

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

CONTRIBUCIÓN DE RESIDUOS CONSERVADOS DE
CISTEÍNA A LA REGULACIÓN REDOX DEL
CATABOLISMO DE LA RUBISCO

JULIA VICTORIA MARÍN NAVARRO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 18 de Juny de 2004 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Juan Carbonell Gisbert
- Dra. D^a. María Da Gloria Esquivel
- Dr. D. Emilio Fernández Reyes
- Dr. D. Vicente Rubio Zamora
- Dr. D. Carlos García Ferris

Va ser dirigida per:

D. Joaquín Moreno Mariño

©Copyright: Servei de Publicacions
Julia Victoria Marín Navarro

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-1454-9

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

Contribución de residuos conservados de cisteína a la regulación redox del catabolismo de la Rubisco

Memoria presentada por

Julia Marín Navarro

para optar al grado de

Doctora en Bioquímica

Director:

Dr. Joaquín Moreno Mariño

VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



ÍNDICE

Abreviaturas	V
INTRODUCCIÓN	1
1. Función y estructura de la Rubisco.	1
1.1. Funciones de la Rubisco.	1
1.2. Formas de la Rubisco.	2
1.3. Actividad enzimática.	5
1.3.1. Activación. Rubisco activasa.	5
1.3.2. Mecanismo catalítico	6
1.3.3. Determinantes de la especificidad de sustrato	8
1.4. Estructura de la Rubisco tipo I.	9
1.4.1. Subunidad grande.	10
1.4.2. Subunidad pequeña.	12
1.5. Función de la subunidad pequeña.	13
2. Síntesis y ensamblaje de la Rubisco en eucariotas.	14
2.1. Expresión génica.	14
2.2. Ensamblaje de las subunidades.	15
2.3. Modificaciones postraduccionales.	16
3. Catabolismo.	17
3.1. Alteraciones de la Rubisco durante la senescencia y el estrés.	17
3.2. Modificaciones oxidativas de la Rubisco.	17
3.2.1. Regulación redox en el cloroplasto.	17
3.2.2. Modificación oxidativa de residuos.	19
3.2.3. Polimerización oxidativa.	21
3.3. Asociación de la Rubisco con membranas.	21
3.4. Proteólisis de la Rubisco.	22
3.4.1. Proteólisis de la Rubisco <i>in vitro</i> con proteasas exógenas.	22
3.4.2. Actividades proteolíticas implicadas <i>in vivo</i> .	23
3.4.2.1. Proteasas cloroplásticas.	23
3.4.2.2. Proteasas vacuolares.	24
3.4.3. Detección de intermediarios de degradación.	25
3.5. Papel de los residuos de cisteína en el catabolismo de la Rubisco.	28
OBJETIVOS	31

CAPÍTULO I: Estudio del patrón diferencial de proteólisis de Rubisco reducida y oxidada.	33
Resultados	35
1. Diferencias en el patrón de proteólisis entre la Rubisco reducida y oxidada.	35
2. Patrón proteolítico de la Rubisco en diferentes especies.	38
3. Efecto de diferentes modificaciones de cisteína sobre la accesibilidad proteolítica del sitio II.	39
4. Delimitación de las zonas de corte accesibles a proteasas	44
5. Estudio de la estabilidad estructural del holoenzima reducido y oxidado.	46
6. Estudio de los cambios en la estabilidad del holoenzima inducidos por el corte diferencial.	48
7. Modelización del proceso proteolítico.	49
Discusión	57
CAPÍTULO II: Obtención de mutantes de Rubisco por sustitución de residuos conservados de cisteína.	63
Resultados	65
1. Diseño de oligonucleótidos para la mutagénesis dirigida de <i>rbcL</i> y <i>rbcS</i> .	65
2. Transformación del cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i>	67
3. Transformación del genoma nuclear de <i>C. reinhardtii</i>	70
Discusión	71
CAPÍTULO III: Estudio del papel del par Cys 449 – Cys 459 en la modulación redox de la Rubisco.	73
Resultados	75
1. Caracterización de las Rubiscos mutantes C449S, C459S y C449S/C459S <i>in vitro</i>	75
1.1. Determinación de la actividad específica y las constantes cinéticas.	75
1.2. Estudio de la estabilidad térmica de los enzimas mutantes.	76
1.3. Inactivación de las Rubiscos mutantes en tampones redox con potenciales de oxidación variables.	78
1.4. Efecto de diferentes agentes oxidantes sobre la actividad.	79
1.5. Susceptibilización proteolítica inducida por oxidación.	81
2. Caracterización de los mutantes C449S, C459S y C449S/C459S de <i>C. reinhardtii in vivo</i> .	81

2.1. Curvas de crecimiento y análisis bioquímico de los mutantes.	81
2.2. Estudio de la respuesta a estrés salino de los mutantes.	87
2.2.1. Degradación de la Rubisco.	87
2.2.2. Formación de agregados de alto peso molecular y movilización de la Rubisco a la fracción membranosa	91
2.2.3. Variación de la fijación fotosintética de carbono	94
Discusión	97
CONCLUSIONES	101
MATERIALES Y MÉTODOS	103
1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de <i>C. reinhardtii</i> .	103
2. Obtención de mutantes de <i>C. reinhardtii</i> .	104
2.1. Mutagénesis dirigida de los genes <i>rbcL</i> y <i>rbcS</i> de <i>C. reinhardtii</i> .	104
2.2. Transformación de <i>C. reinhardtii</i> .	105
2.2.1. Transformación del cloroplasto.	105
2.2.2. Transformación nuclear.	106
3. Purificación de Rubisco.	107
4. Determinación de la actividad carboxilasa.	109
5. Determinación del factor de especificidad de la Rubisco.	109
6. Determinación de las constantes cinéticas de la Rubisco.	110
7. Tratamiento de la Rubisco con diferentes agentes oxidantes y reductores.	110
8. Proteólisis de la Rubisco.	111
7.1. Ensayo de proteólisis.	111
7.2. Ajuste matemático al modelo de proteólisis.	111
9. Electroforesis, transferencia a membranas e inmunorevelado de la Rubisco.	112
10. Análisis bioquímico de <i>C. reinhardtii</i> .	113
10.1. Toma de muestras.	113
10.2. Determinación del contenido en clorofilas.	113
10.3. Determinación de la cantidad de proteínas.	113
11. Seguimiento del estrés salino.	114
12. Purificación de la fracción membranosa de <i>C. reinhardtii</i> .	114
15. Ensayo de fijación de CO ₂ <i>in vivo</i> durante el estrés.	115
BIBLIOGRAFÍA	117

ABREVIATURAS

2CABP	2-carboxi-D-arabinitol 1,5 bisfosfato
CA1P	2-carboxi-D-arabinitol 1-fosfato
CSH	cisteamina (2-mercaptoetilamina)
CSSC	cistamina (disulfuro de cisteamina)
dNTPs	desoxirribonucleótidos
DTNB	ditionitrobenzoato.
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilendiaminotetraacetato sódico
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida sin SDS.
PAGGE	electroforesis en gel de gradiente de poliacrilamida.
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	fluoruro de metilfenilsulfonilo
POPOP	1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil) benceno
PPO	2,5-difeniloxazol
RuBP	ribulosa 1,5-bisfosfato
SDS	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo centra su atención en un enzima clave en el desarrollo de la biosfera terrestre, la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa. La puerta de entrada principal del carbono inorgánico al mundo orgánico y, quizás, la proteína más abundante del planeta, se muestra a nuestro entendimiento como una enigmática combinación de virtudes y defectos. Objeto de intensas investigaciones durante más de medio siglo, sigue hoy en día revelando propiedades sorprendentes y planteando cuestiones que desafían nuestra comprensión.

1. Función y estructura de la Rubisco:

1.1 Funciones de la Rubisco:

La ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco, EC 4.1.1.39) cataliza el primer paso en la **asimilación fotosintética de carbono** a través del ciclo de Calvin (Figura i.1) y es, por tanto, la principal vía de entrada del CO_2 de la atmósfera en la biosfera. La reacción catalizada por el enzima convierte una molécula de ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP) y una de dióxido de carbono (CO_2) en dos moléculas de 3-fosfoglicerato (110).

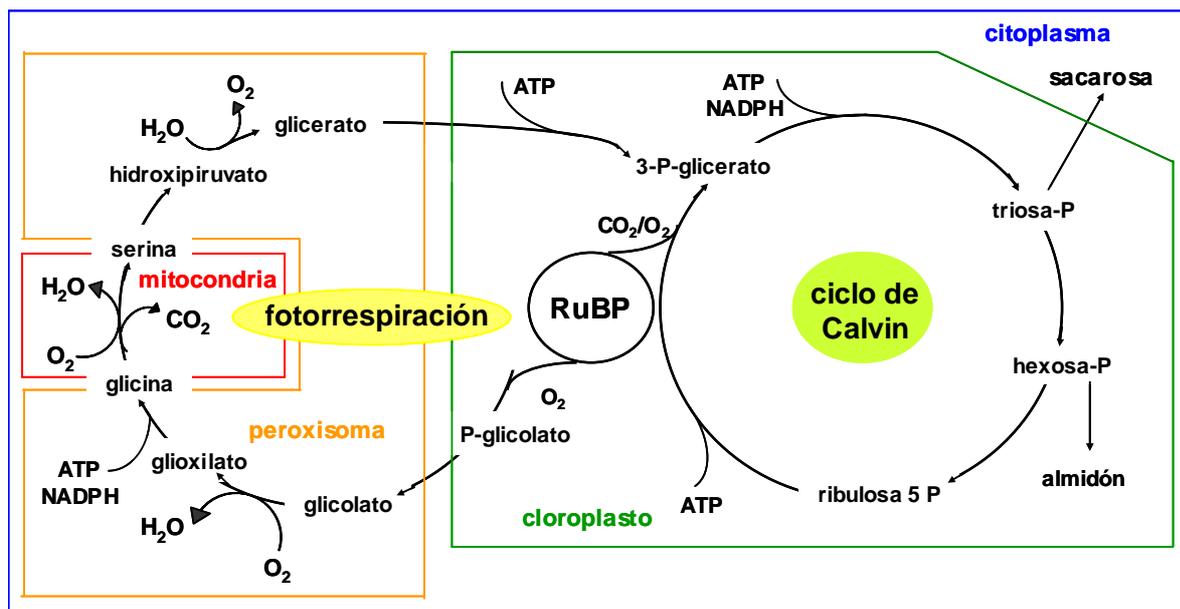


FIGURA i.1. Esquema representativo del ciclo de Calvin y del ciclo fotorrespiratorio. Se destaca el papel central entre ambos procesos de las dos reacciones (carboxilación y oxigenación) catalizadas por la Rubisco. Adaptado y modificado de (151).

Introducción

Por otro lado, la Rubisco utiliza O_2 como sustrato alternativo al CO_2 , iniciando el proceso de la **fotorrespiración** (Figura i.1) (19). En la reacción de oxigenación, el enzima cataliza la producción de una molécula de fosfoglicerato, que se metaboliza a través del ciclo de Calvin, y una de 2-fosfoglicolato. Este último producto se procesa a través de la ruta del glicolato y se reconvierte parcialmente en fosfoglicerato, de manera que puede ser asimilado de nuevo por el ciclo de Calvin (8). El proceso de la fotorrespiración reduce la eficiencia global de fijación de CO_2 hasta en un 50% (173), y disminuye la eficiencia energética de la fotosíntesis al consumir ATP y poder reductor. Se ha propuesto que la oxigenación es una reacción parásita que la Rubisco ha arrastrado a través de su evolución por el hecho de haber aparecido en un momento muy temprano en la historia de la Tierra, en el que la atmósfera era anoxigénica (110). La ruta fotorrespiratoria se habría desarrollado posteriormente con objeto de eliminar el 2-fosfoglicolato (que es un inhibidor de la triosa fosfato isomerasa, uno de los enzimas del ciclo de Calvin (108)) y recuperar parte del carbono invertido en esta molécula. Sin embargo, existen evidencias de que la vía fotorrespiratoria ha adquirido funciones adaptativas adicionales en la protección celular frente al estrés oxidativo (101).

La Rubisco tiene además una baja afinidad por el CO_2 y una baja velocidad de catálisis, por lo que las células de organismos fotosintéticos acumulan grandes cantidades del enzima (10). Los bioelementos invertidos en su síntesis pueden ser recuperados ya que las rutas catabólicas de la Rubisco se activan cuando se produce una decadencia funcional durante la senescencia natural o inducida por estrés, o en una situación de carencia de nutrientes (49). De estas características, surge otra de las funciones de la Rubisco: la de servir como una importante **reserva de nitrógeno, azufre y carbono**, todos ellos elementos esenciales que la célula puede redirigir hacia otros destinos en situaciones críticas.

Por último, debido a la alta concentración de sitios activos de la Rubisco, capaces de unir azúcares de fosfato, adenosínfosfato y NADPH, se ha propuesto una función de la Rubisco como **tampón metabólico**, regulando la concentración de diversos metabolitos en el estroma (49).

