no se ha demostrado directamente su

participación *in vivo*. Varios trabajos proponen que los primeros pasos de degradación de la Rubisco en hojas senescentes tiene lugar dentro de cloroplastos intactos ya que la desaparición de proteínas es mucho más rápida que la disminución del número de estos orgánulos (Mae *et al.*, 1984; Wardley *et al.*, 1984; Mitsuhashi *et al.*, 1992; Ono *et al.*, 1995). Por otra parte, de manera indirecta se ha demostrado la existencia de **proteasas vacuolares** (EP1 y EP2) que son capaces de degradar la Rubisco *in vitro* (Miller y Huffaker, 1982; Thayer y Huffaker, 1984). Se proponen dos modelos de degradación vacuolar. Por un lado se postula un **modelo selectivo**, en el que solo ciertas proteínas son enviadas a los lisosomas por vesículas sin necesidad de que se rompa irreversiblemente la integridad del cloroplasto. Experimentalmente se ha descrito la formación de cuerpos específicos derivados de la envoltura del cloroplasto, que contienen Rubisco, y que son excluidos en las fases iniciales de la senescencia natural e internalizados en la vacuola (Chiba *et al.*, 2003). Alternativamente, se sugiere un **modelo no selectivo**, en el que las vacuolas envuelven a los cloroplastos degradando todas las proteínas por igual. De hecho, se ha observado por microscopía electrónica que en protoplastos de hojas senescentes los cloroplastos se mueven hacia e incluso son fagocitados por la vacuola (Wittenbach *et al.*, 1982).

Estos mecanismos (cloroplástico y vacuolar) no son excluyentes y se ha propuesto que en diferentes estadios o bajo ciertas condiciones fisiológicas predominará uno u otro (Ferreira *et al.*, 2000). La degradación selectiva de la Rubisco podría ocurrir dentro del cloroplasto por la acción de **proteasas cloroplásticas**, sirviendo así como fuente de aminoácidos para las necesidades metabólicas de la célula o del organismo. En condiciones fisiológicas adversas prolongadas cuando el daño ya sea irreversible, la maquinaria **proteolítica vacuolar** actuaría degradando de manera no selectiva la Rubisco, en un

proceso que conduciría a la muerte celular. En este caso el total de las proteínas de la célula proporcionaría la fuente de aminoácidos para el resto del organismo (Ferreira *et al.*, 2000).

La formación de intermediarios del proceso de degradación se ha seguido *in vivo* (Desimone *et al.*, 1996; Ishida *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 1998; Kokubun *et al.*, 2002; Hajheidari *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). En general, se observa que el patrón de degradación muestra una gran variabilidad dependiendo de las condiciones empleadas y del organismo estudiado, por lo que parece ser que no haya un único mecanismo de degradación de la Rubisco sino que cooperan varias vías catabólicas.

#### ***6.4 PAPEL DE LAS CISTEÍNAS EN LA ACTIVIDAD Y CATABOLISMO DE LA RUBISCO***

La actividad enzimática de la Rubisco puede ser modulada *in vitro* por efectores redox que actúan sobre los grupos sulfhídrico de residuos de cisteína (Tenaud y Jacquot, 1987) sugiriendo que el enzima podría estar sujeto a regulación redox *in vivo*. Así, tanto la actividad enzimática como la susceptibilidad proteolítica de la Rubisco parecen estar regulados por un mecanismo redox implicando residuos críticos de cisteína de la proteína (Peñarrubia y Moreno, 1990; García-Ferris y Moreno, 1993; Moreno *et al.*, 1995). Por tanto, algunos residuos de cisteína de la Rubisco podrían actuar *in vivo* como sensores del potencial redox en el estroma del cloroplasto. Se ha demostrado que los residuos críticos para la inactivación del enzima son distintos de los implicados en su susceptibilización proteolítica. De esta manera, las modificaciones oxidativas producirían en primer lugar la inactivación del enzima y posteriormente desencadenarían su degradación proteolítica. Las cisteínas críticas no han sido identificadas, pero la diversidad

de especies en las que se ha observado este proceso indica que probablemente este mecanismo de regulación redox sea universal entre los eucariotas fotosintéticos y, por consiguiente, apunta a los residuos de cisteína filogenéticamente conservados como los candidatos más probables (fig.13).

El residuo Cys247 cuya oxidación se ha detectado *in vivo* en respuesta a tratamientos con  $\text{Cu}^{2+}$  (Mehta *et al.*, 1992) o privación de nitrógeno (García-Ferris y Moreno, 1994), no parece tener efecto sobre la actividad (Ranty *et al.*, 1991; Marcus *et al.*, 2003), la degradación (Marcus *et al.*, 2003) o la movilización de la Rubisco a la fracción membranosa (Mehta *et al.*, 1992), pero es responsable de la dimerización covalente de dos subunidades grandes (Ranty *et al.*, 1991). Se ha demostrado la relación entre modificación de cisteína y recambio *in vivo* en el estudio de la Rubisco de mutantes de *C. reinhardtii* donde cisteínas conservadas de la subunidad grande se reemplazaron por serina C172S, C449S, C459S, C449S/C459S (Moreno y Spreitzer, 1999; Marín-Navarro, 2004). Las cisteínas 449 y 459 son necesarias para inactivar completamente el enzima a potenciales redox elevados y favorecen la exposición del lazo Ser61-Thr68 a la acción de proteasas exógenas *in vitro* en condiciones oxidantes (Marín-Navarro, 2004). Las cisteínas 449 y 459 tienen un papel redundante, y su relevancia funcional solo se pone de manifiesto *in vivo* al sustituir ambos residuos. El doble mutante C449S/C459S responde al estrés salino intensificando los procesos de agregación y movilización a la fracción membranosa relacionados con el catabolismo del enzima (Marín-Navarro, 2004). Por otro lado, el enzima C172S es activo, aunque estructuralmente menos estable mostrando una termosensibilidad moderada (Moreno y Spreitzer, 1999). La sustitución de la Cys172 modifica el potencial redox crítico que controla la susceptibilidad proteolítica *in vitro* y aumenta la resistencia a la degradación inducida por

estrés *in vivo* (Moreno y Spreitzer, 1999). El mismo resultado se obtuvo al sustituir este residuo en la Rubisco de la cianobacteria *Synechocystis* sp PCC6803, mientras que la sustitución del residuo vecino Cys192 no retrasó la degradación (Marcus *et al.*, 2003).

Todo esto reafirma la idea de que diversos residuos de cisteína contribuyen a través de distintas vías a los procesos de inactivación y proteólisis inducidos por un aumento en las condiciones oxidantes. El estudio del papel de las cisteínas conservadas puede ayudar a entender los mecanismos que regulan la inactivación y proteólisis de la Rubisco, procesos que están directamente implicados en el funcionamiento general de la célula y definen su economía nutricional.

**A**

<i>C.reinhardtii</i> SS1	MMVWTPVNNKMFETFSYLPPLTDEQIAAQVDYIVANGWIP <sup>41</sup> CLEFAEADKA	50
<i>C.reinhardtii</i> SS2	-----s-----s---	50
<i>Euglena gracilis</i>	-k--n----fw-----s-ae-k--m-i-k-----slreis	50
<i>Synechocystis</i>	.mk-lpkerry--l-----q--k--eflldq-f--gv--e-dpqp	48
<i>Nicotiana tabacum</i>	-q--p-i-k-ky--l----d-sq--llse-e-llk--v----etehgf	50
<i>Spinacea oleracea</i>	-q--p-lgl-k---l-----t--ll-e-n-llvk---p---evk-gf	50
<i>C.reinhardtii</i> SS1	YVSNESAIRFGSVS <sup>65</sup> CL.....YYDNRYWTMWKLPMPFG <sup>83</sup> CRDPMQVLR EI	93
<i>C.reinhardtii</i> SS2	-----s-----s---	93
<i>Euglena gracilis</i>	eraypccyilandntyrfsgtaag-----t-as--k-l	100
<i>Synechocystis</i>	ethf.....f--gatane--a-v	73
<i>Nicotiana tabacum</i>	vyrennkspg.....g-----t-at--a-v	87
<i>Spinacea oleracea</i>	vyrehdkspg.....g-----gt--a--vn-v	87
<i>C.reinhardtii</i> SS1	<sup>96</sup> VACTKAFPDAYVRLVAFDNQKQVQIMGFLVQRPKTARDFQPANKRSV	140
<i>C.reinhardtii</i> SS2	-----s---w-----	140
<i>Euglena gracilis</i>	splef-a-enf---a---sv---vts-v---sgssw.....	138
<i>Synechocystis</i>	re-rsen-nc-i-vig---i-c-tvs-i-hk-nqnggry.....	113
<i>Nicotiana tabacum</i>	eeak--y-q-wi-iig---vr---cis-iayk-egy.....	123
<i>Spinacea oleracea</i>	eevk--p---f--fig-ndkre--cis-iayk-agy.....	123

**Fig.13. Alineamiento de las secuencias de las subunidades pequeñas (A) y las subunidades grandes (B) de *C.reinhardtii*, *Euglena gracilis*, *Synechocystis* PCC6803, *Nicotiana tabacum*, y *Spinacea oleracea*.** Las secuencias se obtuvieron de la base de datos del NCBI y se alinearon con el programa DNAMAN. Los guiones indican la conservación del residuo correspondiente. Los puntos indican huecos en el alineamiento. Los números de la derecha indican la numeración de las secuencias. Se indican en rojo las cisteínas que están muy conservadas y en azul las cisteínas parcialmente o no conservadas.

Introducción

**B**

<i>C.reinhardtii</i>	MVPQETETKAGAGFKAGVKDYRLTYYPDYVVRDITDILAAFRMTPQPGVPP	50
<i>Euglena gracilis</i>	-s-----t-----q-se-----a	50
<i>Synechocystis</i>	.....mvq-k-----q-----tpk--l--c-----a	45
<i>Nicotiana tabacum</i>	.....-----e-qt-k-----v-----	29
<i>Spinacea oleracea</i>	-s-----sve-----k-----e-etl-----vs-----	50
<i>C.reinhardtii</i>	<sup>53</sup> EECGAAVAEESSTGTWTTVWTDGLTSLDRYKGR <sup>84</sup> CYDIEFVPGEDNQYIAY	100
<i>Euglena gracilis</i>	-----q-----l-----s-----	100
<i>Synechocystis</i>	--aa-----n--d-----l-a--n-----f-f	95
<i>Nicotiana tabacum</i>	--a-----r--r-v--kd-----	79
<i>Spinacea oleracea</i>	--a-----n-----h--a--e-----c-	100
<i>C.reinhardtii</i>	VAYXIDLFEEGSVTNMFTSIVGNVFGFKALRALRLEDLRIPPAYVKTFVG	150
<i>Euglena gracilis</i>	--p-----ll-----s---w	150
<i>Synechocystis</i>	i--pl-----vl--l-----i-f-v-li---q	145
<i>Nicotiana tabacum</i>	--pl-----q	129
<i>Spinacea oleracea</i>	--pl-----v-----q-	150
<i>C.reinhardtii</i>	XPHGIQVERDKLNKYGRGLL <sup>172</sup> GCTIKPKLGLSAKNIYGRAVYE <sup>192</sup> CLRGGLDFT	200
<i>Euglena gracilis</i>	p-----r-----p-----	200
<i>Synechocystis</i>	p---t-----p-----	195
<i>Nicotiana tabacum</i>	p-----p-----	179
<i>Spinacea oleracea</i>	p-----p-----	200
<i>C.reinhardtii</i>	XDDENVNSQPFRWRDRFLVFAEAIYKAQAETGEVKGHYLNATAGT <sup>247</sup> CEEM	250
<i>Euglena gracilis</i>	k-----s-----t-----	250
<i>Synechocystis</i>	k---i-----q--e-----n-m---v-----	245
<i>Nicotiana tabacum</i>	k-----c--l--e---i-----	229
<i>Spinacea oleracea</i>	-----c--l-----i-----d-	250
<i>C.reinhardtii</i>	MKRAV <sup>256</sup> CAKELGVPIIMHDYLTGGFTANTSLAIY <sup>284</sup> CRDNGLLLIHRAMHAV	300
<i>Euglena gracilis</i>	y---sf-aqi-----m-----	300
<i>Synechocystis</i>	---ef--i-t-----ff-----t-rw---i-----	295
<i>Nicotiana tabacum</i>	i---f-r-----v-----h-----	279
<i>Spinacea oleracea</i>	----f-r-----v-----t-sh-----	300
<i>C.reinhardtii</i>	IDRQRNHGIHFRVLAKALRMSGDHLHSGTVVGKLEGEREVTLGFVDLMR	350
<i>Euglena gracilis</i>	-----t-----	350
<i>Synechocystis</i>	v--k-----c--l-----gi-m-----	345
<i>Nicotiana tabacum</i>	---k-----i-----di-----l-	329
<i>Spinacea oleracea</i>	---k--m-----l-----i-----di-----l-	350
<i>C.reinhardtii</i>	DDYVEKDRSRGIYFTQDWC <sup>369</sup> SMPGVMPVASGGIHVWHMPALVEIFGDDACL <sup>399</sup>	400
<i>Euglena gracilis</i>	-a-----cg-g-t-----t-----	400
<i>Synechocystis</i>	e---e-----f---ya--t-----s--	395
<i>Nicotiana tabacum</i>	---f--q-----v-l--l-----t-----sv-	379
<i>Spinacea oleracea</i>	--t-----s-v-t--l-----t-----sv-	400
<i>C.reinhardtii</i>	QFGGGTLGHPWGNAPGAAANRVALEA <sup>427</sup> CTQARNEGRDLAREGGDVIRSACK <sup>449</sup>	450
<i>Euglena gracilis</i>	-----s--v-----s-----e--	450
<i>Synechocystis</i>	-----t-----v-----n-----n---e--r	445
<i>Nicotiana tabacum</i>	-----v-----vk-----q--nei--e--	429
<i>Spinacea oleracea</i>	-----v-----v-----nti--e-t-	450
<i>C.reinhardtii</i>	WSPELAAACEVWKEIKFEFDTIDKL	475
<i>Euglena gracilis</i>	-----e---	475
<i>Synechocystis</i>	-----l-----eam-t-	470
<i>Nicotiana tabacum</i>	-----v-.....	446
<i>Spinacea oleracea</i>	-----pam-tv	475

Fig.13 (continuación)

---

## *OBJETIVOS*



El objetivo general del presente trabajo es evaluar la implicación de los residuos conservados Cys172 y Cys192 en la modulación redox de la Rubisco, e investigar las consecuencias de la eliminación de los grupos tiolicos de estas cisteínas sobre la estructura tridimensional del enzima. En particular, son objetivos concretos:

## **I. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS RUBISCOS MUTANTES C172S, C192S Y C172S/C192S**

Las funciones de los residuos Cys172 y Cys192 se investigaran estudiando el fenotipo de mutantes en los que dichos residuos se han sustituido por serina mediante mutagénesis dirigida del gen *rbcL*. Estos mutantes se obtendrán en *C. reinhardtii* dada las facilidades únicas que presenta dicho organismo para la transformación estable del genoma cloroplástico.

Una vez obtenidas las cepas mutantes se abordarán la caracterización de las Rubiscos mutadas mediante la purificación de los enzimas y el estudio de su actividad catalítica, de las posibles alteraciones estructurales y de la regulación redox, tanto de la actividad enzimática como de la sensibilidad proteolítica.

## **II. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LAS RUBISCOS C172S Y C192S POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X**

Para obtener una información más detallada de la estructura de las Rubisco mutantes y correlacionarla con las propiedades estudiadas en el apartado anterior, se abordará la cristalización de las Rubiscos mutantes purificadas y la determinación de la estructura tridimensional de los enzimas por difracción de rayos X en colaboración con el grupo de la Dra. I.Andersson (Universidad Agrícola Sueca en Uppsala).

### III. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LOS MUTANTES A DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS

Se abordará el estudio de la implicación *in vivo* del par Cys172 y Cys192 en la respuesta a un estrés general salino y un estrés oxidativo inducido por diamida. Se analizará la desaparición de la Rubisco y de la actividad carboxilasa *in vivo*, con el objetivo de estudiar la relación entre las propiedades determinadas para el enzima *in vitro* y su comportamiento *in vivo*.

---

## *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*



## *CAPÍTULO I*

---

### *OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS RUBISCOS MUTANTES C172S, C192S Y C172S/C192S*

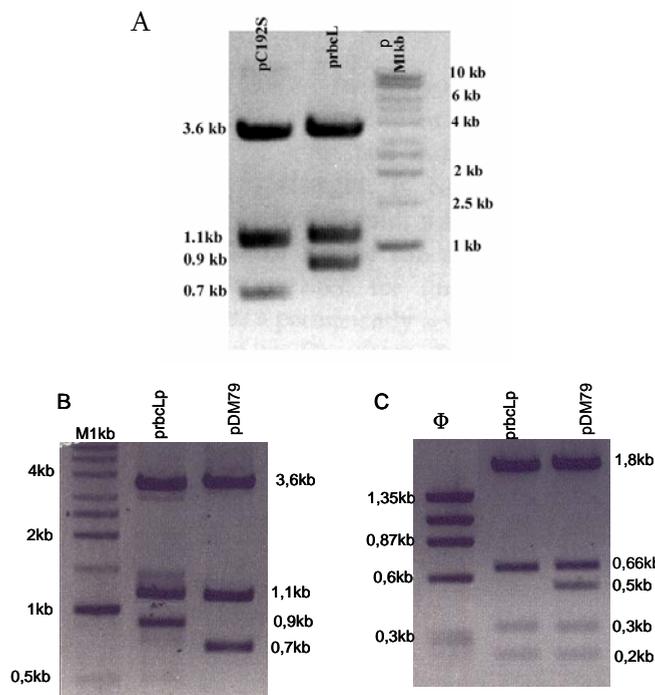


## 1. OBTENCIÓN DE MUTANTES EN RESIDUOS CONSERVADOS DE CISTEÍNAS

### ***1.1. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE GEN *rbcL****

La sustitución del codón TGT de la Cys192 o por un codón AGC de serina en la secuencia del gen *rbcL* de la subunidad grande de la Rubisco incluido en un plásmido (prbcLP) se llevó a cabo usando el kit comercial de mutagénesis dirigida (QuickChange Site-Directed Mutagenesis de Stratagene). Tras la transformación de *E.coli* con el producto final de la reacción de la mutagénesis, se aisló el DNA de 16 transformantes potenciales, y la presencia o ausencia de la mutación se comprobó mediante análisis de restricción con *Hind* III (fig.1A). Todas las colonias transformantes analizadas produjeron el mismo patrón de restricción característico de la mutación introducida.

La obtención del plásmido doble mutante (pC172S/C192S) se realizó a partir del plásmido C192S sustituyendo el codón TGT de la Cys172 por un codón TCT de serina. La sustitución eliminaba un sitio de restricción *Rsa* I. Tras la mutagénesis, se realizó la restricción *Rsa* I (característica de la sustitución C172S) y *Hind* III (característica de la mutación C192S) de los plásmidos obtenidos de los transformantes (fig.1B y 1C). Ambas restricciones demostraron la existencia de la doble mutación en el plásmido pC172S/C192S.



**Fig.1. Análisis de restricción de los plásmidos purificados de las colonias de *E. coli* transformada con pC192S (A) y pC172S/C192S (pDM79) (B y C).** La restricción con *Hind* III de la mutación C192S (A y B) genera la banda característica de 0,7kb, mientras que la restricción con *Rsa* I de la mutación C172S (C) da una banda de 435pb. Se indica el tamaño de las bandas de restricción y algunas del marcador molecular (M1kb, Kilobase DNA Marker de Pharmacia Biotech y  $\Phi$  ( $\Phi$ X174DNA/*Hae*III) de Promega).

## 1.2. TRANSFORMACIÓN DEL CLOROPLASTO DE *C.reinhardtii*

Se procedió a la transformación del cloroplasto de un mutante no fotosintético de *C. reinhardtii* (18-7G) mediante bombardeo de partículas de tungsteno portadoras de la construcción mutada pC192S o pC172S/C192S. La selección de los transformantes se realizó por recuperación de la capacidad fotosintética mediante el aislamiento de colonias capaces de crecer en medio

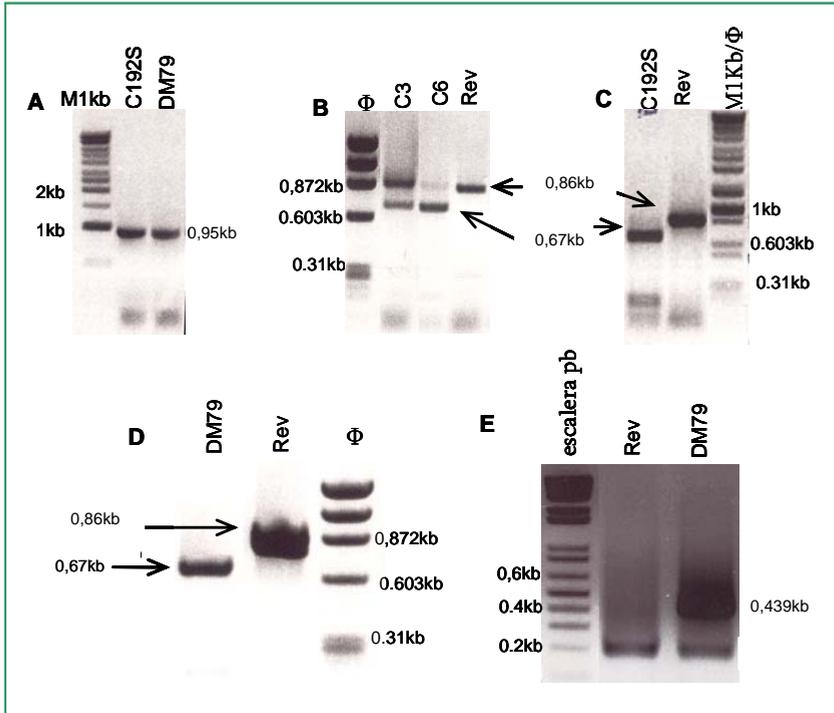
mínimo con luz. Tras varios intentos de bombardeo se recuperaron 11 colonias, de las cuales tres no portaban la mutación, y por tanto eran revertientes, y 8 colonias poseían la mutación C192S. Las cepas mutantes se crecieron en medio mínimo en luz hasta que se consiguió la homoplasmicidad (comprobada a través del análisis de restricción con *Hind* III después de la amplificación del gen *rbcl*) demostrando así que la Rubisco C192S era catalíticamente activa. Tras la restricción del gen *rbcl* silvestre amplificado (950pb) cabe esperar bandas de 863 y 87 pb, mientras que para la cepa transformada que hubiera incorporado la mutación C192S se obtendrían bandas de 670, 193 y 87 pb. En el caso que la cepa transformada fuera heteroplásmica coexistiría la banda de 863 pb con la banda de 670 pb característica de C192S (fig.2A).

De las 8 colonias heteroplásmicas obtenidas en el primer rastreo, se seleccionaron 3 para analizar la segunda generación, de las cuales se seleccionaron 2 para analizar generaciones posteriores. Para la obtención de la cepa mutante C192S homoplásmica se analizaron hasta 10 generaciones de estas colonias. La coexistencia de las dos bandas (863pb y 670pb) en las primeras generaciones indicaba que las células eran heteroplásmicas (fig.2A), por ello se continuó forzando la selección en medio mínimo con luz para alcanzar la homoplasmicidad. De hecho, se observó con el paso de las generaciones como las células iban adquiriendo una mayor proporción de copias mutadas (medida como la cantidad de banda de 670pb respecto a la banda de 863pb), hasta que se consiguió la cepa homoplásmica (banda 863pb ausente) (fig.2C). Se seleccionó una de las colonias homoplásmicas como cepa mutante C192S estándar. La identidad y exclusividad de la mutación se confirmó mediante la secuenciación del gen *rbcl* completo de esta cepa. La

cepa mutante en *rbcl* creada por mutagénesis dirigida y transformación se nombró C192S.

También se tomó una de las cepas revertiente, y se secuenció su gen *rbcl* confirmándose que era idéntico al gen *rbcl* tipo silvestre. Las células revertientes y el enzima purificado de ellas se utilizaron como control del tipo silvestre en los estudios del comportamiento de los mutantes.

Para la obtención de la cepa mutante C172S/C192S se llevó a cabo la misma estrategia que para la cepa C192S. Tras la transformación de la cepa 18-7G se obtuvieron transformantes heteroplásmicos, que tras 5 rondas de selección alcanzaron la homoplasmicidad. En este caso la presencia de la mutación se detectó mediante el análisis del patrón de restricción característico de los enzimas *Hind* III y *Rsa* I. La digestión del gen *rbcl* amplificado de la cepa C172S/C192S (fragmento de 950pb) con *Hind* III producía fragmentos idénticos al mutante C192S (fig.2D). A su vez, la restricción con *Rsa* I del gen silvestre daría fragmentos de 225, **220**, **219**, 205... pb, mientras que la presencia de la mutación C172S causaría la aparición de una banda de **439pb** (fig.2E). La presencia de los fragmentos esperados, tanto para la secuencia silvestre como para la mutada, después de la restricción del DNA de las cepas transformantes sería indicativa de heteroplasmicidad. Tras alcanzar la homoplasmicidad, la presencia de las mutaciones introducidas se comprobó de nuevo mediante la secuenciación del gen *rbcl*. La cepa homoplásmica que contenía la mutación se nombró C172S/C192S.



**Fig.2 Análisis de colonias transformantes de *C. reinhardtii* tras bombardeo con el plásmido pC192S y pC172S/C192S.** (A) Producto de PCR al amplificar el gen *rbcL* de los transformantes C192S y C172S/C192S (DM79) con cebadores separados 0,95kb. Se muestra la restricción con *Hind* III (B-D) y *Rsa* I del amplificado de *rbcL*. Para la transformación de pC192S el resultado de la digestión de los amplificadores de PCR procedentes de colonias heteroplásticas de tercera (C3) y sexta (C6) generación, así como de la cepa homoplástica (C192S). Se indican el tamaño de algunas bandas. Los marcadores de tamaño fueron: M1kb, 1kb marker de Pharmacia Biotech, Φ. (ΦX174DNA/HaeIII) y escalera de pb (100pb ladder) de Promega.

La recuperación de cepas capaces de crecer en medio mínimo en presencia de luz indicó que ambas cepas mutantes eran catalíticamente activas, y por tanto no parece que estos residuos conservados sean esenciales para la actividad ni la estabilidad estructural del enzima a temperatura ambiente. La presencia de gran número de revertientes a lo largo de todo el

proceso de selección fue probablemente debida a la generación de copias de *rbcl* silvestre por recombinación homóloga entre las posiciones mutadas del gen *rbcl* introducido (C192S o C172S/C192S) y el receptor durante la fase de heteroplasmicidad. Aunque se sometieron las células a un tratamiento previo con fluordesoxiuridina para reducir el número de copias del genoma cloroplástico y facilitar la homoplasmicidad, los revertientes siguieron apareciendo con una notable frecuencia. Esto parece sugerir una cierta desventaja de las Rubiscos (C192S o C172S/C192S) frente a las copias silvestres.

### ***1.3. CARACTERIZACIÓN PREVIA DE LAS CEPAS MUTANTES C192S Y C172S/C192S***

Las colonias de la cepa C192S fueron visualmente indistinguibles de las de la cepa revertiente cuando se hizo crecer en medio sólido suplementado con acetato o en medio mínimo. Asimismo, en medio líquido la cepa C192S presentó una velocidad de crecimiento y una densidad celular en fase estacionaria similar a la cepa revertiente. El contenido de Rubisco por célula y el rendimiento de la purificación del enzima fueron similares también a los de la cepa revertiente.

Las células del doble mutante C172S/C192S crecieron típicamente en forma de agregados grandes, tanto en medio líquido suplementado con acetato como en medio mínimo, y presentaron un leve retraso en el crecimiento respecto el cultivo revertiente silvestre. La cantidad de Rubisco por célula en cultivos en fase estacionaria fue del 60-70% del contenido de la cepa revertiente. Sin embargo, el rendimiento de la purificación del enzima a partir de la cepa doble mutante fue unas 10 veces inferior a la del revertiente. Este hecho apunta a una cierta inestabilidad estructural de la Rubisco

doblemente mutada, que causaría un nivel estacionario de proteína más bajo *in vivo*, y una mayor pérdida del enzima a lo largo del proceso de purificación.

## 2. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LAS RUBISCOS MUTANTES C172S, C192S Y C172S/C192S

Con el objeto de estudiar el papel de las cisteínas críticas mutadas (Cys 172 y Cys192), en la actividad, estabilidad estructural y modulación redox de la actividad y proteólisis, se purificó la Rubisco de las cepas mutantes (C172S, C192S, C172S/C192S) de *C. reinhardtii*, y se sometió a distintos ensayos comparando su comportamiento con el de la Rubisco purificada de la cepa revertiente silvestre.

### ***2.1. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LAS RUBISCOS***

Se midió la actividad específica carboxilasa de las Rubiscos purificadas de las cepas revertiente, C172S, C192S y C172S/C192S (tabla I). La actividad específica de la Rubisco revertiente silvestre fue aproximadamente de 2  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg enzima})$ , valor similar a los descritos por otros autores (Moreno y Spreitzer, 1999; Marín-Navarro y Moreno, 2003) para la Rubisco silvestre. La actividad del C172S fue alrededor de un 35% inferior a la del enzima silvestre. En presencia del agente reductor cisteamina, la actividad del enzima C172S, al igual que la del enzima silvestre, sufrió un ligero aumento (en torno a un 5%).

	Actividad específica	
	Sin tratar	CSH
<b>wt</b>	1,97 ± 0,08	2,05 ± 0 13
<b>C172S</b>	1,29 ± 0,06	1,35 ± 0,05
<b>C192S</b>	1,27 ± 0,07	1,62 ± 0,10
	0,83 ± 0,05	1,63 ± 0,07
	1,14 ± 0,04	1,67 ± 0,04
<b>C172S/C192S</b>	0,70 ± 0,04	0,87 ± 0,04

**Tabla I. Actividad específica carboxilasa de la Rubisco purificada del revertiente silvestre (wt) y de los mutantes C172S, C192S, C172S/C192S.** Para la cepa C192S se dan valores de tres preparaciones distintas. La Rubisco purificada (0,13mg/ml) se incubó en presencia (CSH) o ausencia (sin tratar) de cisteamina 40mM durante 2h antes de la determinación de la actividad. Se muestra la media ± la desviación típica de un ensayo realizado por triplicado, expresada en  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg enzima})$ .

La actividad específica del enzima C192S reducido por cisteamina fue solo un 20% inferior a la del silvestre (también reducido). Sin embargo, cuando se midió la actividad específica en diferentes muestras de Rubisco C192S no reducidas, se observó una gran variabilidad en los valores de actividad, detectándose valores en torno a un 40-60% de la actividad del enzima silvestre (también sin tratar) en diferentes preparados del enzima purificado. Cuando estos preparados de C192S se trataron con un agente reductor (CSH), los valores de actividad de diferentes experimentos se igualaron (tabla I). La gran variabilidad detectada en condiciones no reductoras se podría explicar en base a diferentes grados de inactivación

espontánea y reversible del enzima por oxidación que, en principio, podría haber tenido lugar *in vivo* y/o a lo largo del proceso de purificación.

Por otro lado, la actividad específica del enzima doble mutante C172S/C192S fue un 65% inferior que la del enzima silvestre. En presencia de cisteamina, el enzima se reactivó considerablemente, aunque la actividad no llegó a alcanzar el 50% de la actividad del enzima silvestre. Esta baja actividad específica podría deberse a un efecto aditivo de la doble sustitución de los residuos sobre la inactivación, o bien podría ser que la doble mutación produjera un cambio estructural distinto que afectara al centro catalítico más drásticamente que las mutaciones simples.

## ***2.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS***

Se realizó un análisis más detallado del efecto de las mutaciones en el centro activo del enzima midiendo la actividad en muestras en las que se varió la concentración de CO<sub>2</sub>, en un rango de concentraciones limitantes para la reacción de carboxilación, bajo una atmósfera de nitrógeno u oxígeno. De este modo se calcularon las constantes de Michaelis para el CO<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub>, y la velocidad máxima de carboxilación (tabla II). Por otro lado, el factor de especificidad se determinó por el método del doble marcado (tabla II). Estos ensayos fueron realizados por Julia Marín Navarro y Sriram Satagopan en el laboratorio del Dr. Robert Spreitzer de la Universidad de Nebraska con el que se estableció una colaboración.

Enzimas	$\Omega$ ( $V_c K_o / V_o K_c$ )	$V_c$ $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	$K_c$ $\mu\text{M CO}_2$	$K_o$ $\mu\text{M O}_2$	$K_o/K_c$
Revertiente	$62 \pm 3$	$130 \pm 20$	$24 \pm 3$	$620 \pm 50$	26
C172S	$68 \pm 2^*$	$120 \pm 30$	$47 \pm 3^{**}$	$1360 \pm 130^{**}$	29
C192S	$61 \pm 2$	$92 \pm 16^{**}$	$18 \pm 2^{**}$	$550 \pm 60^*$	31

**Tabla II: Factor de especificidad y constantes cinéticas de la Rubisco obtenida de la cepa revertiente y los mutante C172S y C192S.** Se muestran las medias  $\pm$  las desviaciones típicas de múltiples determinaciones independientes [cuatro de los valores de  $\Omega$  (factor de especificidad) y seis de  $K_c$  (constante de Michaelis para la reacción de carboxilación,  $K_o$  (constante de Michaelis para la reacción de oxigenación) y  $V_c$  (velocidad máxima para la reacción de carboxilación)]. Se indican los valores significativamente distintos a los del enzima revertiente con  $P < 0.05$  (\*) o  $P < 0,01$  (\*\*).