Este enclave central de la Rubisco, tanto en la vida como en la muerte de los organismos fotosintéticos, la convierte en una importante diana para la mejora genética de especies vegetales.

1.2. Formas de la Rubisco.

La Rubisco se distribuye entre casi todos los organismos fotosintéticos incluyendo plantas superiores, algas, cianobacterias y otras bacterias fotosintéticas, encontrándose también en bacterias quimioautotróficas. En los organismos eucariotas se localiza en el estroma del cloroplasto, y en procariotas, en el citoplasma.

En base a la divergencia de secuencia y a la organización oligomérica se distinguen 4 formas de la Rubisco (Figura i.2):

- Las plantas terrestres, las algas, las cianobacterias y algunas bacterias fotosintéticas poseen la **forma I** de Rubisco, donde el holoenzima es un hexadecámero compuesto por 8 subunidades grandes (L, de 51-58KDa, codificadas por el gen *rbcL*) y 8 subunidades pequeñas (S, de 12-18KDa, codificadas por el gen o familia de genes *rbcS*) (Figura i.3A). Las subunidades grandes forman un núcleo organizado como un tetrámero de dímeros (L₂)₄ alrededor de un eje de simetría C₄, y las subunidades pequeñas se sitúan en ambos polos de dicho eje, 4 en cada lado. La molécula está atravesada por un canal acuoso, que coincide con el eje C₄.

Mediante estudios filogenéticos se han clasificado las secuencias de *rbcL* de la forma I de Rubisco en dos tipos (213). Los enzimas "tipo verde" se distribuyen entre plantas superiores, algas verdes, cianobacterias y algunos otros procariontes. En los eucariotas con este tipo de Rubisco, el gen *rbcL* está localizado en el cloroplasto y los genes *rbcS* en el núcleo. Por otro lado, los enzimas "tipo rojo" se encuentran en algunos procariontes y en todas las algas no verdes (incluyendo los dinoflagelados que contienen la forma I de Rubisco). En las algas no verdes, *rbcL* y *rbcS* residen ambos en el cloroplasto.

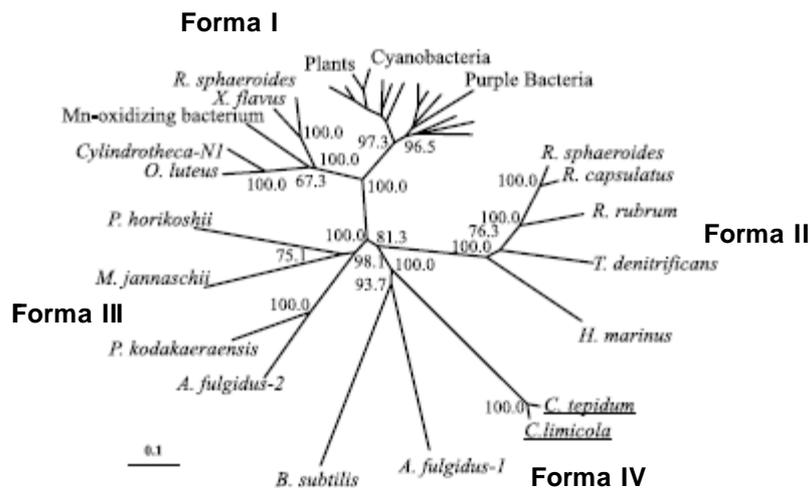


FIGURA i.2. Árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas de Rubisco (formas I-III) y de proteínas similares a Rubisco (forma IV). Los números miden el porcentaje de seguridad estadística de cada nodo (65).

Introducción

- Algunas bacterias fotosintéticas y dinoflagelados tienen Rubisco **forma II**, que consiste en un solo dímero de subunidades grandes L_2 (Figura i.3C), semejante, a grandes rasgos, a los dímeros que componen el núcleo central de la forma I (Figura i.3B) (174, 175).

- La **forma III** de Rubisco se encuentra en algunas arqueobacterias, entre las que se ha resuelto la estructura de *Thermococcus kodakaraensis* (97). El holoenzima está compuesto únicamente por subunidades grandes que se disponen en un decámero con simetría pentamérica (L_2)₅ donde las interfases entre dímeros son muy diferentes a las de la forma I (Figura i.3D).

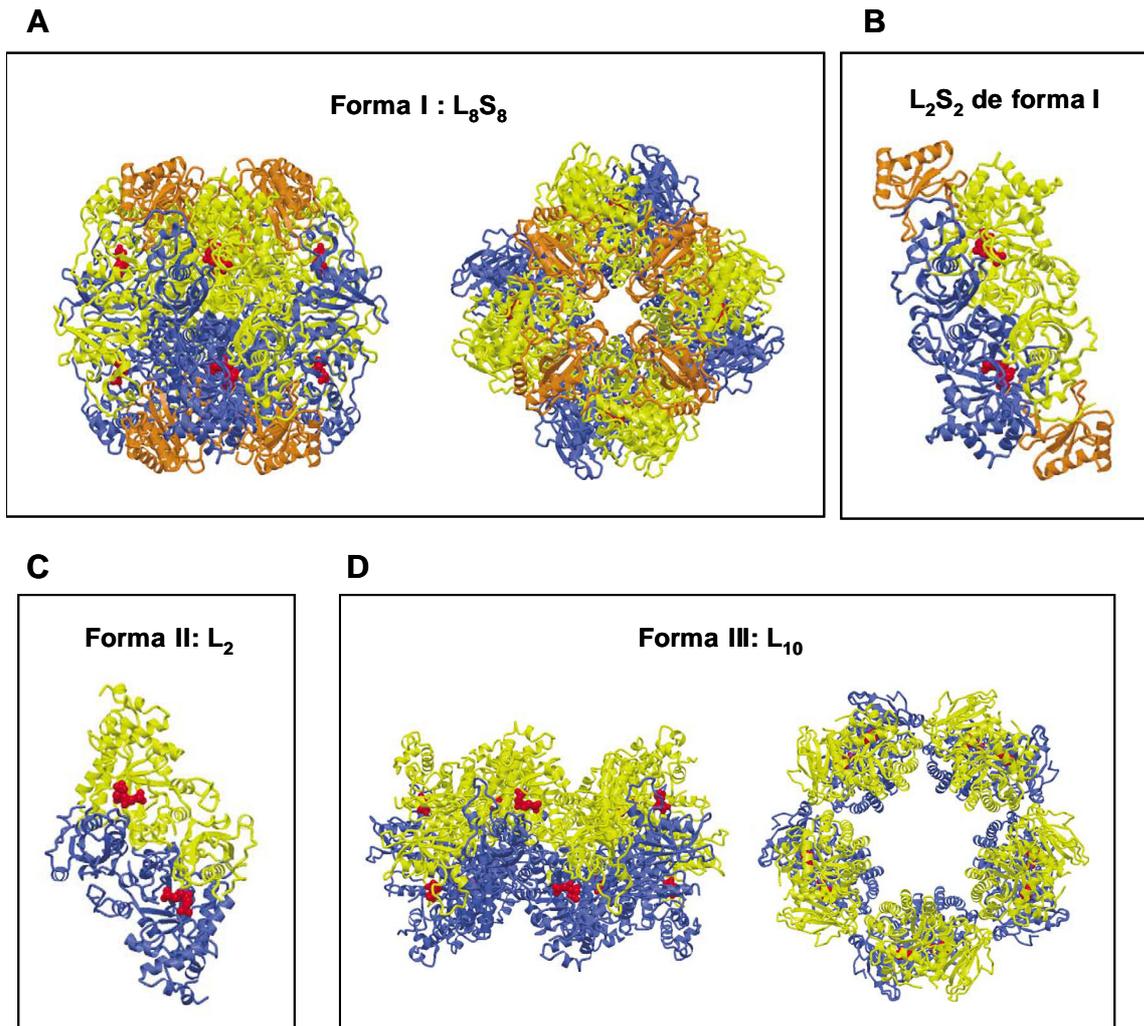


FIGURA i.3. Diferentes estructuras cuaternarias de la Rubisco. (A) Hexadecámero (L_8S_8) correspondiente a la Rubisco de espinaca (forma I), visto en la dirección de los ejes de simetría C_2 (izquierda) y C_4 (derecha). (B) Unidad L_2S_2 de la Rubisco de espinaca destacada fuera del hexadecámero completo. (C) Rubisco forma II (L_2) de *Rhodospirillum rubrum*. (D) Rubisco forma III (L_{10}) de *Thermococcus kodakaraensis* vista desde los ejes de simetría C_2 (izquierda) y C_5 (derecha). La localización del centro activo se muestra resaltando la posición del sustrato bisfosforilado en rojo. Tomado de (6).

- La **forma IV** es un término que se reserva a proteínas de secuencia homóloga a la Rubisco, que carecen de los residuos que componen el centro activo y que, consecuentemente, no poseen una actividad carboxilasa apreciable. Se encuentra en bacterias verdes sulfurosas y se les han asociado funciones en la respuesta a estrés oxidativo y en el metabolismo del azufre (65). No se conoce la estructura de ninguna de estas proteínas.

1.3. Actividad enzimática

De entre las funciones asignadas a la Rubisco, las que suponen el inicio de la vía fotosintética y de la vía fotorrespiratoria están directamente relacionadas con su actividad enzimática. Su papel como proteína de reserva depende de los procesos relacionados con el catabolismo del enzima, que serán estudiados en una sección posterior.

1.3.1. Activación. Rubisco activasa.

El **centro activo** de la Rubisco se encuentra localizado en la interfase entre dos subunidades grandes del mismo dímero (Figura i.3) (105, 107).

Para adquirir su competencia catalítica, tanto para la reacción de carboxilación como para la de oxigenación, el sitio activo debe experimentar un proceso de **activación** mediante la formación de un carbamato por reacción de una molécula de CO₂ con el grupo ε-amino de la Lys 201 (112). Este CO₂ activador es diferente del CO₂ que sirve de sustrato a la reacción y permanece unido al enzima durante múltiples ciclos catalíticos (129). El sitio activo se completa con la coordinación de Mg²⁺ al carbamato (estabilizado por el Asp203 y el Glu204) (61). El enzima carbamilado puede acomodar otros cationes divalentes como Fe²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ o Ca²⁺ (10) pero la sustitución del Mg²⁺ por cualquiera de ellos se hace a costa de una disminución en la eficiencia de fijación de CO₂ a favor de la reacción con el O₂.

La Rubisco no carbamilada tiene una mayor afinidad por RuBP que la Rubisco carbamilada (84). Por otro lado, la unión de RuBP al enzima descarbamilado inhibe el proceso de activación. En estas circunstancias, la activación *in vivo* de la Rubisco en presencia de luz (esto es, en presencia de RuBP) sería prácticamente imposible de forma espontánea (169). El descubrimiento de la existencia de un enzima auxiliar, conocido como Rubisco activasa, resolvió esta dificultad.

La **Rubisco activasa** se encuentra en todas las plantas superiores y en algas, donde es codificada por el genoma nuclear, habiéndose detectado también en algunas cianobacterias (67). Funciona como una chaperona, cambiando la conformación de la Rubisco, mediante la hidrólisis de ATP, para eliminar la RuBP fuertemente unida al enzima no carbamilado, permitiendo así el proceso de activación (155, 156, 169)

Introducción

Se ha propuesto un modelo (135) por el cual la activasa regularía la actividad de la Rubisco de acuerdo con los ciclos de luz/oscuridad. En oscuridad, la activasa está fuertemente inhibida por ADP y la Rubisco permanecería inactiva por la unión del enzima no carbamilado a RuBP. En presencia de luz, la activasa se activa (probablemente por el incremento en los niveles de ATP) y permite la liberación de la RuBP, favoreciendo la activación de la Rubisco.

Por otro lado, la activasa puede interaccionar también con la Rubisco carbamilada para liberarla de diferentes inhibidores (156), como la D-xilulosa 1,5-bisfosfato y el 3-ceto-D-arabinitol 1,5 bisfosfato, formados por reacciones laterales derivadas del mecanismo catalítico de la Rubisco, o el análogo del estado de transición 2-carboxi-D-arabinitol 1-fosfato (CA1P), un inhibidor natural sintetizado en algunas especies de plantas superiores durante periodos de oscuridad.

El llamado **inhibidor nocturno** (CA1P) se sintetiza lentamente (durante horas) en condiciones de oscuridad o de baja luminosidad y se degrada completamente por desfosforilación en pocos minutos de exposición a alta intensidad de luz (169, 180). La concentración de CA1P varía entre diferentes especies, desde las que no lo sintetizan, como *Arabidopsis thaliana*, *Spinacea oleracea* y *Triticum aestivum*, pasando por aquellas que acumulan una concentración equivalente al 50% de sitios activos de la Rubisco, como *Nicotiana tabacum*, *Glycine max*, *Solanum tuberosum* hasta aquellas en las que la concentración de inhibidor sobrepasa la de sitios activos de la carboxilasa, como *Phasaеolus vulgaris* (169, 209). Además, al CA1P se le ha asignado un papel como regulador de la unión de metabolitos a la Rubisco en la oscuridad (169). En estas condiciones, la concentración de RuBP (que en presencia de luz ocupa mayoritariamente los centros activos) es menor y la alta concentración de sitios activos libres podría funcionar como un tampón metabólico uniendo diferentes compuestos como azúcares fosfato, adenosin fosfatos o NADPH. La unión de CA1P evitaría el secuestro de estos metabolitos dentro del cloroplasto.

1.3.2. Mecanismo catalítico

Los pasos esenciales en el mecanismo catalítico de la reacción de carboxilación de la Rubisco (Figura i.4) son (111, 153):

1. Unión de RuBP al sitio catalítico previamente activado.
2. Formación de un 2,3-enodiol por desprotonación del C3.
3. Ataque nucleofílico del CO₂ en el C2.
4. Hidratación en el C3.
5. Desprotonación a nivel del C3-O, que inicia la ruptura del enlace C2-C3 dando lugar a dos moléculas de 3-fosfo-D-glicerato.

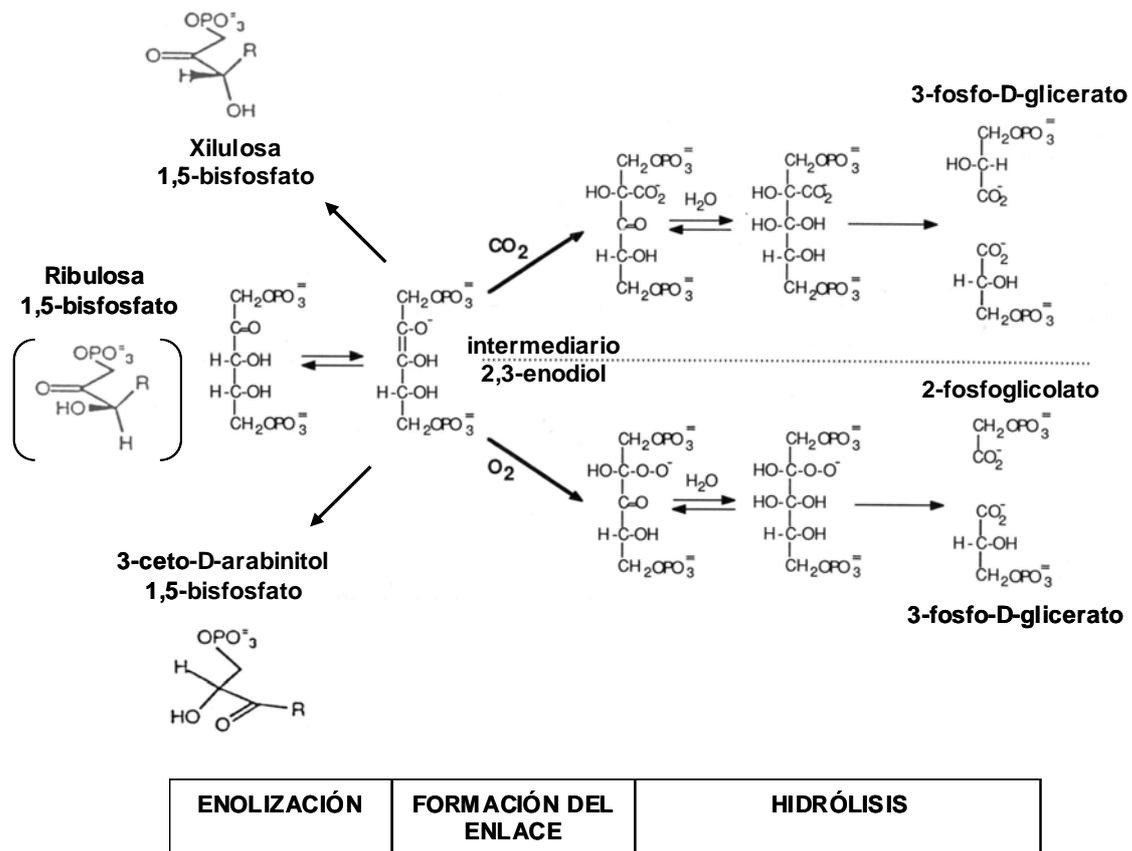


FIGURA i.4. Mecanismo catalítico de la Rubisco para las reacciones de carboxilación y oxigenación. Se indica además la vía de formación de los productos secundarios xilulosa 1,5-bisfosfato y 3-ceto-D-arabinitol 1,5-bisfosfato. Adaptado y modificado de (152).

A partir del intermediario 2,3-enodiol, la Rubisco cataliza además otras reacciones, de las cuales, la principal competidora de la carboxilación es la reacción de oxigenación, que presenta un mecanismo catalítico similar (Figura i.4). Esta vía se inicia con el ataque nucleofílico del O_2 sobre el C2 del enodiol, seguido de pasos de hidratación y desprotonación, que conducen a la formación de una molécula de 3-fosfo-D-glicerato (que se incorpora al ciclo de Calvin) y una de 2-fosfoglicolato (que entra en la ruta fotorrespiratoria). Como alternativas minoritarias, la protonación en el C3 o C2 del enodiolato da lugar a los inhibidores xilulosa 1,5-bisfosfato o 3-ceto-D-arabinitol 1,5-bisfosfato respectivamente (41, 123, 225) (Figura i.4), que bloquean el sitio activo. Estos subproductos son una de las causas posibles del fenómeno de "fallover" (225) o pérdida progresiva de la actividad carboxilasa con el tiempo en ensayos *in vitro* por una disminución de los sitios activos disponibles, en ausencia de Rubisco activasa.

Tanto en la reacción de carboxilación como en la de oxigenación, el proceso es irreversible tras el ataque nucleofílico del sustrato gaseoso, por lo que es en este paso donde se decide cuáles van a ser los productos finales de la reacción catalizada por la Rubisco (151).

Introducción

Hay que destacar en este punto, que el enzima no contiene sitios de unión formales para el CO₂ o el O₂ (12), pero de alguna manera, la estructura y conformación de la Rubisco proporcionan una preferencia determinada por una u otra vía.

1.3.3. Determinantes de la especificidad de sustrato:

La reacción de oxigenación supone una pérdida de C en forma de 2-fosfoglicolato, ya que la ruta fotorrespiratoria sólo puede recuperar uno de sus átomos de C, transformándolo en 3-fosfo-D-glicerato, mientras que el otro se libera en forma de CO₂ (Figura i.1). Consecuentemente, la eficiencia neta de la fijación de C depende del balance entre las actividades de carboxilación y oxigenación.

En condiciones de Michaelis-Menten, con inhibición recíproca de dos sustratos, la relación entre las velocidades de carboxilación (v_c) y oxigenación (v_o) viene dada por:

$$v_c / v_o = [Vc \cdot K_o / (V_o \cdot K_c)] \cdot [CO_2] / [O_2] ,$$

donde V_c, V_o son las velocidades máximas para las reacciones de carboxilación y oxigenación y K_c, K_o son las constantes de Michaelis para el CO₂ y el O₂ respectivamente.

El cociente entre las velocidades de carboxilación y oxigenación (v_c/v_o) cuando las concentraciones CO₂ y O₂ son iguales define el llamado **factor de especificidad** (Ω) que, de acuerdo con la relación anterior, se puede expresar como:

$$\Omega = Vc \cdot K_o / (V_o \cdot K_c),$$

Este factor depende únicamente de las constantes cinéticas del enzima y mide, por tanto, la capacidad intrínseca de la Rubisco para seleccionar la carboxilación frente a la oxigenación (86, 151).

En consecuencia, los organismos fotosintéticos pueden alcanzar una alta eficiencia en la fijación de C, bien aumentando la relación de $[CO_2]/[O_2]$ en el entorno de Rubisco, bien con un valor alto del factor de especificidad.

El valor de Ω es una consecuencia de la estructura de la Rubisco, y depende de factores como el ion divalente que se une al sitio carbamilo, la temperatura y la fuente del enzima. De esta manera, la sustitución de Mg²⁺ por cualquier otro catión divalente disminuye considerablemente el factor de especificidad (10, 67). Por otro lado, un aumento de temperatura, disminuye el valor de Ω , además de aumentar la relación $[O_2]/[CO_2]$ de una disolución en equilibrio con el aire (87). Por último, los organismos superiores presentan, en líneas generales, un factor de especificidad mayor (Tabla i.1). Entre las plantas superiores, las de metabolismo C₃, que no poseen mecanismos concentradores de CO₂, han sufrido probablemente una mayor presión evolutiva para mejorar el valor de Ω . Sin embargo, no se comprende actualmente el significado fisiológico ni evolutivo de la alta especificidad encontrada en Rubiscos de algunas algas no verdes y en la forma III de procariotas.

Fuente de Rubisco	Ω	Mecanismo concentrador de CO ₂	Referencia
Forma II: Bacterias fotosintéticas, Dinoflagelados	15	viven en ambiente anaeróbico	(86, 215)
Forma I: Cianobacterias	40	AC/bomba HCO ₃ ⁻ /carboxisoma	(86, 90)
Algas verdes	60	AC/bomba HCO ₃ ⁻ /pirenoide y otros	(86, 134, 186, 189)
Plantas C ₄	80	mecanismo C ₄	(42, 189)
Plantas C ₃	80-100	no	(189)
Algas no verdes	100-240	AC/?	(3, 160, 208)
Forma III: <i>T. kodakaraensis</i>	310	-	(45)

TABLA i.1. Factores de especificidad (Ω) y mecanismos concentradores de CO₂ en diferentes especies. En algas no verdes se ha identificado la anhidrasa carbónica (AC), uno de los elementos esenciales en los mecanismos concentradores de CO₂.

Numerosas investigaciones han intentado delimitar qué residuos son los responsables de la variación en el factor de especificidad de una especie a otra y, a un nivel más aplicado, aumentar el valor de Ω sin disminuir la velocidad de catálisis. Para ello, se han estudiado mutantes naturales de la Rubisco y otros obtenidos mediante mutagénesis dirigida, analizando el efecto de cambios sencillos (generalmente mutaciones simples) en el factor de especificidad y en las constantes cinéticas (V_c , K_c , K_o) (12, 28, 32, 67, 92, 146, 157, 160, 187, 188, 204, 226). Los resultados obtenidos sugieren que una mejora sustancial de la especificidad por el CO₂ sin detrimento de la velocidad de catálisis requeriría modificaciones más extensivas que las que se han practicado hasta ahora (189).

1.4. Estructura de la Rubisco tipo I.

La Rubisco tipo I es la forma de Rubisco más extendida entre los organismos fotosintéticos y se dispone de una gran cantidad de datos estructurales acerca de ella en diferentes especies de bacterias fotosintéticas (64, 174, 175), algas rojas (197), cianobacterias (138, 139), algas verdes (130, 203) y plantas superiores (5, 31, 176, 202). Las características

Introducción

generales de la estructura cuaternaria de este tipo de Rubisco se han comentado ya en el apartado 1.1. y a continuación, se revisa el plegamiento individual de las subunidades grande y pequeña.

1.4.1 Subunidad grande.

En el plegamiento de la subunidad grande se distinguen dos dominios diferenciados: un dominio N-terminal (residuos 1-150), que consiste en una hoja β -antiparalela de 4 tramos y un dominio C-terminal (residuos 151-475) que contiene un barril $(\alpha/\beta)_8$ como motivo principal (Figura i.5).



FIGURA i.5. Plegamiento de la subunidad grande de *Chlamydomonas reinhardtii*. Las hélices y las hojas β se indican en verde y amarillo respectivamente. La figura se ha realizado con el programa Swiss PDB Viewer a partir de los datos publicados en el Protein Data Bank (número de acceso 1IR2).

Los primeros residuos del **extremo N-terminal** (hasta el residuo 5-10) se encuentran muy desordenados y no se les puede asignar una posición determinada, ni siquiera en las estructuras obtenidas con una resolución de 1.4 Å.

La región que comprende los residuos 86-96, que **interacciona con la Rubisco activasa** (106, 144, 177) es relativamente flexible, se encuentra expuesta al disolvente, y tiene una conformación diferente en los enzimas de diferentes especies. Los residuos de esta zona probablemente confieren la especificidad de la interacción entre Rubisco y Rubisco activasa observada en solanáceas.

El **centro activo** (Figura i.6) se localiza en la interfase entre el barril $(\alpha/\beta)_8$ de una subunidad y el dominio N-terminal de otra subunidad del mismo dímero L_2 .

Entre los residuos que forman parte del sitio activo, destaca el papel de la Lys 175, y del carbamato formado sobre la Lys 201, que se han relacionado con la desprotonación inicial que induce el intermediario 2,3-enodiol (5, 6, 30, 67, 139).

La comparación de los datos estructurales del enzima no carbamilado y carbamilado con los de sus complejos con diferentes ligandos ha ayudado a comprender la secuencia de cambios conformacionales que se dan alrededor del centro activo durante un ciclo catalítico. Aunque el proceso previo de activación (carbamilación y coordinación de Mg^{2+} al carbamato) induce sólo pequeños cambios conformacionales, la unión de ligandos bisfosforilados, tanto a la Rubisco no carbamilada como a la Rubisco activada, promueve la transición de un estado "abierto" a un estado "cerrado", que implica el reordenamiento de 4 lazos del dominio N-terminal de la subunidad grande, especialmente el lazo 6, para cubrir el ligando (176, 200, 202) (Figura i.7). Finalmente, la Rubisco activada y complejada con 3-fosfoglicerato recupera su conformación abierta, lo que permite la liberación del producto de la reacción de carboxilación (201).