La sustitución de la Cys192 por serina produce una disminución de las constantes de Michaelis para el  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ , con una disminución mayor de la  $K_m$  para el  $\text{CO}_2$ . Por tanto, la menor velocidad de carboxilación que posee (30% inferior) se ve compensada por el aumento de afinidad por el  $\text{CO}_2$  respecto al  $\text{O}_2$ , dando así un valor de factor de especificidad similar.

La velocidad máxima de carboxilación del enzima C172S fue similar a la del silvestre. Por contra, las constantes aparentes de Michaelis, tanto para el  $\text{CO}_2$  ( $K_c$ ) como para el  $\text{O}_2$  ( $K_o$ ) del mutante C172S fueron bastante superiores (aproximadamente el doble) que las del enzima silvestre. Estos resultados sugieren que la menor actividad específica aparente del mutante C172S (tabla II), podría ser el resultado de una menor saturación del centro catalítico bajo las condiciones estándar del ensayo de actividad carboxilasa.

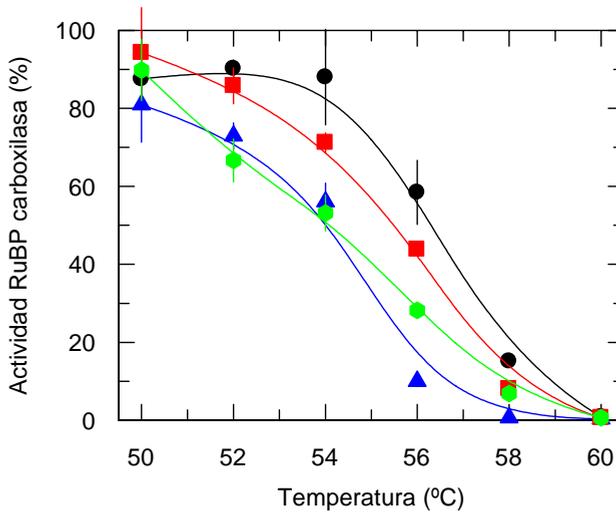
El factor de especificidad determinado para la Rubisco silvestre fue 62 (tabla II), el cual es similar a los valores previamente descritos para el

enzima de *C.reinhardtii* usando el mismo método (Du *et al.*, 2000; Spreitzer *et al.*, 2001; Du *et al.*, 2003; Satagopan y Spreitzer, 2004). A diferencia del enzima C192S cuyo factor de especificidad fue idéntico al silvestre, el mutante C172S mostró un valor significativamente superior, de 68. La comparación de las constantes cinéticas de la Rubisco C172S con los valores del silvestre mostró que la relación  $K_o/K_c$  estaba ligeramente aumentada (tabla II), lo que podría por si mismo explicar el factor de especificidad superior. Debido a que ni  $\text{CO}_2$  ni el  $\text{O}_2$  se unen al enzima antes de reaccionar con la forma enediol de RuBP, las constantes de Michaelis aumentadas del enzima C172S podrían estar causadas por cambios conformacionales inducidos por la mutación que conducirían i) al debilitamiento de las interacciones con RuBP que inducen la forma enediol, consiguiendo así, un sustrato menos reactivo para  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ; ii) a una accesibilidad restringida del  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$  al enediol de RuBP unido; y/o iii) a una estabilización limitada de los intermediarios de las reacciones de carboxilación y oxigenación. Dado que la especificidad de sustrato depende de la estabilización diferencial de estos intermediarios (Chen y Spreitzer, 1991), el hecho de que el factor de especificidad también esté afectado indica al menos una contribución parcial de esta última explicación.

### ***2.3 ESTUDIO DE LA TERMOSENSIBILIDAD DE LOS ENZIMAS MUTANTES***

La sensibilidad térmica del enzima se determinó midiendo la actividad carboxilasa de la Rubisco a 30°C después de una incubación a diferentes temperaturas (de 30 a 60°C) durante un tiempo fijo de 30 min. (fig.3) o bien a una temperatura fija de 55°C a lo largo de 3 horas (fig.4).

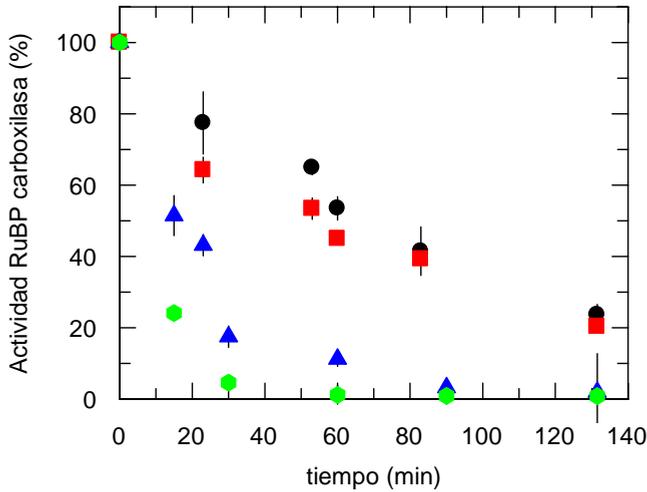
En las dos condiciones ensayadas, la Rubisco purificada del mutante C192S presentó un comportamiento cercano al enzima silvestre, mostrando una estabilidad térmica ligeramente menor. La temperatura crítica de inactivación del enzima C192S fue de aproximadamente 1°C inferior al tipo silvestre (fig.3) y presentó una cinética de inactivación a 55°C similar a la del enzima silvestre (fig.4).



**Fig.3. Inactivación térmica de la Rubisco purificada de los mutantes C192S (■), C172S (▲), C172S/C192S (●) y tipo silvestre control (●) incubada a diferentes temperaturas.** La Rubisco se incubó a cada temperatura durante 30 min, se enfrió en hielo durante 5 min, y se ensayó la actividad RuBP carboxilasa residual. Se representa el porcentaje de actividad residual respecto la actividad específica de la misma muestra incubada a 30°C durante 30min. Las barras de error indican la desviación típica obtenida de tres muestras independientes.

En cambio, las Rubiscos doble mutante C172S/C192S y C172S fueron más sensibles que la Rubisco silvestre. Ambos enzimas presentaban una temperatura de desnaturalización inferior y una mayor velocidad de desnaturalización. La temperatura de semi-inactivación de las Rubiscos

C172S y C172S/C192S en las condiciones ensayadas fue entre 2-2.5°C inferior a la silvestre (fig.3). Además, las Rubiscos C172S y C172S/C192S incubadas a 55°C mostraron una cinética de inactivación sensiblemente más rápida (tiempo de semi-inactivación de 20 y 10 min respectivamente) que el enzima silvestre (fig.4).



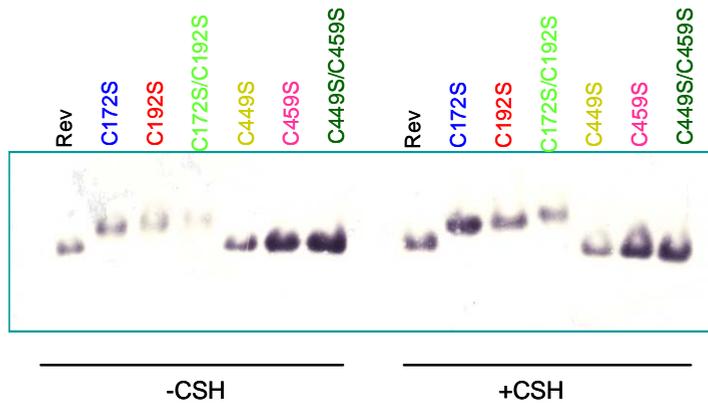
**Fig.4. Inactivación térmica de la Rubisco purificada del mutante C192S (■), C172S (▲), C172S/C192S (●) y tipo silvestre control (●) incubada a 55°C.** La Rubisco purificada (0,2mg/ml) de las diferentes cepas de *C. reinhardtii* se incubó a 55°C durante 130 min. A los tiempos indicados se tomaron muestras que se enfriaron en hielo durante 5 min, y se ensayó la actividad RuBP carboxilasa residual. Se representa el porcentaje de actividad residual respecto la actividad inicial de cada Rubisco. Las barras de error indican la desviación típica obtenida de tres muestras incubadas independientemente.

Los resultados confirman la inestabilidad térmica de la Rubisco C172S ya descrita en un publicación previa (Moreno y Spreitzer, 1999). En aquel trabajo, se especuló que la baja estabilidad del mutante C172S podría ser debido a la imposibilidad de formar un puente disulfuro entre la Cys172 y

Cys192, que podría estar presente en la Rubisco silvestre. Debido a que el enzima C192S es estable, se puede concluir ahora que la termosensibilidad de la Rubisco C172S no está causada por la ausencia del presunto puente disulfuro Cys172-Cys192. La mayor sensibilidad térmica de las Rubiscos C172S y C172S/C192S, revela el papel estructural de la Cys172 por si misma, que no puede ser complementado por la sustitución por serina. Por el contrario, la sustitución de Cys192 por serina no altera apenas la estabilidad estructural del enzima.

#### ***2.4. COMPORTAMIENTO ELECTROFORÉTICO EN GELES NATIVOS***

Para detectar posibles alteraciones estructurales en las Rubiscos mutadas se analizó la movilidad electroforética de los enzimas en condiciones nativas. En este caso, se partió de extractos crudos de las diferentes cepas que se sometieron a electroforesis e inmunorevelado para detectar el holoenzima de Rubisco. Se observó una menor movilidad de las cepas C172S, C192S y C172S/C192S respecto al enzima silvestre y a otros controles añadidos (C449S, C459S, C449S/C459S) tanto en muestras reducidas previamente como sin tratar (fig.5). Esta diferencia probablemente refleja algún cambio en la conformación de los holoenzimas mutantes que reduce su movilidad electroforética en condiciones nativas.



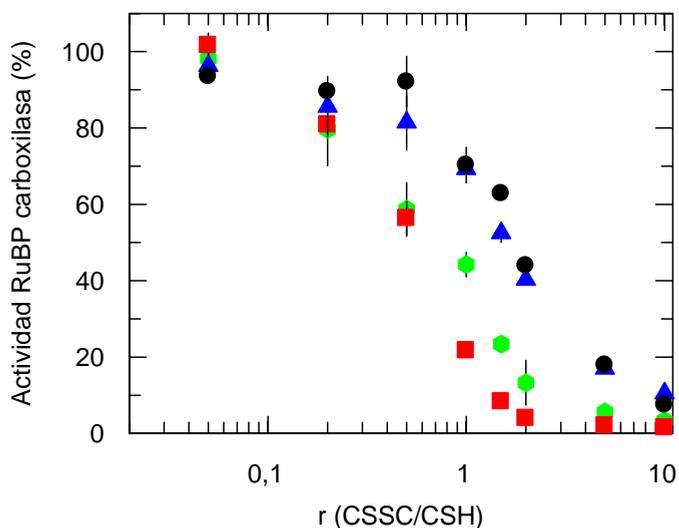
**Fig.5. Inmunodetección del holoenzima de Rubisco tras electroforesis nativa y electrotransferencia.** Los cultivos de cada cepa se resuspendieron en tampón de homogenización con o sin CSH. Tras romper las células por sonicación, se incubó el extracto durante 2h a 30°C en atmósfera inerte, las muestras se resuspendieron en tampón de electroforesis para geles nativos con  $\beta$ -EtSH, y se corrieron en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% (pregel 4%).

## 2.5. MODULACIÓN REDOX DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### 2.5.1. *Inactivación en tampones redox*

Con el objeto de estudiar la inactivación de Rubisco por oxidación se incubaron los enzimas purificados en distintos tampones redox. Los tampones redox empleados consistieron en mezclas de cisteamina (CSH) y cistamina (CSSC) y se caracterizaron por una concentración monomérica ( $c=[\text{CSH}]+2[\text{CSSC}]$ ) constante de 40mM y una relación disulfuro/tiol ( $r=[\text{CSSC}/\text{CSH}]$ ) variable. Tras 2 horas de incubación a 30°C en atmósfera inerte de nitrógeno, la actividad carboxilasa disminuyó al aumentar la relación disulfuro/tiol de los tampones (fig.6) como ya se había descrito para los enzimas silvestre y C172S con un punto de inflexión (correspondiente al 50% de la actividad) situado en una  $r$  entre 1,5 y 2 (Moreno y Spreitzer, 1999).

El enzima mutante C192S presentó una mayor sensibilidad a la oxidación, volviéndose inactivo bajo condiciones menos oxidantes (alrededor de  $r=0,7$ ) que el enzima silvestre y C172S. En cambio, el enzima doble mutante presentó un comportamiento intermedio, con una  $r$  crítico en torno a 1 (fig.6).



**Fig. 6. Inactivación de las Rubiscos purificadas de los mutantes C192S (■), C172S (▲), C172S/C192S (●) y tipo silvestre control (●) incubadas en tampones con potenciales de oxidación crecientes.** Se prepararon tampones redox como mezclas de CSH y CSSC con diferentes relaciones molares ( $r = [CSSC]/[CSH]$ ) desde  $r=0$  hasta  $r=100$  y concentración monomérica ( $[CSH] + 2[CSSC]$ ) constante e igual a 40mM. Las Rubiscos purificadas (0,13mg/ml) de las cepas revertiente y mutantes de *C. reinhardtii* se incubaron en los diferentes tampones durante 2 horas a 30°C en una atmósfera inerte de nitrógeno, y a continuación se ensayó la actividad carboxilasa residual. Se representa el porcentaje de la actividad residual respecto a la actividad del mismo enzima totalmente reducido (con  $r=0$ ). Las barras de error indican la desviación típica de triplicados del ensayo de actividad.

Estos resultados indican que el enzima C192S es más sensible a la inactivación, vía oxidación de cisteínas (de tiol a disulfuro) que el silvestre. El bajo potencial redox crítico del enzima C192S (fig.6) sugiere que la Cys192 protege otro grupo redox sensible en la Rubisco silvestre. Debido a la proximidad entre Cys192 y Cys172, este último residuo sería el candidato más plausible para ser el residuo protegido. La protección de la oxidación espontánea de la Cys172 se podría ejercer a partir de la formación de un puente disulfuro de la Cys192 con la Cys172 (cuando las condiciones ambientales se vuelvan oxidativas). Si fuera así, la formación de un disulfuro mixto del residuo Cys172 con la cistamina inactivaría el enzima y la curva de inactivación redox que corresponde al enzima C192S revelaría la modificación del residuo Cys172 desprotegido. En cambio, las curvas de los enzimas C172S y silvestre responderían a la modificación oxidativa de otro residuo (o residuos) de cisteína más difícilmente oxidable. Esta cisteína no determinada (la cual llamaremos a partir de ahora CysX) podría ser la diana por defecto de la inactivación oxidativa cuando la Cys172 está ausente (como en la Rubisco C172S) o protegido por la Cys192 (como en el enzima silvestre).

Una explicación alternativa podría ser que la inactivación ocurra en todos los casos a través de la modificación del mismo residuo (CysX) cuyo potencial redox crítico cambie por la ausencia de Cys192 a través de un mecanismo a larga distancia.

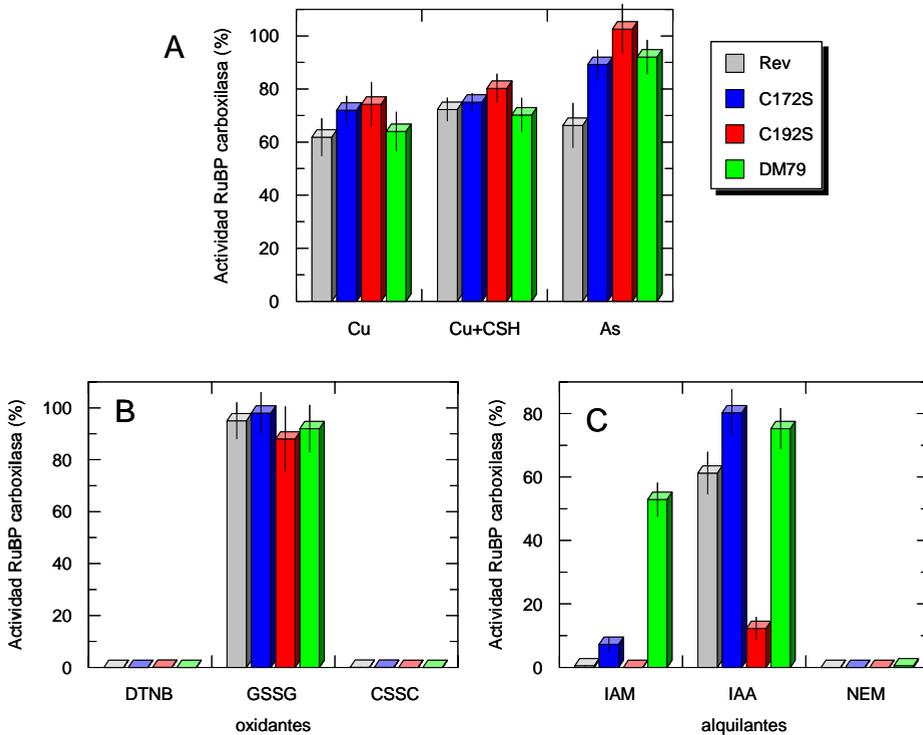
El comportamiento de la Rubisco doble mutante C172S/C192S con un potencial crítico de inactivación intermedio no aporta elementos de juicio que permitan inclinarse por una u otra opción. Si el residuo Cys192 protegiera al Cys172 de la oxidación, el doble mutante debería comportarse como el C172S (o el silvestre). Por el contrario, si la desaparición de la Cys192 afectara al potencial redox crítico de la CysX (a larga distancia), la

curva de inactivación (redox) del doble mutante debería duplicar la de C192S. El comportamiento intermedio del doble mutante parece reflejar el hecho de que la sustitución de ambos residuos induce un cambio conformacional distinto que afecta a la exposición de residuos críticos (CysX o incluso otros) al agente oxidativo.

### ***2.5.2. Efecto de agentes modificadores de cisteínas***

Se determinó la actividad carboxilasa de la Rubisco purificada tras incubarla con diferentes agentes modificadores de grupos sulfhidrilo: sales de cobre, agentes que podrían formar disulfuros mixtos intermoleculares como el ditionitrobenzoato (DTNB), glutatión oxidado (GSSG) y cistamina (CSSC), agentes que reaccionan con ditioles como el arsenito de sodio y agentes alquilantes como yodoacetamida (IAM), ácido yodoacético (IAA), y n-etil maleimida (NEM) (fig.7). Como controles se determinaron en paralelo las actividades de la Rubisco purificadas sin tratar y reducida con cisteamina.

La exposición de la Rubisco purificada de los mutantes C172S, C192S y C172S/C192S a estos agentes produjo la inactivación de los enzimas en diferente grado. En algunos casos, especialmente en aquellos tratamientos donde se observó un efecto diferencial de los agentes oxidantes sobre los distintos mutantes, se realizó un estudio más detallado de la cinética de inactivación (fig.8).



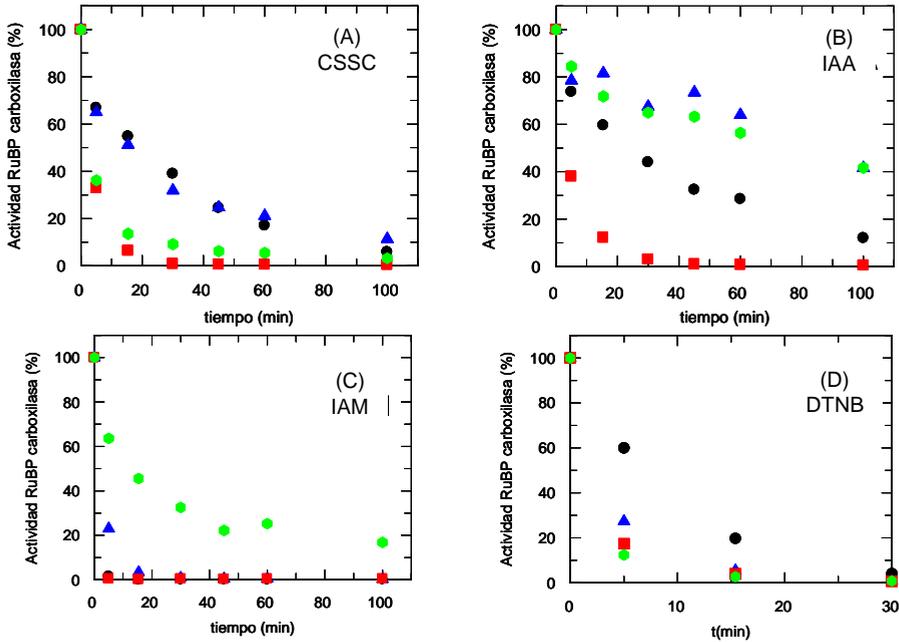
**Fig.7. Inactivación de las Rubiscos obtenidas del revertiente silvestre y de los mutantes C172S, C192S, C172S/C192S por tratamientos con diferentes agentes modificadores de cisteínas.** La Rubisco purificada (0,13mg/ml en tampón de activación) se incubó durante 2h (A y B) o 15min (C) a 30°C con diferentes agentes modificadores: **Cu**, sulfato de cobre 25µM; **Cu + CSH**, sulfato de cobre 25µM en presencia de CSH 40mM; **As**, arsenito de sodio 2mM; **DTNB**, ditionitrobenzoato; 2mM; **GSSG**, glutatión oxidado 20mM; **CSSC**, cistamina 20mM; **IAM**, yodoacetamida 10mM; **IAA**, yodoacetato 5mM y **NEM**, N-etilmaleimida 10mM. Posteriormente se midió la actividad residual de las Rubiscos silvestre (en gris), C172S (en azul), C192S (en rojo) y C172S/C192S (en verde). Se representa el porcentaje de la actividad carboxilasa respecto a la actividad del mismo enzima sin tratar. Las barras de error muestran la desviación típica de triplicados del ensayo de actividad.

El **cobre** ( $\text{Cu}^{2+}$ ), capaz de catalizar la oxidación de los grupos sulfhidrilo mediada por la formación de radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1989) redujo la actividad de la Rubisco silvestre un 30-40%, igual que en el resto de los mutantes (fig.7A). La presencia de CSH no alteró notablemente el grado de inactivación por  $\text{Cu}^{2+}$ . Por tanto, la modificación oxidativa del  $\text{Cu}^{2+}$  sobre el enzima no se revertió por la cisteamina. Además, la alta concentración de tioles en el medio (CSH 40mM) comparada con la concentración de tioles de la Rubisco (del orden de  $\mu\text{M}$ ), no consiguió tamponar el efecto del  $\text{Cu}^{2+}$ .

La incubación con el disulfuro **cistamina** inhibió totalmente la actividad de todas las Rubiscos tras 2 horas de incubación (fig.7B). Sin embargo, se observó una cinética de inactivación más rápida para la Rubisco C192S y C172S/C192S que para las C172S y silvestre (fig.8A). Esto revela la diferente identidad y/o accesibilidad de las cisteínas críticas a los agentes disulfuros en los distintos mutantes tal como se ha discutido en el apartado anterior.

Por otro lado, el disulfuro **DTNB**, agente que intercambia disulfuros con tioles libres, inhibió totalmente la actividad del enzima en 30 minutos (fig.7B y 8D). Sin embargo, en este caso la velocidad relativa de modificación de los distintos enzimas fue algo diferente de la respuesta a CSSC ya que la Rubisco silvestre se inactivó más lentamente que el resto de mutantes.

A diferencia del DTNB y de la CSSC, el **GSSG**, no fue capaz de inhibir a las Rubiscos ni mutantes ni silvestres (fig.7B). Se ha sugerido que la incapacidad de oxidación del GSSG se debe a posibles dificultades estéricas para acceder a los residuos críticos de cisteína (García-Ferris y Moreno, 1993; Moreno y Spreitzer, 1999; Marcus *et al.*, 2003).



**Fig.8.** Cinética de inactivación de las Rubiscos obtenidas del revertiente silvestre (●) y de los mutantes C172S (▲), C192S (■), C172S-C192S (●) incubadas con diferentes agentes modificadores de cisteínas. La Rubisco purificada (0,13mg/ml) se incubó durante 100min a 30°C con diferentes agentes modificadores: CSSC, cistamina 20mM (A); IAM, yodoacetamida 10mM (B); IAA, yodoacetato 5mM (C); DTNB, ditionitrobenzoato 2mM (D). A los tiempos indicados se tomaron muestras y se midió la actividad carboxilasa. Se representa el porcentaje de actividad residual respecto a la actividad del mismo enzima sin tratar.

Se estudió también el efecto de agentes alquilantes tales como el **NEM**, **IAM** e **IAA** (fig.7C). La incubación de las Rubiscos con **NEM** a la concentración ensayada inhibió totalmente la actividad tras 15 min de tratamiento (fig.7C). El efecto de la **IAM** fue también muy rápido para la Rubiscos silvestre, C172S y C192S, mientras que el doble mutante se mostró más resistente (fig.7C y 8C). La incubación con **IAA** provocó una cinética de inactivación más rápida para la Rubisco C192S, mientras que las Rubiscos

C172S y doble mutante se inactivaron de forma notablemente más lenta y la Rubisco silvestre presentó un comportamiento intermedio (fig.7C y 8B). De nuevo se observa una diferente respuesta de los mutantes, causada, probablemente por una diferente accesibilidad de las cisteínas que son críticas en cada caso. En conjunto, cabe destacar que la Rubisco C192S se mostró entre las más sensibles a todos los tratamientos, de acuerdo con la idea de que la cisteína diana podría ser distinta para este mutante, como se ha discutido anteriormente.

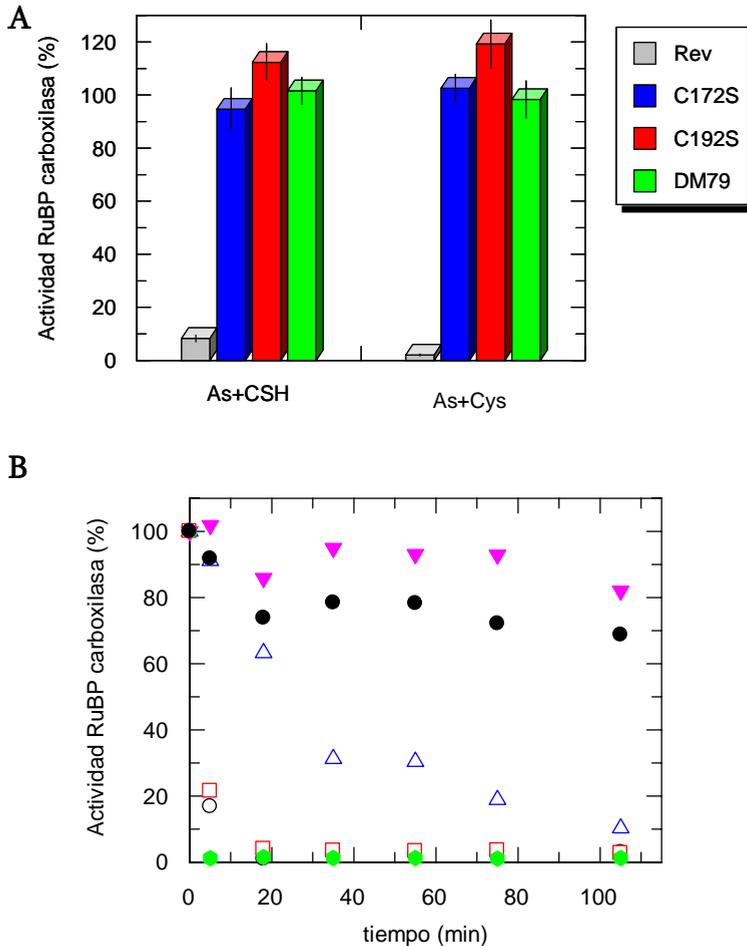
Por otro lado, el comportamiento de la Rubisco C172S/C192S que en ocasiones difiere de la del mutante C172S (caso del tratamiento con CSSC), de la del mutante C192S (tratamiento con IAA), o de ambos (tratamientos con IAM), sugiere de nuevo que la doble mutación tiene un efecto distinto a la simple suma de la mutaciones individuales.

El **arsenito**, un reactivo de ditiolos (Zahler y Cleland, 1968), disminuyó la actividad carboxilasa de la Rubisco silvestre en un 30-40% mientras que la de Rubisco C172S, C192S y C172S/C192S no se modificó significativamente (fig.7A). Esto sugiere que la inactivación parcial de la Rubisco silvestre por el arsenito es debida a la reacción con los residuos vecinos Cys172 y Cys192. Esta inactivación parcial se podría explicar en principio mediante dos supuestos (extremos). Podría ser que la reacción del arsenito con los ditiolos vecinos Cys172 Cys192 causara solo una reducción parcial de la actividad como se ha supuesto en una publicación previa (Moreno y Spreitzer, 1999). O también podría ocurrir que la modificación con arsenito inhibiera totalmente el enzima, pero que solo un porcentaje de los pares Cys172 Cys192 se encuentren en forma de ditiol (susceptibles de reaccionar con arsenito).

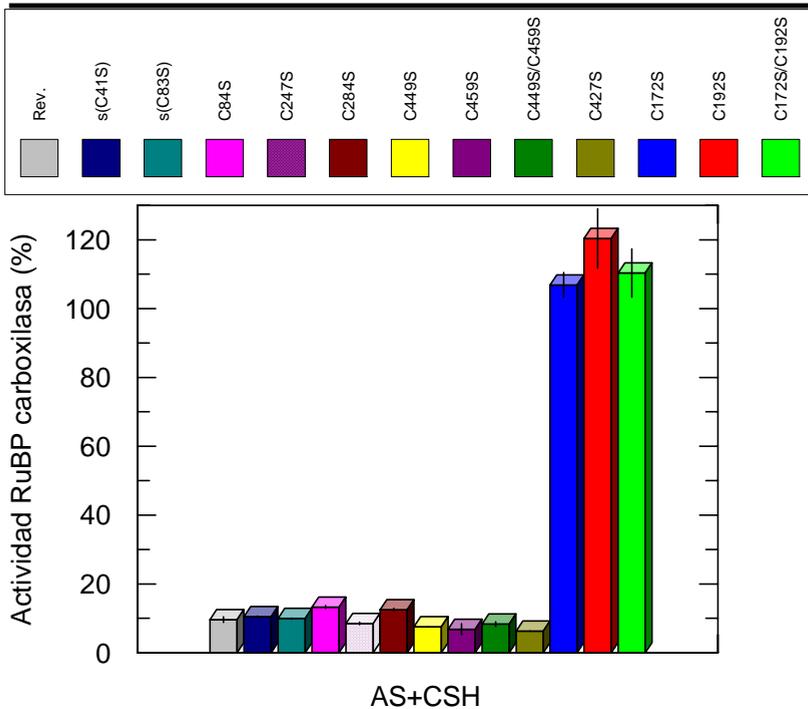
Para discernir entre las dos posibilidades se trató la Rubisco con diferentes agentes reductores de disulfuro (cisteamina, 2-mercaptoetanol,

cisteína, N-acetilcisteína, glutatión reducido), intentando de esta manera reducir todos los pares Cys172-Cys192. La incubación conjunta de arsenito y alguno de los agentes reductores produjo la pérdida total de la actividad carboxilasa del enzima silvestre, sin afectar a los enzimas C172S, C192S y C172S/C192S (fig.9). Solo el GSH, entre todos los agentes reductores ensayados, no consiguió potenciar el efecto inactivador del arsenito. Este resultado apoya la hipótesis de que la reacción del arsenito con el ditiol Cys172-Cys192 inactiva la Rubisco completamente. En el caso del enzima silvestre no reducido, esta modificación se evitaría en un alto porcentaje (sobre un 60-70%) por la existencia de un puente disulfuro previamente formado entre estos residuos. Este puente sería fácilmente reducible por diversos tioles (excepto el glutatión), y además su presencia no afectaría a la actividad enzimática de la Rubisco.

Para comprobar el efecto específico del arsenito sobre el par Cys172 y Cys192, se ensayó la actividad de los extractos crudos de otras cepas de *C.reinhardtii* con mutaciones en cisteínas conservadas de Rubisco, tanto en residuos que pueden formar parte de ditioles (C247S, C449S, C459S, C449S/C459S) como en otros residuos de la subunidad grande (C84S, C284S, C427S), y pequeña [s(C41S), s(C83S)]. En todos estos mutantes se determinó una inhibición total de la actividad en presencia de arsenito y cisteamina, mientras que, como ya se había visto para el enzima purificado, la actividad de los extractos de los mutantes C172S, C192S y C172S/C192S no se afectó en estas condiciones (fig.10). Por tanto, los resultados indican que el efecto inhibitorio del arsenito en condiciones reductoras es debido exclusivamente a su efecto sobre el par Cys172-Cys192.



**Fig.9. Efecto del arsenito en presencia de diferentes agentes reductores de disulfuros sobre la actividad de Rubisco silvestre, C172S, C192S y C172S/C192S (DM79).** **A.** Actividad residual de la Rubisco purificada de cada cepa tras 2h de incubación con NaAsO<sub>2</sub> (As) 2mM junto con CSH 40mM o Cys 2mM. Las barras de error muestran la desviación típica de los triplicados del ensayo de actividad. **B.** La Rubisco purificada de la cepa revertiente se incubó en presencia de NaAsO<sub>2</sub> 2mM solo (●) o junto con CSH 40mM (○), N-Acetilcisteína 2mM (△), Cys 2mM (□), β-EtSH 40mM (●) o GSH 40mM (▼) a 30°C. A los tiempos indicados se tomaron muestras y se midió la actividad carboxilasa. Se representa el porcentaje de la actividad residual respecto a la actividad del mismo enzima en ausencia de tratamiento.