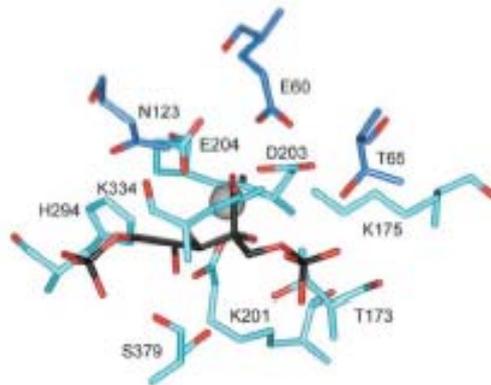


FIGURA i.6. Vista parcial del centro activo de la Rubisco de espinaca. Se muestran los residuos del dominio C-terminal (azul claro) de una subunidad y los residuos del dominio N-terminal (azul oscuro) de la subunidad vecina en el mismo dímero, que interactúan con el CABP (negro). El ion Mg^{2+} se indica como una esfera gris. Los átomos de oxígeno de han coloreado en rojo. Tomada de (194).

Aunque los residuos de cisteína no forman parte del centro activo del enzima (67) podrían jugar un papel estructural o de regulación. En los enzimas de la mayor parte de las especies eucarióticas, existen tres parejas de cisteína lo suficientemente próximas entre sí en la estructura tridimensional de la Rubisco como para establecer enlaces disulfuro. Los pares de cisteínas 172/192 y 247/247 (constituído por el mismo residuo en subunidades adyacentes de un homodímero) presentan un alto grado de conservación entre eucariotas (99). El residuo de cisteína 449 del par 449/459 está sustituido por Thr en un grupo de especies de plantas

Introducción

superiores (como *Spinacea oleracea*) de manera que el enlace disulfuro con la cisteína 459 no es posible en estos casos (5). Aunque la eliminación del residuo de cisteína 247 no afecta a ninguno de los parámetros cinéticos del enzima, la formación de un enlace disulfuro intercatenario entre las cisteínas 247 homólogas de las dos subunidades que componen un mismo dímero estabilizaría la interacción intradimérica (158). Por otro lado, los residuos de cisteína 172 y 192 parecen formar un enlace covalente en la estructura cristalográfica de la Rubisco de tabaco no carbamilada, pero se encuentran sólo en contacto de Van der Waals cuando el enzima se activa (31, 177).

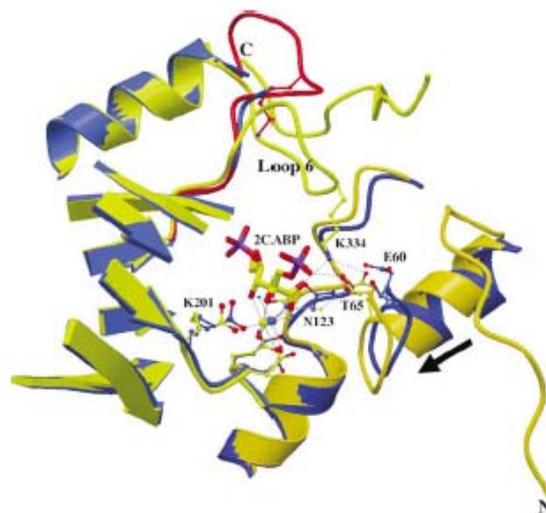


FIGURA i.7. Vista de una sección de la Rubisco de espinaca alrededor del centro activo, mostrando las variaciones conformacionales entre el enzima sin ligandos (azul) y el complejo con 2CABP (amarillo). Se indica la posición del lazo 6 (Loop 6) que cierra el sitio activo en el complejo Mg^{2+} -2CABP pero no en el complejo Ca^{2+} -RuBP (rojo). Tomado de (6).

1.4.2. Subunidad pequeña.

En contraste con la relativa homogeneidad encontrada para las subunidades grandes, existe una mayor variabilidad tanto en las secuencias como en el plegamiento de las subunidades pequeñas de diferentes especies.

La parte central de la subunidad pequeña se pliega en una hoja β -antiparalela de 4 tramos, cubierta en un lado por dos α -hélices. Estos motivos son comunes en la estructura de todas las especies estudiadas hasta ahora (5, 130, 138, 139, 197, 203) (Figura i.8).

El lazo entre los tramos A y B de la hoja β se adentra en el canal del disolvente del holoenzima, interactuando además con tres subunidades grandes y con los lazos β A- β B de dos subunidades pequeñas vecinas (190). Es en esta región donde se encuentran las mayores diferencias entre especies al comparar las estructuras de las Rubiscos forma I (Figura i.8). Así,

los procariotas y las algas no verdes contienen sólo 10 residuos, las plantas superiores tienen 22 residuos y, en las algas verdes, el lazo se expande hasta llegar a 28 residuos (190), que incluyen, al menos en el caso de *C. reinhardtii*, dos hélices 3_{10} . A medida que aumenta el tamaño del lazo disminuye el diámetro del orificio de entrada al canal central del disolvente (130, 203).

Por otro lado, las subunidades pequeñas de todas las algas no verdes, los dinoflagelados y algunos procariotas tienen un extremo carboxiterminal más largo, que forma dos hojas β adicionales (E y F) (Figura i.8d). Este lazo β E- β F se interna en el canal del disolvente en lugar del lazo β A- β B (que es más corto en estas especies) (64, 197). En las algas verdes, el extremo C-terminal de la subunidad pequeña es también más largo que en plantas superiores, formando una corta hélice 3_{10} , pero estos residuos adicionales se sitúan en la superficie del holoenzima (130) y no son esenciales para la función o ensamblaje de la Rubisco (44).

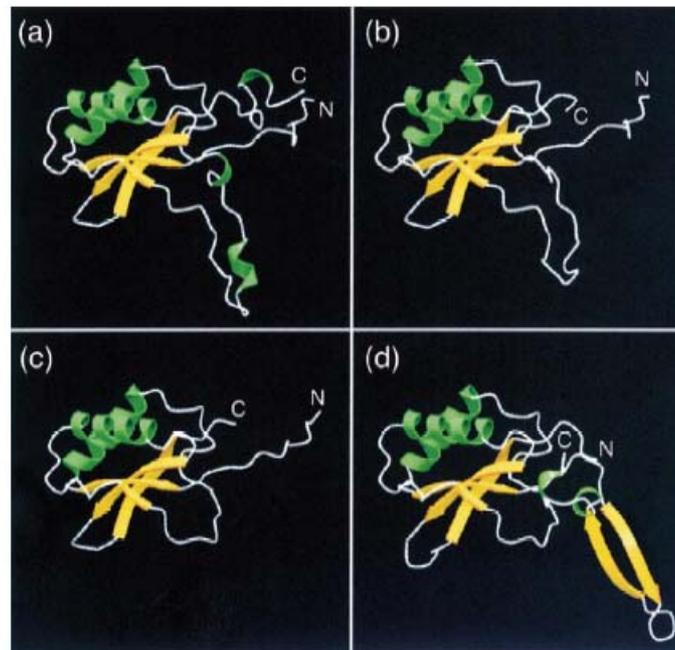


FIGURA i.8. Plegamiento de las subunidades pequeñas. Se muestran las correspondientes a (a) *Chlamydomonas reinhardtii* (alga verde), (b) espinaca (planta superior), (c) *Synechococcus* PCC6301 (cianobacteria), y (d) *Galdieria partita* (alga roja). Todas ellas se representan desde el mismo ángulo y a la misma escala. Las hélices y las hojas β se indican en verde y amarillo respectivamente. Tomado de (130).

1.5. Función de la subunidad pequeña.

Se ha discutido mucho acerca del papel de la subunidad pequeña en la función de la Rubisco, ya que el sitio catalítico y la zona de unión a la Rubisco activasa pertenecen por

completo a las subunidades grandes. Se le ha asignado una función estructural, en el ensamblaje y estabilidad del holoenzima, e indirectamente en la actividad, afectando al menos a la velocidad de carboxilación.

En un intento de explicar el origen de la subunidad pequeña, se ha propuesto que pudiera haber evolucionado a partir de una proteína implicada en el ensamblaje del carboxisoma de cianobacterias, una estructura que contribuye (como el pirenoide en algas verdes) a los mecanismos concentradores de CO₂ de organismos autótrofos unicelulares. Así, la función originaria de la subunidad pequeña sería unir y concentrar dímeros de la subunidad grande, permitiendo la acumulación de una mayor cantidad de Rubisco en la célula (190).

Por otro lado, las subunidades pequeñas pudieran ser responsables, al menos en parte, de los valores más altos del factor de especificidad de las Rubiscos forma I respecto a los de la forma II. En este sentido, la construcción de holoenzimas híbridos compuestos por las subunidades grandes de una especie y las pequeñas de otra ha dado lugar a resultados contradictorios, recuperándose enzimas quiméricos con factores de especificidad equivalentes al del holoenzima del que provenían las subunidades grandes (7, 9, 211), o las pequeñas (89) o con un valor intermedio entre ambas (159). De todas las mutaciones realizadas en el lazo β A- β B de la subunidad pequeña de *C. reinhardtii*, sólo el cambio R71A fue capaz de afectar al factor de especificidad, reduciéndolo en un 8% (191). Aún teniendo en cuenta aquellos casos en los que las subunidades pequeñas no contribuyen directamente al factor de especificidad, podrían haber aportado el componente estructural necesario para que las subunidades grandes evolucionaran hacia conformaciones con un mayor factor de especificidad, sin disminuir la velocidad de catálisis (190).

2. Síntesis y ensamblaje de la Rubisco en eucariotas.

2.1. Expresión génica.

La síntesis de la Rubisco de eucariotas, con excepción de las algas no verdes, es el resultado de la expresión coordinada de los genomas cloroplástico (que alberga el gen *rbcl* de la subunidad grande) y nuclear (que contiene los genes *rbcS* que codifican la subunidad pequeña). En la Tabla i.2 se resumen las características de los genes codificantes *rbcl* y *rbcS* de la Rubisco.

Para ajustar la estequiometría entre las subunidades grande y pequeña, el control de la biosíntesis se hace en respuesta a la acumulación de subunidades no ensambladas. Así, un exceso de subunidad grande reprime su propia síntesis a nivel del inicio de la traducción (164) y un exceso de subunidad pequeña se corrige a nivel de degradación proteica en el cloroplasto (163).

Se ha descrito que al menos una parte de la síntesis de la subunidad grande de espina (hasta el 44%) ocurre en polisomas unidos a los tilacoides (68). Se ha propuesto que la subunidad grande sintetizada de esta manera se integra en la membrana tilacoidal cotraduccionalmente y se libera al estroma en forma de partículas lípido-proteína antes de dirigirse a su ensamblaje final. De acuerdo con esto, se ha observado una asociación de la subunidad grande de Rubisco a las membranas tilacoidales antes de su incorporación al holoenzima (68, 98, 116) y se han detectado partículas lípido-proteína en el estroma del cloroplasto de células de hojas de judía, con una composición lipídica muy similar a la de las membranas tilacoidales, que contienen Rubisco y chaperonina 60 (185).

	<i>rbcl</i>	<i>rbcS</i>	Ref.
Localización	Genoma cloroplástico	Genoma nuclear (excepto Rubisco tipo rojo)	(49,190)
Dosis génica	1 copia/molécula DNA 10-100 moléculas de DNA/cloroplasto hasta 50 cloroplastos/célula	Familia génica (2-20 genes)	(49, 145)
Nº aa codificados	~ 475	~ 120	(61)
Intrones	No (excepto 9 en <i>Euglena</i>)	Sí (1-3)	(59,61)
Regulación expresión	- dosis génica. - silenciamiento génico - transcripción. - estabilidad transcrito. - traducción	- transcripción	(49, 61, 78, 122, 148, 168)

TABLA i.2. Características de los genes codificantes de la subunidad grande (*rbcl*) y de la subunidad pequeña (*rbcS*) de las Rubiscos de eucariotas.

2.2. Ensamblaje de las subunidades.

La subunidad grande se sintetiza en el cloroplasto y se procesa eliminando los 2 primeros aminoácidos (36, 58, 73). La subunidad pequeña se sintetiza en el citoplasma y se importa al cloroplasto por un transportador dependiente de ATP (10), tras lo que una metaloendopeptidasa corta el péptido de transición (141, 161, 162, 196) y se libera la subunidad pequeña madura (143).