**Fig.10. Efecto del arsenito sobre la actividad de Rubisco en extractos de las cepas revertiente, s(C41S), s(C83S), C84S, C247S, C284S, C449S, C459S, C449S/C459S, C427S, C172S, C192S y C172S/C192S.** Las células se resuspendieron en tampón conteniendo arsenito 2mM y/o CSH 40mM y se sonicaron y tras centrifugación y 1h de incubación a 30°C se midió la actividad carboxilasa residual. Se representa el porcentaje de actividad carboxilasa respecto a la actividad del mismo enzima en ausencia de tratamiento. Las barras de error muestran la desviación típica de seis réplicas del ensayo de actividad.

### **2.5.3. Hipótesis de la modulación redox de la actividad enzimática a través del par Cys172-Cys192**

Los resultados anteriores son consistentes con el esquema de la figura 11. En la Rubisco silvestre activa, las cisteínas 172 y 192 podrían estar o bien reducidas en forma de tioles libres, u oxidadas a través de un puente disulfuro interno. Ambas formas serían igualmente activas desde el punto de vista

catalítico y se encontrarían presentes, en una relación aproximadamente de 1:2, al menos en las preparaciones del enzima purificado. Sin embargo, este par de cisteínas sería altamente sensible al entorno (actuando como un sensor redox) estando reducido en presencia de reductores externos y pasando a oxidarse en condiciones moderadamente oxidantes (en torno  $r=0,7$  de acuerdo con la curva de inactivación redox del mutante C192S). La forma ditiol libre sería susceptible de reaccionar con arsenito, estableciendo de esta manera un puente de arsénico entre los residuos que inactivaría la Rubisco completamente. En ausencia de la Cys172 o Cys192 (en los mutantes), el puente disulfuro interno no podría formarse y la cisteína presente se encontraría libre para formar disulfuros mixtos con cisteamina (u otros tioles de bajo peso molecular) en condiciones levemente oxidantes (por encima de  $r=0,7$ ). En este caso la respuesta sería asimétrica debido a que el disulfuro mixto formado con la Cys172 inactiva el enzima, mientras que el establecido con la Cys192 aparentemente no afecta a la actividad carboxilasa. Cuando la Cys172 está ausente (C172S) o unida a la Cys192 (en la forma silvestre activa), el enzima se inactivaría por un incremento de las condiciones oxidativas (por encima de  $r=1,5$ ) que afectaría a uno o varios residuos de cisteína indeterminado/s (CysX). Debido al efecto protector de la Cys192 sobre la Cys172, la inactivación oxidativa de la Rubisco silvestre estaría causada en última instancia por la modificación de la CysX. Por otro lado, la ausencia del residuo protector Cys192 causaría la especial sensibilidad del mutante C192S a la inactivación oxidativa por modificación del residuo crítico de Cys172.

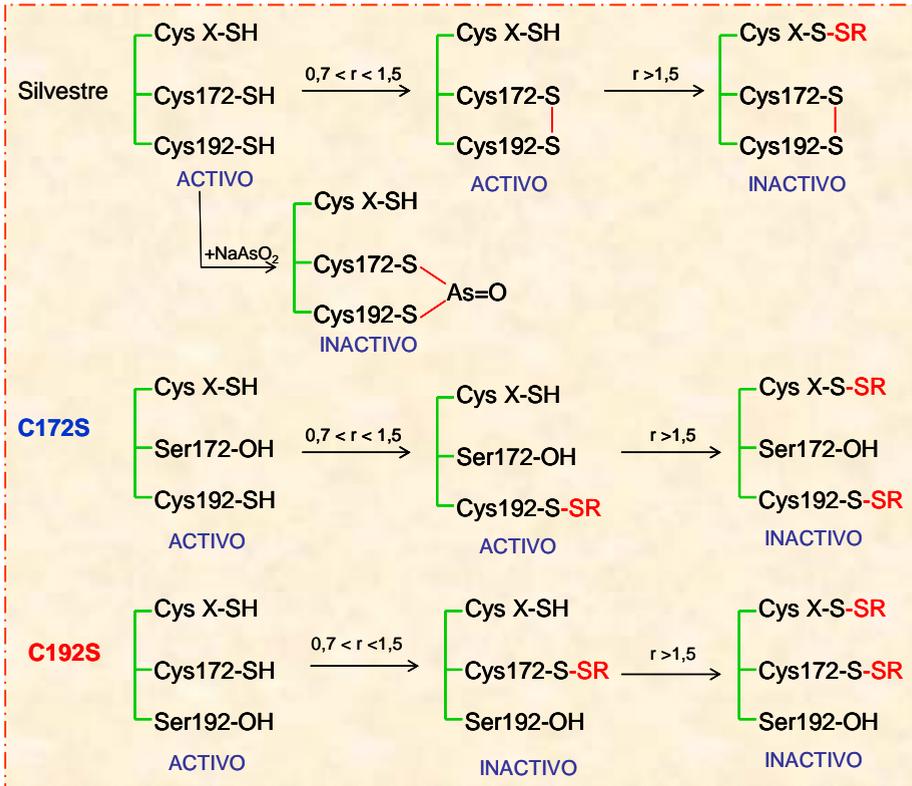
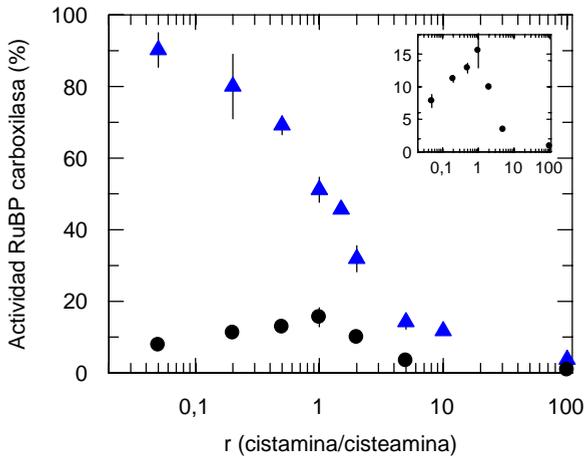


Fig.11. Esquema de modulación redox donde se indican las transiciones oxidativas de las cisteínas de Rubisco y la competencia catalítica de cada estado.

Para contrastar este modelo, la Rubisco silvestre se sometió a tampones redox de diferente relación disulfuro/tiol en presencia de arsenito (fig.12). El enzima se mostró inactivo a lo largo de todo el rango  $r$  excepto en un pequeño pico de actividad alrededor de  $r=1$  (fig.12). Esto debe ser el resultado de la superposición de la inactivación total por la reacción de arsenito con el par de Cys192 Cys172 cuando está reducido (por debajo de  $r=0,7$ ) y la inactivación del enzima a través de la modificación oxidativa de la CysX (por encima de  $r=1,5$ ). Debido a que los valores de  $r$  críticos para la CysX (por encima de  $r=1,5$ ). Debido a que los valores de  $r$  críticos para la Cys172 (sobre 0,7 como se observa en la Rubisco C192S en fig.6) y para la Cys

X (sobre 1,5-2 como se deduce de las curvas C172S y silvestre en la misma figura) son diferentes, cabe esperar una actividad residual que aumente entre estos valores críticos, como de hecho se observa. Como control, la presencia de arsenito no afectó a las curva redox del enzima C192S y C172S (fig.12).



**Fig.12. Inactivación de las Rubiscos purificadas del mutante C172S (▲) y del tipo silvestre control (●) incubadas en tampones redox en presencia de arsenito.** La Rubisco purificada (0,13mg/ml) se incubó como en la fig.6 pero en presencia de arsenito de sodio 2mM. Se representa el porcentaje de actividad residual respecto a la actividad del mismo enzima totalmente reducido en ausencia de arsenito. Las barras de error indican la desviación típica de triplicados del ensayo de actividad. En el inserto se muestra a escala ampliada el pico de actividad de la Rubisco silvestre.

## ***2.6. MODULACIÓN REDOX DE LA SUSCEPTIBILIDAD PROTEOLÍTICA***

Con objeto de estudiar la contribución de los residuos Cys172 y Cys192 a la susceptibilización proteolítica de la Rubisco por oxidación de cisteínas (Peñarrubia y Moreno, 1990; García-Ferris y Moreno, 1993; Moreno y Spreitzer, 1999) se incubaron los enzimas silvestre y mutantes en

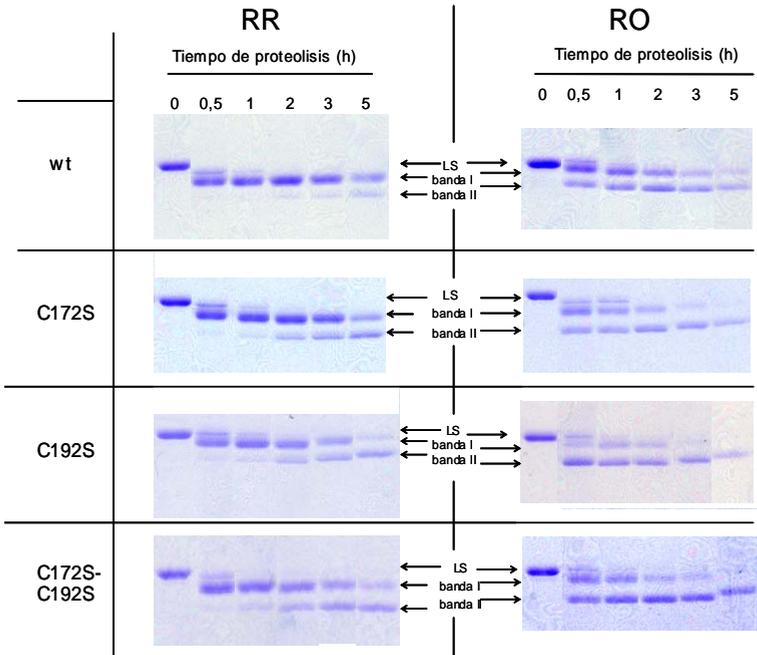
condiciones oxidantes (incubación con CSSC) o reductoras (incubación con CSH) y posteriormente se digirieron con subtilisina.

Como ya se había descrito para el enzima silvestre (Marín-Navarro y Moreno, 2003) la proteólisis de la Rubisco oxidada dio lugar a fragmentos de 53 kDa (banda I) y de 47kDa (banda II), derivados de la subunidad grande, e inmediatamente apreciables desde el comienzo del ensayo (fig.13). Sin embargo, la Rubisco reducida únicamente generó el fragmento de 53kDa (banda I) a tiempos cortos. La banda II (47kDa) solo se detectó a tiempos largos cuando casi toda la subunidad grande de la Rubisco reducida se había procesado previamente a banda I (fig.13). Las bandas electroforéticas I y II consistían en una serie de polipéptidos de masa similar cuyo tamaño convergía hacia un límite inferior al prolongar el tiempo de proteólisis. El tamaño asignado a las bandas I y II corresponde a este límite inferior.

En un trabajo previo (Marín-Navarro y Moreno, 2003) se identificaron las dos regiones en la subunidad grande de la Rubisco susceptibles a la hidrólisis por proteasas de baja especificidad, cuyo corte genera las bandas I y II. Una está localizada en el extremo N-terminal desestructurado (hasta la Lys18) donde ya se había descrito previamente la actuación de otra proteasas de mayor especificidad como la tripsina (Gutteridge *et al.*, 1986). El corte proteolítico en esta zona produce la banda I de forma independiente al estado redox de las cisteínas de la Rubisco. La otra región es un lazo conservado entre los residuos Ser61 y Thr68, cuya sensibilidad proteolítica muestra, por el contrario, una dependencia clara y gradual de la oxidación de las cisteínas de la Rubisco. El corte en este punto genera la banda II (Marín-Navarro y Moreno, 2003).

Al comparar el patrón de proteólisis del enzima silvestre con el de los mutantes en ambas condiciones (oxidadas, reducidas) se detectaron

diferencias, sobre todo en condiciones reductoras. En los enzimas mutantes, la banda II apareció antes y se acumuló en mayor cantidad que en el enzima silvestre (fig.13), lo que parece indicar una mayor facilidad para el corte en el lazo Ser61-Thr 68 que origina la banda II.



**Fig.13. Proteolisis de la Rubisco reducida (RR) y oxidada (RO) purificada de las cepas C172S, C192S, C172S/C192S, y revertiente silvestre (wt) por incubación prolongada con subtilisina.** La Rubisco purificada (0,13mg/ml en tampón de activación) de *C. reinhardtii* tratada previamente 2h con CSH 40mM o CSSC 20mM se incubó a 30°C con subtilisina (0,5µg/ml) durante diferentes tiempos (hasta 5h). Las posiciones de la subunidad grande intacta (LS) y de los fragmento de degradación (banda I y banda II), después de SDS-PAGE, están indicadas con flechas.

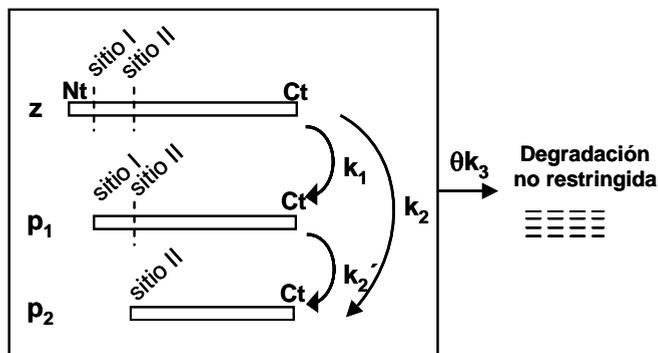
Con el objeto de realizar un análisis cuantitativo de este comportamiento se probó a ajustar los datos de la cinética de proteolisis a un modelo matemático del proceso, elaborado para explicar la degradación del enzima silvestre (Marín-Navarro y Moreno, 2003). El modelo predice la evolución de la cantidad de subunidad grande intacta ( $z$ ), banda I ( $p_1$ ) y banda II ( $p_2$ ) a lo largo del proceso de proteolisis por subtilisina, mediante las siguientes ecuaciones:

$$dz/dt = - (k_1 + k_2 + \theta \cdot k_3) \cdot z \quad \text{ec.1}$$

$$dp_1/dt = k_1 \cdot z - (k_2' + \theta \cdot k_3) \cdot p_1 \quad \text{ec.2}$$

$$dp_2/dt = k_2 \cdot z + k_2' \cdot p_1 - \theta \cdot k_3 \cdot p_2 \quad \text{ec.3}$$

Donde  $k_1$  es la constante de primer orden para la rotura del fragmento N-terminal que produce la banda I ( $p_1$ ) y que actuaría sobre las subunidades intactas ( $z$ ).  $k_2$  y  $k_2'$  son las constantes de primer orden que gobiernan el procesado a banda II de las subunidades intactas o previamente procesadas a banda I, respectivamente. Y  $k_3$  es la constante de desensamblaje del holoenzima que conduce a la degradación no restringida de las subunidades liberadas. Este desensamblaje parece depender de la coincidencia de dos subunidades grandes procesadas a banda II dentro de uno de los cuatro dímeros que integran el núcleo del enzima (Marín-Navarro y Moreno, 2003). Por ello la constante  $k_3$  está modulada por el factor  $\theta = f^2$ , siendo  $f$  la fracción promedio de las subunidades grandes que han sido procesadas en el lazo Ser61-Thr68 (banda II) [ $f = p_2 / (z + p_1 + p_2)$ ]. Las relaciones e interacciones implícitas en las ecuaciones del modelo se resumen en forma esquemática en la fig.14.



**Fig.14. Representación esquemática del procesamiento proteolítico de la subunidad grande de Rubisco por subtilisina de acuerdo con el modelo cinético descrito por las ecuaciones 1-3.** Las flechas (con las constantes cinéticas asociadas) indican las transformaciones postuladas entre la subunidad grande intacta ( $z$ ), los fragmentos de la banda I ( $p_1$ ) y la banda II ( $p_2$ ), y los péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos que se obtienen como resultado de la proteólisis no restringida (representados por pequeños trazos horizontales). Los sitios I y II son los puntos de corte para la generación de las bandas I y II, respectivamente.

Una vez determinadas las cantidades de subunidad grande ( $z$ ) y de sus subproductos detectables, la banda I de 53kDa ( $p_1$ ) y la banda II de 47kDa ( $p_2$ ), durante la degradación de la Rubisco por subtilisina, el sistema de ecuaciones diferenciales (ecuaciones 1-3) se resolvió numéricamente ajustando los valores de las constantes por minimización de la suma de las diferencias entre los valores del modelo y los datos experimentales elevadas al cuadrado. El modelo se ajustó bien a los datos experimentales tanto para la Rubisco reducida como para la oxidada (fig.15) con un coeficiente de determinación global mayor de 0,9 (es decir, el modelo fue capaz de explicar más del 90% de la variación observada). Los valores estimados de las

constantes para la Rubisco reducida y oxidada de los enzimas mutantes y silvestre se muestran en la tabla III.

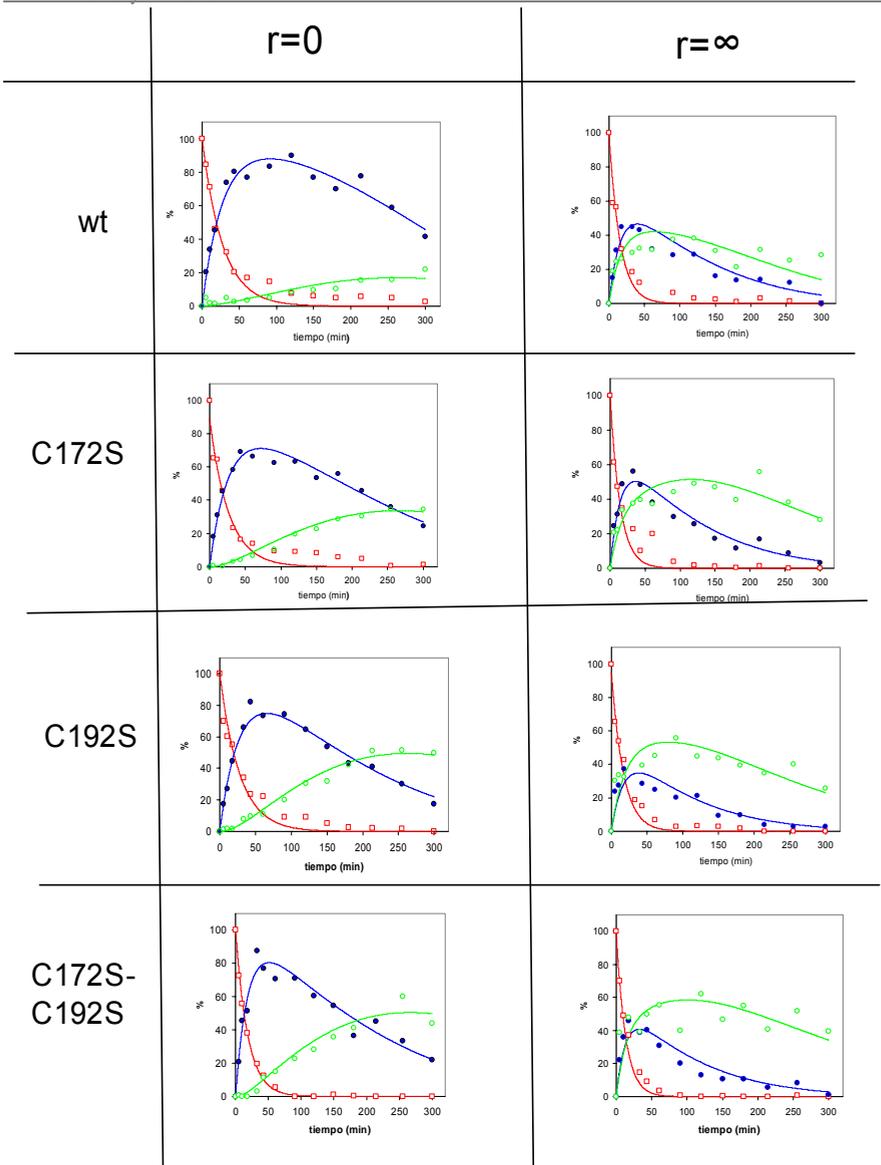
### A

Valores estimados para las constantes de primer orden de Rubiscos reducidas				
Constante cinética	wt	C172S	C192S	C172S-C192S
$k_1$	$36 \pm 2$	$37 \pm 2$	$36 \pm 3$	$53^{**} \pm 4$
$k_2$	$0,2 \pm 1$	$0,1 \pm 0,8$	$0 \pm 0$	$0,0 \pm 0,7$
$k_2'$	$1,0 \pm 0,2$	$3,0^{**} \pm 0,2$	$4,3^{**} \pm 0,2$	$4,2^{**} \pm 0,3$
$k_3$	$68 \pm 16$	$12^{**} \pm 2$	$6^{**} \pm 1$	$5^{**} \pm 3$

### B

Valores estimados para las constantes de primer orden de Rubiscos oxidadas				
Constante cinética	wt	C172S	C192S	C172S-C192S
$k_1$	$37 \pm 6$	$45 \pm 7$	$29 \pm 9$	$40 \pm 9$
$k_2$	$26 \pm 5$	$25 \pm 5$	$30 \pm 12$	$35 \pm 11$
$k_2'$	$3 \pm 1$	$6 \pm 1$	$6 \pm 2$	$7 \pm 2$
$k_3$	$16 \pm 4$	$8 \pm 2$	$8^* \pm 1$	$6^* \pm 1$

**Tabla III. Valores estimados para las constantes cinéticas de primer orden del modelo cinético de proteólisis de la Rubisco silvestre (wt), C172S, C192S y C172S/C192S reducidos (A) y oxidados (B).** Las constantes se calcularon ajustando el modelo a los datos experimentales mediante minimización de la suma de las desviaciones al cuadrado. Se indican los valores  $\pm$  el error estándar expresados en  $\text{min}^{-1}$  y multiplicados por un factor de  $10^3$ . Los valores de las constantes de los mutantes que son significativamente diferentes de los del enzima silvestre se indican en azul con \* ( $P < 0,05$ ) o \*\* ( $P < 0,01$ ).



**Fig.15. Evolución temporal de la subunidad grande intacta (□), de la banda I (●) y de la banda II (○) durante la proteólisis con subtilisina de la Rubisco reducida y oxidada de las cepas silvestre, C172S, C192S, y C172S-C192S.** Las muestras de Rubisco oxidada o reducida se incubaron con subtilisina. Tras detener la reacción a diferentes tiempos, los productos se corrieron en SDS-PAGE. La subunidad grande de la Rubisco intacta y sus fragmentos de proteólisis (banda I y banda II) se cuantificaron de los geles teñidos con azul Comassie. Los valores obtenidos para las bandas I y II se normalizaron respecto a la subunidad completa compensando la pérdida de masa. Todos los valores se representan como porcentajes del contenido inicial de subunidad grande intacta. Las curvas que se ajustan a los puntos experimentales se obtuvieron ajustando los datos al modelo descrito por las ecuaciones 1-3.

En condiciones reductoras, se determinaron diferencias significativas entre todos los mutantes y el enzima silvestre. La constante  $k_2'$ , que mide la aparición del fragmento de 47kDa (banda II) a partir de la banda I, fue significativamente superior en los enzimas mutados ( $P < 0,01$ ), mientras la constante  $k_3$ , que mide la velocidad de desensamblaje, fue significativamente inferior en los enzimas mutados ( $P < 0,01$ ).

Las diferencias observadas indicarían que en condiciones reductoras, el corte en el lazo Ser61-Thr68 está más favorecido en los mutantes que en el enzima silvestre. Sin embargo, la velocidad de desensamblaje y proteolisis no restringida (medida como  $k_3$ ) es inferior en los mutantes. El conjunto de estas dos condiciones favorece la acumulación de banda II en condiciones reductoras. En condiciones oxidantes, se observaron también diferencias similares aunque menos acusadas y con un nivel de significación estadística inferior.

Por otra parte, el doble mutante en condiciones reductoras presentaba una  $k_1$  significativamente superior ( $P < 0,01$ ) al resto de enzimas, indicando una mayor velocidad de rotura del fragmento N-terminal que produce la banda I y que actuaría sobre las subunidades intactas. El hecho de que esta especial sensibilidad en el sitio I solo se manifieste en la Rubisco C172S/C192S sugiere de nuevo que la doble mutación introduce alteraciones estructurales propias, que no se hallan en los mutantes simples.

Los cambios en las constantes cinéticas  $k_2'$  y  $k_3$  que son comunes a todos los mutantes indican que, a pesar de que los enzimas muestren una mayor predisposición al corte en el lazo Ser61-Thr68, el núcleo del enzima es más resistente al desensamblaje y posterior proteolisis no restringida. La dificultad que presentan estos enzimas al desensamblaje podría afectar

también a la estabilidad del enzima *in vivo*, aspecto que se estudiara en otro capítulo.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se han obtenido las cepas fotosintéticamente activas C192S y C172S/C192S por mutagénesis dirigida del gen *rbcl* en *C. reinhardtii*. Estas cepas, junto con la cepa C172S (Moreno y Spreitzer, 1999), se han utilizado como fuente para la purificación de los enzimas mutantes, con objeto de estudiar la contribución de estos residuos de cisteína a la actividad enzimática, estabilidad térmica y modulación redox de la Rubisco. En trabajos previos se ha estudiado la función de la Cys172 en el enzima de *C. reinhardtii* (Moreno y Spreitzer, 1999) y el papel de la Cys172 y Cys192 en la Rubisco de la cianobacteria *Synechocystis* (Marcus *et al.*, 2003) también mediante mutagénesis dirigida de los residuos y la caracterización del fenotipo resultante. Se han observado algunas diferencias entre los resultados con el enzima de *C. reinhardtii* y *Synechocystis*. El análisis de la sensibilidad térmica de los enzimas mutantes de *Synechocystis* puso de manifiesto un comportamiento contrario al mostrado por los enzimas de *C. reinhardtii* [(Moreno y Spreitzer, 1999) y fig.3 y 4] ya que la Rubisco C192A de la cianobacteria fue más termosensible y el enzima C172A presentó una resistencia térmica similar al enzima silvestre. Por otra parte, los parámetros cinéticos de las Rubiscos mutantes de *Synechocystis* comparados con el tipo silvestre no presentaron diferencias similares a las observadas para los enzimas de *C. reinhardtii* (tabla II). Estas diferencias ente los mutantes de *Synechocystis* y de *C. reinhardtii* revelan un distinto efecto estructural de la mutación, probablemente debido a las alteraciones conformacionales

derivadas de las diferencias de secuencia entre las Rubiscos eucariótica y procariótica. No se puede descartar, además, algún efecto derivado de la distinta sustitución realizada en los dos casos (cisteína por serina en *C. reinhardtii*, y cisteína por alanina en *Synechocystis*). Además de estas diferencias de origen estructural, también se detectaron diferencias en el comportamiento redox. El enzima C172A de *Synechocystis* fue más resistente a la inactivación por oxidación con CSSC que el enzima silvestre, diferencia que no se aprecia en los mutantes de *C. reinhardtii* [(Moreno y Spreitzer, 1999) y fig.6 y 8A]. Aun así, el enzima C192A fue más sensible a la oxidación, igual se observa en *C. reinhardtii* (fig.6 y 8A). Esta discrepancia en la sensibilidad del mutante en el residuo Cys172 a la modificación con CSSC seguramente refleja una distinta accesibilidad de las cisteínas críticas y, por consiguiente, depende en último término de las diferencias estructurales ya mencionadas. Por otro lado, se ha descrito que la oxidación del enzima de *Synechocystis* conduce a la disociación de la Rubisco en sus subunidades (Marcus *et al.*, 2003). Esta observación es probablemente fruto del hecho de que, en los experimentos que prueban dicha disociación, la oxidación de la Rubisco de *Synechocystis* se llevó a cabo con DTNB (Marcus *et al.*, 2003), un reactivo voluminoso que al combinarse con las cisteínas puede generar tensiones estructurales. En cambio, se ha demostrado que la oxidación de la Rubisco de *C. reinhardtii* con CSSC inactiva al enzima sin desensamblarlo (Marín-Navarro y Moreno, 2003). Los resultados obtenidos al estudiar la cinética de digestión de la Rubisco por subtilisina indican que todas las mutaciones (C172S, C192S, C172S/C192S) dificultan el desensamblaje inducido por proteolisis (apartado 2.6), lo que puede retrasar el ataque proteolítico de las subunidades intactas a potenciales redox ligeramente

oxidantes, como se ha descrito anteriormente para el enzima C172S (Moreno y Spreitzer, 1999).

En general, los resultados muestran que las mutaciones producen efectos estructurales y redox comunes a los mutantes C172S y C192S (que podríamos llamar efectos simétricos), y otros específicos de la sustitución de una u otra cisteína (efectos asimétricos). Entre los efectos simétricos se han detectado cambios estructurales similares para los mutantes C172S, C192S y C172S/C192S mediante el análisis de la cinética de proteólisis *in vitro*. Dichos efectos podrían estar derivados, en principio, de la existencia en el tipo silvestre de un puente disulfuro. Este puente podría actuar como un sensor redox del ambiente, sería fácilmente reducible por reductores externos (como CSH), y su formación podría, en principio, producir cambios estructurales con posibles funciones reguladoras. Una serie de experimentos apoyan de forma indirecta la existencia, en preparaciones de Rubisco purificada, de una fracción mayoritaria de moléculas en la que se ha establecido un puente disulfuro entre los residuos Cys172 y Cys192. La evidencia más fuerte proviene del hecho de que el efecto inactivador del arsenito se debe exclusivamente a su actuación sobre este par (fig.10), y este efecto se potencia en presencia de agentes reductores (fig.9). La existencia de un puente disulfuro protector entre la Cys172 y Cys192 es la explicación más sencilla de estos resultados. Sin embargo, no se pueden descartar otras hipótesis, como que la potenciación del efecto inhibitor del arsenito se debiera a la combinación de la modificación de los residuos Cys172 y Cys192 por este agente y la reducción de otra cisteína distinta, si bien, no parece que esta última pudiera encontrarse entre los residuos conservados (fig.10). En cualquier caso, la ausencia del puente disulfuro no puede explicar por si sola los efectos simétricos observados en los mutantes, ya que la reducción del

enzima silvestre con CSH no consigue reproducir ni la cinética proteolítica (tabla II) ni la movilidad electroforética de los mutantes (fig.5). Así pues, no parece que la formación del presunto puente disulfuro produzca efectos detectables sobre la estructura que podrían sustentar una acción reguladora.

Por otro lado, también se han observado efectos asimétricos de las mutaciones, en los que, en general, C192S se muestra más sensible a agentes oxidantes y C172S a la inactivación térmica. Ambos resultados postulan un carácter crítico de la Cys172, dotada de un papel estructural propio y cuya modificación inactiva al enzima. El carácter crítico de la Cys172 ya fue postulado hace casi 30 años en base a la inactivación producida por ciertos agentes marcadores de afinidad (Schloss *et al.*, 1978). En los resultados presentados, se observa además una especial sensibilidad a la inactivación producida por modificación de cisteínas del mutante C192S respecto al silvestre. Ello se explicaría por un posible papel protector de la Cys192 sobre la modificación de la Cys172. Así, en el enzima silvestre, la oxidación de la Cys172 se evitaría en condiciones débilmente oxidantes con el establecimiento de un puente disulfuro inocuo con la Cys192, mientras que en condiciones fuertemente oxidantes, la modificación de una/s CysX provocaría la inactivación del enzima. De nuevo, ésta sería la explicación más simple de acuerdo con la hipótesis previa de la posible formación de un disulfuro entre los dos residuos. Sin embargo, también aquí son posibles otras explicaciones, como, por ejemplo, que la sustitución de la Cys192 afecte indirectamente al potencial redox de la CysX u otra cisteína, adelantando la inactivación a condiciones más reductoras.

Por tanto, los efectos simétricos y asimétricos de las mutaciones apuntan a la formación de un puente disulfuro entre Cys172 y Cys192, cuya función parece ser simplemente la protección de la modificación de la Cys172

por agentes modificadores y por tanto el mantenimiento de la actividad enzimática en condiciones débilmente oxidantes.

Finalmente, cabe destacar el aumento en el factor de especificidad del enzima C172S (tabla II) que, aun siendo moderado, debe producir un incremento en la fijación neta de carbono *in vivo* y una disminución del coste energético global de esta fijación. Teniendo en cuenta que la Cys172 es un residuo crítico, que provoca la inactivación de Rubisco cuando se modifica oxidativamente por diferentes agentes, cabe preguntarse por qué está tan altamente conservada y no ha sido sustituida evolutivamente por serina para aumentar la especificidad por el sustrato y la resistencia del enzima a la oxidación. Las únicas desventajas del intercambio de la Cys172 por serina podrían ser una leve desestabilización estructural, que no parece ser relevante a temperaturas fisiológicas (fig.3), y un aumento en las constantes de Michaelis (tabla II). Podría argumentarse que una mayor constante de Michaelis limitaría la velocidad de carboxilación *in vivo* a las concentraciones de CO<sub>2</sub> fisiológicas. Sin embargo, este no parece ser el caso, ya que el mutante C172S crece a la misma velocidad que el silvestre en condiciones fotoautotróficas en medio mínimo (Moreno y Spreitzer, 1999). Aun así, es posible que esta limitación cinética pudiera manifestarse en condiciones de alta luminosidad, en la que la actividad de la Rubisco pasara a gobernar el ritmo de fijación fotosintética. No obstante, pueden existir otras razones adicionales o alternativas para la conservación de la Cys172. Quizá es precisamente la capacidad de actuar como un interruptor activado por la oxidación, formando parte de un diseño más amplio de control redox de la fijación de CO<sub>2</sub> y recambio de la Rubisco, lo que ha evitado la sustitución de este residuo a lo largo de la evolución.