El mecanismo de plegamiento y ensamblaje de proteínas se conoce mejor en organismos procariotas, donde se han identificado una batería de chaperonas (DnaJ, DnaK y GrpE) que interaccionan con las proteínas recién sintetizadas, de forma secuencial, antes del ensamblaje final por las chaperoninas GroEL/GroES (18). Se han descrito los homólogos cloroplásticos de

Introducción

DnaK (Hsp70) (37, 179), DnaJ (172) y Grp E (172, 178), y se ha demostrado que el péptido de transición de la subunidad pequeña interacciona directamente con Hsp70 (82, 83). El homólogo de GroEL en el cloroplasto (chaperonina 60) es un tetradecámero compuesto por dos tipos de subunidades (α y β) de 60KDa cada una, ambas necesarias para conseguir una eficacia máxima en el plegamiento (35). Por otro lado, el homólogo cloroplástico de GroES, la chaperonina 10, es comparable en tamaño a la fusión de dos péptidos GroES (13, 14).

El anillo multimérico de GroEL atrapa proteínas que se encuentren en un estado no nativo, pero es necesaria la adición de GroES, ATP y Mg^{2+} , que provocan un cambio conformacional importante sobre GroEL, para inducir el plegamiento correcto de la proteína. Las bases de este mecanismo han sido descifradas utilizando como sustrato la Rubisco de *R. rubrum* desplegada. De esta manera, se sabe que el sistema completo GroEL/GroES/ Mg^{2+} -ATP funciona promoviendo ciclos sucesivos de desplegamiento parcial y liberación de la proteína, permitiendo así en cada ciclo que segmentos atrapados en estructuras no nativas adquieran el plegamiento correcto (182).

Se ha sugerido (49) que otras enzimas como la disulfuro isomerasa (95, 103) y la peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa (103, 104) podrían estar implicados en el correcto plegamiento de la Rubisco.

2.3. Modificaciones postraduccionales.

Los dos tipos de subunidades de la Rubisco se modifican en el extremo N-terminal. En el caso de la subunidad grande, se produce la desformilación de la metionina N-terminal de forma cotraduccional, previa a la eliminación de los residuos Met1-Ser2 (36, 58), y la Pro3 es acetilada (73). En la subunidad pequeña, la metionina que queda expuesta tras la eliminación del péptido señal se metila. Éste puede ser un mecanismo para diferenciar las proteínas importadas de las que se sintetizan en el propio cloroplasto, y una forma de proteger al polipéptido frente al ataque de aminopeptidasas (74).

Se han detectado otros tipos de modificaciones postraduccionales en la subunidad grande de la Rubisco de algunos organismos.

La Lys 14 se halla trimetilada en algunas especies (tabaco, guisante, petunia, tomate, soja, patata) pero en otras no (espinaca, trigo, *Marchantia*, *Chlamydomonas*) (189), lo que parece deberse a la ausencia, en estas últimas, de las metiltransferasas responsables de la trimetilación (75, 210). Se sabe que esta modificación puede darse incluso después del ensamblaje final del holoenzima, pero no se conoce su significado funcional.

En particular, en *Chlamydomonas reinhardtii* se han detectado algunas modificaciones peculiares. Así, las Pro 104 y 154, muy conservadas en cianobacterias y plantas, se encuentran 4-hidroxiladas en este alga (130, 203), lo que se ha propuesto como una forma de facilitar la

transición de *cis* a *trans* del enlace imida de la Pro, acelerando así el plegamiento de la subunidad grande después de la traducción (130). Por otro lado, las Cys 256 y 369 de *C. reinhardtii*, parcialmente conservadas en algas pero no en plantas superiores, están S-metiladas (130, 203). Por último, el residuo 471, que debería ser una Thr por lo que se deduce de la secuencia nucleotídica, presenta una densidad electrónica compatible tanto con una O^γ-metilThr, que se explicaría por una modificación postraduccional, como con una Ile, que se podría haber obtenido por editado del RNA mediante una transición C a U del codón 471 ACU a AUU (130).

3. Catabolismo.

3.1. Alteraciones de la Rubisco durante la senescencia y el estrés.

El recambio de la Rubisco en plantas superiores depende del estado fisiológico y de desarrollo. Durante el crecimiento de los tejidos fotosintéticos, el enzima se acumula progresivamente a causa de una síntesis continua y una degradación prácticamente inexistente, alcanzando su máxima concentración poco después de que se complete la expansión de los órganos. Sin embargo, durante la senescencia, la síntesis se detiene y la Rubisco se degrada de forma rápida y específica, lo que favorece la movilización del nitrógeno hacia tejidos de reserva u órganos en crecimiento (49). Por otro lado, muchos tipos de estreses ambientales inducen también un catabolismo generalizado, similar al que ocurre durante la senescencia natural, favoreciendo la degradación selectiva de la Rubisco en fases tempranas del proceso, cuando éste todavía es reversible (49, 52, 56).

De forma previa a esta degradación inducida por senescencia o estrés, la Rubisco sufre una serie de alteraciones como la oxidación de diversos residuos, la polimerización en forma de agregados de alto peso molecular y la asociación a la fracción membranosa, que parecen conducirla, de forma regulada, hacia la degradación final. Existe una fuerte interconexión entre estos tres tipos de modificaciones previas a la degradación, siendo probablemente la oxidación el desencadenante (directo o indirecto) de las otras dos (49).

3.2. Modificaciones oxidativas de la Rubisco.

3.2.1. Regulación redox en el cloroplasto.

La cadena de transporte fotoelectrónico tiene como función principal la producción de ATP y poder reductor para la fotosíntesis. De forma natural, la alternancia diaria de periodos de luz y oscuridad produce una oscilación de la producción de poder reductor por parte de la cadena fotoelectrónica que afecta al ambiente redox en el interior del cloroplasto. Además, el transporte electrónico puede convertirse en un generador potencial de especies activas de oxígeno (radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) debido a que el O₂

generado a través del fotosistema II puede funcionar como aceptor de electrones alternativo al NADP⁺ (en situaciones de exceso de iluminación o de defecto de regeneración del NADP⁺ por el ciclo de Calvin). En un rango amplio de condiciones fisiológicas, el cloroplasto dispone de sistemas antioxidantes que lo protegen de los efectos adversos de estos radicales, y cuyos elementos clave son la superóxido dismutasa (que transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno) y el sistema ascorbato peroxidasa/glutatión reductasa (que reduce el peróxido de hidrógeno a agua), a los que se unen tocoferoles y carotenoides (capaces de detener la peroxidación de lípidos), y otros compuestos (117). Sin embargo, en condiciones de estrés intenso, la concentración de especies activas de oxígeno aumenta, y supera las capacidades de los sistemas antioxidantes del cloroplasto, aun a pesar de que la célula responde ante muchos tipos de estrés incrementando la expresión de estos sistemas de defensa. Los radicales hidroxilo formados en estas condiciones a través de la reacción de Fenton (148) son especialmente reactivos y conducen a daños oxidativos iniciando la peroxidación de lípidos de las membranas (60) y la oxidación de proteínas (195).

Por todo ello, el ambiente redox en el interior del cloroplasto, que se establece como un balance entre actividades oxidantes y reductoras en un momento dado, es sensible tanto a la situación fisiológica y funcional del orgánulo, como a factores ambientales (cambios en la intensidad de la luz, en la temperatura o en la disponibilidad de CO₂, agua o nutrientes). Este balance redox, que refleja el estado funcional del cloroplasto, tiene la capacidad de modular la expresión y actividad de distintas proteínas cloroplásticas actuando a distintos niveles. Así, a nivel de la transcripción, la expresión coordinada de los genes de los fotosistemas I y II se halla regulada por la relación de plastoquinona reducida a oxidada (149). Por otro lado, existe también una modulación redox de la estabilidad de los RNA mensajeros plastídicos, en concreto en el caso del transcrito del gen *rbcL*, de manera que una señal reductora (como la que se da en presencia de luz) es capaz de promover la degradación del mensajero (168). La transición de oscuridad a luz provoca, sin embargo, un incremento en la síntesis de la Rubisco que se ha atribuido a la activación redox de factores de elongación de la traducción (96) e, incluso, a un efecto directo del gradiente de protones sobre los polisomas unidos a la membrana tilacoidal, donde se sintetiza parte de la Rubisco (136). En condiciones de luz muy intensa se detiene la traducción de la Rubisco, lo que coincide con un aumento en los niveles intracelulares de especies activas de oxígeno y de la relación de glutatión oxidado a reducido (78). Se ha propuesto que en estas condiciones la Rubisco en su forma oxidada es capaz de unirse a la región 5' de su propio mensajero deteniendo su traducción (221). Se ha demostrado también la existencia de una regulación redox mediada por la tiorredoxina a nivel del inicio de la traducción del gen *psbA* (que codifica la proteína D1 del fotosistema II) que requiere la reducción previa de un complejo multiproteico que debe unirse a la región 5' del mensajero de

psbA (207). El sistema ferredoxina/tiorredoxina tiene además otras dianas importantes en la regulación redox de actividades cloroplásticas, como son enzimas clave en la regulación del ciclo de Calvin (fructosa 1,6-bisfosfatasa, sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa y fosforribuloquinasa), la NADP malato deshidrogenasa, la ATP sintasa, y otros (21). Esta regulación de la actividad enzimática tiene lugar a nivel de pares de cisteínas estructuralmente vecinas que alternan entre la forma ditiol (activa) y disulfuro (inactiva) por intercambio de disulfuros con la tiorredoxina. Aunque la Rubisco no es uno de los sustratos de la tiorredoxina, sí lo es una de las isoformas de la Rubisco activasa (224), presente en algunas especies (como *Arabidopsis*, espinaca, algodón) (170, 214) pero no en otras (como tabaco) (171), y que parece ser responsable de la regulación redox de la actividad de la Rubisco en condiciones limitantes de luz (223). Por último, la regulación redox a nivel de la degradación proteica tiene un claro ejemplo en el rápido recambio de la proteína D1 del fotosistema II inducido por iluminación de las membranas tilacoidales. Este recambio acelerado está causado por un daño oxidativo sobre la proteína que la convierte en un sustrato fácilmente degradable por proteasas preexistentes (2, 131, 183).

Existen numerosas evidencias de que la degradación de la Rubisco promovida por estrés es un proceso sometido a regulación redox. Por un lado, se sabe que algunos de los estreses que conducen a la pérdida de la Rubisco (radiación ultravioleta, ozono, limitaciones nutricionales, estrés osmótico o luz intensa) generan especies activas de oxígeno en el cloroplasto (124) y por otro, se ha comprobado también que la oxidación de la Rubisco por diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo* la convierte en un sustrato más sensible a la degradación proteolítica. Diversos grupos han reiterado la idea de que la degradación de la Rubisco durante el proceso senescente depende de la modificación oxidativa del enzima (4, 33, 34, 50, 55, 118, 132, 133, 147). Sin embargo, la existencia de una relación causal entre modificación oxidativa y degradación *in vivo* resulta difícil de demostrar.

3.2.2. Modificación oxidativa de residuos.

La **oxidación de grupos tioles** de la Rubisco es una de las respuestas más generalizadas ante distintos tipos de estrés en especies diferentes, como son el estrés osmótico en *Lemna minor* (48), el ayuno de nitrógeno en *Euglena gracilis* (56), el tratamiento por ozono en patata (40) o el estrés por frío en *Secale cereale*, (77). Los residuos de cisteína del enzima pueden funcionar, por tanto, como sensores redox de los cambios en el ambiente cloroplástico que se dan como consecuencia de los procesos de senescencia natural o inducida por estrés. Su papel en el catabolismo de la Rubisco merece una atención especial y por ello, se profundizará en este punto más adelante.

De forma algo más específica, según la especie utilizada o el tipo de estrés aplicado, se han detectado otras modificaciones oxidativas de la Rubisco. Así, en *Lemna minor*, los estreses que causan daños en la membrana (choque osmótico, ayuno de calcio, oscuridad, deficiencia de CO₂, tratamiento con etanol) 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, como intermediario de un proceso de polimerización (52, 54). En este caso, se trata de una oxidación enzimática que supone la expresión de un sistema no totalmente caracterizado conocido como Rubisco oxidasa, capaz de inactivar la Rubisco y que requiere la presencia de compuestos de bajo peso molecular no identificados. La Rubisco oxidada y polimerizada obtenida a partir de *Lemna minor* sometida a diferentes condiciones de estrés osmótico es más sensible que la Rubisco nativa a la degradación por un sistema proteolítico endógeno (4). Por otro lado, el tratamiento con luz ultravioleta tanto *in vivo* (216) como *in vitro* (51) provoca también, en una gran variedad de especies, una dimerización entre una subunidad grande y una pequeña a través de un enlace covalente no disulfuro (en el que se ha implicado la fotólisis de un residuo de Trp) (57), seguida de una polimerización en agregados de alto peso molecular. Sin embargo, no se dispone de evidencias de que la naturaleza del enlace que forma el dímero inducido por luz ultravioleta sea la misma que la del p65 observado en *L. minor* en respuesta a los estreses anteriormente citados.

Contrastando con esta dimerización oxidativa, otra de las modificaciones peculiares que sufre la Rubisco es la **fragmentación no enzimática** de la subunidad grande, esencialmente a nivel de la Gly 329 (79, 114), detectada en lisados de cloroplastos o en cloroplastos aislados de trigo, y mediada por radicales libres de oxígeno generados a través de la cadena de transporte electrónico tilacoidal (80, 81). La especificidad en el sitio de corte parece deberse a que un catión oxidable, como el Fe²⁺, se une al sitio activo del enzima y genera radicales hidroxilo (a través de la reacción de Fenton) que atacan a los residuos expuestos más cercanos (81, 114).

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 de la pequeña (40, 88).

Por último, se ha descrito que el ascorbato puede provocar la **glicación** (formación de un aducto covalente con grupos amino) de residuos de la Rubisco, proceso que va acompañado de la inactivación del enzima y de un incremento en su susceptibilidad proteolítica (219). Aunque esta modificación no ha sido detectada *in vivo*, la glicación de proteínas en el cloroplasto en respuesta al estrés es una hipótesis plausible teniendo en cuenta que la concentración de ácido ascórbico en este orgánulo es considerablemente alta (12-25mM) y que

los productos de oxidación del ascorbato, más eficientes que el propio ascorbato en la reacción de glicación, aumentan en condiciones de senescencia o ante estreses ambientales.

3.2.3. Polimerización oxidativa.

Otra de las alteraciones que sufre la Rubisco en respuesta a diferentes tipos de estrés es la polimerización en agregados de alto peso molecular (50, 70, 100, 102).

Las modificaciones oxidativas descritas en el apartado anterior están asociadas en muchos casos a la formación de agregados de alto peso molecular a través de enlaces covalentes. Uno de los ejemplos más claros lo constituye la polimerización oxidativa de la Rubisco en *L. minor* que sigue a la formación del dímero p65, inducida por el sistema Rubisco oxidasa, y que aumenta la susceptibilidad proteolítica del enzima a proteasas endógenas y exógenas (4).

La formación de derivados carbonilo (generados por tratamientos con ozono) se ha relacionado también con los procesos de agregación covalente de la Rubisco. Así, cuando la exposición a ozono se hace directamente sobre la proteína purificada, sobre extractos de hoja, sobre cloroplastos aislados (102), o incluso sobre planta completa (40), se observa también la formación de agregados de Rubisco. El mecanismo de entrecruzamiento en este caso podría ser la formación de una base de Schiff entre el derivado carbonilo y el grupo ϵ -amino (de una Lys) de otra cadena polipeptídica (195).

Otra de las vías para la formación de enlaces intercatenarios de la Rubisco podría ser la glicación, si es que ésta tiene un papel relevante *in vivo*, ya que el tratamiento extensivo de la Rubisco con ascorbato *in vitro*, provoca su polimerización mediante la formación de aductos entre Lys y Arg de diferentes cadenas polipeptídicas (219).

Finalmente, cabe destacar que se ha detectado también el entrecruzamiento intercatenario de la Rubisco a través de enlaces disulfuro *in vivo* en respuesta a diferentes tipos de estrés como el ayuno de nitrógeno (48), o el tratamiento con Cu^{2+} (125). Esta oxidación podría cooperar, por tanto, con los mecanismos de polimerización anteriormente descritos.

3.3. Asociación de la Rubisco con membranas.

Aunque la Rubisco se considera habitualmente una proteína soluble localizada en el estroma del cloroplasto de los organismos eucariotas, hay datos experimentales que apuntan a que, en algunas circunstancias, puede hallarse en una localización excepcional. Así, determinadas situaciones de senescencia inducida por estrés promueven la asociación de una fracción de la Rubisco con las membranas del cloroplasto. Por ejemplo, se ha descrito que, en cloroplastos aislados de cebada sometidos a altas concentraciones de oxígeno en presencia de luz, se genera un fragmento de proteólisis de 36KDa que está asociado preferentemente a la

fracción insoluble del cloroplasto (33). Además, al someter diferentes organismos a un tratamiento con Cu^{2+} (que genera especies activas de oxígeno en el interior de la célula) se produce la translocación de una parte de la Rubisco desde el estroma a la fracción membranosa (125), detectándose también fragmentos de proteólisis asociados a esta fracción. Un estrés diferente, como el que supone el ayuno de nitrógeno en *E. gracilis*, provoca también la asociación del enzima a las membranas, junto a su oxidación y polimerización, acompañada de una proteólisis progresiva durante el ayuno (56). Finalmente, en discos de hoja de judía sometidos a hipoxia se produce la degradación y polimerización de Rubisco (70), detectándose la subunidad grande intacta y un fragmento de proteólisis de 45KDa esencialmente en la fracción soluble, mientras que los agregados de alto peso molecular se asocian de forma preferencial a las membranas.

En conclusión, la oxidación, polimerización y movilización de Rubisco a membranas cloroplásticas son procesos íntimamente relacionados entre sí y parecen constituir etapas previas a la degradación del enzima.

3.4. Proteólisis de la Rubisco.

3.4.1. Proteólisis de la Rubisco *in vitro* con proteasas exógenas.

Los estudios de proteólisis *in vitro* con proteasas como la tripsina o la carboxipeptidasa A han permitido analizar la relevancia de determinados cambios conformacionales de la Rubisco en cuanto a su susceptibilidad proteolítica, y caracterizar los efectos de la eliminación de determinados fragmentos en la funcionalidad del enzima. Así, la formación del complejo carbamilado y, especialmente, la incubación con RuBP o la unión del inhibidor CA1P a la Rubisco, convierten al enzima en un sustrato más resistente al ataque proteolítico (27, 72, 93). Se ha comprobado además que la eliminación tríptica del fragmento N-terminal de la subunidad grande hasta la Lys 14 no provoca el desensamblaje del holoenzima, pero es suficiente para inactivar la Rubisco (62). La trimetilación postraduccional de este residuo, descrita en algunas especies, protege al enzima de este corte y de la consecuente inactivación (76). Por otro lado, se ha demostrado que la eliminación proteolítica de un único residuo en el extremo C-terminal de la subunidad grande de la Rubisco de algunas especies (espinaca, *C. reinhardtii* o *R. alaternus*) es capaz de inactivar el enzima (93, 154).

Dentro del marco de los procesos asociados al catabolismo de la Rubisco, este tipo de análisis *in vitro* ha permitido establecer una relación directa entre la modificación oxidativa de la Rubisco y su susceptibilidad proteolítica. En concreto, se ha demostrado que la oxidación de los grupos tioles del enzima incrementa su sensibilidad a proteasas exógenas, además de provocar su inactivación (55, 147).

3.4.2. Actividades proteolíticas implicadas *in vivo*.

3.4.2.1. Proteasas cloroplásticas.

Actualmente no se conoce el papel fisiológico de muchas de las proteasas cloroplásticas identificadas (2), y no se dispone de evidencias directas de la relación de ninguna de ellas con la degradación de la Rubisco *in vivo*. Sin embargo, existen datos a favor de que las proteasas cloroplásticas están implicadas en la degradación de la Rubisco, como la detección del procesamiento de la subunidad grande en lisados de cloroplastos tratados previamente con termolisina (para eliminar posibles proteasas vacuolares adheridas externamente) (34) o en cloroplastos intactos (23, 24, 128, 165, 166). Se han descrito numerosas proteasas cloroplásticas, tanto en el estroma como asociadas a las membranas tilacoidales (2). Sin embargo, hasta ahora, sólo se ha demostrado la capacidad de degradar la Rubisco *in vitro* de la proteasa EP1, purificada del estroma del cloroplasto de guisante. Se trata de una metaloproteasa dependiente de Zn^{2+} (y estabilizada por Ca^{2+}), que corta entre dos Ala o dos Gly consecutivas (109) y que *in vitro* degrada la Rubisco de forma específica respecto a otras proteínas cloroplásticas, generando un fragmento de 36KDa a partir de la subunidad grande (22). EP1 no requiere de la hidrólisis de ATP, tiene posiblemente una estructura cuaternaria variable, con una composición de subunidades dependiente del medio en el que se encuentre, y es inhibida al reducirse por DTT. Una metaloproteasa dependiente de Zn^{2+} con las características de EP1 es capaz de degradar la Rubisco en cloroplastos aislados de guisante mantenidos en oscuridad y esta actividad proteolítica se estimula cuando se somete las hojas de guisante a ayuno de nitrógeno (165).

De forma indirecta, se ha relacionado también con la degradación de la Rubisco una endoproteinasa ácida (con un pH óptimo de 4.8) fuertemente asociada a la membrana tilacoidal (23), debido a que esta actividad proteolítica se estimula al exponer cloroplastos aislados de avena a altas concentraciones de oxígeno en presencia de luz, lo que coincide con una mayor degradación de Rubisco. Se ha propuesto una vía de activación mediada por la peroxidación de lípidos (promovida por los radicales libres generados por el oxígeno), que afectaría a la fluidez de la membrana tilacoidal y aumentaría la actividad de la proteasa, bien directamente, bien facilitando la accesibilidad de las proteínas sustrato.

Por último, en base al requerimiento de ATP observado en la degradación de Rubisco en lisados de cloroplastos de cebada, se ha sugerido a la serinoproteasa cloroplástica Lon (1, 2) como una posible actividad proteolítica candidata a participar en dicho proceso proteolítico (34).

3.4.2.2. Proteasas vacuolares.

La cooperación entre el cloroplasto y la vacuola en procesos degradativos durante la senescencia se ha demostrado para la ruta catabólica de las clorofilas, en la que éstas se procesan inicialmente en el cloroplasto y los catabolitos intermediarios se exportan a la vacuola donde se completa su degradación (71,199).

En su papel de compartimento que almacena una parte importante de la maquinaria proteolítica celular, las vacuolas contienen altas concentraciones de carboxipeptidasas y de cisteín-endopeptidasas (46), y se ha observado que los niveles de estas últimas aumentan durante la senescencia (47). Las proteasas vacuolares son capaces de degradar la Rubisco *in vitro* (15, 126, 205, 222), pero existen ciertas discrepancias acerca del modo en que podrían entrar en contacto con las proteínas cloroplásticas *in vivo*.

Por un lado, existen evidencias de autofagia de cloroplastos senescentes por parte de la vacuola en estudios de microscopía electrónica (217), detectándose incluso la presencia de Rubisco (no necesariamente intacta) en fragmentos de cloroplasto internalizados en la vacuola y localizándose una fracción de la cistein-proteasa vacuolar EP-C1 en el cloroplasto (127). Aunque muchos trabajos han mostrado que la pérdida de Rubisco es mucho más rápida que la disminución en el número de cloroplastos durante la senescencia (53, 115, 119, 142, 212), esta observación no es suficiente para rechazar algún tipo de participación de las proteasas vacuolares en la degradación de la Rubisco. De hecho, se ha descrito recientemente la formación de cuerpos específicos que contienen Rubisco y glutamina sintetasa, que son excluidos del cloroplasto durante las fases iniciales de la senescencia natural de hojas de trigo e internalizados en la vacuola (29). La generación de estas vesículas derivadas al parecer de la envoltura del cloroplasto, podría ser una vía por la que proteínas del estroma llegan hasta la vacuola sin necesidad de que se rompa irreversiblemente la integridad del cloroplasto. Por otro lado, cuando el proceso senescente progresa hasta sus últimos pasos y se produce la desestabilización de las estructuras membranosas, parece muy probable que los enzimas vacuolares puedan liberarse en otros compartimentos (71, 120).

Por tanto, los modelos de degradación vacuolar y degradación cloroplástica no son excluyentes sino que pueden complementarse el uno al otro en diferentes condiciones metabólicas, fisiológicas o patológicas. Se tiende a pensar que en situación metabólica estable o en los primeros pasos de la senescencia, la proteólisis es esencialmente intracloroplástica, pero cuando se produce un daño de estrés irrevésible, las proteasas vacuolares pueden asumir un papel importante en la degradación (49).

3.4.3. Detección de intermediarios de degradación:

Una de las razones por las que no resulta sencillo desentrañar el mecanismo que conduce a la degradación de la Rubisco *in vivo* es que la alta eficiencia de la maquinaria proteolítica impide generalmente la acumulación de intermediarios del proceso de degradación. A pesar de esto, se han detectado fragmentos de Rubisco en tejidos sometidos a determinadas condiciones de senescencia o estrés que pueden mermar la eficiencia proteolítica intracelular, o en cloroplastos aislados. En general, se observa que el patrón de degradación muestra una gran variabilidad dependiendo de las condiciones empleadas y el organismo estudiado (Tabla i.3). Sólo en uno de estos casos (33), al estudiar la degradación de la Rubisco en cloroplastos aislados de cebada sometidos a estrés oxidativo, se secuenció el extremo N-terminal del fragmento de proteólisis mayoritario, determinando así que el sitio de corte que lo genera es el enlace peptídico entre la Tyr 100 y la Val 101. Además, se han detectado fragmentos de Rubisco al incubar el enzima con lisados cloroplásticos o vacuolares procedentes de tejidos senescentes o en los que se induce algún tipo de estrés, obteniéndose de nuevo una gran heterogeneidad en los tamaños de los fragmentos encontrados en diferentes condiciones (Tabla i.4). Entre aquellos casos en los que se ha identificado el sitio de corte por secuenciación del extremo N-terminal de los fragmentos acumulados, se observa esta misma disparidad de resultados. Así, por ejemplo, la Rubisco se hidroliza entre la Phe 40 y la Arg 41 cuando se incuba con lisados cloroplásticos de trigo en oscuridad (tanto con la fracción tilacoidal como con el estroma) (100). Sin embargo, cuando la incubación se hace específicamente con la fracción tilacoidal en presencia de luz, se genera un fragmento que se ha asociado con el ataque directo de radicales libres de oxígeno sobre la Gly 329 de la Rubisco (80), y que coincide con el observado al iluminar cloroplastos aislados (81). Por otro lado, cuando se utilizan lisados vacuolares de hojas senescentes de judía, se generan una serie de cortes sucesivos entre los enlaces peptídicos Lys14/Ala15, Thr23/Tyr24, Ala58/Ala 59 y Thr68/Val69 (222).