## *CAPÍTULO II*

---

### *DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LAS RUBISCOS C172S Y C192S POR DIFRACCIÓN DE RAYOS X*



## **1. OBTENCIÓN DE CRISTALES DE RUBISCO**

Para determinar la base estructural de las propiedades de las Rubiscos

Por otro lado, también se probaron diversas estrategias para la obtención de cristales de Rubisco silvestre modificada con arsenito en condiciones reductoras, oxidada con cistamina, o incluso modificada con diferentes relaciones redox ( $r$ ) cistamina/cisteamina. Para ello se intentó cristalizar la Rubisco modificada, modificar la proteína una vez cristalizada pasando el cristal a una gota equilibrada con los reactivos, y promover el crecimiento de microcristales en presencia de los modificadores. Aunque se obtuvieron algunos cristales, ninguno difractó a una resolución suficiente para poder obtener la estructura.

## **2. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS MUTANTES C172S Y C192S**

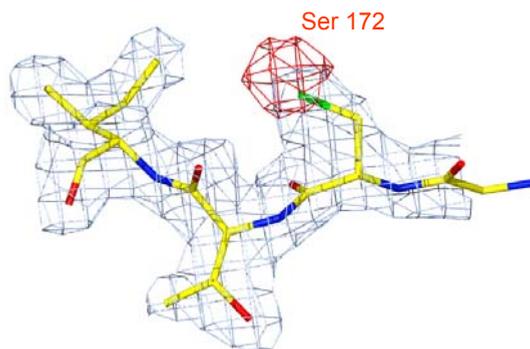
En primer lugar se analizaron los cristales de los mutantes C172S y C192S a 2,9 y 2,6 Å de resolución respectivamente. Después se pudo mejorar la resolución a 2,3 Å de la estructura del mutante C172S al analizar un nuevo cristal. Las dos estructuras del enzima C172S fueron muy similares, por lo que se mostrará únicamente el resultado obtenido con los datos de mayor resolución. El análisis de los datos y determinación de la estructura se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Inger Andersson (Universidad Agrícola Sueca en Uppsala).

Para el procesado de los datos se utilizaron los programas DENZO-SCALEPACK. En ambos casos, la celda unidad presentaba simetría  $p2_1$  con 1 molécula por unidad asimétrica. Como ya se disponía de las fases de la proteína silvestre, se realizó reemplazamiento molecular para la obtención de las fases. Se utilizó el programa REFMAC v.5 (Murshudov *et al.*, 1997) para el refinamiento usando una función de máxima probabilidad con restricciones en la simetría no cristalográfica para las ocho copias de la subunidad grande y

pequeña de la unidad asimétrica y se añadieron las moléculas de agua. Se realizó un refinamiento iterativo realizando múltiples ciclos de cálculo de nuevos mapas de densidad electrónica y construcción del modelo hasta que el modelo construido fue consistente con los datos observados. El proceso se siguió mediante los indicadores  $R_{\text{factor}}$ ,  $R_{\text{libre}}$  y otros parámetros estructurales que indican si el modelo es químicamente, esteroquímicamente, y conformacionalmente razonable. Los datos cristalográficos y la estadística del refinamiento de las estructuras de los enzimas mutados se resumen en la tabla I.

Los bajos valores de  $R_{\text{crist}}$  y  $R_{\text{libre}}$ , las pequeñas desviaciones de la geometría ideal, y la escasez de puntos anómalos en el diagrama de Ramachandran son factores que indican la calidad de la estructura.

Los mapas iniciales de densidad electrónica, calculados después de una ronda de refinamiento, mostraron claramente la presencia de los residuos sustituidos en los enzimas mutantes C192S y C172S (fig.2).



**Fig.2.** Mapa de densidad electrónica para los mapas ponderados sigma A ( $2mF_o-DF_c$  en gris y  $mF_o-DF_c$  en rojo) alrededor del residuo mutado Ser172 en el mutante C172S.

	C172S	C192S
<b>A. Obtención de los datos</b>		
Haz	ID 14-3 (ESRF)	I711 (MAX-lab)
Longitud de onda (Å)	0,931	1,098
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>
Dimensiones de la celda		
a; b; c (Å)	120,2; 178,3; 122,6	120,8; 178,2; 122,9
β(°)	117,9	117,8
Número de reflexiones		
medidas	2.183.919	1427.251
únicas	240.796	133.813
Completitud %	89,8 (89,8)	88,8 (88,2)
Mosaicidad	0,65	0,95
I/σ	7,7 (1,9)	10,4 (3,2)
R <sub>merge</sub>	0,156 (0,436)	0,124 (0,327)
<b>B. Estadísticas del refinamiento</b>		
Rango de resolución (Å)	25-2,3	25-2,65
R-factor	0,183	0,204
R <sub>libre</sub>	0,220	0,244
Factor B Wilson B <sub>w</sub> (Å <sup>2</sup> )	19,5	41,5
Número de moléculas y átomos refinados		
átomos de proteína	38236	38292
moléculas de CABP	8	8
átomos de Mg <sup>2+</sup>	8	8
moléculas de agua	1842	1681
moléculas de etilenglicol	58	43
Desviación r.m.s del ideal		
longitud de enlace (Å)	0,013	0,018
longitud de ángulo (°)	1,3	1,9
Diagrama de Ramachandran		
más favorecidos (%)	92,7	90,9
adicionalmente permitidos (%)	6,6	8,6
generosamente permitidos (%)	0,5	0,3
no permitidos (%)	0,3	0,3

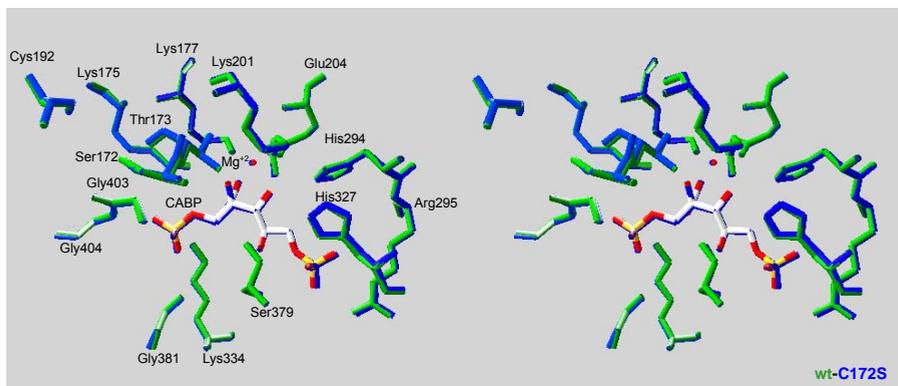
**Tabla I. Datos estadísticos del refinamiento, procesado y recolección de los datos.** Los números entre paréntesis indican los valores obtenidos con los datos de mayor resolución. R<sub>merge</sub> se calculó como  $\frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I_i(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$ , donde I es la intensidad observada e  $\langle I \rangle$  es la intensidad media de la de la reflexión h. Y el factor R se calculó como  $\frac{\sum_{hkl} ||F_o| - |F_c||}{\sum_{hkl} |F_o|}$  donde F<sub>o</sub> y F<sub>c</sub> son las amplitudes de los factores de estructura observados y calculados, respectivamente. El diagrama de Ramachandran se calculó usando el programa PROCHECK (Laskowski *et al*, 1993).

El modelo final después del refinamiento consistió en 8 subunidades grandes, 8 subunidades pequeñas, 8 iones  $Mg^{+2}$ , 8 moléculas del análogo de transición CABP y un número de moléculas de agua y del crioprotector etilenglicol. La estructura L8S8 consistía en 8 grupos  $LiS_1$  relacionados por simetría no cristalográfica (4:2:2). El mapa de densidad electrónica final define los residuos 11-475 (del total de 475 residuos) de la subunidad grande y los residuos 1-140 (del total de 140 residuos) de la subunidad pequeñas en ambos mutantes. En todas las subunidades del hexadecámero se observó una densidad electrónica completa para estos residuos. Esto indica que la simetría no cristalográfica se cumple estrictamente como ya se había observado para el enzima silvestre (Taylor *et al.*, 2001). La región N-terminal de la subunidad grande es una zona muy flexible y por tanto es difícil obtener la información total de esta zona. En algunas cadenas de la subunidad grande de las estructuras C172S y C192S, la densidad electrónica definió los residuos 8-10, pero los residuos 1-8 no fueron resueltos debido a su alta movilidad.

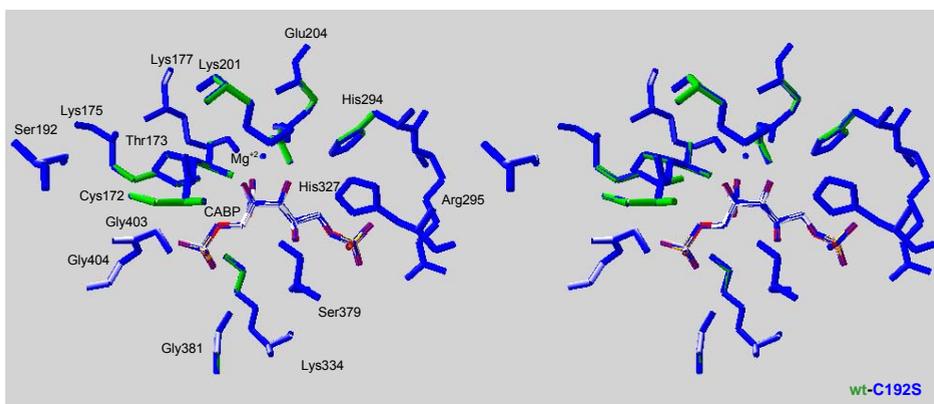
En las estructuras de los enzimas mutantes se observó claramente el grupo carbamilo en la Lys201 y también se pudo observar la modificación de residuos (hidroxiPro 104 y 151 y metilCys 256 y 369) característica del holoenzima de *C. reinhardtii* (Taylor *et al.*, 2001; Mizohata *et al.*, 2002).

La superposición de las estructuras C172S y C192S con la silvestre no mostró, en general, grandes diferencias de estructura. Las desviaciones cuadráticas medias calculadas usando los algoritmos del programa O para todos los **átomos C $\alpha$**  del enzima C172S y C192S fueron de 0,314 y 0,194 Å respectivamente. El análisis del **centro activo** y de las interacciones entre el CABP y los residuos que le rodean no puso de manifiesto diferencias notables entre los mutantes (C172S y C192S) y el enzima silvestre. En la fig.3 se muestra la superposición de los centros activos.

A

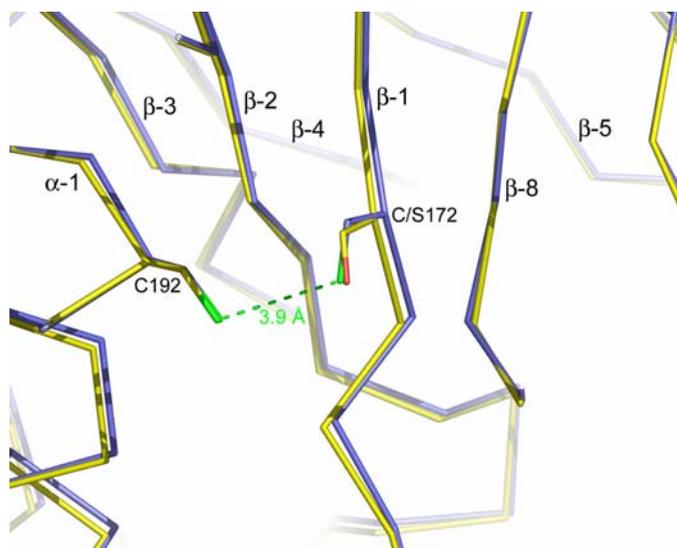


B



**Fig.3. Diferencias estructurales alrededor de los residuos 172 y 192 y el centro activo en los mutantes C172S (A) y C192S (B) (en azul) relativas al silvestre (1GK8) (en verde).** Superposición estereoscópica realizada con el programa Swiss Pdb viewer.

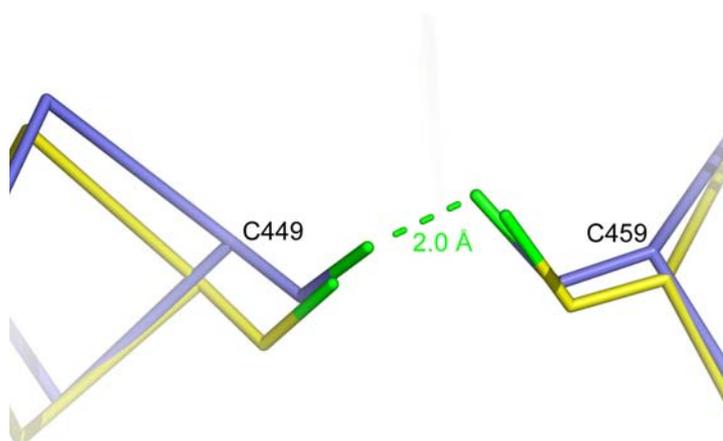
Una inspección más detallada de la comparación de las estructuras revela que la cadena principal de los residuos **170 a 174 está desplazado** unos 0,4 Å en la estructura del **C172S** comparada con la estructura del silvestre. Este desplazamiento es mayor que la desviación media para esta hebra  $\beta$  (hebra  $\beta 1$  del barril  $\alpha/\beta$ ) y también mayor que el de la media de todas las hebras del barril  $\alpha/\beta$  (media del desplazamiento 0,2Å) (fig.4). Este tipo de desplazamiento ya se había observado también en la estructura de C172S obtenida a 2,9Å de resolución, por lo que no parece ser un artefacto del cristal o del procesamiento. Para el enzima C192S no se observó esta desviación.



**Fig.4. Desplazamiento de la hebra  $\beta 1$  en el mutante C172S relativo al enzima silvestre.** Se muestra el trazo  $C\alpha$  mostrando las hebras del barril  $\alpha/\beta$ . En el enzima silvestre (1GK8) los átomos de carbono se muestran en azul, y los del enzima C172S en amarillo.

La distancia entre los átomos de azufre de los residuos 172 y 192 en la estructura del enzima silvestre es de 3,9 Å. Esta distancia y la posición relativa de las dos cisteínas no parecen compatibles con la conformación requerida para la formación de un enlace disulfuro. En la estructura de los mutantes C172S y C192S, las distancias entre el oxígeno y el azufre (Cys172-Ser192, Ser172-Cys192) son incluso algo mayores, 4 Å, en ambos casos.

Otra región que muestra una pequeña variación estructural entre los enzimas C172S, C192S y el enzima silvestre es la localizada entre los **residuos 438 y 466** (sobre todo los residuos 450 y 451 y algunas cadenas laterales). Esta región está localizada entre la hélice  $\alpha 8$  del barril  $\alpha/\beta$  y el extremo C-terminal flexible que se cierra sobre el centro activo durante la catálisis. En esta región se hallan las cisteínas 449 y 459. La distancia entre los átomos de azufre de las cisteínas 449 y 459 (2,0 Å) y sus conformaciones en el enzima silvestre (estructura 1GK8) son ideales para la formación del disulfuro (Taylor *et al.*, 2001). Sin embargo, este par de cisteína está más distanciado en los mutantes, 2,9 Å en C192S y 2,4 Å en C172S (fig.5). Por tanto, la sustitución de la Cys172 o la Cys192 podría provocar un cambio estructural que se propagaría a través de unos 19Å al dominio C-terminal de la subunidad grande, distanciado el par Cys449 Cys459.



**Fig.5. Región de los residuos Cys449 y Cys459 en el enzima silvestre (1GK8) y en el mutante C172S.** El enzima silvestre se muestra en azul, y los átomos del enzima C172S se muestran en amarillo. En los mutantes C172S y C192S la distancia entre los átomos de azufre es de 2,4 Å y 2,9 Å respectivamente, distancia no compatible con el establecimiento de un puente disulfuro.

## DISCUSIÓN

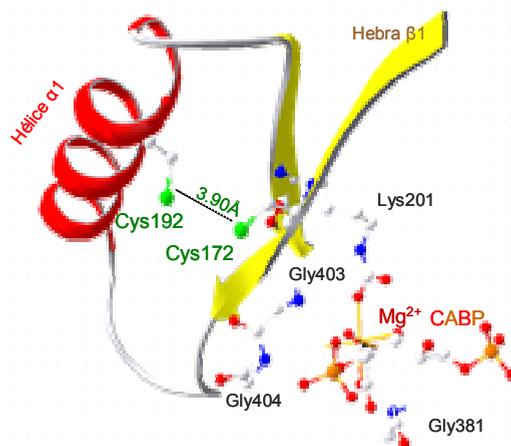
Las proteínas mutantes analizadas presentan únicamente cambios de cisteínas por serinas a nivel de secuencia, lo que implica la sustitución de un único átomo, de oxígeno por azufre. El objetivo de estas mutaciones era eliminar las propiedades redox características del grupo tiol sin afectar notablemente a la estructura y función enzimática de la Rubisco. En este sentido, la determinación de las estructuras de los mutantes C172S y C192S demuestra que los cambios conformacionales son mínimos. Sin embargo, algunas de las propiedades distintivas (no redox) de la proteína C172S (mayor termosensibilidad, alteración de los parámetros cinéticos) deben tener una base estructural, que podría residir en el ligero cambio observado.

El residuo Cys172 está localizado en el medio de la hebra  $\beta$ 1 del barril  $\alpha/\beta$  de la subunidad grande. La Cys172 se encuentra muy cerca del centro activo: su  $C\alpha$  está a 8,12Å del ion  $Mg^{+2}$ , la distancia  $C\alpha-P_1CABP$  es 7,31Å y la  $C\alpha-O_2P_1CABP$  es 6,05Å (fig.3). Además, se encuentra a menos de 6Å de los residuos Thr173 (que interacciona con el sustrato), Gly403 y Gly404 (que unen  $P_1$ ) y de la Lys201 carbamylada (encargada de complejar el  $Mg^{+2}$  y unir el  $CO_2$  activador). Debido a su posición, la sustitución de la Cys172 podría afectar indirectamente a residuos del centro activo. Tales perturbaciones, aunque sutiles, podrían tener notables consecuencias para la cinética de la reacción. De hecho, la sustitución de cualquiera de los dos residuos flanqueantes, Gly171 o Thr173, en la Rubisco de *C. reinhardtii*, anula la actividad carboxilasa (Spreitzer, 1993). El análisis de difracción de rayos X del mutante C172S indica que la sustitución por serina en la posición 172 causa un cambio significativo de la cadena principal de los átomos de la hebra  $\beta$ 1 del barril  $\alpha/\beta$ . Este cambio es probable que perturbe la geometría del centro activo así como la posición individual de los residuos del centro activo. En concreto, es probable que el desplazamiento de la hebra  $\beta$ 1 afecte a las interacciones de la Thr173, que establece un puente de hidrógeno con el hidroxilo del C2 del sustrato en la forma enodiol (Li 2005 *et al.*) y de la Lys175 (situada en el extremo de dicha hebra), la cual participa como aceptor secundario del protón para generar la forma reactiva enediolato de RuBP (Cleland *et al.*, 1998).

Se ha observado que otras sustituciones en la zona cercana a las Cys172 y Cys192, pero alejadas del centro activo, también afectan a la termosensibilidad y los parámetros cinéticos de la Rubisco (Smith y Tabita, 2004). La Gly179 está localizada en un tramo de 7 aminoácidos muy conservados que forman el lazo entre la hebra  $\beta$  donde está la Cys172 y la

hélice  $\alpha$  donde está la Cys192, cerca de la interfaz entre las subunidades grandes. La sustitución del residuo equivalente en *Synechococcus* por aspártico o asparagina afecta a la actividad carboxilasa del enzima, y a la afinidad por el CO<sub>2</sub> y por RuBP, pero el factor de especificidad no se altera. Los cambios en esta región parecen afectar a la interfaz entre las dos subunidades, y se traducen en cambios conformacionales, que afectan a la estabilidad térmica y parámetros cinéticos del enzima.

Por otro lado, el residuo Cys192 que está localizado en la hélice  $\alpha_1$  del barril  $\alpha/\beta$ , se encuentra más alejado del centro activo, pero relativamente cerca de algunos residuos relevantes: a 7Å de la Thr173 y la Gly404 y a 8Å de la Lys175, la Lys201 carbamilada y la Gly403 (fig.6). Sin embargo, la mutación C192S no provoca cambios estructurales detectables alrededor del centro activo y, consecuentemente produce menores alteraciones en las propiedades catalíticas (capítulo I, tabla II).



**Fig.6.** Localización de las Cys172 y Cys192 en relación al análogo del sustrato (CABP) y a otros residuos relevantes del centro catalítico del enzima silvestre.

Por último, no se puede descartar la posibilidad de que los cambios estructurales responsables de la variación de los parámetros cinéticos no sean perceptibles en las estructuras determinadas, bien por la presencia de CABP (un análogo no metabolizable del sustrato que facilita la visualización de las interacciones relevantes para la catálisis y ayuda a la cristalización, pero que también fija el centro catalítico en sólo una de sus posibles conformaciones), o bien porque dichos cambios residen en pequeñas diferencias solo detectables en una estructura obtenida a gran resolución. De hecho, algunos resultados obtenidos con el mutante C192S y descritos en el capítulo anterior (como los referentes al análisis cinético de la proteólisis con subtilisina o a la movilidad electroforética anómala en condiciones nativas) indican la existencia de alguna alteración conformacional, que no ha sido detectada en la estructura obtenida por difracción de rayos X en las condiciones realizadas y al nivel de resolución alcanzado.

El análisis de las estructuras de las Rubiscos de diferentes especies muestra que las Cys172 y Cys192 de la subunidad grande están próximas, aunque en la mayoría de los casos no lo suficientemente cercanas para que se establezca un puente disulfuro (Andersson y Taylor, 2003). En el caso concreto de *C.reinhardtii* la estructura de Rubisco silvestre (Taylor *et al.*, 2001; Mizohata *et al.*, 2002) muestra la presencia de cisteínas libres 172 y 192 en el mapa de densidad electrónica. Además, la geometría de las cisteínas en la Rubisco activada no es adecuada para el establecimiento de un puente disulfuro (fig. 6). Por tanto, la formación del enlace disulfuro en condiciones oxidativas requeriría un desplazamiento significativo del esqueleto peptídico de los residuos. De hecho, se sabe que la modificación oxidativa de cisteínas inducen cambios conformacionales en la Rubisco (Marín-Navarro y Moreno, 2003). Además, el enlace disulfuro entre la Cys172 y Cys192 parece ser

posible cuando la Rubisco está decarbamilada, como se observó en el enzima inactivo de tabaco (Curmi *et al.*, 1992). En este sentido, la presencia del CABP unido al enzima carbamilado durante la cristalización podría condicionar la estructura dificultando el posible puente disulfuro. Por todo ello, no se puede descartar la formación en determinadas condiciones de un puente disulfuro entre Cys172 y Cys192 tal como se ha postulado en el capítulo anterior. El establecimiento de este enlace disulfuro podría tener, en principio, relevancia estructural, catalítica y/o reguladora. Los resultados del capítulo anterior sugieren, sin embargo, que el presunto puente disulfuro no afecta sensiblemente a la actividad y tampoco contribuye de forma notable a la estabilidad estructural. Algunos autores han propuesto que la oxidación de la Cys172-Cys192 podría ser la responsable del cambio de conformación que provoca la exposición de una región con similitud a dominios de unión a RNA (Yosef *et al.*, 2004). Esta zona de unión se encuentra localizada en la interfaz entre el dominio N-terminal (1-150) y el lazo formado por los residuos 354 a 364 del dominio C-terminal y se ha propuesto que su exposición en condiciones oxidantes podría detener la traducción al unirse a su mensajero (Yosef *et al.*, 2004). El examen de la estructura de nuestros mutantes indica que la sustitución de la Cys172 o Cys192 no parece afectar a la conformación de esta zona, al menos en las condiciones reductoras en las que se obtuvieron los cristales.

Es posible incluso que las propiedades redox se vean afectadas por cambios estructurales a larga distancia. Así, la sustitución de la Cys172 o Cys192 produce en ambos casos un alejamiento de los átomos de azufre de otra pareja de cisteínas, la Cys449 y Cys459, localizados a unos 2nm del residuo sustituido. El distanciamiento de estas cisteínas es probable que afecte a su potencial redox y a la capacidad de establecer un enlace disulfuro entre

ellas. Por tanto, se podría postular la existencia de una conexión estructural entre ambos centros redox y, consecuentemente, cabría la posibilidad de que algunos de los efectos redox producidos por la mutación C172S y C192S se debieran en realidad a la alteración de las propiedades redox de los residuos Cys449 y Cys459. Sin embargo, el estudio de los mutantes C449S, C459S y C449S/C459S (Marín-Navarro, 2004) y la utilización de éstos como control en algunos experimentos de esta tesis, descarta esta posibilidad. Por otro lado, el análisis de las distintas estructuras descritas de Rubisco de *C. reinhardtii* (enzima silvestre y diferentes mutantes) y de otras especies demuestra una enorme variabilidad de la distancia entre la Cys449 y la Cys459, mucho mayor que la observada entre la Cys172 y la Cys192 (tabla II).

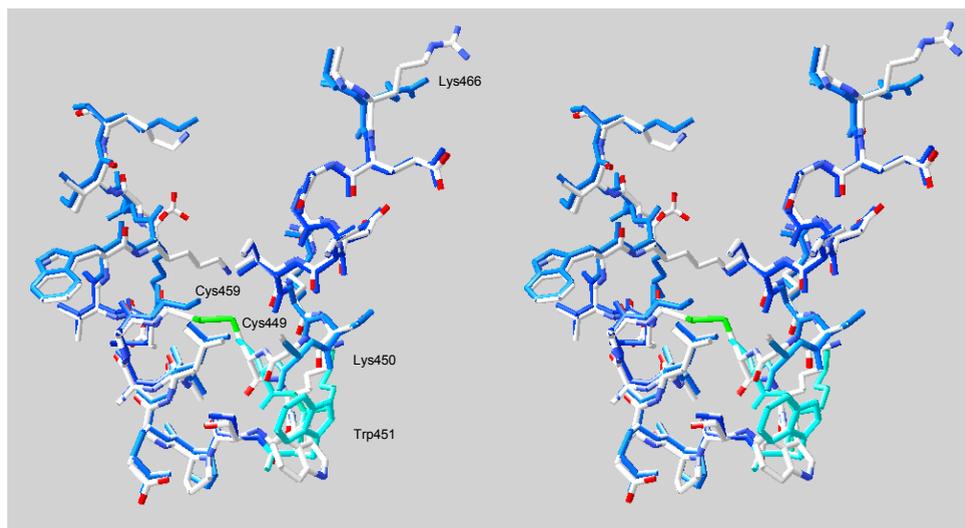
Esta variabilidad se pone de manifiesto incluso entre las dos estructuras descritas para la Rubisco silvestre de *C. reinhardtii* (códigos PDB 1GK8 y 1IR2) (fig.7). A diferencia de la estructura 1GK8, en la que las Cys449 y Cys459 se hallan enlazadas, en la estructura 1IR2, los azufres de los residuos Cys449 y Cys459 se encuentran a 3,47 Å (tabla II), distancia no compatible con el establecimiento de un puente disulfuro. Por tanto, la mayor distancia entre Cys449 y Cys459 observada en los mutantes C172S y C192S respecto a la estructura del enzima silvestre con el que se compara (1GK8) parece ser debida a la variabilidad conformacional inherente de esta zona. Esta variabilidad podría ser resultado de la posible influencia de las condiciones de cristalización (Karkehabadi *et al.*, 2005) o del efecto fotorreductor de los rayos X durante la toma de datos del cristal (Weik *et al.*, 2000).

Rubisco	Distancia S-S (Å)			Reductor	Ligando	Ion	Grupo espacial	Fuente	Ref.
	172-192	449-459							
<i>C.reinhardtii</i>									
wt ( <i>1GK8</i> )	3,86	<b>2,02</b>	DTT	CABP	Mg <sup>2+</sup>	C2	ESRF	(Taylor <i>et al.</i> , 2001)	
wt ( <i>1IR2</i> )	3,90	3,47	DTT	CABP	Mg <sup>2+</sup>	P2 <sub>1</sub>	PF	(Mizohata <i>et al.</i> , 2002)	
C172S	4,06(O-S)	2,41	β-EtSH	CABP	Mg <sup>2+</sup>	P2 <sub>1</sub>	ESRF		
C192S	4,05(S-O)	2,91	β-EtSH	CABP	Mg <sup>2+</sup>	P2 <sub>1</sub>	Lund		
ABSO ( <i>1UZD</i> )	3,71	2,85	β-EtSH	CABP	Mg <sup>2+</sup>	P2 <sub>1</sub> :2 <sub>1</sub> :2	ESRF	(Karkehabadi <i>et al.</i> , 2005)	
ABAN ( <i>1UZH</i> )	3,86	<b>2,04</b>	β-EtSH	CABP	Mg <sup>2+</sup>	P2 <sub>1</sub> :2 <sub>1</sub> :2	ESRF	(Karkehabadi <i>et al.</i> , 2005)	
L290F ( <i>1UWA</i> )	3,76	<b>2,07</b>	β-EtSH	CABP	Mg <sup>2+</sup>	P2 <sub>1</sub>	Lund		
L290F/A222T ( <i>1UW9</i> )	3,85	3,44	DTT	CABP	Mg <sup>2+</sup>	P2 <sub>1</sub>	ESRF		
Espinaca ( <i>1IR2</i> )	3,97	-	DTT	CABP	Mg <sup>2+</sup>	C222 <sub>1</sub>	PF	(Mizohata <i>et al.</i> , 2002)	
Tabaco									
( <i>3RUB</i> )	<b>2,13</b>	3,33	?	-	SO <sup>4-</sup>	I422	NLS	(Curmi <i>et al.</i> , 1992)	
( <i>1EJ7</i> )	3,12	3,77	β-EtSH	-	PO <sup>4-</sup>	I422	Nonius	(Duff <i>et al.</i> , 2000)	
( <i>1RLC</i> )	<b>2,48</b>	3,26	?	CABP	-	I423	CuKα	(Zhang <i>et al.</i> , 1994)	
( <i>4RUB</i> )	3,58	<b>2,37</b>	?	CABP	Mg <sup>2+</sup>	P3 <sub>1</sub> :2 <sub>1</sub>	NLS	(Suh <i>et al.</i> , 1987)	
Arroz ( <i>1WDD</i> )	3,83	3,55	?	CABP	Mg <sup>2+</sup>	I4	PF		

**Tabla II. Condiciones de cristalización y distancias entre los azufres de las Cys449 y Cys459, y de las Cys172 y Cys192 en diferentes estructuras de Rubisco.** En azul se muestran las distancias en las que se postula el establecimiento de un puente disulfuro entre esas cisteínas.

Por último, cabe destacar que la estructura del doble mutante C172S/C192S parece ser distinta ya que no se consiguió cristalizar en las condiciones en las que se obtuvieron cristales para el enzima silvestre y el resto de mutantes. Por tanto, el comportamiento de este enzima podría estar condicionado, no sólo por la doble sustitución de las cisteínas, sino

también por un cambio estructural particular. El análisis del comportamiento redox y de la cinética de proteólisis del doble mutante presentado en el capítulo anterior está de acuerdo con esta suposición.



**Fig.7. Desplazamiento de los residuos 438-466 en las estructuras silvestres.** Se muestra coloreado en código de colores CPK (oxígenos en rojo, nitrógeno en azul, azufres en verde, carbonos en blanco) la estructura 1IR2 y en azul según la desviación cuadrática media (una gama de azul más claro indica mayor desviación) la estructura 1GK8. La desviación cuadrática media de la superposición del C $\alpha$  es de 0,59Å, mientras que la de todos los átomos es de 1,4Å. Se identifican los residuos donde se observa mayor desplazamiento. Superposición estereoscópica realizada con el programa Swiss pdb viewer.