A la luz de los datos de los que se dispone hasta ahora se puede concluir que *in vivo* probablemente no existe un único mecanismo de degradación de Rubisco, sino que cooperan varias vías catabólicas, con una serie de elementos esenciales esquematizados en la Figura i.9. Se desprende de todo esto que la degradación de la Rubisco es un proceso sometido a una regulación precisa, que probablemente refleja el hecho de que la elección de las circunstancias en que la célula ha de perder su capacidad para la fijación de carbono, en favor de la explotación de una fuente importante de aminoácidos, debe ser de crucial importancia para todos los organismos fotosintéticos.

1) Degradación de Rubisco en cloroplastos aislados intactos.			
Especie	Fragmentos LS	SS	Ref.
guisante	Oscuridad: 37kDa Luz: 45,42,37,32 kDa <i>(el patrón depende del medio externo)</i>	no se degrada	(128)
cebada	Luz+O ₂ ó ADP-FeCl ₃ -asc (oscuridad): 36kDa (Tyr100/Val101) <i>(fragmento C-terminal; asociado a fracción insoluble)</i>	no estudiada	(33)
guisante	Osc. + (DTT o KCN o FeCl ₃ /MV): 37kDa Luz + (DTT o KCN o FeCl ₃ /MV):45-32kDa <i>(fragmentos N-terminales)</i>	más estable que LS	(166)
trigo	luz baja y [CO ₂] baja: 30-50 kDa <i>(fragmentos N-terminales)</i>	no estudiada	(71)
trigo	<u>ROTURA NO PROTEOLÍTICA (Gly 329):</u> Luz + (KCN o NaN ₃): 37kDa <i>(fragmento N-terminal)</i>	no estudiada	(81)
2) Degradación de Rubisco en células completas.			
Especie	Fragmentos LS	SS	Ref.
judía, trigo, pepino (segmentos de hoja)	[O ₂] baja, oscuridad: 45kDa <i>(fragmento soluble en el estroma)</i>	más estable que LS	(70)
guisante (segmentos de hoja)	[O ₂] bajas, oscuridad: 2 fragmentos < 45kDa	no estudiada	(70)
trigo (segmentos de hoja)	luz baja y [CO ₂] baja : 50kDa <i>(no contiene extremo N-terminal)</i>	más estable que LS	(71)
guisante (ovarios)	Senescencia: 52, 30kDa <i>(fragmentos ausentes al tratar con GA)</i>	no estudiada	(25)

TABLA i.3. Degradación de la Rubisco *in vivo*. Junto a los tamaños de los fragmentos se indican las condiciones empleadas para su detección. MV = metilviológeno; GA = ácido giberélico; Osc. = oscuridad. Se resaltan en azul los casos en los que se ha secuenciado el extremo N-terminal de los fragmentos de degradación, indicando entre paréntesis el sitio de corte que originó dicho fragmento.

1) Degradación de Rubisco purificada por extractos vacuolares				
proteasa	Especie	Fragmentos LS	SS	Ref.
lisado vacuolar	trigo	Sin SDS: 52.1,50.9,50.1kDa Con SDS: 51.8,44.4,43.6,30.3, 29.5 kDa	más estable que LS	(15)
EP ₁	cebada	54.5,49.0,37.7,34.5, 32.6,27.4,19.1,17.7, 13.7 kDa	más estable que LS	(205)
EP ₂	cebada	40.2,34.6,18.5,16.8 kDa	más sensible que LS: fragmento 13.7 kDa	(205)
Lisado vacuolar (hojas senescentes)	alubia	50kDa (Lys14/Ala15) 48kDa (Thr23/Tyr24) 42kDa (Ala58/Ala59) 41kDa(Thr68/Val69) (fragmentos C- terminales)	no se degrada	(222)
2) Degradación de Rubisco purificada ¹ /endógena ² por extractos cloroplásticos				
proteasa	Especie	Fragmentos LS	SS	Ref.
¹ EP1 (estroma)	guisante	36kDa	no se degrada	(22)
¹ estroma cloroplasto (+ATP)	cebada	Rubisco oxidada: (44),(41),36,(20) kDa	más estable que LS	(34)
² estroma cloroplasto (oscuridad)	trigo	44KDa (fragmento C- terminal)	no estudiada	(100)
¹ fracc. tilacoidal (oscuridad)	trigo	44kDa(Phe40/Arg41) (fragmento C-terminal)	no estudiada	(100)
¹ ROTURA NO PROTEOLÍTICA (fracción tilacoidal +luz)	trigo	37kDa (fragmento N- terminal) (Gly 329)	no estudiada	(80)

TABLA i.4. Fragmentación de la Rubisco *in vitro* por sistemas endógenos. Se resaltan en azul los casos en los que se ha secuenciado el extremo N-terminal de los fragmentos de degradación, indicando entre paréntesis el sitio de corte que originó dicho fragmento.

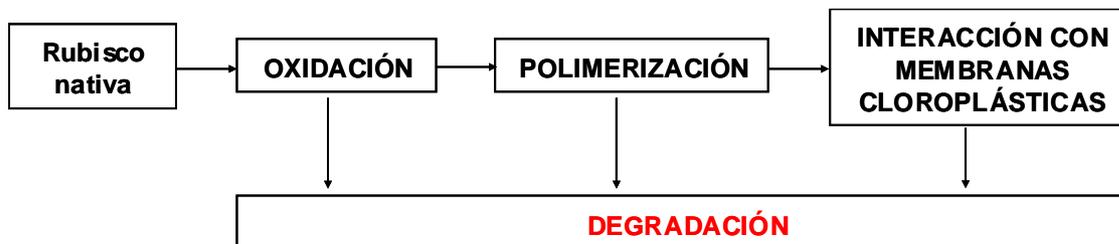


FIGURA i.9. Modelo para la degradación selectiva de la Rubisco (tomado de (49)).

3.5. Papel de los residuos de cisteína en el catabolismo de la Rubisco.

Los residuos de cisteína de la Rubisco son susceptibles de oxidarse por cambios de las condiciones redox en el interior del cloroplasto inducidos por multitud de situaciones de estrés (40, 48, 56, 77). Por otro lado, la oxidación de los grupos tioles del enzima provoca su inactivación y un aumento en su susceptibilidad proteolítica *in vitro* (55, 147). Debido a que ambos procesos se desencadenan en torno a potenciales redox diferentes, se ha propuesto que los residuos de cisteína implicados en la pérdida de actividad son distintos de los responsables de su conversión en un mejor sustrato para las proteasas (55).

El residuo de cisteína 247, cuya oxidación se ha detectado *in vivo* en respuesta a tratamientos con Cu^{2+} (125) o ayuno de nitrógeno (56), no parece tener un efecto sobre la actividad (118, 158), la degradación (118) o la movilización de la Rubisco a la fracción membranosa (125), pero es responsable de la dimerización covalente de dos subunidades grandes. En cambio, se ha demostrado la implicación de la cisteína 172 en la degradación de la Rubisco *in vivo*. Así, cuando este residuo se reemplaza por serina en *C. reinhardtii*, la degradación de la Rubisco se retrasa respecto al control silvestre al someter las células a estrés oxidativo u osmótico (133) y de forma similar, cuando se sustituye por Ala en *Synechocistis sp.* la pérdida de Rubisco inducida por una deficiencia de nitrato en el medio, se reduce considerablemente respecto a los cultivos control (118).

El retraso en la degradación de la Rubisco del mutante en la cisteína 172 de *C. reinhardtii* se correlaciona con una disminución de su susceptibilización proteolítica inducida por oxidación *in vitro*. Sin embargo, la mutación no afecta a la inactivación redox del enzima, y tampoco impide la transición de la Rubisco hacia su forma sensible al ataque por proteasas cuando las condiciones son lo suficientemente oxidantes (133). Esta observación reafirma la idea de que diversos residuos de cisteína contribuyen a través de distintas vías a los procesos de inactivación y proteólisis promovidos por un aumento en las condiciones oxidantes del medio, como el que se da durante la senescencia natural o inducida por estrés. Debido a que dichas respuestas están muy extendidas entre diferentes especies, cabe esperar que esta regulación sea ejercida por residuos de cisteína conservados. El estudio del papel concreto de cada una de

estas cisteínas en los diferentes procesos asociados con el catabolismo de la Rubisco ayudaría a comprender el modo en que la oxidación de estos residuos moldea el enzima hacia una forma catabolizable, y a descifrar alguna de los elementos clave de este mecanismo central en la vida de los organismos fotosintéticos.

OBJETIVOS

En este trabajo se ha pretendido profundizar en el conocimiento de los mecanismos que regulan la actividad y la disponibilidad proteolítica de la Rubisco a través del estado de oxidación de residuos de cisteína del propio enzima. Dentro de este tema se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1) Estudio del patrón diferencial de proteolisis de Rubisco reducida y oxidada.

Los antecedentes indican que la modificación oxidativa de la Rubisco es una de las piezas clave en el mecanismo que dispara las rutas catabólicas del enzima. Además, la oxidación *in vitro* del enzima (y más concretamente, de sus cisteínas) lo convierte en un sustrato más accesible a la acción de proteasas exógenas (147). Esta variación de la susceptibilidad proteolítica de la Rubisco se debe probablemente a cambios conformacionales de la proteína inducidos por la oxidación. En la actualidad, no se posee la información estructural necesaria para determinar la naturaleza de estos cambios, ya que todos los datos cristalográficos de las Rubiscos resueltas hasta ahora corresponden al enzima reducido. Por ello, se decidió realizar un estudio detallado de las modificaciones del patrón de proteolisis de la Rubisco inducidas por la oxidación específica de cisteínas. Esta investigación pretendía detectar cambios conformacionales en la Rubisco oxidada utilizando proteasas de baja especificidad como sondas estructurales, dilucidar detalles del mecanismo de degradación de la proteína *in vitro*, y comparar los resultados con los datos bibliográficos de fragmentación proteolítica *in vivo* con objeto de evaluar la posible implicación de este mecanismo.

2) Obtención de mutantes de Rubisco por sustitución de residuos conservados de cisteína.

Dada la similitud de los efectos de la oxidación de cisteínas en las Rubiscos de especies filogenéticamente alejadas, los residuos de cisteína conservados parecen firmes candidatos para mediar la regulación redox del enzima. Con objeto de investigar la función concreta de cada uno de estos residuos en la modulación redox de las propiedades de la Rubisco, tanto *in vitro* como *in vivo*, nuestro grupo de investigación se propuso llevar a cabo la mutagénesis dirigida de cada una de las cisteínas conservadas y el estudio de los fenotipos mutantes. La sustitución de los residuos de cisteína por serina permite eliminar la actividad redox del residuo mutado mediante el cambio de un único átomo en la molécula (S por O).

Este proyecto se había iniciado ya con la obtención de mutantes de la pareja de cisteínas 172 y 192, por lo que en el presente trabajo se planteó la obtención de los mutantes

Objetivos

del resto de cisteínas conservadas de la Rubisco de *C. reinhardtii*. Éstas son las Cys 84, 247, 284 y 459 de la subunidad grande y las Cys 41 y 83 de la subunidad pequeña. Además, se planeó también la obtención del mutante de la Cys 449 de la subunidad grande, ya que este residuo (algo menos conservado) se halla muy cerca de la Cys 459 y podría interactuar con ella.

3) Estudio del papel del par Cys 449-Cys459 en la modulación redox de la Rubisco.

De entre los mutantes programados en el capítulo anterior, se escogieron para una caracterización más detallada los correspondientes a los residuos de cisteína 449 y 459.

El residuo de cisteína 459 de la subunidad grande de Rubisco presenta un alto grado de conservación entre las secuencias de plantas superiores, algas verdes y cianobacterias. Además, en *C. reinhardtii* este residuo se encuentra a una distancia de la cisteína 449 (con un grado de conservación importante) compatible con la formación de un puente disulfuro, que podría tener algún papel estructural o de regulación. Con objeto de poder evaluar una posible redundancia funcional de estos residuos, se incluyó también la obtención y caracterización del doble mutante C449S/C459S.

Para abordar estos objetivos, se escogió como sistema experimental el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, considerada como organismo modelo para el estudio del cloroplasto, ya que es posible la transformación eficiente tanto del genoma nuclear como del cloroplástico, y se dispone de mutantes de Rubisco no fotosintéticos que pueden ser utilizados como cepas receptoras en la transformación. Entre ellos, se incluye el mutante T-60 que, en la actualidad, es el único organismo que permite la expresión de mutaciones de la subunidad pequeña sin interferencia de la proteína silvestre.