### *CAPÍTULO III*

---

#### *ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LOS MUTANTES A DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS*

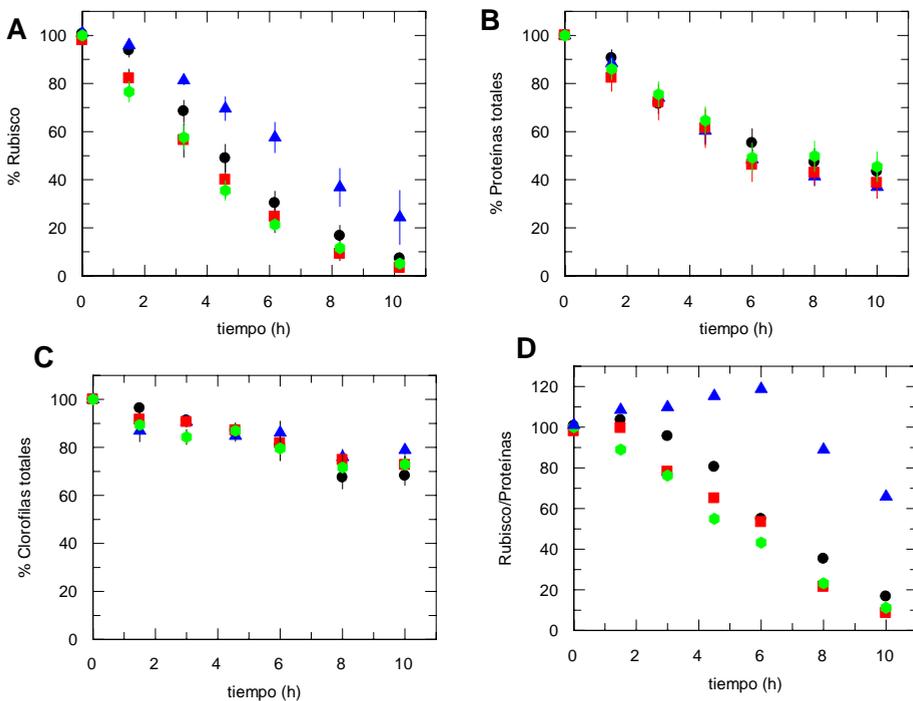


Para estudiar la función *in vivo* de los residuos Cys172 y Cys192 en condiciones que inducen la degradación de Rubisco, se escogió por una parte un **estrés oxidativo** inducido por diamida 2mM, que actúa específicamente sobre los grupos sulfhidrilo, y un estrés más general (**estrés salino** con NaCl 0,3M) de carácter iónico y osmótico, pero que produce también indirectamente efectos oxidativos. El agente oxidante de grupos sulfhidrilo diamida (1,1'-azobis(*N,N*-dimetilformamida)) penetra en la célula y causa estrés oxidativo al convertir el glutatión intracelular de la forma reducida a la oxidada (Kosower y Kosower, 1995). La diamida induce la oxidación de gran cantidad de proteínas (Ghezzi *et al.*, 2002). Reacciona con los grupos -SH, dando complejos Proteína-S-diamida, que después se combinan con el GSH para producir disulfuros Proteína-S-SG (Di Simplicio *et al.*, 1996). El estrés salino, provoca a su vez un estrés osmótico que promueve la oxidación de grupos sulfhidrilo de Rubisco *in vivo* (Ferreira y Shaw, 1989). Además, el estrés salino provoca en los cloroplastos un aumento en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de la peroxidación de lípidos, característicos de un estrés oxidativo (Hernández *et al.*, 1995).

## 1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LOS MUTANTES SOMETIDOS A ESTRÉS SALINO

En el cultivo revertiente, el nivel de Rubisco se redujo a la mitad tras 4,5h de tratamiento con NaCl 0,3M. Después de 10h de estrés, la Rubisco había desaparecido prácticamente de las células revertientes (fig.1A). La desaparición de las proteínas totales fue más lenta, llegándose a degradar solo el 60% de las proteínas a lo largo de las 10h de estrés (fig.1B). La cinética de degradación de las proteínas fue más rápida a tiempos iniciales y a partir de las 6h se ralentizó el proceso. Al representar la relación de Rubisco/proteínas

totales se observó una disminución progresiva de esta relación. Ello indica que la Rubisco de células revertientes sufrió una degradación preferente respecto al resto de proteínas, tal y como se había descrito para otros estreses. El contenido de clorofilas apenas disminuyó un 30% en el mismo intervalo (fig. 1C). Esto indica que en el tiempo de estrés estudiado no se produjo un desmantelamiento masivo de las estructuras tilacoidales del cloroplasto.



**Fig. 1. Seguimiento del estrés provocado por NaCl 0,3 M en las cepas revertiente (●), C172S (▲), C192S (■) y doble mutante C172S/C192S (●).** (A) Degradación de Rubisco medida como la desaparición de la subunidad grande. (B) Degradación de proteínas. (C) Desaparición de clorofilas totales (D) Relación contenido Rubisco/proteína totales. Se representa la media  $\pm$  el error estándar de la media de las réplicas (21 del revertiente, 9 del C172S, 15 del C192S y 18 del C172S/C192S) expresada como porcentaje de la cantidad inicial de cada parámetro analizado. La concentración celular inicial fue de alrededor de  $2 \cdot 10^6$  células/ml y no experimentó variación detectable a lo largo del proceso.

La cinética de desaparición de proteínas totales y clorofilas en los mutantes C172S, C192S, C172S/C192S no mostró diferencias significativas respecto al revertiente (fig. 1B y D). Esto muestra que en todos los casos se produjo un estrés similar. Sin embargo, sí que se hallaron diferencias entre alguno de los mutantes y el revertiente en cuanto a la velocidad de desaparición de Rubisco. En particular, el mutante C172S mostró un retraso considerable en la degradación de Rubisco, manteniendo el 50% de Rubisco después de 7h de tratamiento (frente a las 4,5h del revertiente) (fig. 1A). A las 10h de estrés, el mutante C172S aun contenía un 20% de la Rubisco. La menor velocidad de desaparición de la Rubisco en el mutante C172S dio lugar a una cierta estabilidad de la relación entre Rubisco y proteínas totales (fig. 1C). En concreto, hasta las 8h de estrés, la Rubisco C172S se degradó al mismo ritmo que el conjunto de proteínas totales, y sólo a partir de entonces se observó una cierta preferencia en la degradación de la Rubisco.

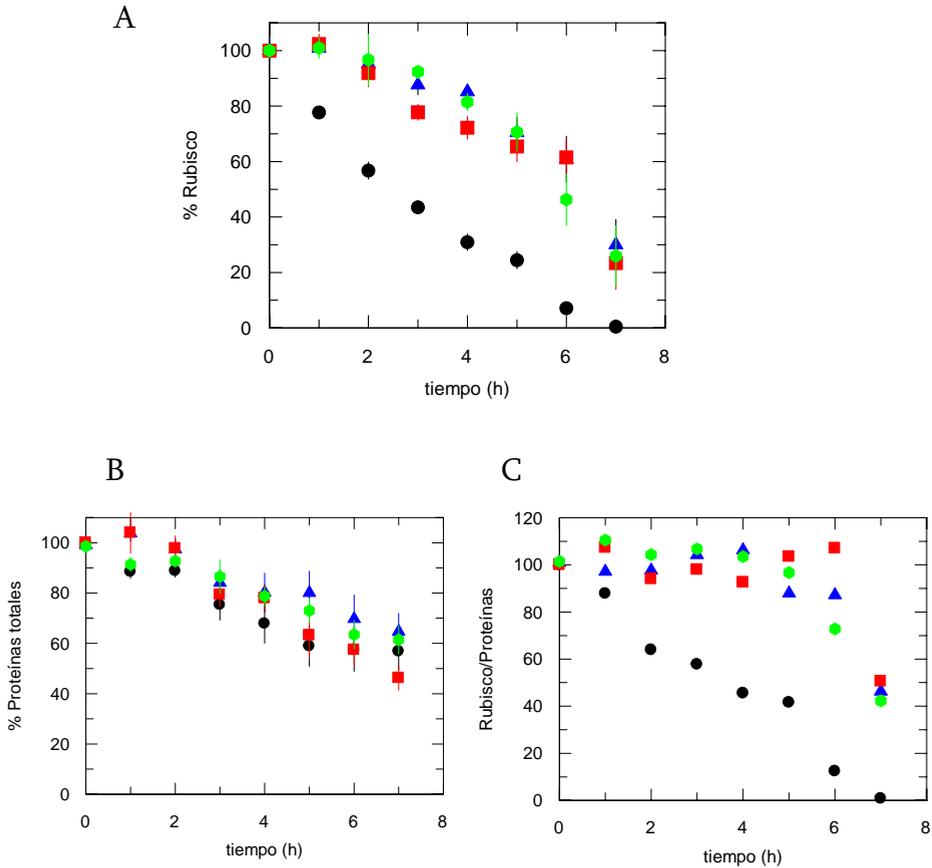
Por otro lado, la Rubisco de los mutantes C192S y C172S/C192S desapareció a un ritmo similar o ligeramente superior a la Rubisco revertiente (fig. 1A y D).

Por tanto, la sustitución de la Cys172 (en el mutante C172S) provoca un retraso en la degradación preferente que sufre la Rubisco en este tipo de estrés, al igual que se observó en un trabajo previo (Moreno y Spreitzer, 1999). Ello sugiere una implicación directa de la Cys172 en la regulación de la degradación específica en el estrés salino. Sin embargo, la doble sustitución de la Cys172 y Cys192 (cepa doble mutante) no provocó este retraso en la degradación, hecho que podría estar condicionado por las aparentes alteraciones estructurales que se deducen de las diferencias de comportamiento mostrado por el enzima doble mutante en ensayos *in vitro*, tal como se ha descrito en capítulos anteriores.

## **2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LOS MUTANTES A ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR DIAMIDA**

El tratamiento con diamida 2mM produjo una disminución progresiva del contenido en Rubisco de las células (fig.2). En el caso del cultivo revertiente, el contenido en Rubisco se redujo a la mitad al cabo de unas 2,5h, desapareciendo totalmente en 7h (fig.2A). El contenido de proteínas disminuyó más lentamente que el de Rubisco, llegando a un 60% del contenido de proteínas iniciales al final del estrés en las células revertientes (fig.2B). Como resultado de ello, la Rubisco revertiente experimentó una degradación preferente respecto al resto de proteínas, tal como ocurría para el estrés salino y se ha descrito para otros estreses (García-Ferris y Moreno, 1994; Marín-Navarro, 2004).

En el caso de los mutantes, los tres tipos celulares se comportaron de una manera similar, mostrando una pérdida de Rubisco menor que el revertiente a lo largo del estrés. Al cabo de 7 horas desapareció aproximadamente el 70% de la Rubisco presente inicialmente (fig.2A). El contenido de proteínas totales mostró una evolución similar en los cultivos mutantes y revertiente (fig.2B). Esto parece indicar que los cultivos mutantes respondieron globalmente al tratamiento de igual modo que el cultivo revertiente. El cálculo de la relación de Rubisco a proteína total muestra que en los mutantes C172S, C192S y C172S/C192S la degradación de Rubisco fue semejante a la degradación media de las proteínas. Sólo en los últimos tiempos, a partir de 6h, se empieza a apreciar una degradación específica de las Rubiscos mutantes (fig.2C).

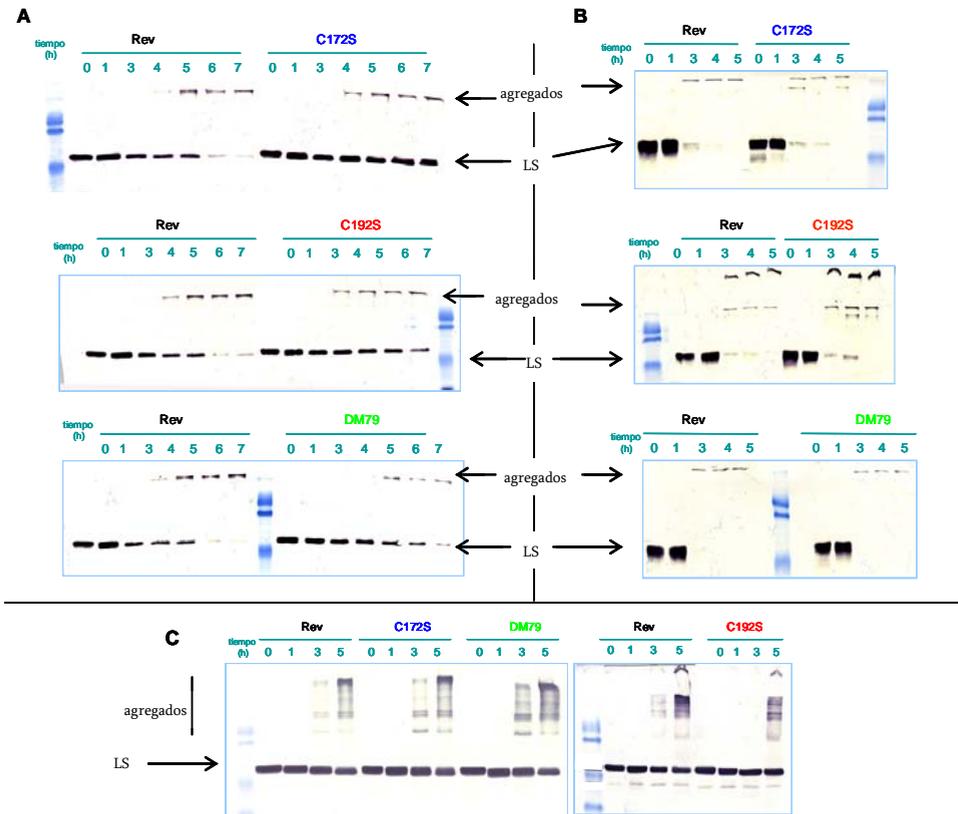


**Fig.2. Seguimiento del estrés oxidativo provocado por diamida 2mM en las cepas revertiente (●), C172S (▲), C192S (■) y doble mutante C172S/C192S (●).** (A) Degradación de Rubisco medido como la desaparición de la subunidad grande. (B) Degradación de proteínas. (C) Relación contenido Rubisco/proteína totales. Se representa la media  $\pm$  la desviación estándar de la media de nueve réplicas (triplicados de tres experimentos) expresada como porcentaje de la cantidad inicial de cada parámetro analizado.

Además, se comparó la señal correspondiente a la subunidad grande de Rubisco en el inmunorevelado de muestras tomadas a lo largo del estrés y resuspendidas en tampón de carga de electroforesis con y sin  $\beta$ -EtSH (fig. 3). En **condiciones reductoras** (con  $\beta$ -EtSH) se detectó una acumulación progresiva de agregados de alto peso molecular y de fragmentos de

degradación procedentes de la subunidad grande a medida que ésta desaparecía (fig.3A). Para poder detectar mejor la formación de estos agregados se cargó una cantidad 20 veces mayor de lo habitual lo que produjo la saturación de la señal correspondiente a la subunidad grande libre en la mayor parte de los tiempos (fig.3B). En **condiciones no reductoras** se observó la desaparición de la subunidad grande de la Rubisco y la aparición de agregados de alto peso molecular a partir de las 3h (fig.3C). Gran parte de los agregados que se detectan en estas condiciones están causados por la oxidación de cisteínas ya que desaparecieron al añadir un agente reductor ( $\beta$ -EtSH) (fig.3A). La comparación de los electroferogramas en condiciones oxidantes y reductoras muestra una pérdida de la señal de la Rubisco en los primeros a partir de las 3h, lo que sugiere la formación de agregados de muy alto peso molecular que no llega a penetrar en el gel resolutivo.

La subunidad grande de la Rubisco del revertiente desaparece más rápidamente que la de los mutantes (fig. 3A y fig.2A), pero, en cuanto a la formación de agregados de alto peso molecular, no parecen encontrarse diferencias cualitativas entre las diferentes cepas a los tiempos mostrados (fig.3A y B). Tampoco existen diferencias considerables en la aparición de las formas de Rubisco oxidada a lo largo del tiempo. Aunque se puedan apreciar pequeñas diferencias, al comparar el resultado de todos los experimentos se concluyó que todas las Rubiscos mutantes se oxidaban y agregaban a un ritmo similar al de la Rubisco revertiente.



**Fig. 3. Efecto de la diamida en la desaparición, oxidación y polimerización de la Rubisco *in vivo* en los mutantes C172S, C192S y C172S/C192S (DM79) comparado con el silvestre.** Se muestran los inmunorevelados de la Rubisco donde se visualiza la desaparición progresiva de la señal de la subunidad grande (LS) y la formación de agregados en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B). La formación de agregados en condiciones reductoras se detectó mejor al cargar las muestras 20 veces más concentradas (C). Se indican con flechas la subunidad grande y los agregados de la Rubisco.

Por otra parte, la detección de fragmentos de degradación, además de agregados de alto peso molecular, parece indicar que la desaparición de la Rubisco es debida a la combinación de procesos de polimerización y de proteólisis. Es difícil determinar qué parte de la desaparición de la Rubisco observada es debida a agregación o a degradación. La cuantificación de los

agregados y comparación con la cantidad de subunidad grande puede conducir a errores ya que estos complejos tienen una menor eficiencia de transferencia y, además, podría ser que no reaccionen igual con el anticuerpo primario. En cualquier caso, no se apreciaron diferencias cualitativas en la formación de agregados entre todas las cepas, en los diversos experimentos analizados.

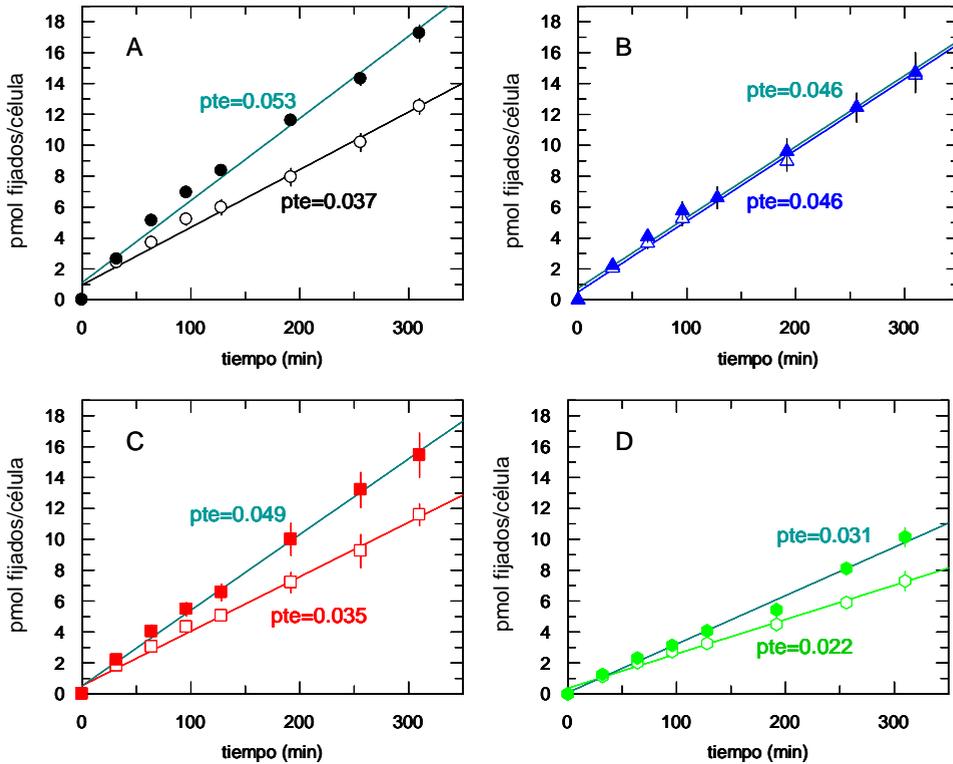
El efecto de las mutaciones en la degradación de Rubisco inducida por diamida pone de manifiesto una cierta redundancia en la función de los residuos mutados en este tipo de estrés, ya que la ausencia de cualquiera de las dos cisteínas (cepas C172S y C192S) tiene el mismo efecto, y éste no es aditivo al eliminar los dos residuos (cepa C172S/C192S). Por tanto, las Cys172 y/o Cys192 parecen ser responsables, en parte, de la degradación preferente de la Rubisco respecto al resto de proteínas en el estrés inducido por diamida. Aun así, en las cepas mutantes la Rubisco no desapareció exactamente al mismo ritmo que las proteínas totales, lo que indicaría la participación de otros factores en la degradación preferente de la Rubisco en este estrés oxidativo.

### 3. EVOLUCIÓN DE LA FIJACIÓN FOTOSINTÉTICA DE CARBONO DURANTE EL ESTRÉS POR DIAMIDA

Con objeto de evaluar el impacto funcional del tratamiento con diamida sobre la actividad de la Rubisco, se estudió la evolución de la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub> de las diferentes cepas durante el estrés.

En ausencia de estrés, la velocidad de fijación de CO<sub>2</sub> dependiente de luz fue distinta para el revertiente y los mutantes (fig.4). El cultivo revertiente fijó a una velocidad superior que el resto de mutantes. El mutante C172S control presentó una actividad equivalente al 86% de la actividad del cultivo revertiente, mientras que la del cultivo C192S fue más parecida a la del revertiente (92%) y la del cultivo doble mutante fue bastante inferior (60% de la actividad del revertiente) (fig.4). Estos valores relativos de actividad son paralelos a los determinados *in vitro* para la Rubisco purificada, aunque ligeramente superiores (C172S, C192S, C172S/C192S presentaban el 70%, 80% y 42% respectivamente de la actividad del enzima revertiente en condiciones reductoras). Ello sugiere que la fijación de CO<sub>2</sub> *in vivo* se midió en condiciones en las que se manifestaba una limitación por parte de la actividad intrínseca de la Rubisco.

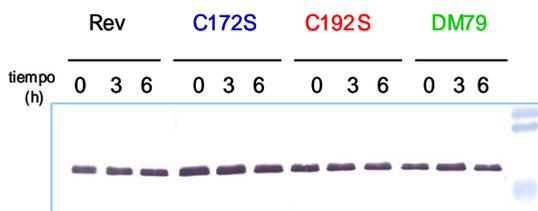
El tratamiento con diamida (a concentración final 1,12mM) produjo una reducción de la velocidad de fijación fotosintética de carbono en los cultivos revertiente, C192S y doble mutante a un 70% de la fijación en condiciones control (fig.4). Sin embargo, la presencia de diamida en el cultivo C172S apenas afectó a su fijación fotosintética, presentando un ritmo de incorporación de CO<sub>2</sub> similar al de su cultivo control (fig.4).



**Fig.4. Fijación acumulada de CO<sub>2</sub>** a lo largo del tiempo en cultivos control (símbolos llenos) y en cultivos tratados con diamida 1,12mM (símbolos vacíos) de las cepas revertiente (A), C172S (B), C192S (C), C172S/C192S (D). Las barras de error representan la desviación estándar de la media de los duplicados de 4 experimentos independientes. Se muestra la pendiente del ajuste lineal de los datos.

En paralelo a la medida de la actividad se tomaron muestras para seguir el contenido de la Rubisco en los cultivos sometidos a estrés con diamida. En las condiciones (de tiempo y concentración de diamida del ensayo) no se produjo una variación significativa en los niveles de Rubisco de los cultivos, ni tampoco se llegó a observar la polimerización del enzima en geles reductores (fig.5). Por tanto, la reducción de la fijación fotosintética del revertiente, C192S y doble mutante parece debido al efecto de la diamida

sobre la actividad de la Rubisco, y no a la desaparición del enzima por el estrés.



**Fig.5. Evolución de la subunidad grande de la Rubisco en cultivos tratados con diamida 1,12mM.** Se muestra el inmunorevelado de la electroforesis realizada en condiciones reductoras.

## DISCUSIÓN

Se ha demostrado que bajo condiciones extremas, incluyendo frío severo (Huner y Macdowall, 1978; Tenaud y Jacquot, 1987; Bruggemann, 1995), estrés osmótico (Ferreira y Shaw, 1989; Ferreira y Davies, 1989), deficiencia de nutrientes (Ferreira y Teixeira, 1992; García-Ferris y Moreno, 1994), estrés oxidativo (Mehta *et al.*, 1992; Landry y Pell, 1993), estrés salino (Marín-Navarro, 2004) y estrés fotooxidativo (Cohen *et al.*, 2005), la Rubisco se oxida (el número de tioles disminuye y el número de disulfuros aumenta) de forma paralela a la disminución de la actividad y a la degradación del enzima. La modificación oxidativa de Rubisco causa cambios estructurales *in vitro* que aumentan su susceptibilidad a proteasas inespecíficas (Marín-Navarro y Moreno 2003). Además, la oxidación de Rubisco parece provocar la exposición de un dominio con capacidad de unión a RNA (Yosef *et al.*, 2004). La detención de la traducción *in vivo* en condiciones de estrés podría estar

mediada por la unión de Rubisco ( a través de esta región) a su mensajero (Yosef *et al.*, 2004). En estas condiciones oxidantes, el ensamblaje de Rubisco también se ve afectado probablemente por la oxidación de las cisteínas de la subunidad grande nascente que impediría su asociación con las chaperonas (Cohen *et al.*, 2005).

Para evaluar el papel de las Cys172 y Cys192 en la regulación de la actividad y degradación del enzima, se ha estudiado el efecto de dos estreses diferentes sobre las cepas de *C.reinhardtii* en las que estos residuos de la Rubisco han sido mutados. Se ha ensayado un estrés más general, salino, y otro inducido por diamida, dirigido directamente a oxidar los sulfhidrilos, y se ha analizado la desaparición de la señal de la subunidad grande de la Rubisco a lo largo del estrés. La disminución de la señal puede estar causada por procesos de degradación y/o polimerización, ambos característicos del catabolismo de la Rubisco.

En el caso del estrés salino se detectó un retraso en la degradación de la Rubisco de la cepa C172S, tal como se había observado con el mismo mutante sometido a estrés osmótico u oxidativo (Moreno y Spreitzer, 1999). Este comportamiento también es coincidente con el de los mutantes de *Synechocystis*, en los que la privación de nitrógeno retrasaba la degradación de Rubisco en las cepas C172A y C172A/C192A, pero no en C192A (Marcus *et al.*, 2003). Por tanto, cabe destacar el papel regulador que mantiene la Cys172 en ambos organismos a pesar de la distancia filogenética. En el caso del doble mutante C172S/C192S de *C. reinhardtii*, parece que las alteraciones estructurales asociadas a la doble mutación condicionan su fenotipo más allá de la sustitución de los residuos Cys172 y Cys192. Es posible que dichas variaciones conformacionales tiendan a incrementar el recambio, como se pone de manifiesto en el reducido nivel estacionario del enzima en las células

del doble mutante en ausencia de estrés. Así, la inestabilidad estructural podría compensar el posible efecto retardador del catabolismo producido por la ausencia de la Cys172 en condiciones de estrés.

En el estrés por diamida, a diferencia del salino, todos los mutantes mostraron un mayor retraso en la degradación específica de la Rubisco. Esta respuesta indica que, ante un estrés específicamente dirigido a la oxidación de cisteínas, la ausencia de cualquiera de los dos residuos, Cys172 o Cys192, retrasa el catabolismo. Ello sugiere de nuevo la implicación de un posible puente disulfuro entre la Cys172 y Cys192 en la respuesta al estrés *in vivo*. La formación de este puente podría ser una de las señales desencadenantes de la degradación y, en su ausencia, se produciría un retraso del proceso catabólico. Esto es distinto a lo observado en el caso del estrés salino y otros estreses generales, en los que el efecto sobre la velocidad de degradación parecía depender exclusivamente de la presencia o ausencia del residuo de Cys172. La diferencia debe radicar en los diferentes mecanismos de percepción y transducción de la señal del estrés. Es posible, por ejemplo, que en el caso del estrés salino no se alcance el mismo grado de oxidación de las cisteínas de la Rubisco que en presencia de diamida. Así, el estado redox de la pareja Cys172-Cys192 no llegaría a vencerse hacia la formación del disulfuro. En este sentido, cabe destacar que, al tratarse de un enzima oligomérico, la Rubisco podría modular la respuesta a la oxidación de cisteínas. Por ejemplo, podría ser necesario que el par Cys172-Cys192 estuviera formando un disulfuro en un elevado número de subunidades del holoenzima para que se desencadenara la degradación. De esta forma, el enzima podría retardar la respuesta hasta alcanzar condiciones de oxidación extremas. Por otro lado, también es posible que la formación del disulfuro sea una señal de menor relevancia frente a otras generadas por el estrés sistémico, que

desencadenarían el catabolismo de la Rubisco por una vía alternativa en la que la presencia o ausencia de la Cys172 seguiría teniendo un papel determinante.

El efecto del estrés por diamida sobre la fijación de CO<sub>2</sub> muestra que la inhibición de la actividad de la Rubisco *in vivo* en este tipo de estrés depende de la modificación del residuo de Cys172. Ello está de acuerdo con la especial sensibilidad de la actividad enzimática a la oxidación de este residuo, tal como se concluyó de los experimentos de modificación de cisteínas *in vitro* (capítulo I). Sin embargo, el doble mutante muestra aquí de nuevo un comportamiento excepcional ya que se inactiva de forma similar al tipo silvestre.

Todos estos resultados demuestran que los residuos de cisteínas estudiados, y particularmente la Cys172, juegan un papel relevante en los mecanismos que controlan la actividad enzimática y el catabolismo de la Rubisco durante los procesos de estrés. Asimismo, demuestran que es posible alterar la velocidad de degradación de la Rubisco *in vivo* - un proceso de importancia fisiológica que condiciona la redistribución de nutrientes en los organismos fotosintéticos - mediante mutagénesis dirigida de residuos críticos, que pueden ser utilizados como dianas para una manipulación del catabolismo de la Rubisco con fines biotecnológicos.

---

## *CONCLUSIONES*



1. Se han obtenido las cepas mutantes C192S y C172S/C192S mediante mutagénesis dirigida y transformación estable del cloroplasto de *C.reinhardtii*. Dichas cepas son fotosintéticamente activas.
2. El enzima C172S posee un factor de especificidad mayor que el silvestre, con unas constantes aparentes de Michaelis para el CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> aumentadas. El enzima C192S presenta un factor de especificidad similar al silvestre y una menor velocidad de carboxilación.
3. El estudio del ensayo de la sensibilidad térmica, de los cambios en la sensibilidad proteolítica y de la movilidad del holoenzima en geles nativos indica que la sustitución de las Cys172 y/o Cys192 afecta a la estructura de los enzimas.
4. Se ha determinado la estructura tridimensional de la Rubisco de los mutantes C172S y C192S por cristalografía de rayos X. Como diferencia más significativa se ha detectado un desplazamiento de la hebra β1 del barril α/β en el enzima C172S en relación a la estructura del enzima silvestre.
5. El enzima doble mutante presenta unas características singulares de acumulación celular, dificultad de cristalización, actividad enzimática, susceptibilidad proteolítica e inactivación en respuesta a agentes oxidantes que sugieren la presencia de alteraciones

estructurales particulares diferentes a las de los mutantes C172S y C192S.

6. La Rubisco C192S presenta una especial sensibilidad a la inactivación por agentes modificadores de grupos sulfhidrilo. Ello parece responder al carácter crítico de la modificación de la Cys172 en la actividad enzimática y al efecto protector que sobre este residuo ejerce la Cys192.
  
7. El mutante C172S sometido a estrés salino degrada la Rubisco de forma más lenta que la cepa silvestre o los demás mutantes. Además, bajo un estrés por diamida específicamente dirigido a la oxidación de los grupos sulfhidrilo, el mutante C172S se muestra resistente a la inactivación que sufren las demás cepas. Ello apunta a un papel singular del residuo Cys172 en la modulación del catabolismo de la Rubisco en respuesta a situaciones de estrés.
  
8. En condiciones de estrés por diamida, todas las cepas mutantes (C172S, C192S y C172S/C192S) presentan una degradación retardada de la Rubisco por comparación con la cepa silvestre. Ello sugiere que, en estas condiciones de oxidación directa de los tioles celulares, la formación de un puente disulfuro entre la Cys172 y la Cys192 podría actuar como una señal condicionante de la degradación del enzima.

---

## *MATERIALES Y MÉTODOS*



## 1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE *C.reinhardtii*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y mantenimiento de *C. reinhardtii* se basaron en el medio TAP (Harris, 1989) variando las concentraciones de  $K_2HPO_4$  y  $KH_2PO_4$ , que fueron de 0,1434g/l y 0,0725g/l respectivamente, y la fuente de carbono que se añadió en forma de acetato de sodio (0,164 g/l) en lugar de ácido acético. Al medio preparado de esta forma se le denominó medio acetato. Alternativamente, se preparó un medio equivalente al anterior eliminando la fuente de carbono al que se denominó medio mínimo. Los medios sólidos se prepararon añadiendo Bacto-agar (Difco) (15g/l).

Las cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* utilizadas fueron la tipo silvestre 2137 mt<sup>+</sup> (Spreitzer y Mets, 1981), la cepa mutante 18-7G mt<sup>+</sup> que posee una mutación sin sentido en el codón 66 de *rbcl* (Spreitzer y Ogren, 1983), la cepa 25-B1 mt<sup>+</sup> que contiene un inserto de 0,48kb en el sitio *Pst* I de *rbcl* interrumpiendo la pauta de lectura en el codón 418 (Newman *et al.*, 1991) y la cepa mutante C172S mt<sup>+</sup> donde el residuo de cisteína 172 de la subunidad grande de la Rubisco está reemplazado por serina (Moreno y Spreitzer, 1999). Todas las cepas fueron mantenidas a 25°C en oscuridad en un medio acetato sólido.

La densidad celular se determinó a partir de una alícuota del cultivo en las que se detuvo el crecimiento con formaldehído al 0,037%, las células se contaron en una hemocitómetro Neubauer contando al menos mil células de cada muestra. En algunas ocasiones se usó un contador Coulter Z2 (con un diámetro de apertura de 100  $\mu$ m). Para ello la muestra se diluyó en 10ml de tampón Isoton (Coulter) y antes del conteo se sonicó (3-4 pulsos 5s, 40W) para desaglomerar posibles agregados celulares.

Las cinéticas de crecimiento de los mutantes C192S y C172S/C192S se siguieron en paralelo a la del revertiente silvestre. Para ello se inocularon  $5 \cdot 10^4$  células/ml en dos tipos de medios: medio acetato (por duplicado) y medio mínimo. De los dos cultivos inoculados en medio acetato, uno de ellos se creció en oscuridad y el otro, en luz continua (suministrada por 3 tubos de 30W a 30cm de los cultivos). En estas mismas condiciones de luz se crecieron los cultivos en medio mínimo. Todos ellos se mantuvieron a 28°C con agitación orbital continua (120rpm).

En los experimentos de estrés, los cultivos de los mutantes se crecieron en paralelo al revertiente. Los cultivos se inocularon por triplicado y se crecieron en medio acetato a 28°C con agitación orbital e iluminación continua hasta alcanzar una densidad celular de unos  $6-7 \cdot 10^6$  células/ml. Durante dos o más días los cultivos se diluyeron diariamente eliminando  $2/3$  del volumen y sustituyéndolo por medio acetato. Antes de aplicar el estrés, se tomó una alícuota de cada uno de los cultivos para determinar la densidad celular, y se diluyeron todos ellos a  $2,5 \cdot 10^6$  células/ml (en el caso del estrés con diamida) o a  $5 \cdot 10^6$  células/ml (en el caso del estrés salino).

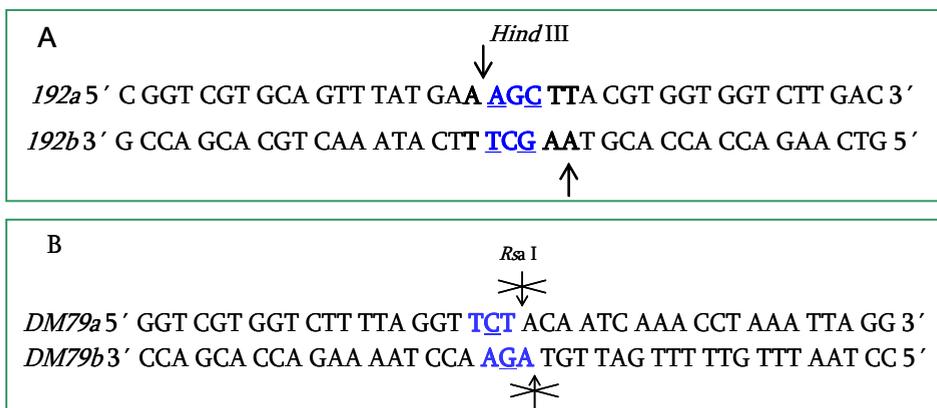
Para la purificación de la Rubisco, *C. reinhardtii* se creció en medio acetato con luz, en matraces de 2l hasta alcanzar la saturación del cultivo (aproximadamente  $10^7$  células/ml).

## 2. OBTENCIÓN DE MUTANTES DE *C. reinhardtii*

### 2.1. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DEL GEN *rbcL* DE *C. reinhardtii*

#### 2.1.1. Diseño de los oligonucleótidos

Se diseñaron dos oligonucleótidos cebadores complementarios (fig.1A) de manera que contuvieran el cambio del codón original cisteína 192 (TGT) por uno de serina (AGC) de acuerdo con las indicaciones del kit comercial de mutagénesis dirigida (QuikChange de Stratagene). Los oligonucleótidos tenían una longitud de 40 bases y un contenido de GC del 50%. La temperatura de fusión estimada del híbrido con la secuencia silvestre era de 80°C. Las sustituciones se escogieron de manera que el cambio de codón introdujera un nuevo sitio de restricción *Hind* III. Estos oligonucleótidos se utilizaron para la construcción del plásmido conteniendo el gen *rbcL* con la Cys192 sustituida por una serina (pC192S).



**Fig.1. Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la mutagénesis dirigida del gen *rbcL* para introducir el cambio C192S (A) y C172S/C192S (B). Los nucleótidos sustituidos se muestran subrayados. El nuevo sitio de restricción *Hind* III o la eliminación del sitio *Rsa* I se indica con flechas.**

Para la obtención del gen *rbcL* con la doble sustitución, se partió del plásmido pC192S y se diseñaron los oligonucleótidos cebadores complementarios que contenían el cambio del codón original de la Cys172 (TGT) por uno de serina (TCT) (fig.1B). La sustitución elimina un sitio de restricción *Rsa* I. La restricción del plásmido que contiene el gen *rbcL* silvestre (prbcLP) con *Hind* III produce fragmentos de 3,6, 1,1 y 0,9 Kb, mientras que en el plásmido pC192S, el fragmento de 0,9 kb se corta dando dos fragmentos de 0,7, y 0,2 kb, característicos de la mutación. El enzima *Rsa* I corta al plásmido prbcLP dando fragmentos de 1821, 1785, 660, 342, **323**, 225, **219**, 205...pb, mientras que en el plásmido pC192S/C172S desaparece un sitio *Rsa* I entre los fragmentos indicados en negrita y subrayados, apareciendo por tanto un fragmento de **542 pb**.

### **2.1.2. Mutagénesis dirigida**

Para la mutagénesis de *rbcL*, se partió del plásmido prbcLP que contiene el subfragmento HpaI perteneciente al fragmento EcoRI-14 del DNA cloroplástico de *C. reinhardtii*, clonado en el sitio SmaI del vector pBluescriptII KS- (Stratagene). El inserto (de 2,67Kb) de prbcLP comprende desde 743pb antes del inicio de la zona codificante de *rbcL* hasta 499pb después del codón final.

La mutagénesis dirigida se llevó a cabo utilizando el kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis de Stratagene basado en la amplificación *in vitro* del plásmido prbcLP a partir de oligonucleótidos sintéticos mutados que son complementarios a la región que se va a mutar, y la posterior transformación de células de *E. coli*. Las oligonucleótidos se diseñaron de manera que la mutación introducida creara o destruyera un sitio de restricción, para facilitar

posteriormente el rastreo de transformantes. Los oligonucleótidos cebadores (150ng), complementarios a cadenas opuestas del vector (5-50ng), se fueron extendiendo por la *Pfu* DNA polimerasa (2.5U) durante los ciclos de temperatura. La reacción de mutagénesis se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l. Las condiciones fueron: una preincubación de 30s. a 95°C, y 16 ciclos de tres segmentos de 30s a 95°C, 1 min a 55°C. y 11 min (2min/kb) a 68°C, en un termociclador Techne de Progene. El producto de la reacción se digirió con 2,5 U de *DpnI* (secuencia diana: G<sup>m6</sup>ATC-3') que eliminó el molde DNA parental (Nelson y McClelland, 1992). El vector mellado que contenía la mutación se utilizó para transformar *E. Coli* (Epicurian Coli XL1-Blue supercompetent cells). El plásmido que contenía el gen *rbcL* con la mutación que codifica la sustitución de la Cys192 por serina (C192S) se aisló de los transformantes bacterianos y se denominó pC192S. El doble mutante C172S/C192S se obtuvo por el mismo protocolo utilizando como molde de partida el plásmido con la mutación C192S e introduciendo sobre él la mutación C172S.

### **2.1.3. Transformación de células competentes de *E. coli***

Para la mutagénesis dirigida, el DNA tratado con *Dpn I* se añadió a 50 $\mu$ l de células supercompetentes Epicurian Coli XL-1 Blue o 100 $\mu$ l de *E.coli* DH5 $\alpha$  competentes y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se administró un pulso de calor durante 45 segundos a 42°C y se pasaron a hielo durante 2 minutos. Se añadió 0,5 ml de NZY+broth (hidrolizado de caseína 1%, extracto de levadura 0,5%, cloruro sódico 0,5%, Glucosa 0,4%, cloruro de magnesio 0,125M y sulfato de magnesio 0,125M) precalentado a 42°C y se incubó a 37°C durante 1 hora en agitación a 225-250rpm. Transcurrido este tiempo se

extendió todo el volumen en placas agar LB-ampicilina (cloruro sódico 1%, triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, agar 2%, ampicilina 0.05 mg.ml<sup>-1</sup>). Las placas se incubaron hasta la visualización de las colonias transformantes, más de 16 horas a 37°C.

Para mantener los plásmidos prbcLP, pC172S, pC192S, pC192S/C172S y p228 se utilizaron células de *Escherichia coli* DH5α competentes por el método de cloruro cálcico (Seidman *et al.*, 1997) o cloruro de rubidio (Hanahan, 1985) transformándolas por choque térmico según un procedimiento descrito (Seidman *et al.*, 1997). Los transformantes se conservaron en forma de glicerizados mezclando las células en relación 1:1 con una disolución de glicerol (glicerol 65%, MgSO<sub>4</sub> 0,1M, TrisHCl 0,025M pH8) mantenidos a -80°C.

#### **2.1.4. Extracción y purificación de plásmidos de *E. coli***

La **extracción** del plásmido de *E. coli* se llevó a cabo por el método de lisis alcalina (Birnboim, 1983). Las muestras de DNA se analizaron en un gel de agarosa 1% tras la digestión con el enzima de restricción que produce el patrón característico según la mutación presente. En general, las **electroforesis de DNA** se realizaron en geles de agarosa (0,8-3%) con bromuro de etidio. Las muestras se prepararon añadiendo tampón de carga 6x (Na<sub>2</sub>EDTA 0,06M pH 8, Ficoll 400 12%, SDS 0,6%, azul de bromofenol 0,15%, xileno cianol 0,15%) y se corrieron en tampón TAE (Tris 0,04M, ácido acético 0,02M, Na<sub>2</sub>EDTA 2mM) durante aproximadamente 1h a 90V,

Los plásmidos mutantes se **purificaron** por diversos métodos: por reprecipitación de la miniprep, por extracción de la banda por extrusión o con el kit QIAquick Gel extraction de Qiagen. Las preparaciones de

plásmidos se **cuantificaron** espectrofotométricamente (considerando que 1 unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 50µg/ml de DNA) y se utilizaron para la transformación de *C. reinhardtii*.

## ***2.2. TRANSFORMACIÓN DEL CLOROPLASTO DE C. reinhardtii***

### ***2.2.1. Procedimiento de transformación***

La transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* se realizó mediante bombardeo de microproyectiles de tungsteno cargados con los plásmidos mutantes e impulsados por helio comprimido utilizando el dispositivo PDS-1000/He (Bio-Rad) (Boynton *et al.*, 1988). Como organismos receptores se utilizaron las cepas no fotosintéticas de *C. reinhardtii* 18-7G (Spreitzer y Ogren, 1983) y la cepa 25-B1 (Newman *et al.*, 1991). Antes de la transformación, la ploidía del cloroplasto de la cepa receptora (crecida en medio acetato en oscuridad) se redujo mediante un tratamiento con 5-fluor-2'-desoxiuridina 1mM durante aproximadamente 7 generaciones (Wurtz *et al.*, 1977). Tras este tratamiento, se concentraron las células por centrifugación (2500g x 5min) y se extendieron en placas de medio acetato (aproximadamente  $0,8 \cdot 10^8$  células/placa), dejándolas secar semiabiertas en una campana de flujo laminar en oscuridad durante 2h.

Antes de iniciar la transformación, todo el material se esterilizó con etanol al 70%. Para la desaglomeración de los microproyectiles, se resuspendieron 30mg de tungsteno finamente granulado en forma de partículas de 1,1µm de diámetro (M-17, Bio-Rad) en 0,5ml de etanol 96% agitando en vortex tres veces durante 2 min. Los microproyectiles se lavaron 3 veces con 0,5ml de agua destilada estéril, eliminando cada vez el sobrenadante tras una centrifugación a 1000g x 1min y resuspendiéndolos

finalmente en 0,5ml de agua destilada estéril. Para precipitar el DNA sobre el tungsteno, se tomaron alícuotas de 50µl de la suspensión de tungsteno y se les añadió, en este orden, 5µg de DNA, 50µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5M, y 20µl de espermidina 0,1M (grado de cultivo de tejidos). Esta mezcla se agitó durante 3 min, se centrifugó (1000g x 10s) y el precipitado se lavó con 250µl de etanol 96%, agitando de nuevo en vortex durante 30s. Después de centrifugar (1000g x 10s) el sedimento se resuspendió finalmente en 30µl de etanol al 96%. Con cada una de estas alícuotas se realizaron 3 disparos por placa (10µl/disparo). Para la transformación se utilizó un disco de ruptura de 1350 psi. La distancia de la placa respecto al disco de ruptura fue variable entre 8-14 cm en los diferentes disparos que recibió cada placa. A las 2h de la transformación, cada placa se dividió en 3 sectores, recogiendo las células de cada uno de ellos con un asa de siembra y resuspendiéndolas en 0,5ml de medio mínimo. Finalmente se añadieron 2ml más de medio mínimo sobre cada placa para recoger los restos de células. Las cuatro muestras se sembraron en diferentes placas de medio mínimo y se dejaron crecer las colonias transformantes durante más de 20 días.

Considerando la posibilidad de que la mutación introducida produjera la inactivación de la Rubisco (y la consiguiente incapacidad de crecer en medio mínimo) se llevó en paralelo un **procedimiento alternativo** de selección de transformantes. Para ello células de *C. reinhardtii* tipo silvestre (cepa wt 2137 mt<sup>+</sup>) fueron bombardeadas con una mezcla de la construcción mutada (pC192S o pC172S/C192S) y el plásmido p228 (que confiere resistencia a espectinomicina) (Newman *et al.*, 1990) y se seleccionaron en un medio suplementado con acetato que contenía espectinomicina (50 µg/ml). Las colonias transformantes se dispersaron en un medio acetato líquido estéril y se plaquearon de nuevo en medio acetato (sin espectinomicina). De la

segunda generación, que potencialmente contendría colonias homoplásmicas, se hicieron réplicas en medio mínimo (sin fuente de carbono) y medio acetato. Si las mutaciones C192S o C172S/C192S inactivaran la Rubisco, los mutantes homoplásmicos para estas mutaciones deberían dar colonias en medio acetato, pero no en la réplica en medio mínimo. No se identificó ninguna cepa mutante mediante esta estrategia lo que está de acuerdo con que las cepas portadoras de estas mutaciones son fotosintéticamente activas.

### **2.2.2. Purificación del DNA de *C. reinhardtii* y caracterización de la mutación**

El DNA de los transformantes se purificó mediante una modificación de un método descrito (Spreitzer *et al.*, 1985). Las colonias potencialmente transformantes se resuspendieron en 0,5ml de medio mínimo: 0,25ml se plaquearon en medio mínimo y 0,25ml se mezclaron con 4 ml de medio acetato líquido y se incubaron en presencia de luz. Para la purificación del DNA de los transformantes se centrifugaron 1,5-3ml del cultivo líquido, y las células se resuspendieron en 150µl de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril, y se lisaron al añadir 450µl de tampón de lisis (Tris-HCl 0,1M pH8, SDS 2%, NaCl 0,4M, EDTA 40µM). Tras incubar 5min en hielo, las proteínas se eliminaron por extracción con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y lavado con otro volumen de cloroformo. Por último los ácidos nucleicos se precipitaron con 2 volúmenes de alcohol 96% a -20°C (durante más de 2h). El precipitado obtenido tras la centrifugación se lavó con etanol al 70% y se dejó secar. El precipitado seco se resuspendió en 25-50µl de H<sub>2</sub>O MilliQ. Antes de la amplificación del gen *rbcL*, el DNA se digirió previamente con *Hae*III (que reconoce la secuencia GGCC que no se encuentra dentro del gen *rbcL*) durante 2h a 37°C. El **gen *rbcL* se amplificó** por la reacción en cadena de la

polimerasa (Saiki *et al.*, 1988), utilizando como cebadores diferentes combinaciones de los oligonucleótidos fwd1 (bases de +54 a +73), fwd2 (bases +296 a +310) y fwd15 (bases -159 a -142) en 5' con rev8 (+1500 a +1484) rev9 (bases +1232 a +1246) y rev16 (bases +1756 a +1732) en 3' (tabla I). Las condiciones de la reacción fueron una preincubación a 94°C durante 5min seguida de 35 ciclos de tres segmentos (1 min a 94°C, 1min a 50°C y 2min a 72°C) y con un tiempo de extensión final de 10 min a 72°C. La presencia de la mutación se detectó por análisis de restricción del producto de PCR, que permitió además comprobar el grado de homoplasmicidad de la mutación dentro del cloroplasto. Una de las colonias seleccionadas en medio mínimo a partir de la transformación con el plásmido C192S, contenía el gen silvestre de *rbcL* y esta cepa, con el fondo genético de 18-7G y el gen *rbcL* silvestre (llamada “revertiente”) se utilizó como control en todos los experimentos. Se realizaron rondas sucesivas de aislamiento y resiembra de las colonias en medio mínimo hasta alcanzar su **homoplasmicidad**, confirmada por análisis de restricción. Por último, en las cepas C192S, C172S/C192S y revertiente silvestre se comprobó la presencia de la mutación deseada y la ausencia de mutaciones adicionales en *rbcL* mediante **secuenciación** a partir del fragmento de PCR obtenido con la pareja de oligonucleótidos fwd15 y rev16 (utilizando en este caso una polimerasa con una alta fidelidad de lectura, Expand High Fidelity PCR System, Roche). Para ello, se utilizó una batería de catorce cebadores (fwd1 a rev14) espaciados unos 200pb (tabla I), que cubren toda la región codificante de *rbcL*, siete en sentido 5' a 3' y siete en sentido 3' a 5', de manera que se obtuvieron al menos dos lecturas de cada región.

Nombre de oligonucleótido	Secuencia	Posición en <i>rbcl</i>
fwd 1	5'-AGA CTA CCG TTT AAC ATA CT-3'	bases +54 a +73
fwd 2	5'-GCT TAC GTA TAC CCA AT-3'	bases +296 a +310
fwd 3	5'-GTA GAA CGT GAC AAA TTA AA-3'	bases +469 a 488
fwd 4	5'-GCT GGT ACT TGT GAA AT-3'	bases +730 a +745
fwd 5	5'-CAC GGT ATT CAC TTC CGT GTT-3'	bases +919 a +939
fwd 6	5'-CAC GTA TGG CACA TG CCA GCT-3'	bases +1147 a +1167
fwd 7	5'-GGC GAC GTA ATT CGT TCA G-3'	bases +1324 a +1342
rev 8	5'-TTA ACC TAA ACA CCA TAA AA-3'	bases +1500 a +1484
rev 9	5'-TGG AGC GTT ACC CCA AGG GT-3'	bases +1232 a +1246
rev 10	5'-CTA GTT TAC CTA CAA CAG TA-3'	bases +1010 a +992
rev11	5'-GTT AAG TAG TCG TGC ATA AT-3'	bases +813 a +794
rev 12	5'-TTT AGC TGA AAG ACC TAA TT-3'	bases +550 a +531
rev13	5'-TTC TTC GAA TAA GTC GAT T-3'	bases +331 a +313
rev 14	5'-TCT TAC TAC GTA ATC AGC T-3'	bases +97 a +80
fwd 15	5'-GAC TGA TAA GAC AAG TAC AT-3'	bases -159 a -142
rev 16	5'-TTG GTT TAG CGG ATG GGA CTC G-3'	bases +1756 a +1732

**Tabla I. Secuencia de los oligonucleótidos usados para la amplificación y secuenciación de *rbcl*.**

### **3. PURIFICACIÓN DE LA RUBISCO DE *C. reinhardtii***

Las células de *C. reinhardtii* se sedimentaron mediante centrifugación (3000g x 5min), se lavaron con agua destilada y se congelaron en nitrógeno líquido, almacenándose a -80°C hasta el momento de utilizarlas. Excepto cuando se indique, todos los pasos de la purificación de Rubisco se realizaron a una temperatura de 4°C. 6-10g de células (peso fresco; 30g en el caso del enzima doble mutante) suspendidas en un volumen equivalente a 5 veces su peso de tampón de homogeneización (Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, β-mercaptoetanol 20mM, pH 8) se sonicaron (pulsos de 30s, 75W, separados 30s) en un baño de hielo hasta que se observó por microscopía la rotura celular prácticamente completa. A continuación, se añadió al extracto crudo polivinilpolipirrolidona insoluble al 2% agitando 5min a 4°C. Tras centrifugar a 35000g x 10min el sobrenadante se sometió a precipitación fraccionada con

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entre el 35 y el 60% de saturación. El precipitado de la centrifugación final (15000g x 15min), disuelto en 2,5ml de tampón A (Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, NaHCO<sub>3</sub> 10mM, β-mercaptoetanol 1mM, pH 8), se aplicó a una columna de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia), equilibrada con tampón A, eluyéndose la proteína libre de sulfato amónico con 3,5 ml de dicho tampón. El eluido de la columna se repartió entre dos tubos de policarbonato que contenían 16ml de un gradiente lineal de sacarosa (0,2-0,8M) en tampón A, aplicando aproximadamente 1,75ml sobre cada uno de ellos. A continuación los tubos se centrifugaron a 132000g x 4h en un rotor de ángulo fijo (55.2 Ti, Beckman). Al finalizar la centrifugación se fraccionaron los gradientes con la ayuda de una cánula sumergida hasta el fondo del tubo y conectada a una bomba peristáltica en serie con un monitor de absorbancia a 280nm (modelo UV-1, Amersham-Pharmacia). Se recogió el pico correspondiente a la Rubisco y se guardó a -20°C.

El extracto parcialmente purificado (en un volumen aproximado de 10ml) se sometió posteriormente a una cromatografía de intercambio iónico en una columna (0,5 x 5cm) de DEAE celulosa equilibrada con tampón Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10mM pH 7,8. La muestra diluída con 10ml de dicho tampón se inyectó a un flujo de 1-2ml/min. A continuación, se lavó la columna con 20ml más de tampón y se eluyó la muestra con 100ml de un gradiente lineal de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0-0,15M, en tampón de equilibrado). Todo este proceso se realizó entre 4 y 8°C.

De forma alternativa a la cromatografía en DEAE-celulosa, se realizó una cromatografía líquida (FPLC) a temperatura ambiente en una columna de intercambio aniónico Resource Q (Amersham-Pharmacia) de 1ml, equilibrada previamente con Tris-HCl 20mM pH 7,5, y cargada con la muestra obtenida del gradiente de sacarosa. La elución se llevó a cabo con

28ml de un gradiente lineal de NaCl (0 – 0,42M, en tampón Tris-HCl 20mM pH 7,5) a un flujo de 6ml/min y se recolectó directamente el pico de la Rubisco observado en el registro de un detector espectrofotométrico conectado en línea a la salida de la columna.

Finalmente, las muestras correspondientes al pico de la Rubisco fueron transferidas a tampón de activación (Tris-HCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NaHCO<sub>3</sub> 10mM, pH 8,2) mediante cromatografía en Sephadex G-25 (PD-10) equilibrada en este mismo tampón. La concentración de la Rubisco se determinó espectrofotométricamente, suponiendo un  $\epsilon^{1\%} = 15,7$  a 280nm (basado en los datos revisados por (Ferreira *et al.*, 2000)). El análisis electroforético de la preparación final permitió estimar que la Rubisco constituía más del 95% de la proteína presente.

Para la **crystalización de Rubisco** se utilizó un protocolo de purificación ligeramente diferente: Las células se lisaron por sonicación en una solución de Bicina 50mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NaHCO<sub>3</sub> 10mM, EDTA (triplex) 1mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, con 1 pastilla de inhibidores de proteasas (complete de Sigma) cada 50ml. Tras una precipitación diferencial con sulfato amónico entre 35 y 60% de saturación, el precipitado se disolvió en tampón de extracción y se cargó en una columna de exclusión molecular Superdex-200 16/60 (Amersham Pharmacia). Las fracciones que contenían Rubisco se cargaron en una columna de intercambio aniónico MonoQ 6ml (Amersham Pharmacia), y la muestra se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0,1-0,4 M. La Rubisco purificada se concentró por centrifugación en un tubo Centricon (modelo YM-100, Millipore) a 10mg/ml en un tampón activador (HEPES 50mM pH 7,5, NaHCO<sub>3</sub> 10mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM), y se incubó con CABP 1mM durante 1h a 4°C.

#### 4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA RUBISCO

##### **4.1. DETERMINACIÓN ACTIVIDAD CARBOXILASA**

La Rubisco purificada (20µl de ≈ 0,2mg/ml) o procedente de un extracto crudo (50 µl) se incubó durante 10 minutos a 30°C en un volumen final de 200µl de tampón de activación (Tris-HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NaHCO<sub>3</sub> 10mM pH 8,2). La reacción se inició añadiendo 50µl de la **disolución radiactiva** (Tris-HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, [<sup>14</sup>C]-NaHCO<sub>3</sub> 55mM (1,5·10<sup>9</sup> dpm/mmol), RuBP 2,3mM, pH 8,2). Después de incubar la mezcla durante 5 min a 30°C, la reacción se detuvo con 50µl de HCl 2M. El exceso de NaHCO<sub>3</sub> no fijado se evaporó como CO<sub>2</sub> en una estufa con conexión a vacío durante 4-5 h a 90°C. El residuo seco se resuspendió en 200µl de H<sub>2</sub>O, se evaporó de nuevo en las mismas condiciones y finalmente, se redisolvió en 200µl de H<sub>2</sub>O. Se añadieron 3ml de mezcla de centelleo (Cocktail-22 Normascint, Scharlau) y se midió la radiactividad del <sup>14</sup>C incorporado en un contador de centelleo Wallac 1409. En todos los ensayos se desarrollaron en paralelo controles sin Rubisco. La radiactividad específica del sustrato se determinó a partir del conteo de la marca introducida en cada ensayo. Para ello, se tomaron 50µl de la disolución radiactiva, se les añadió 3ml de mezcla de centelleo alcalina (0,98g de PPO y 0,2g de POPOP en 115ml de la mezcla tolueno/feniletilamina/agua/metanol (57:50:5:3, v/v) y se midió su radiactividad.

Para el estudio de la estabilidad térmica de los enzimas mutantes, la Rubisco purificada se incubó a las temperaturas y tiempos indicados. A continuación, la muestra se enfrió 5min en hielo, se incubó 10min en el tampón de activación y se midió la actividad residual.

Para el seguimiento de las cinéticas de los tratamientos redox, se tomaron 20 $\mu$ l de las muestras en tampón de activación tratadas durante diferentes tiempos y se incubaron 5 min con 180 $\mu$ l de tampón de activación antes de iniciar la reacción con la adición de la disolución radioactiva.

#### ***4.2. TRATAMIENTO DE LA RUBISCO CON DIFERENTES AGENTES OXIDANTES Y REDUCTORES***

Para la reducción o la oxidación completa del enzima, la Rubisco purificada a una concentración aproximada de 0,2mg/ml en tampón de activación (Tris-HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NaHCO<sub>3</sub> 10mM pH 8,2) se incubó habitualmente con cisteamina (CSH) 40mM o cistamina (CSSC) 20mM, respectivamente, durante 2h a 30°C bajo atmósfera de nitrógeno en una estufa de vacío.

Los tampones redox se prepararon como mezclas de CSH y CSSC en tampón de activación con diferentes relaciones molares ( $r = \frac{[CSSC]}{[CSH]}$ ) desde  $r=0$  hasta  $r=100$  y concentración monomérica ( $[CSH]+2[CSSC]$ ) constante e igual a 40mM.

Los tratamientos específicos con diferentes agentes oxidantes (arsenito de sodio, sulfato de cobre, glutatión oxidado, yodoacetamida, ácido yodoacético, n-etilmaleimida, ditionitrobenzoato) a las concentraciones indicadas en cada caso, se realizaron durante el tiempo especificado a 30°C en atmósfera de nitrógeno.

Para el seguimiento de las cinéticas de los tratamientos, las muestras se incubaron a 30°C en viales abiertos y a los tiempos indicados se tomaron muestras para medir la actividad carboxilasa residual.

### ***4.3. DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE ESPECIFICIDAD Y DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LA RUBISCO***

Este ensayo fue realizado por Julia Marín Navarro y Sriram Satagopan en el laboratorio del Dr. Robert Spreitzer de la Universidad de Nebraska con el que se estableció una colaboración. Para la determinación del factor de especificidad se utilizó el método de Jordan y Ogren (Jordan y Ogren, 1981), basado en la determinación simultánea de las actividades carboxilasa y oxigenasa con  $[1\text{-}^3\text{H}]\text{RuBP}$  y  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ . Se preincubó la Rubisco (20 $\mu\text{g}$ /reacción) con  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  20mM (5Ci/mol) (en tampón Bicina 50mM,  $\text{MgCl}_2$  10mM, DTT 1mM, pH 8,3) durante 15min a 25°C en un volumen de 490 $\mu\text{l}$  en un tubo cerrado, previamente insuflado con  $\text{O}_2$  100% a través de un tapón de goma. La reacción se inició mediante la adición de 10 $\mu\text{l}$  de  $[1\text{-}^3\text{H}]\text{RuBP}$  2,87mM (7,2 Ci/mol) y se mantuvo a 25°C durante 30min hasta ser detenida con 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{ZnSO}_4$  50mM en HCl 0,5M. La mezcla se neutralizó con 100 $\mu\text{l}$  de cacodilato de sodio 1,5M antes de añadir 100 $\mu\text{l}$  de una mezcla de 3-fosfoglicerato 0,2M y 2-fosfoglicolato 0,5mM. A continuación se añadieron 100 $\mu\text{l}$  de fosfoglicolato fosfatasa (0,25 unidades, en tampón cacodilato de sodio 1,5M,  $\text{ZnSO}_4$  2mM, citrato de sodio 10mM, pH 6,3) y se dejó incubar la mezcla durante 30min a 30°C deteniéndose la reacción con 900 $\mu\text{l}$  de ácido fórmico 1N. De esta manera se convirtió el  $[^3\text{H}]\text{-fosfoglicolato}$  en  $[^3\text{H}]\text{-glicolato}$  facilitando su separación posterior del resto de productos fosforilados en una columna de intercambio iónico. Se tomo una alícuota de 750 $\mu\text{l}$  que se pasó por una columna de AG-1X8 (Bio-Rad) (montada sobre una jeringa de 1ml), que retuvo los productos fosforilados. Tras eluir el glicolato lavando la columna 4 veces con 750 $\mu\text{l}$  de ácido fórmico 1N, se liofilizó una alícuota de 1,5ml del eluido. La actividad oxigenasa se determinó a partir de la medida de la radiactividad fijada en forma de  $^3\text{H}$  en esta muestra en un

contador de centelleo. Se tomó otra alícuota de 750µl de la mezcla de reacción, a la que se añadió 100µl de HCl 1M y se eliminó el exceso de NaHCO<sub>3</sub> no fijado por evaporación a 80°C durante una noche. La actividad carboxilasa se determinó directamente midiendo la radiactividad fijada en forma de <sup>14</sup>C en esta alícuota en un contador de centelleo.

Las **constantes de Michaelis** para el CO<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub>, así como la **velocidad máxima** para la velocidad de carboxilación se determinaron midiendo la fijación de <sup>14</sup>C a partir de NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> (Chen *et al*, 1988). La Rubisco previamente activada con NaHCO<sub>3</sub> 10mM a 4°C durante una noche, se incubó (5µg/reacción) durante 1min a 25°C, con diferentes concentraciones de NaHCO<sub>3</sub> (de 0 – 16mM) en un tampón Bicina 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, DTT 1mM, RuBP 0,76mM, pH 8,5 en dos condiciones diferentes: en un ambiente de 100% de N<sub>2</sub> o en un ambiente de 100% de O<sub>2</sub>. Las concentración de CO<sub>2</sub> se calcularon a partir de las de NaHCO<sub>3</sub>, calculando el pKa mediante la relación:

$$pKa = 0,175 \log(1/I) + 0,2957 \log (1/T) + 6,3572$$

donde I es la fuerza iónica de la disolución, y T la temperatura en °C (Yokota y Kitaoka, 1985). De la representación de dobles inversos de la actividad carboxilasa (medida en condiciones anoxigénicas) respecto a las diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> se obtuvieron la constante de Michaelis para el CO<sub>2</sub> y la velocidad máxima. La constante de Michaelis para el O<sub>2</sub> (K<sub>o</sub>) se calculó considerando el O<sub>2</sub> como un inhibidor competitivo del CO<sub>2</sub> para la reacción de carboxilación. Se calcularon las relaciones (R) de la velocidad de carboxilación en ausencia de oxígeno (sin inhibidor) respecto a la velocidad de carboxilación en presencia de oxígeno (con inhibidor), a las diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> del ensayo. En estas condiciones de inhibición cruzada se cumple la relación (Laing *et al* 1975):

$$R = 1 + K_c[O_2]/K_o(K_c+[CO_2])$$

$K_0$  se calculó a partir del punto de corte en el eje de ordenadas de la representación  $1/(R-1)$  frente a la concentración de  $CO_2$ .

#### ***4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CARBOXILASA EN EXTRACTOS CRUDOS***

Para estos ensayos se usaron los mutantes de *C. reinhardtii* en residuos conservados de la subunidad pequeña [s(C41S), s(C83S)] y grande (C84S, C247S, C284S, C449S, C459S, C449S/C459S, C427S) que fueron obtenidos en un trabajo previo en nuestro grupo de trabajo (Marín-Navarro, 2004). Los cultivos de los mutantes crecidos en medio acetato con luz se diluyeron a  $4 \cdot 10^6$  céls/ml. Entre 2-8ml de cultivo se centrifugaron (1500g 2min) y el sedimento se resuspendió en 100  $\mu$ l/ml de tampón de homogeneización (Tris-HCl 100mM pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 20mM, EDTA 1mM, NaHCO<sub>3</sub> 10mM, inhibidores de proteasas complete de Sigma (1pastilla/50ml)) junto el agente modificador (arsenito de sodio 2mM y/o CSH 20mM). Cada tratamiento se realizó por duplicado. Las células se sonicaron en un baño de hielo con pulsos de 5seg 75W hasta que se observó por microscopía una rotura celular total. Los restos celulares se sedimentaron por centrifugación (1500g x 5min, 4°C) y se incubaron a 30° durante 1h. Se tomaron 50 $\mu$ l por triplicado de cada muestra para la medida de actividad, y 75 $\mu$ l para la electroforesis nativa.

## **5. PROTEOLISIS DE LA RUBISCO**

### ***5.1. ENSAYO DE PROTEOLISIS***

Para la digestión con subtilisina, se mezclaron 80  $\mu\text{l}$  de la Rubisco reducida u oxidada con 20  $\mu\text{l}$  de proteasa (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en tampón de activación. Las mezclas se incubaron en un baño de agua a 30°C a diferentes tiempos, y la reacción se paró mediante la adición de 10  $\mu\text{l}$  de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 22mM, disuelto en isopropanol, transfiriendo inmediatamente las muestras a hielo durante 10min. A continuación se prepararon las muestras para la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Para ello se añadieron 55 $\mu\text{l}$  de tampón de carga SDS 3X (Tris-HCl 0,188M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,6M, SDS 6% (p/v), glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,075% (p/v), pH 6,8) y la mezcla se hirvió durante 5 min.

### ***5.2. AJUSTE MATEMÁTICO AL MODELO DE PROTEOLISIS***

Los sistemas de ecuaciones diferenciales (ecuaciones 1-3 descritas en los resultados del capítulo I, apartado 2.6) se resolvieron numéricamente mediante el método de Newton, utilizando una hoja Excel. Los parámetros desconocidos (constantes cinéticas) se determinaron ajustando los puntos teóricos calculados por el modelo a los puntos experimentales, minimizando la suma de las desviaciones elevadas al cuadrado con la herramienta Solver de Microsoft Excel. La calidad del ajuste se evaluó con el coeficiente de determinación (Chatfield, 1983). El error estándar de las constantes se calculó utilizando el procedimiento de remuestreo virtual conocido como jackknife (Efron, 1982).

## 6. ELECTROFORESIS (SDS-PAGE Y PAGE), TRANSFERENCIA A MEMBRANAS E INMUNOREVELADO DE LA RUBISCO

La **SDS-PAGE** discontinua se realizó en geles del 10% o del 14% de poliacrilamida en el gel resolutivo (Laemmli, 1970). La electroforesis se corrió a 70V durante 30min y 100V durante 1h. Después, los geles se tiñeron con Coomassie R-250 0,1% en una mezcla de metanol 46% (v/v) y ácido acético 8% (v/v) y se destiñeron con una mezcla de ácido acético 5% (v/v) y metanol 20% (v/v). En otros casos, las proteínas se **electrotransfirieron** desde los geles a membranas de polivinildifluorideno (PVDF, Bio-Rad) a 20V durante una noche o 100V 1h30 en tampón TB (Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20%(v/v) pH 8,3). La **inmunodetección** se llevó a cabo utilizando, como anticuerpo primario, un antisuero de conejo contra la Rubisco purificada de *Euglena gracilis* (Garcia-Ferris y Moreno, 1994) o en otros casos un antisuero de conejo obtenido comercialmente contra la Rubisco purificada de *C.reinhardtii*. Como anticuerpo secundario se usó uno de cabra anti-inmunoglobulina G de conejo conjugado al enzima peroxidasa (Goat antirabbit IgG(H+L) HRP conjugate, Bio-Rad), revelando finalmente con el sustrato 4-cloro-1-naftol (HRP color development reagent, Bio-Rad). Los geles teñidos con Coomassie y las membranas inmunoreveladas fueron escaneadas y cuantificadas utilizando un programa de análisis de imagen (Quantity One, Bio-Rad).

La electroforesis de la Rubisco nativa se llevó a cabo en **geles no desnaturalizantes** de poliacrilamida (PAGE) que se prepararon con un gel resolutivo de poliacrilamida al 7% (p/v) y un pregel de poliacrilamida al 4% (p/v) en un tampón Tris-HCl 0,375M, pH 8,9. Las muestras se prepararon en tampón de carga no desnaturalizante 3X [Tris-HCl 0,2M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,6M, glicerol 25% (p/v), azul de bromofenol 0,075% (p/v), pH 8] sin hervir.

La electroforesis se corrió durante 1h a 70V y 17h a 40V en tampón Tris-glicina 50mM pH 8,3.

## **7. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES DE *C. reinhardtii***

### ***7.1. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE *C. reinhardtii****

#### ***7.1.1 Determinación del contenido de clorofilas***

Se partió de alícuotas de 1ml de cultivo. Las células se sedimentaron por centrifugación (1500g x 2min) y se resuspendieron en 1ml de acetona manteniéndolas a partir de entonces a 4°C y en oscuridad. Después de eliminar los restos celulares por centrifugación (1500g x 10min, 4°C), se determinó el contenido en clorofilas del sobrenadante, midiendo las absorbancias a 645 y 663 nm y aplicando la siguiente fórmula (Arnon, 1949):

$$\text{Clorofilas tot } (\mu\text{g/ml}) = 20,2 \cdot \text{Abs}(645\text{nm}) + 8,02 \cdot \text{Abs}(663\text{nm})$$

#### ***7.1.2. Determinación de la cantidad de proteínas***

Las proteínas de los extractos se precipitaron con TCA al 10% a 4°C durante una noche. El sedimento se centrifugó (1500g x 10min, 4°C), se lavó con 1ml de acetona para eliminar los restos de ácido, y tras una segunda centrifugación (1500g x 10min, 4°C) se resuspendió en 50µl de NaOH 1M. Se añadió 0,45ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,22% (p/v) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación se añadió 0,5ml de Lowry C, preparado como una mezcla 50:1:1 de LowryA (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%(p/v) en NaOH 0,1M)/LowryB1 (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,5% (p/v) en H<sub>2</sub>O)/LowryB2(Na/K tartrato 1%(p/v) en H<sub>2</sub>O). Las mezclas se incubaron de nuevo a temperatura ambiente durante 10 min, y se revelaron finalmente con 0,1ml de Lowry D (mezcla 1:1 de H<sub>2</sub>O/ reactivo de Folin-Ciocalteu, Panreac). Se dejó completar la reacción

a temperatura ambiente durante 30 min y se midió la absorbancia a 750nm, tras eliminar los restos celulares por centrifugación (1500g x 5min). Como patrón se utilizó seroalbúmina bovina (0-80µg por ensayo).

## ***7.2. SEGUIMIENTO DEL CONTENIDO EN RUBISCO, PROTEÍNAS TOTALES Y CLOROFILA DURANTE LOS ESTRESSES***

El **estrés salino** se realizó con NaCl a una concentración final de 0.3M, y el **estrés oxidativo** con diamida a una concentración final de 2mM, ambos en medio acetato. Los estreses se aplicaron por triplicado a los mutantes y revertiente en paralelo. Los cultivos estresados se mantuvieron bajo luz continua (suministrada por 3 tubos de luz blanca de 30W situados a 30cm) a 28°C con agitación orbital. Durante el intervalo de estrés (7h (diamida) y 11 h (salino)) se tomaron periódicamente muestras para el seguimiento de la Rubisco, y en paralelo, como control interno del estrés, se siguió la evolución del contenido de proteínas y clorofilas totales (éstas últimas solo en el estrés salino).

El contenido de Rubisco y su estado de oxidación se analizó mediante electroforesis e inmunorevelado de muestras procesadas en condiciones reductoras y no reductoras (los tioles libres se bloquearon con IAM 10mM durante 10min a temperatura ambiente antes de añadir el tampón de carga sin β-ETSH y hervir las muestras).

El estado de los cultivos, medido por la densidad celular, contenido de proteínas y clorofilas fue similar al inicio del estrés. Con objeto de homogeneizar las condiciones iniciales todos los cultivos se diluyeron diariamente a la misma densidad celular durante los 2 o 3 días previos al inicio del estrés. Los resultados se dan como promedio de diferentes

experimentos independientes. En concreto para el estrés con diamida se muestra la media de tres experimentos con tres réplicas de cada mutante y para el estrés salino: siete experimentos del cultivo revertiente, tres del cultivo C172S, cinco del cultivo C192S y seis del cultivo C172S/C192S.

### ***7.3. ENSAYO DE FIJACIÓN DE CO<sub>2</sub> IN VIVO DURANTE EL ESTRÉS***

El estrés con diamida (1,12mM en medio acetato) se aplicó por duplicado sobre cultivos crecidos independientemente, en tubos de cristal iluminados por una bombilla de luz blanca de 100W situada a 20cm, mantenidos en un baño de agua a 30°C, y agitados manualmente de forma periódica. En paralelo se ensayó un control no sometido a estrés, obtenido por mezcla de los cultivos de partida a la misma concentración celular. El estrés con diamida se inició añadiendo 35 µl de stock de diamida 102,4mM y 200 µl de [<sup>14</sup>C]-NaHCO<sub>3</sub> 40mM (5·10<sup>9</sup> dpm/mmol) a 2965 µl de células (2,2·10<sup>6</sup> células/ml). A diferentes tiempos de estrés, se tomaron alícuotas de 200µl, en las que se detuvo la fijación con 50µl de SDS 2% en HCl 2M. El exceso de NaHCO<sub>3</sub> no fijado se evaporó como en el ensayo de actividad carboxilasa *in vitro* y, de la misma manera, se midió la radiactividad fijada.

Para evitar la influencia comprobada de la posición respecto al foco de luz en la fijación, cada réplica (conjunto de cultivos estresados y control de cada mutante) se sometió a permutaciones periódicas de manera, que cada vez que se tomaba una muestra, los tubos habían estado en las mismas posiciones durante el mismo periodo de tiempo.

La radiactividad específica del sustrato se calculó a partir de la medida de radiactividad correspondiente a 12,5µl de la disolución [<sup>14</sup>C]-NaHCO<sub>3</sub> 40mM, añadiendo 3ml de la mezcla de centelleo alcalina.

Para la medida simultánea de la cantidad de Rubisco, se dispuso en paralelo, una segunda fila de tubos. En este caso el estrés se inició de igual manera pero se añadió el NaHCO<sub>3</sub> 40mM no radioactivo. Periódicamente, se tomaron alícuotas para la cuantificación de la Rubisco total, cuya cantidad se determinó por SDS-PAGE, transferencia a membrana e inmunodetección.

## **8. CRISTALIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA RUBISCO DE LOS MUTANTES**

### ***8.1. CRISTALIZACIÓN***

Se utilizó la técnica de la gota colgante/equilibrio de vapor para crecer los cristales a una temperatura constante de 20°C. Las gotas se prepararon sobre un porta siliconizado mezclando 2-3µl de una muestra que tenía Rubisco 10mg/ml y 1mM 2-CABP con un volumen igual de la solución del pocillo que contenía HEPES 50mM (0,02% azida sódica) pH 7,5, NaCl 0,05 a 0,2M, PEG 4000 7 a 12% (0,02% azida sódica), NaHCO<sub>3</sub> 10mM y MgCl<sub>2</sub> 5mM (Karkehabadi *et al*, 2005).

Para cristalizar la proteína silvestre modificada con diferentes agentes como cistamina, diferentes relaciones redox ( $r=0,8$ ,  $r=1,5$ ,  $r=4$ ,  $r=8$ ) o arsenito en presencia de un reductor (cisteamina o  $\beta$ -mercaptoetanol) se probaron distintas técnicas. Se intentó cristalizar la proteína modificada previamente pasada por cromatografía de exclusión molecular para quitar el exceso de reactivos; cocrystalizar la proteína en presencia de los reactivos; modificar la proteína una vez cristalizada pasando un cristal de la proteína silvestre a una gota equilibrada con los reactivos; o promover el crecimiento de microcristales en presencia de los modificadores en una gota equilibrada (para

ellos se transfirieron microcristales de la proteína silvestre con un pelo de gato).

## ***8.2. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA RUBISCO***

### ***8.2.1. Obtención de los datos y procesamiento***

Los datos de difracción de rayos X de cristales simples de las proteínas C172S y C192S, que se habían congelado en nitrógeno líquido en una solución criogénica (solución de cristalización con etilenglicol 30%) se recopilaron a 100 K en el haz I711 del sincrotrón del MAX-lab (Universidad de Lund, Suecia). El tiempo de exposición por imagen fue de 100s cada 0,5° rotando el cristal en un goniómetro con giro mecánico. Los cristales difractaron a una resolución de 2,9Å para el mutante C172S y 2,6Å para el mutante C192S. Se analizó otro cristal del mutante C172S en el haz ID 14-3 en *European Synchrotron Radiation Facility* (Grenoble, Francia) a 100 K que difractó a una resolución de 2,3Å.

El procesamiento de los datos y determinación de la estructura se llevó a cabo con la colaboración de Saeid Karkehabadi e Inger Andersson (Universidad Agrícola Sueca en Uppsala). Los datos se procesaron usando los programas DENZO y SCALEPACK (Otwinowski y Minor, 1997). En ambos casos, la célula unidad presentaba simetría  $p2_1$  con 1 molécula por unidad asimétrica.

### ***8.2.2. Obtención de las fases, construcción del modelo y refinamiento***

Las estructuras de los cristales se resolvieron mediante **reemplazamiento molecular** con el programa AMORE (Navaza y Saludjian, 1997; Collaborative Computational Project, 2005). La molécula modelo fue

un juego de subunidad grande y pequeña de la Rubisco silvestre de *C. reinhardtii* obtenida a 1,4 Å de resolución (código PDB 1GK8) donde las cadenas laterales de los residuos sustituidos se habían eliminado. En cada caso (C172S y C192S) se encontraron las ocho soluciones correspondientes a las ocho orientaciones diferentes en la unidad modelo dentro de un hexadecámero en la unidad asimétrica.

El ajuste final de la estructura se llevó a cabo usando los programas del pack CC4P REFMAC v.5 (Murshudov *et al.*, 1997). Todas las reflexiones entre 25 Å y 2.3 Å resolución (C172S) y 25 Å y 2,65 Å (C192S) se usaron en el proceso de refinamiento, excepto el 5% de datos que se excluyeron aleatoriamente para el cálculo de  $R_{\text{libre}}$ . Los mapas de densidad electrónica iniciales calculados después de una primera ronda de refinamiento mostró claramente densidad para los residuos sustituidos 172 y 192 respectivamente. Después de la construcción de los residuos correspondientes, las estructuras de los enzimas mutantes se siguieron refinando usando una función de máxima probabilidad. Finalmente, el ajuste se mejoró introduciendo restricciones en la simetría no cristalográfica (SNC) de las ocho copias de la subunidad grande y pequeña de la unidad asimétrica. Las moléculas de agua se añadieron usando el programa ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1997), seguido por confirmación visual y la corrección de las asignaciones. Durante todo el refinamiento se inspeccionaron los mapas ponderados  $\sigma_A$   $2mFo-DFc$  y  $mFo-DFc$  (Pannu y Read, 1996). El programa O (Jones *et al.*, 1991) se usó para la visualización de los mapas de densidad electrónica, ajuste de los modelos, y el seguimiento y evaluación del refinamiento de las estructuras. Las estructuras de C172S y C192S se refinaron a un valor final de  $R_{\text{crist}}/R_{\text{libre}}$  de 0,183/0,220 y 0,204/0,244 respectivamente. La calidad estereoquímica del modelo se analizó con PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993 ).

El programa Swiss pdb viewer se utilizó para el estudio de las estructuras finales, y la obtención de las figuras.



---

## *BIBLIOGRAFÍA*



**Albuquerque, J.A., Esquivel, M.G., Teixeira, A.R., y Ferreira, R.B.** 2001. The catabolism of ribulose biphosphate carboxylase from higher plants. A hypothesis. *Plant Sci.* **161**:55-65.

**Adam, Z. y Clarke, A. K.** 2002. Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends Plant Sci.* **7**: 451-456

**Adam, Z., Adamska, I., Nakabayashi, K., Ostersetzer, O., Haussuhl, K., Manuell, A., Zheng, B., Vallon, O., Rodermeil, S. R., Shinozaki, K. y Clarke, A. K.** 2001. Chloroplast and mitochondrial proteases in Arabidopsis. A proposed nomenclature. *Plant Physiol* **125**:1912-1918.

**Andersson, I., Knight, S., Schneider, G., Lindqvist, Y., Lundqvist, T., Branden, C.I., y Lorimer, G.H.** 1989. Crystal structure of the active site of ribulose-biphosphate carboxylase. *Nature* **337**:229-234.

**Andersson, I.** 1996. Large structures at high resolution: the 1.6 Å crystal structure of spinach ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase complexed with 2-carboxyarabinitol biphosphate. *J. Mol. Biol.* **259**:160-174.

**Andersson, I. y Taylor, T.C.** 2003. Structural framework for catalysis and regulation in ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **414**:130-140.

**Andrews, T.J. y Lorimer, G.H.** 1978. Photorespiration: still unavoidable? *FEBS Lett.* **90**:1-9.

**Andrews, T.J. y Ballment, B.** 1983. The function of the small subunits of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *J. Biol. Chem.* **258**:7514-7518.

**Andrews, T.J. y Lorimer, G.H.** 1985. Catalytic properties of a hybrid between cyanobacterial large subunits and higher plant small subunits of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *J. Biol. Chem.* **260**:4632-4636.

**Andrews, T.J. y Lorimer, G.H.** 1987. Rubisco: structure, mechanisms and prospects for improvement. *In* The Biochemistry of Plants, Vol. 10. M.D.Hatch and N.K.Boardman, editors. Academic Press, San Diego. 131-218.

**Andrews, T.J.** 1988. Catalysis by cyanobacterial ribulose-bisphosphate carboxylase large subunits in the complete absence of small subunits. *J. Biol. Chem.* **263**:12213-12219.

**Andrews, T.J. y Kane, H.J.** 1991. Pyruvate is a by-product of catalysis by ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* **266**:9447-9452.

**Arnon, D.I.** 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**:1-15.

**Ashida, H., Saito, Y., Kojima, C., Kobayashi, K., Ogasawara, N., y Yokota, A.** 2003. A functional link between RuBisCO-like protein of Bacillus and photosynthetic RuBisCO. *Science* **302**:286-290.

**Ashida, H., Danchin, A., y Yokota, A.** 2005. Was photosynthetic RuBisCO recruited by acquisitive evolution from RuBisCO-like proteins involved in sulfur metabolism? *Res. Microbiol* **156**:611-618.

**Ashton, A.R.** 1982. A role for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase as a metabolite buffer. *FEBS Lett.* **145**:1-17.

**Bainbridge, G., Madgwick, P., Parmar, S., Mitchell, R., Paul, M., Pitts, J., Keys, A., y Parry, M.A.** 1995. Engineering Rubisco to change its catalytic properties. *Journal of Experimental Botany* **46**:1269-1276.

**Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schurmann, P., y Buchanan, B.B.** 2003. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**:370-375.

**Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Schurmann, P., y Buchanan, B.B.** 2004a. Proteomics uncovers proteins interacting electrostatically with thioredoxin in chloroplasts. *Photosynth. Res.* **79**:275-280.

**Balmer, Y., Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Hurkman, W.J., Gelhaye, E., Rouhier, N., Jacquot, J.P., Manieri, W., Schurmann, P., Droux, M., y Buchanan, B.B.** 2004b. Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**:2642-2647.

**Baneyx, F., Bertsch, U., Kalbach, C.E., van der Vies, S.M., Soll, J., y Gatenby, A.A.** 1995. Spinach chloroplast cpn21 co-chaperonin possesses two functional domains fused together in a toroidal structure and exhibits nucleotide-dependent binding to plastid chaperonin 60. *J. Biol. Chem.* **270**:10695-10702.

**Barcena, J.A.** 1983. Differential effect of Ca<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> on activation and catalysis of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biochemistry International* **6**:755-760.

**Bassham, J.S.** 2003. Mapping the carbon reduction cycle: a personal retrospective. *Photosynth. Res.* **76**:35-52.

**Bedbrook, J.R., Coen, D.M., Beaton, A.R., Bogorad, L., y Rich, A.** 1979. Location of the single gene for the large subunit of ribulosebisphosphate carboxylase on the maize chloroplast chromosome. *J. Biol. Chem.* **254**:905-910.

**Benson, A.A.** 2002. Following the path of carbon in photosynthesis: a personal story. *Photosynth. Res.* **73**:29-49.

**Bertsch, U., Soll, J., Seetharam, R., y Viitanen, P.V.** 1992. Identification, characterization, and DNA sequence of a functional "double" groES-like chaperonin from chloroplasts of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:8696-8700.

**Birnboim, H.C.** 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**:243-255.

**Biteau, B., Labarre, J. y Toledano, M. B.** 2003. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature.* **425**: 980-984.

**Boston, R.S., Viitanen, P.V., y Vierling, E.** 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* **32**:191-222.

**Bowes, G., Ogren, W.L., y Hageman, R.H.** 1971. Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**:716-722.

Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., y Shark, K.B. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* **240**:1534-1538.

Broin, M., Cuine, S., Eymery, F., y Rey, P. 2002. The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *Plant Cell* **14**:1417-1432.

Bruggemann, W. 1995. Long-term chilling of young tomato plants under low light. VI. Differential chilling sensitivity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is linked to the oxidation of cysteine residues. *Plant Cell Physiol.* **36**:733-736.

Buchanan, B.B. y Balmer, Y. 2004. Redox Regulation: A Broadening Horizon. *Annu. Rev. Plant Biol.*

Buchanan, B.B., Schurmann, P., y Jacquot, J.P. 1994. Thioredoxin and metabolic regulation. *Semin. Cell Biol.* **5**:285-293.

Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S., y Venter, J.C. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**:1058-1073.

Bushnell, T.P., Bushnell, D. y Jagendorf, A.T. 1993. A Purified Zinc Protease of Pea Chloroplasts, EP1, Degrades the Large Subunit of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Plant Physiol* **103**: 585-591.

Casano, L.M., Gómez, L. D. y Trippi, V.S. 1990. Oxygen- and light-induced proteolysis in isolated oat chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **31**, 377-382.

Calvin, M. 1956. The photosynthetic carbon cycle. *J. Chem. Soc.* 1895-1915.

Chatfield, C. 1983. Statistics for technology. Chapman and Hall, London.

- Chen, Z.X., Chastain, C.J., Al Abed, S.R., Chollet, R. y Spreitzer, R.J.** 1988. Reduced CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase in a temperature-sensitive chloroplast mutant of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**: 4696-4699.
- Chen, Z. y Spreitzer, R.J.** 1991. Proteolysis and transition-state-analogue binding of mutant forms of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **183**:597-603.
- Chiba, A., Ishida, H., Nishizawa, N.K., Makino, A., y Mae, T.** 2003. Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiol* **44**:914-921.
- Christeller, J.T. y Laing, W.A.** 1979. Effects of manganese ions and magnesium ions on the activity of soya-bean ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biochem. J.* **183**:747-750.
- Clegg, M.T., Cummings, M.P., y Durbin, M.L.** 1997. The evolution of plant nuclear genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:7791-7798.
- Cleland, W.W., Andrews, T.J., Gutteridge, S., Hartman, F.C., y Lorimer, G.H.** 1998. Mechanism of Rubisco: The Carbamate as General Base. *Chem. Rev.* **98**:549-562.
- Cohen, I., Knopf, J.A., Irihimovitch, V., y Shapira, M.** 2005. A proposed mechanism for the inhibitory effects of oxidative stress on rubisco assembly and its subunit expression. *Plant Physiol* **137**:738-746.
- Collaborative Computational Project, N.4.** 2005. The CCP4 suite programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* **50**:760-763.
- Curmi, P.M., Cascio, D., Sweet, R.M., Eisenberg, D., y Schreuder, H.** 1992. Crystal structure of the unactivated form of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from tobacco refined at 2.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **267**:16980-16989.
- Dean, C., Pichersky, E., y Dunsmuir, P.** 1989. Structure, Evolution, and Regulation of RbcS Genes in Higher Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**:415-439.

**Delwiche, C.F. y Palmer, J.D.** 1996. Rampant horizontal transfer and duplication of rubisco genes in eubacteria and plastids. *Mol. Biol. Evol.* **13**:873-882.

**Desimone, M., Henke, A., y Wagner, E.** 1996. Oxidative Stress Induces Partial Degradation of the Large Subunit of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Isolated Chloroplasts of Barley. *Plant Physiol* **111**:789-796.

**Desimone, M., Wagner, E., y Johanningmeier, U.** 1998. Degradation of active-oxygen-modified ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by chloroplastic proteases requires ATP-hydrolysis. *Planta* **205**:459-466.

**Di Simplicio, P., Lupis, E., y Rossi, R.** 1996. Different mechanisms of formation of glutathione-protein mixed disulfides of diamide and tert-butyl hydroperoxide in rat blood. *Biochim. Biophys. Acta* **1289**:252-260.

**Dickson, R., Weiss, C., Howard, R.J., Alldrick, S.P., Ellis, R.J., Lorimer, G., Azem, A., y Viitanen, P.V.** 2000. Reconstitution of higher plant chloroplast chaperonin 60 tetradecamers active in protein folding. *J. Biol. Chem.* **275**:11829-11835.

**Dorner, R.W., Kahn, A., y Wildman, S.G.** 1957. The proteins of green leaves. VII. Synthesis and decay of the cytoplasmic proteins during the life of the tobacco leaf. *J. Biol. Chem.* **229**:945-952.

**Drzymalla, C., Schroda, M., y Beck, C.F.** 1996. Light-inducible gene HSP70B encodes a chloroplast-localized heat shock protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* **31**:1185-1194.

**Du, Y.C., Hong, S., y Spreitzer, R.J.** 2000. RbcS suppressor mutations improve the thermal stability and CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of rbcL- mutant ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:14206-14211.

**Du, Y.C. y Spreitzer, R.J.** 2000. Suppressor mutations in the chloroplast-encoded large subunit improve the thermal stability of wild-type ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* **275**:19844-19847.

**Du, Y.C., Peddi, S.R., y Spreitzer, R.J.** 2003. Assessment of structural and functional divergence far from the large subunit active site of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* **278**:49401-49405.

**Duff, A.P., Andrews, T.J., y Curmi, P.M.** 2000. The transition between the open and closed states of rubisco is triggered by the inter-phosphate distance of the bound bisphosphate. *J. Mol. Biol.* **298**:903-916.

**Eckardt, N.A. y Pell, E.J.** 1995. Oxidative modification of Rubisco from potato foliage in response to ozone. *Plant Physiol. Biochem.* **33**:273-282.

**Edmonson, D.L., Badger, M.R., y Andrews, T.J.** 1990. A kinetic characterization of slow inactivation of ribulose carboxylase during catalysis. *Plant Physiol* **93**:1376-1382.

**Efron, B.** 1982. The jackknife, the bootstrap and other resampling plans. SIAM, Philadelphia.

**Ellis, R.J.** 1979. The most abundant protein in the world. *Trends Biochem. Sci.* **4**:241-244.

**Esquivel, M.G., Anwaruzzaman, M., y Spreitzer, R.J.** 2002. Deletion of nine carboxy-terminal residues of the Rubisco small subunit decreases thermal stability but does not eliminate function. *FEBS Lett.* **520**:73-76.

**Evans, J.R. y J.R.Seeman.** 1989. The allocation of protein nitrogen in the photosynthetic apparatus: costs, consequences, and control. *In* Photosynthesis. W.R.Briggs, editor. Alan R. Liss, New York. 183-206.

**Ezaki, S., Maeda, N., Kishimoto, T., Atomi, H., y Imanaka, T.** 1999. Presence of a structurally novel type ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Biol. Chem.* **274**:5078-5082.

**Ferreira, R.B. y Davies, D.D.** 1989. Conversion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase to an acidic and catalytically inactive form by extracts of osmotically stressed *Lemna minor* fronds. *Planta* **179**:448-455.

**Ferreira, R.B. y Shaw, N.M.** 1989. Effect of osmotic stress on protein turnover in *Lemna minor* fronds. *Planta* **179**:456-465.

**Ferreira, R.M. y Teixeira, A.R.** 1992. Sulfur starvation in *Lemna* leads to degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase without plant death. *J. Biol. Chem.* **267**:7253-7257.

**Ferreira, R.M., Franco, E., y Teixeira, A.R.** 1996. Covalent dimerization of ribulose bisphosphate carboxylase subunits by UV radiation. *Biochem. J.* **318**:227-234.

**Ferreira, R.B., Esquivel, M.G., y Teixeira, A.R.** 2000. Catabolism of ribulose bisphosphate carboxylase from higher plants. *Current Topics in Phytochemistry* **3**:129-165.

**Finn, M.W. y Tabita, F.R.** 2003. Synthesis of catalytically active form III ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in archaea. *J. Bacteriol.* **185**:3049-3059.

**Finn, M.W. y Tabita, F.R.** 2004. Modified pathway to synthesize ribulose 1,5-bisphosphate in methanogenic archaea. *J. Bacteriol* **186**:6360-6366.

**Flachmann, R. y Bohnert, H.J.** 1992. Replacement of a conserved arginine in the assembly domain of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit interferes with holoenzyme formation. *J. Biol. Chem.* **267**:10576-10582.

**Franco, E., Ferreira, R.B., y Teixeira, A.R.** 1992. Involvement of membrane damage in stress-induced oxidative deactivation of ribulose bisphosphate carboxylase from *Lemna minor*. *Aust. J. Plant Physiol.* **19**:297-307.

**García-Ferris, C. y Moreno, J.** 1993. Redox regulation of enzymatic activity and proteolytic susceptibility of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Euglena gracilis*. *Photosynthesis Research* **35**:55-66.

**García-Ferris, C. y Moreno, J.** 1994. Oxidative modification and breakdown of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase induced in *Euglena gracilis* by nitrogen starvation. *Planta* **193**:208-215.

**Gerhardt, K.E., Wilson, M.I., y Greenberg, B.M.** 1999. Tryptophan photolysis leads to a UVB-induced 66 kDa photoproduct of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) *in vitro*. *Photochemistry and Photobiology* **70**:49-56.

Ghezzi, P., Romines, B., Fratelli, M., Eberini, I., Gianazza, E., Casagrande, S., Laragione, T., Mengozzi, M., Herzenberg, L.A., y Herzenberg, L.A. 2002. Protein glutathionylation: coupling and uncoupling of glutathione to protein thiol groups in lymphocytes under oxidative stress and HIV infection. *Mol. Immunol.* **38**:773-780.

Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., Colombo, R., y Dalle-Donne, I. 2004. S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J. Cell Mol. Med.* **8**:201-212.

Goldschmidt-Clermont, M. y Rahire, M. 1986. Sequence, evolution and differential expression of the two genes encoding variant small subunits of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Mol. Biol.* **191**:421-432.

Grimm, R., Grimm, M., Eckerskorn, C., Pohlmeier, K., Rohl, T., y Soll, J. 1997. Postimport methylation of the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in chloroplasts. *FEBS Lett.* **408**:350-354.

Gutteridge, S., Millard, B.N., y Parry, M.A. 1986. Inactivation of ribulose-bisphosphate carboxylase by limited proteolysis. *FEBS Lett.* **196**:263-268.

Gutteridge, J.M. y Halliwell, B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* **15**:129-135.

Gutteridge, S. y Gatenby, A.A. 1995. Rubisco Synthesis, Assembly, Mechanism, and Regulation. *Plant Cell* **7**:809-819.

Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S.Y., Ober, E.S., y Hosseini, S.G. 2005. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics* **5**:950-960.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.. 1989. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford.

Hanahan, D. 1985. DNA Cloning. IRL Press London.

**Hansen, S., Vollan, V.B., Hough, E., y Andersen, K.** 1999. The crystal structure of rubisco from *Alcaligenes eutrophus* reveals a novel central eight-stranded beta-barrel formed by beta-strands from four subunits. *J. Mol. Biol.* **288**:609-621.

**Hanson, T.E. y Tabita, F.R.** 2001. A ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO)-like protein from *Chlorobium tepidum* that is involved with sulfur metabolism and the response to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:4397-4402.

**Hanson, T.E. y Tabita, F.R.** 2003. Insights into the stress response and sulfur metabolism revealed by proteome analysis of a *Chlorobium tepidum* mutant lacking the Rubisco-like protein. *Photosynthesis Research* **78**:231-248.

**Harris, E.H.** 1989. The Chlamydomonas sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, Inc., San Diego.

**Hartman, F.C. y Harpel, M.R.** 1994. Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:197-234.

**Heo, J. y Holbrook, G.P.** 1999. Regulation of 2-carboxy-D-arabinitol 1-phosphate phosphatase: activation by glutathione and interaction with thiol reagents. *Biochem. J.* **338 ( Pt 2)**:409-416.

**Hernández, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F., y del Rfo, L.A.** 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.* **105**:151-167.

**Hilbrand, M., Fischer, A., y Feller, U.** 1994. Protein catabolism in bean leaf discs: accumulation of a soluble fragment of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase under oxygen deficiency. *Journal of Experimental Botany* **45**:1197-1204.

**Hogg, P.J.** 2003. Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem.* **28**:210-214.

**Horken, K.M. y Tabita, F.R.** 1999. Closely related form I ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase molecules that possess different CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> substrate specificities. *Arch. Biochem. Biophys.* **361**:183-194.

**Houtz, R.L. y Portis, A.R.** 2003. The life of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase—posttranslational facts and mysteries. *Arch. Biochem. Biophys.* **414**:150-158.

**Huner, N.P. y Macdowall, F.D.** 1978. Evidence for an in vivo conformational change in ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase from Puma rye during cold adaptation. *Can. J. Biochem.* **56**:1154-1161.

**Irihimovitch, V. y Shapira, M.** 2000. Glutathione redox potential modulated by reactive oxygen species regulates translation of Rubisco large subunit in the chloroplast. *J. Biol. Chem.* **275**:16289-16295.

**Ishida, H., Nishimori, Y., Sugisawa, M., Makino, A., y Mae, T.** 1997. The large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. *Plant Cell Physiol* **38**:471-479.

**Ishida, H., Shimizu, S., Makino, A., y Mae, T.** 1998. Light-dependent fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in chloroplasts isolated from wheat leaves. *Planta* **204**:305-309.

**Ishida, H., Makino, A., y Mae, T.** 1999. Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species occurs near Gly-329. *J. Biol. Chem.* **274**:5222-5226.

**Ivey, R.A. III y Bruce, B.D.** 2000. In vivo and in vitro interaction of DnaK and a chloroplast transit peptide. *Cell Stress Chaperones* **5**:62-71.

**Ivey, R.A. III, Subramanian, C., y Bruce, B.D.** 2000. Identification of a Hsp70 recognition domain within the rubisco small subunit transit peptide. *Plant Physiol* **122**:1289-1299.

**Jaworowski, A., Hartman, F.C., y Rose, I.A.** 1984. Intermediates in the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase reaction. *J. Biol. Chem.* **259**:6783-6789.

**Jensen, R.G.** 2000. Activation of Rubisco regulates photosynthesis at high temperature and CO<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:12937-12938.

**Job, C., Rajjou, L., Lovigny, Y., Belghazi, M., y Job, D.** 2005. Patterns of Protein Oxidation in Arabidopsis Seeds and during Germination. *Plant Physiol* **138**:790-802.

**Johansson, E., Olsson, O., y Nystrom, T.** 2004. Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**:22204-22208.

**Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., y Kjeldgaard.** 1991. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* **47 ( Pt 2)**:110-119.

**Jordan, D.B. y Ogren, W.L.** 1981a. A sensitive assay procedure for simultaneous determination of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and oxygenase activities. *Plant Physiol* **67**:237-245.

**Jordan, D.B. y Ogren, W.L.** 1981b. Species variation in the specificity of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Nature* **291**:513-515.

**Jordan, D.B. y Chollet, R.** 1983. Inhibition of ribulose bisphosphate carboxylase by substrate ribulose 1,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **258**:13752-13758.

**Jordan, D.B. y Ogren, W.L.** 1983. Species variation in kinetic properties of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **227**:425-433.

**Jordan, D.B. y Ogren, W.L.** 1984. The CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: Dependence on ribulosebisphosphate concentration, pH and temperature. *Planta* **161**:308-313.

**Junqua, M., Biolley, J.P., Pie, S., Kanoun, M., Duran, R., y Goulas, P.** 2000. In vivo occurrence of carbonyl residues in *Phaseolus vulgaris* proteins as a direct consequence of a chronic ozone stress. *Plant Physiol. Biochem.* **38**:853-861.

**Kanevski, I., Maliga, P., Rhoades, D.F., y Gutteridge, S.** 1999. Plastome engineering of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in tobacco to form a sunflower large subunit and tobacco small subunit hybrid. *Plant Physiol* **119**:133-142.

- Kaplan, A., Friedberg, D., Schwarz, R., Ariel, R., Seijffers, J., y Reinhold, L.** 1989. The CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms of cyanobacteria: physiological, molecular and theoretical studies. *In* Photosynthesis. W.R.Briggs, editor. Alan R. Liss, Inc., New York. 243-255.
- Karkehabadi, S., Taylor, T.C., y Andersson, I.** 2003. Calcium supports loop closure but not catalysis in Rubisco. *J. Mol. Biol.* **334**:65-73.
- Karkehabadi, S., Peddi, S.R., Anwaruzzaman, M., Taylor, T.C., Cederlund, A., Genkov, T., Andersson, I., y Spreitzer, R.J.** 2005a. Chimeric Small Subunits Influence Catalysis without Causing Global Conformational Changes in the Crystal Structure of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Biochemistry* **44**:9851-9861.
- Karkehabadi, S., Taylor, T.C., Spreitzer, R.J., y Andersson, I.** 2005b. Altered intersubunit interactions in crystal structures of catalytically compromised ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biochemistry* **44**:113-120.
- Kasting, J.F.** 1993. Earth's early atmosphere. *Science* **259**:920-926.
- Kawashima, N. y Wildman, S.G.** 1971. Studies on fraction-I protein. Effect of crystallization of fraction-I protein from tobacco leaves on ribulose diphosphate carboxylase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **229**:240-249.
- Kellog, E.A. y Juliano, N.D.** 1997. The structure and function of RuBisCO and their implications for systematic studies. *American Journal of Botany* **84**:413-428.
- Khan, S., Andralojc, P.J., Lea, P.J., y Parry, M.A.** 1999. 2'-carboxy-D-arabitol 1-phosphate protects ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase against proteolytic breakdown. *Eur. J. Biochem.* **266**:840-847.
- Khrebtukova, I. y Spreitzer, R.J.** 1996. Elimination of the Chlamydomonas gene family that encodes the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:13689-13693.
- Kim, J. y Mullet, J.E.** 2003. A mechanism for light-induced translation of the rbcL mRNA encoding the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in barley chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **44**:491-499.

**Kitano, K., Maeda, N., Fukui, T., Atomi, H., Imanaka, T., y Miki, K.** 2001. Crystal structure of a novel-type archaeal rubisco with pentagonal symmetry. *Structure* **9**:473-481.

**Klenk, H.P., Clayton, R.A., Tomb, J.F., White, O., Nelson, K.E., Ketchum, K.A., Dodson, R.J., Gwinn, M., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Richardson, D.L., Kerlavage, A.R., Graham, D.E., Kyrpides, N.C., Fleischmann, R.D., Quackenbush, J., Lee, N.H., Sutton, G.G., Gill, S., Kirkness, E.F., Dougherty, B.A., McKenney, K., Adams, M.D., Loftus, B., y Venter, J.C.** 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**:364-370.

**Knight, S., Andersson, I., y Branden, C.I.** 1989. Reexamination of the three-dimensional structure of the small subunit of Rubisco from higher plants. *Science* **244**:702-705.

**Knight, S., Andersson, I., y Branden, C.I.** 1990. Crystallographic analysis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4 Å resolution. Subunit interactions and active site. *J. Mol. Biol.* **215**:113-160.

**Knopf, J.A. y Shapira, M.** 2005. Degradation of Rubisco SSU during oxidative stress triggers aggregation of Rubisco particles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **222**:787-793.

**Kokubun, N., Ishida, H., Makino, A., y Mae, T.** 2002. The degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase into the 44-kDa fragment in the lysates of chloroplasts incubated in darkness. *Plant Cell Physiol* **43**:1390-1395.

**Kosower, N.S. y Kosower, E.M.** 1995. Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol.* **251**:123-133.

**Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., y Danchin, A.** 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249-256.

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

**Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. y Thornton, J.M.** 2006. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J.Appl.Crystallog.* **26**: 283-291.

**Laing, W.A., Ogren, W.L. y Hageman, R.H.** 1975. Bicarbonate stabilization of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase. *Biochemistry*. **14**: 2269-2275.

**Landry, L.G. y Pell, E.J.** 1993. Modification of Rubisco and Altered Proteolytic Activity in O<sub>3</sub>-Stressed Hybrid Poplar (*Populus maximowizii* x *trichocarpa*). *Plant Physiol* **101**:1355-1362.

**Lang, K., Schmid, F.X., y Fischer, G.** 1987. Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* **329**:268-270.

**Lang, K. y Schmid, F.X.** 1988. Protein-disulphide isomerase and prolyl isomerase act differently and independently as catalysts of protein folding. *Nature* **331**:453-455.

**Larimer, F.W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., Land, M.L., Pelletier, D.A., Beatty, J.T., Lang, A.S., Tabita, F.R., Gibson, J.L., Hanson, T.E., Bobst, C., Torres, J.L., Peres, C., Harrison, F.H., Gibson, J., y Harwood, C.S.** 2004. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nat. Biotechnol.* **22**:55-61.

**Larson, E.M., O'Brien, C.M., Zhu, G., Spreitzer, R.J., y Portis, A.R., Jr.** 1997. Specificity for activase is changed by a Pro-89 to Arg substitution in the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* **272**:17033-17037.

**Leegood, R.C., Lea, P.J., Adcock, M.D., y Hausler, R.E.** 1995. The regulation and control of photorespiration. *Journal of Experimental Botany* **46**:1397-1414.

**Lemaire, S.D., Guillon, B., Le Marechal, P., Keryer, E., Miginiac-Maslow, M., y Decottignies, P.** 2004. New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**:7475-7480.

**Li, H., Sawaya, M.R., Tabita, F.R., y Eisenberg, D.** 2005. Crystal structure of a RuBisCO-like protein from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Structure. (Camb.)* **13**:779-789.

**Lindahl, M. y Florencio, F.J.** 2003. Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**:16107-16112.

**Lorimer, G.H. y Miziorako, H.M.** 1980. Carbamate formation on the epsilon-amino group of a lysyl residue as the basis for the activation of ribulosebiphosphate carboxylase by CO<sub>2</sub> and Mg<sup>2+</sup>. *Biochemistry* **19**:5321-5328.

**Lorimer, G.H., Chen, Y.R., y Hartman, F.C.** 1993. A role for the epsilon-amino group of lysine-334 of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in the addition of carbon dioxide to the 2,3-enediol(ate) of ribulose 1,5-bisphosphate. *Biochemistry* **32**:9018-9024.

**Lundqvist, T. y Schneider, G.** 1989a. Crystal structure of the binary complex of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and its product, 3-phospho-D-glycerate. *J. Biol. Chem.* **264**:3643-3646.

**Lundqvist, T. y Schneider, G.** 1989b. Crystal structure of the complex of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and a transition state analogue, 2-carboxy-D-arabinitol 1,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **264**:7078-7083.

**Luo, S., Ishida, H., Makino, A., y Mae, T.** 2002. Fe<sup>2+</sup>-catalyzed site-specific cleavage of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase close to the active site. *J. Biol. Chem.* **277**:12382-12387.

**Mae, T., Kai, N., Makino, A., y Ohira, K.** 1984. Relation between ribulose bisphosphate carboxylase content and chloroplast number in naturally senescing primary leaves of wheat. *Plant Cell Physiol* **25**:333-336.

**Maeda, N., Kanai, T., Atomi, H., y Imanaka, T.** 2002. The unique pentagonal structure of an archaeal Rubisco is essential for its high thermostability. *J. Biol. Chem.* **277**:31656-31662.

**Marcus, Y., Altman-Gueta, H., Finkler, A., y Gurevitz, M.** 2003. Dual role of cysteine 172 in redox regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and degradation. *J. Bacteriol.* **185**:1509-1517.

**Marín-Navarro, J. y Moreno, J.** 2003. Modification of the proteolytic fragmentation pattern upon oxidation of cysteines from ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biochemistry* **42**:14930-14938.

**Marín-Navarro, J.** Contribución de residuos conservados de cisteína a la regulación redox del catabolismo de la Rubisco. 2004. Universidad de Valencia. Tesis Doctoral

**Mausser, H., King, W.A., Gready, J.E., y Andrews, T.J.** 2001. CO<sub>2</sub> fixation by Rubisco: computational dissection of the key steps of carboxylation, hydration, and C-C bond cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* **123**:10821-10829.

**McCurry, S.D. y Tolbert, N.E.** 1977. Inhibition of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by xylulose 1,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **252**:8344-8346.

**McRae, D.G. y Thompson, J.E.** 1983. Senescence-dependent changes in superoxide anion production by illuminated chloroplasts from bean leaves. *Planta* **158**:185-193.

**Mehta, R.A., Fawcett, T.W., Porath, D., y Mattoo, A.K.** 1992. Oxidative stress causes rapid membrane translocation and in vivo degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* **267**:2810-2816.

**Miller, B.L. y Huffaker, R.C.** 1982. Hydrolysis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by endoproteinases from senescing barley leaves. *Plant Physiol* **69**:58-62.

**Mitsubishi, W., Crafts-Brandner, S.J., y Feller, U.** 1992. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase degradation in isolated pea chloroplasts incubated in the light or in the dark. *J. Plant Physiol.* **139**:653-658.

**Miziorko, H.M.** 1979. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. Evidence in support of the existence of distinct CO<sub>2</sub> activator and CO<sub>2</sub> substrate sites. *J. Biol. Chem.* **254**:270-272.

- Mizohata, E., Matsumura, H., Okano, Y., Kumei, M., Takuma, H., Onodera, J., Kato, K., Shibata, N., Inoue, T., Yokota, A., y Kai, Y.** 2002. Crystal structure of activated ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from green alga *Chlamydomonas reinhardtii* complexed with 2-carboxyarabinitol-1,5-bisphosphate. *J. Mol. Biol.* **316**:679-691.
- Morell, M.K., Wilkin, J.M., Kane, H.J., y Andrews, T.J.** 1997. Side reactions catalyzed by ribulose-bisphosphate carboxylase in the presence and absence of small subunits. *J. Biol. Chem.* **272**:5445-5451.
- Moreno, J., Peñarrubia, L., y García-Ferris, C.** 1995. The mechanism of redox regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase turnover. A hypothesis. *Plant Physiol. Biochem.* **33**:121-127.
- Moreno, J. y Spreitzer, R.J.** 1999. C172S substitution in the chloroplast-encoded large subunit affects stability and stress-induced turnover of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* **274**:26789-26793.
- Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M.T., y Hisabori, T.** 2001. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:11224-11229.
- Mott, K.A. y Woodrow, I.E.** 1993. Effects of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> on Nonsteady-State Photosynthesis (Further Evidence for Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Limitation). *Plant Physiol* **102**:859-866.
- Muhlbauer, S.K. y Eichacker, L.A.** 1999. The stromal protein large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase is translated by membrane-bound ribosomes. *Eur. J. Biochem.* **261**:784-788.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., y Dodson, E.J.** 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **53**:240-255.
- Navaza, J. y Saludjian, P.** 1997. AMoRe: An automated molecular replacement program package. *Methods Enzymol.* **276**:581-594.

- Nelson, M. y McClelland, M.** 1992. Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Methods Enzymol.* **216**:279-303.
- Newman, J., Branden, C.I., y Jones, T.A.** 1993. Structure determination and refinement of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Synechococcus* PCC6301. *Acta Crystallog. sect. D* **49**:548-560.
- Newman, J. y Gutteridge, S.** 1993. The X-ray structure of *Synechococcus* ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase-activated quaternary complex at 2.2-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **268**:25876-25886.
- Newman, J. y Gutteridge, S.** 1994. Structure of an effector-induced inactivated state of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: the binary complex between enzyme and xylulose 1,5-bisphosphate. *Structure.* **2**:495-502.
- Newman, S.M., Boynton, J.E., Gillham, N.W., Randolph-Anderson, B.L., Johnson, A.M., y Harris, E.H.** 1990. Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics* **126**:875-888.
- Newman, S.M., Gillham, N.W., Harris, E.H., Johnson, A.M., y Boynton, J.E.** 1991. Targeted disruption of chloroplast genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* **230**:65-74.
- Oblong, J.E. y Lamppa, G.K.** 1992. Identification of two structurally related proteins involved in proteolytic processing of precursors targeted to the chloroplast. *EMBO J.* **11**:4401-4409.
- Offermann, M., McKay, J., Marsh, W., y Jond, S.** 1984. Glutathione disulfide inactivates, destabilizes, and enhances proteolytic susceptibility of fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* **259**:8886-8891.
- Ogren, W.L.** 1984. Photorespiration - Pathways, regulation, and modification. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**:415-442.
- Okano, Y., Mizohata, E., Xie, Y., Matsumura, H., Sugawara, H., Inoue, T., Yokota, A., y Kai, Y.** 2002. X-ray structure of *Galdieria* Rubisco complexed with one sulfate ion per active site. *FEBS Lett.* **527**:33-36.

**Ono, K., Hashimoto, H., y Katoh, S.** 1995. Changes in the number and size of chloroplasts during senescence of primary leaves of wheat grown under different conditions. *Plant Cell Physiol* **36**:9-17.

**Ostrem, J.A., Ramage, R.T., Bohnert, H.J., y Wasmann, C.C.** 1989. Deletion of the carboxyl-terminal portion of the transit peptide affects processing but not import or assembly of the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **264**:3662-3665.

**Ott, C.M., Smith, B.D., Portis, A.R., Jr., y Spreitzer, R.J.** 2000. Activase region on chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Nonconservative substitution in the large subunit alters species specificity of protein interaction. *J. Biol. Chem.* **275**:26241-26244.

**Otwinowski, Z. y Minor, W.** 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**:307-326.

**Pannu, N.S. y Read, R.J.** 1996. Improved structure refinement through maximum likelihood. *Acta Crystallogr. A* **52**:659-668.

**Parry, M.A., Andralojc, P.J., Mitchell, R.A., Madgwick, P.J., y Keys, A.J.** 2003. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. *J. Exp. Bot.* **54**:1321-1333.

**Peñarrubia, L. y Moreno, J.** 1990. Increased susceptibility of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase to proteolytic degradation caused by oxidative treatments. *Arch. Biochem. Biophys.* **281**:319-323.

**Perrakis, A., Sixma, T.K., Wilson, K.S., y Lamzin, V.S.** 1997. wARP: improvement and extension of crystallographic phases by weighted averaging of multiple-refined dummy atomic models. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **53**:448-455.

**Pfannschmidt, T.** 2003. Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci.* **8**:33-41.

**Pfannschmidt, T., Nilsson, A., y Allen, J.F.** 1999. Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**:625-628.

**Pierce, J.** 1988. Prospects for manipulating the substrate specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Physiol. Plant.* **72**:690-698.

**Pierce, J., Lorimer, G.H., y Reddy, G.S.** 1986. Kinetic mechanism of ribulosebiphosphate carboxylase:evidence for an ordered, sequential reaction. *Biochemistry* **25**:1636-1644.

**Portis, A.R.** 1990. Rubisco activase. *Biochim. Biophys. Acta* **1015**:15-28.

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

**Ranty, B., Lorimer, G., y Gutteridge, S.** 1991. An intra-dimeric crosslink of large subunits of spinach ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase is formed by oxidation of cysteine 247. *Eur. J. Biochem.* **200**:353-358.

**Read, B.A. y Tabita, F.R.** 1992. A hybrid ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase enzyme exhibiting a substantial increase in substrate specificity factor. *Biochemistry* **31**:5553-5560.

**Rey, P., Cuine, S., Eymery, F., Garin, J., Court, M., Jacquot, J.P., Rouhier, N., y Broin, M.** 2005. Analysis of the proteins targeted by CDSP32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses. *Plant J.* **41**:31-42.

**Robinson, C. y Ellis, R.J.** 1984a. Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of important precursor polypeptides. *Eur. J. Biochem.* **142**:337-342.

**Robinson, C. y Ellis, R.J.** 1984b. Transport of proteins into chloroplasts. The precursor of small subunit of ribulose biphosphate carboxylase is processed to the mature size in two steps. *Eur. J. Biochem.* **142**:343-346.

**Robison, P.D., Martin, M.N., y Tabita, F.R.** 1979. Differential effects of metal ions on *Rhodospirillum rubrum* ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase and stoichiometric incorporation of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> into a cobalt(III)-enzyme complex. *Biochemistry* **18**:4453-4458.

**Rodermel, S., Haley, J., Jiang, C.Z., Tsai, C.H., y Bogorad, L.** 1996. A mechanism for intergenomic integration: abundance of ribulose biphosphate carboxylase small-subunit protein influences the translation of the large-subunit mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:3881-3885.

**Rodermel, S.** 1999. Subunit control of Rubisco biosynthesis - a relic of an endosymbiotic past? *Photosynth. Res.* **59**:105-123.

**Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., y Erlich, H.A.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.

**Salvador, M.L. y Klein, U.** 1999. The redox state regulates RNA degradation in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **121**:1367-1374.

**Salvador, M.L., Suay, L., Anthonisen, I.L., y Klein, U.** 2004. Changes in the 5'-untranslated region of the *rbcL* gene accelerate transcript degradation more than 50-fold in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* **45**:176-182.

**Salvucci, M.E., Werneke, J.M., Ogren, W.L., y Portis, A.R.** 1987. Purification and species distribution of Rubisco activase. *Plant Physiol* **84**:930-936.

**Salvucci, M.E.** 1989. Regulation of Rubisco activity *in vivo*. *Physiol. Plant.* **77**:164-171.

**Salvucci, M.E., van de Loo, F.J., y Stecher, D.** 2003. Two isoforms of Rubisco activase in cotton, the products of separate genes not alternative splicing. *Planta* **216**:736-744.

**Sasanuma, T.** 2001. Characterization of the *rbcS* multigene family in wheat: subfamily classification, determination of chromosomal location and evolutionary analysis. *Mol. Genet. Genomics* **265**:161-171.

**Satagopan, S. y Spreitzer, R.J.** 2004. Substitutions at the Asp-473 latch residue of chlamydomonas ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase cause decreases in carboxylation efficiency and CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity. *J. Biol. Chem.* **279**:14240-14244.

**Schlicher, T. y Soll, J.** 1997. Chloroplastic isoforms of DnaJ and GrpE in pea. *Plant Mol. Biol.* **33**:181-185.

**Schloss, J.V., Stringer, C.D., y Hartman, F.C.** 1978. Identification of essential lysyl and cysteinyl residues in spinach ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase modified by the affinity label N-bromoacetyethanolamine phosphate. *J. Biol. Chem.* **253**:5707-5711.

**Schneider, G., Lindqvist, Y., Branden, C.I., y Lorimer, G.H.** 1986. Three-dimensional structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum* at 2,9Å resolution. *EMBO J.* **5**:3409-3415.

**Schneider, G., Knight, S., Andersson, I., Branden, C.I., Lindqvist, Y., y Lundqvist, T.** 1990a. Comparison of the crystal structures of L<sub>2</sub> and L<sub>8S8</sub> Rubisco suggests a functional role for the small subunit. *EMBO J.* **9**:2045-2050.

**Schneider, G., Lindqvist, Y., y Lundqvist, T.** 1990b. Crystallographic refinement and structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from *Rhodospirillum rubrum* at 1,7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **211**:989-1008.

**Schneider, G., Lindqvist, Y., y Branden, C.I.** 1992. RUBISCO: structure and mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**:119-143.

**Schreuder, H.A., Knight, S., Curmi, P.M., Andersson, I., Cascio, D., Branden, C.I., y Eisenberg, D.** 1993a. Formation of the active site of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by a disorder-order transition from the unactivated to the activated form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:9968-9972.

**Schreuder, H.A., Knight, S., Curmi, P.M., Andersson, I., Cascio, D., Sweet, R.M., Branden, C.I., y Eisenberg, D.** 1993b. Crystal structure of activated tobacco rubisco complexed with the reaction-intermediate analogue 2-carboxy-arabinitol 1,5-bisphosphate. *Protein Sci.* **2**:1136-1146.

**Schroda, M., Vallon, O., Wollman, F.A., y Beck, C.F.** 1999. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell* **11**:1165-1178.

**Schroda, M., Vallon, O., Whitelegge, J.P., Beck, C.F., y Wollman, F.A.** 2001. The chloroplastic GrpE homolog of *Chlamydomonas*: two isoforms generated by differential splicing. *Plant Cell* **13**:2823-2839.

**Schwender, J., Goffman, F., Ohlrogge, J.B., y Shachar-Hill, Y.** 2004. Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds. *Nature* **432**:779-782.

**Seemann, J.R., Berry, J.A., Freas, S.M., y Krump, M.A.** 1985. Regulation of ribulose bisphosphate carboxylase activity *in vivo* by a light-modulated inhibitor of catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**:8024-8028.

**Seidman, C.E., Struhl, K., Sheen, J., y Jessen, T.** 1997. Current Protocols in Molecular Biology. 1.8.1-1.8.3 pp.

**Sekowska, A. y Danchin, A.** 2002. The methionine salvage pathway in *Bacillus subtilis*. *BMC. Microbiol* **2**:8.

**Sekowska, A., Denervaud, V., Ashida, H., Michoud, K., Haas, D., Yokota, A., y Danchin, A.** 2004. Bacterial variations on the methionine salvage pathway. *BMC. Microbiol.* **4**:4-9.

**Shibata, N., Inoue, T., Fukuhara, K., Nagara, Y., Kitagawa, R., Harada, S., Kasai, N., Uemura, K., Kato, K., Yokota, A., y Kai, Y.** 1996. Orderly disposition of heterogeneous small subunits in D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from spinach. *J. Biol. Chem.* **271**:26449-26452.

**Shtilerman, M., Lorimer, G.H., y Englander, S.W.** 1999. Chaperonin function: folding by forced unfolding. *Science* **284**:822-825.

**Singer, S.J., Eggman, L., Campbell, J.M., y Wildman, S.G.** 1952. The proteins of green leaves. IV. A high molecular weight protein comprising a large part of the cytoplasmic proteins. *J. Biol. Chem.* **197**:233-239.

**Smith, S.A. y Tabita, F.R.** 2004. Glycine 176 affects catalytic properties and stability of the *Synechococcus* sp. strain PCC6301 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.* **279**:25632-25637.

- Somerville, C.R. y Somerville, S.C.** 1984. Cloning and expression of the *Rhodospirillum rubrum* ribulose biphosphate carboxylase gene in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **193**:214-219.
- Spreitzer, R.J. y Mets, L.** 1981. Photosynthesis-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with associated light-sensitive phenotypes. *Plant Physiol (Bethesda)* **67**:565-569.
- Spreitzer, R.J. y Ogren, W.L.** 1983. Rapid recovery of chloroplast mutations affecting ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**:6293-6297.
- Spreitzer, R.J., Goldschmidt-Clermont, M., Rahire, M., y Rochaix, J.D.** 1985. Nonsense mutation in the *Chlamydomonas* chloroplast gene that codes for the large subunit of ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**:5460-5464.
- Spreitzer, R.J.** 1993. Genetic dissection of Rubisco structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**:411-434.
- Spreitzer, R.J.** 1999. Questions about the complexity of chloroplast ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *Photosynth. Res.* **60**:29-42.
- Spreitzer, R.J., Esquivel, M.G., Du, Y.C., y McLaughlin, P.D.** 2001. Alanine-scanning mutagenesis of the small-subunit beta A-beta B loop of chloroplast ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase: substitution at Arg-71 affects thermal stability and CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity. *Biochemistry* **40**:5615-5621.
- Spreitzer, R.J. y Salvucci, M.E.** 2002. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**:449-475.
- Spreitzer, R.J.** 2003. Role of the small subunit in ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **414**:141-149.
- Stadtman, E.R.** 1990. Covalent modification reactions are marking steps in protein turnover. *Biochemistry* **29**:6323-6331.

**Su, Q., Schumann, P., Schild, C., y Boschetti, A.** 1999. A processing intermediate of a stromal chloroplast import protein in *Chlamydomonas*. *Biochem. J.* **344**:391-395.

**Suay, L., Salvador, M.L., Abesha, E., y Klein, U.** 2005. Specific roles of 5' RNA secondary structures in stabilizing transcripts in chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* **33**:4754-4761.

**Sugawara, H., Yamamoto, H., Shibata, N., Inoue, T., Okada, S., Miyake, C., Yokota, A., y Kai, Y.** 1999. Crystal structure of carboxylase reaction-oriented ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from a thermophilic red alga, *Galdieria partita*. *J. Biol. Chem.* **274**:15655-15661.

**Suh, S.W., Cascio, D., Chapman, M.S., y Eisenberg, D.** 1987. A crystal form of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Nicotiana tabacum* in the activated state. *J. Mol. Biol.* **197**:363-365.

**Tabita, F.R.** 1999. Microbial ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: A different perspective. *Photosynthesis Research* **60**:1-28.

**Taylor, T.C. y Andersson, I.** 1996. Structural transitions during activation and ligand binding in hexadecameric Rubisco inferred from the crystal structure of the activated unliganded spinach enzyme. *Nat. Struct. Biol.* **3**:95-101.

**Taylor, T.C., Fothergill, M.D., y Andersson, I.** 1996. A common structural basis for the inhibition of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase by 4-carboxyarabinitol 1,5-bisphosphate and xylulose 1,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **271**:32894-32899.

**Taylor, T.C. y Andersson, I.** 1997. Structure of a product complex of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biochemistry* **36**:4041-4046.

**Taylor, T.C., Backlund, A., Bjorhall, K., Spreitzer, R.J., y Andersson, I.** 2001. First crystal structure of Rubisco from a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **276**:48159-48164.

**Tenaud, M. y Jacquot, J.P.** 1987. In vitro thiol-dependent redox regulation of purified ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *J. Plant Physiol.* **130**:315-326.

**Thayer, S.S. y Huffaker, R.C.** 1984. Vacuolar localization of endoproteinases EP1 and EP2 in barley mesophyll cells. *Plant Physiol* **75**:70-73.

**Uemura, K., Anwaruzzaman, Miyachi, S., y Yokota, A.** 1997. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from thermophilic red algae with a strong specificity for CO<sub>2</sub> fixation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**:568-571.

**Vu, J.C.V., Allen, L.H., y Bowes, G.** 1984. Dark/light modulation of ribulose bisphosphate carboxylase activity in plants from different photosynthetic categories. *Plant Physiol* **76**:843-845.

**Wardley, T.A., Bhalla, P.L., y Dalling, M.J.** 1984. Changes in the number and composition of chloroplasts during senescence of mesophyll cells of attached and detached leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol* **75**:421-424.

**Wasmann, C.C., Ramage, R.T., Bohnert, H.J., y Ostrem, J.A.** 1989. Identification of an assembly domain in the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:1198-1202.

**Watson, G.M., Yu, J.P., y Tabita, F.R.** 1999. Unusual ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of anoxic Archaea. *J. Bacteriol.* **181**:1569-1575.

**Watson, G.M. y Tabita, F.R.** 1997. Microbial ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a molecule for phylogenetic and enzymological investigation. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**:13-22.

**Weik, M., Ravelli, R.B., Kryger, G., McSweeney, S., Raves, M.L., Harel, M., Gros, P., Silman, I., Kroon, J., y Sussman, J.L.** 2000. Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:623-628.

**Weissbach, A., Horecker, B.L., y Hurwitz, J.** 1956. The enzymatic formation of phosphoglyceric acid from ribulose diphosphate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* **218**:795-810.

**Werneke, J.M., Chatfield, J.M., y Ogren, W.L.** 1989. Alternative mRNA splicing generates the two ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and Arabidopsis. *Plant Cell* **1**:815-825.

**Whitney, S.M. y Andrews, T.J.** 1998. The CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of single-subunit ribulose-bisphosphate carboxylase from the dinoflagellate, *Amphidinium carterae*. *Aust. J. Plant Physiol.* **25**:131-138.

**Whitney, S.M., Shaw, D.C., y Yellowlees, D.** 1995. Evidence that some dinoflagellates contain a ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase related to that of the alpha-proteobacteria. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **259**:271-275.

**Wildman, S.G.** 2002. Along the trail from Fraction I protein to Rubisco (ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase). *Photosynthesis Research* **73**:243-250.

**Wilson, M.I., Ghosh, S., Gerhardt, K.E., Holland, N., Babu, T.S., Edelman, M., Dumbroff, E.B., y Greenberg, B.M.** 1995. *In Vivo* Photomodification of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Holoenzyme by Ultraviolet-B Radiation (Formation of a 66-Kilodalton Variant of the Large Subunit). *Plant Physiol* **109**:221-229.

**Wittenbach, V.A., Lin, W., y Habert, R.R.** 1982. Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiol* **69**:98-102.

**Wurtz, E.A., Boynton, J.E., y Gillham, N.W.** 1977. Perturbation of chloroplast DNA amounts and chloroplast gene transmission in *Chlamydomonas reinhardtii* by 5-fluorodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**:4552-4556.

**Yamauchi, Y., Ejiri, Y., y Tanaka, K.** 2002. Glycation by ascorbic acid causes loss of activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and its increased susceptibility to proteases. *Plant Cell Physiol* **43**:1334-1341.

**Yokota, A. y Kitaoka, S.** 1985. Correct pK values for dissociation constant of carbonic acid lower the reported Km values of ribulose bisphosphate carboxylase to half. Presentation of a nomograph and an equation for determining the pK values. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**:1075-1079.

**Yosef, I., Irihimovitch, V., Knopf, J.A., Cohen, I., Orr-Dahan, I., Nahum, E., Keasar, C., y Shapira, M.** 2004. RNA Binding Activity of the Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large Subunit from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **279**:10148-10156.

**Zahler, W.L. y Cleland, W.W.** 1968. A specific and sensitive assay for disulfides. *J. Biol. Chem.* **243**:716-719.

**Zhang, K.Y., Cascio, D., y Eisenberg, D.** 1994. Crystal structure of the unactivated ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase complexed with a transition state analog, 2-carboxy-D-arabinitol 1,5-bisphosphate. *Protein Sci.* **3**:64-69.

**Zhang, N. y Portis, A.R., Jr.** 1999. Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:9438-9443.

**Zhang, N., Kallis, R.P., Ewy, R.G., y Portis, A.R., Jr.** 2002. Light modulation of Rubisco in *Arabidopsis* requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:3330-3334.

**Zhao, C., Wang, J., Cao, M., Zhao, K., Shao, J., Lei, T., Yin, J., Hill, G.G., Xu, N., y Liu, S.** 2005. Proteomic changes in rice leaves during development of field-grown rice plants. *Proteomics* **5**:961-972.

**Zhu, G. y Jensen, R.G.** 1991a. Fallover of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity (Decarbamylation of catalytic sites depends on pH). *Plant Physiol* **97**:1354-1358.

**Zhu, G. y Jensen, R.G.** 1991b. Xylulose 1,5-bisphosphate synthesised by ribulose 1-5-bisphosphate carboxylase/oxygenase during catalysis binds to decarbamylated enzyme. *Plant Physiol* **97**:1348-1353.