Los resultados obtenidos y su correspondiente discusión se han estructurado en tres capítulos, que se ajustan a cada uno de los objetivos propuestos.

CAPÍTULO I

**Estudio del patrón diferencial de proteolisis
de Rubisco reducida y oxidada**

RESULTADOS

1. Diferencias en el patrón de proteólisis entre la Rubisco reducida y oxidada: *El patrón de fragmentación proteolítica de la subunidad grande de la Rubisco depende del estado redox de sus cisteínas.*

La Rubisco purificada de *Chlamydomonas reinhardtii* se incubó previamente con cistamina (agente oxidante de grupos tioles) o cisteamina (agente reductor de grupos tioles) y se sometió posteriormente a la acción de proteasas de baja especificidad de sitio de corte e insensibles a efectores redox, como la subtilisina o la proteinasa K. La proteólisis de la Rubisco oxidada dio lugar a fragmentos de 53KDa (banda I en SDS-PAGE) y de 47KDa (banda II en SDS-PAGE), a partir de la subunidad grande del enzima, durante los primeros 40 minutos de ensayo (Figura 1.1). Sin embargo, la Rubisco reducida generó sólo el fragmento de 53KDa (banda I) durante el mismo tiempo de incubación con cualquiera de las proteasas (Figura 1.1).

Las bandas electroforéticas I y II no fueron estrictamente homogéneas sino que consistieron en una serie de polipéptidos de masa similar cuyo tamaño convergía hacia un límite inferior al prolongar el tiempo de proteólisis. Probablemente esto se debió al corte repetido y progresivo de la proteasa dentro de un mismo dominio hasta llegar a un núcleo resistente de tamaño fijo. El tamaño asignado anteriormente a las bandas I y II corresponde a este límite inferior.

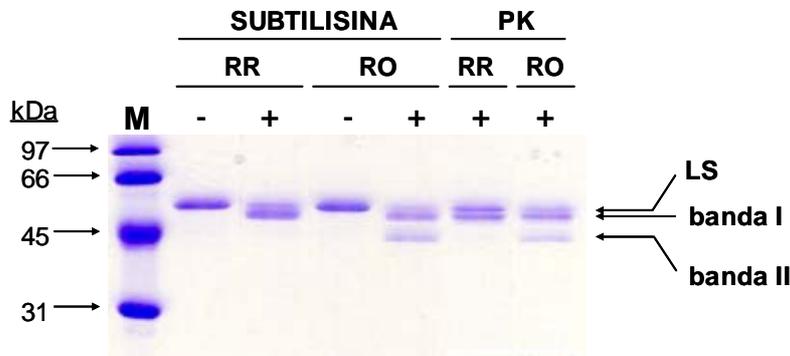


FIGURA 1.1: Proteólisis de la Rubisco reducida (RR) y oxidada (RO) con proteasas de baja especificidad de secuencia. Rubisco purificada (0,1 mg/ml en tampón de activación) de *C. reinhardtii* se incubó durante 40 min a 30°C en presencia (+) o ausencia (-) de subtilisina o proteinasa K (PK) a una concentración final de 0,5 µg/ml. Los productos de reacción se separaron por SDS-PAGE junto con marcadores de peso molecular (M). Las posiciones de la subunidad grande intacta (LS), así como de los fragmentos de degradación banda I y banda II, después de SDS-PAGE, están indicados con flechas.

Resultados I

Cuando se prolongó la incubación con subtilisina a tiempos más largos (hasta 5 horas) se pudo observar la generación de banda II también a partir de la Rubisco reducida, pero a una velocidad mucho menor. La banda II sólo se detectó después de 1 hora, cuando casi toda la subunidad grande de la Rubisco reducida se había procesado previamente en forma de banda I (Figura 1.2).

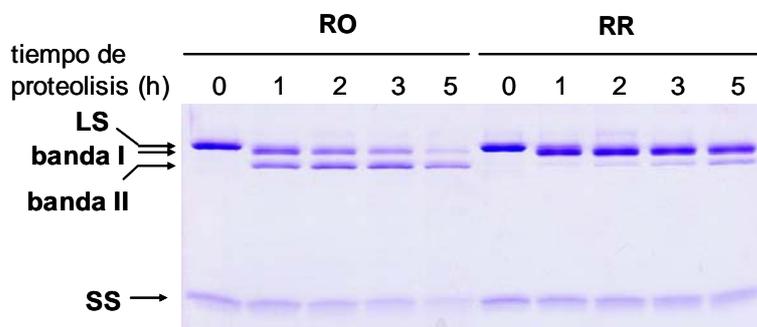


FIGURA 1.2: Proteólisis de la Rubisco reducida (RR) y oxidada (RO) por incubación prolongada con subtilisina. Rubisco purificada (0,1mg/ml) de *C. reinhardtii* se incubó a 30°C con subtilisina (0,5µg/ml) durante diferentes tiempos (hasta 5 h). Las posiciones de la subunidad grande intacta (LS), de la subunidad pequeña (SS) y de los fragmentos de degradación (banda I y banda II), después de SDS-PAGE, están indicados con flechas.

Estos resultados revelan la existencia de dos sitios sensibles al ataque proteolítico dentro de la estructura de la Rubisco. El sitio I (que genera la banda I) parece igualmente accesible en la forma reducida y oxidada del enzima. Por el contrario, el sitio II (que genera la banda II) incrementa notablemente su exposición a la acción de la proteasa como consecuencia de la oxidación (con cistamina) de los grupos tiólicos de la Rubisco.

Cabe destacar que la cantidad total de subunidad grande (intacta más fragmentos) observada en el gel disminuyó considerablemente con el tiempo en el caso del enzima oxidado, pero experimentó sólo una pequeña disminución en el caso de la Rubisco reducida, acumulándose principalmente como banda I (Figura 1.2). Además, el procesamiento proteolítico de la subunidad pequeña (15KDa) fue también mucho más lento en la Rubisco reducida que en el enzima oxidado, aunque no produjo fragmentos detectables en ninguno de los dos casos (Figura 1.2). Esto sugiere que ambas subunidades en la Rubisco oxidada se degradan posteriormente a aminoácidos o péptidos demasiado pequeños para ser detectados como bandas en un gel de SDS-PAGE. Se puede llamar a este paso final proteolisis "no-restringida" en oposición al término proteolisis "limitada" que da lugar a fragmentos de masa molecular relativamente alta y de tamaño definido. La proteólisis no-restringida de la subunidad grande se determinó representando la evolución temporal de la suma de la subunidad intacta más

todos los fragmentos observables derivados de la misma (banda I y banda II), después de compensar la intensidad de la tinción con azul Coomassie por la pérdida de masa. Al compararla con la degradación de la subunidad pequeña (Figura 1.3) se observó que la proteólisis no-restringida ocurría a la misma velocidad para las dos subunidades. Este paralelismo probablemente refleja el hecho de que la proteólisis no-restringida sólo es posible tras el desmantelamiento de la estructura cuaternaria de la Rubisco (L_8S_8). Cabe esperar que la degradación de las subunidades libres sea mucho más rápida que cuando están integradas en la estructura cuaternaria. En consecuencia, la cinética de la proteólisis no-restringida debe estar limitada por el desensamblaje del holoenzima y, por tanto, debe ser común para ambas subunidades, tal como efectivamente se observa. En este sentido, el hecho de que la Rubisco reducida experimentara una proteólisis no-restringida muy baja, incluso después de 5 horas de incubación con la proteasa (Figura 1.2), parece indicar que la disociación en subunidades debe estar favorecida (directa o indirectamente) por el estado de oxidación del enzima.

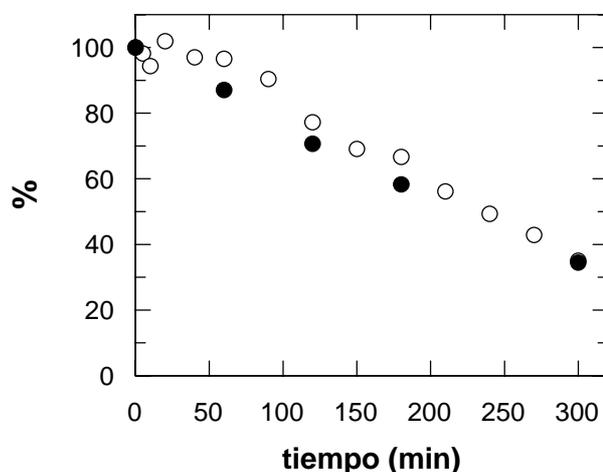


FIGURA 1.3: Proteólisis no restringida de la subunidad grande (○) y pequeña (●) de la forma oxidada de la Rubisco de *C. reinhardtii* por subtilisina. Diversas muestras de Rubisco purificada y oxidada (0,1 mg/ml en tampón de activación) se incubaron con subtilisina (0,5 µg/ml). Las reacciones se detuvieron a diferentes tiempos (hasta 300 min) y los productos se corrieron en SDS-PAGE. La subunidad grande y los fragmentos procedentes de la misma, así como la subunidad pequeña, se cuantificaron de los geles teñidos con azul Coomassie. Los valores obtenidos para la banda I y la banda II se corrigieron por la pérdida de masa debida al procesamiento, y se sumaron a los de la subunidad grande intacta. Los valores finales, que reflejan la cantidad de subunidad observable en el gel (no sometida a proteólisis no-restringida), se representan como porcentajes del contenido inicial.

Cuando se incubó la Rubisco purificada con tampones redox de diferentes relaciones (r) cisteamina/cistamina y se sometió posteriormente a proteólisis con subtilisina durante 20 minutos, se observó que la acumulación de la banda I era independiente del ambiente redox en el que se hubiera equilibrado el enzima (Figura 1.4). Por el contrario, el experimento puso

Resultados I

de manifiesto una clara correlación entre la generación de la banda II y el grado de oxidación de la Rubisco (Figura 1.4), lo que sugiere que el cambio conformacional que sufre el enzima alrededor del sitio II, desde el estado reducido al oxidado, es gradual y sensible a la fracción de cisteínas oxidadas.

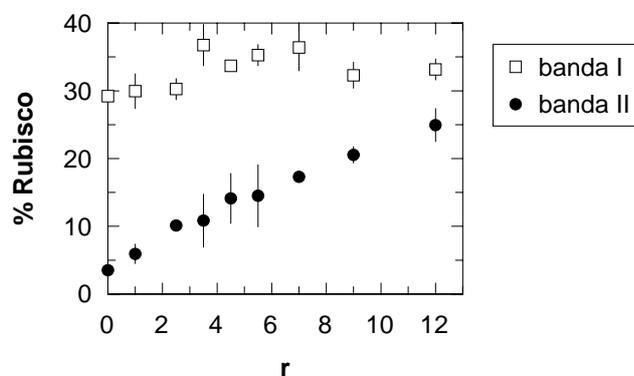


FIGURA 1.4: Evolución del patrón proteolítico de la Rubisco incubada en tampones redox con grados de oxidación crecientes. La Rubisco purificada (0,13mg/ml) de *C. reinhardtii* se incubó durante 2h a 30°C en una atmósfera de nitrógeno con los distintos tampones redox, preparados como mezclas de cisteamina y cistamina en diferentes relaciones molares ($r = \text{CSSC}/\text{CSH}$) y concentración monomérica total constante e igual a 40mM, en tampón de activación. A continuación, la Rubisco se sometió a proteólisis con subtilisina (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 20 minutos a 30°C. Las muestras se corrieron en SDS-PAGE y se cuantificaron los fragmentos de degradación (banda I, \square y banda II, \bullet) del gel teñido con azul Coomassie, corrigiendo los valores obtenidos por la pérdida de masa. El resultado final se muestra como porcentaje respecto a la cantidad de subunidad grande que permanece intacta tras el tratamiento con subtilisina de la Rubisco reducida ($r = 0$).

2. Patrón proteolítico de la Rubisco en diferentes especies: *El patrón de proteólisis de la Rubisco reducida y oxidada está conservado en diferentes especies.*

Con el fin de investigar si el patrón diferencial de proteólisis dependiente de las condiciones redox es una característica particular del enzima de *C. reinhardtii* o bien se halla conservado en enzimas de otros organismos, se escogieron 4 especies más (*Euglena gracilis*, espinaca, morera y arroz) entre aquellas en las que la secuencia de la Rubisco es conocida y muestra un cierto grado de divergencia en las posiciones ocupadas por cisteínas (Figuras 1.6A y 1.6B). La Rubisco purificada de estas especies mantuvo en todos los casos el mismo patrón de fragmentación proteolítica diferencial entre la forma reducida y oxidada observado en *C. reinhardtii* (Figura 1.5). Esto sugiere que el cambio conformacional inducido por oxidación de la Rubisco está conservado en diferentes especies y que algunos de los residuos de cisteínas más ampliamente conservados entre cianobacterias, algas verdes y plantas superiores, y que

son comunes a las 5 especies estudiadas (cisteínas 84, 172, 192, 247, 284, 427, 459 de la subunidad grande y Cys 83 de la subunidad pequeña) deben estar implicados en dicho cambio.

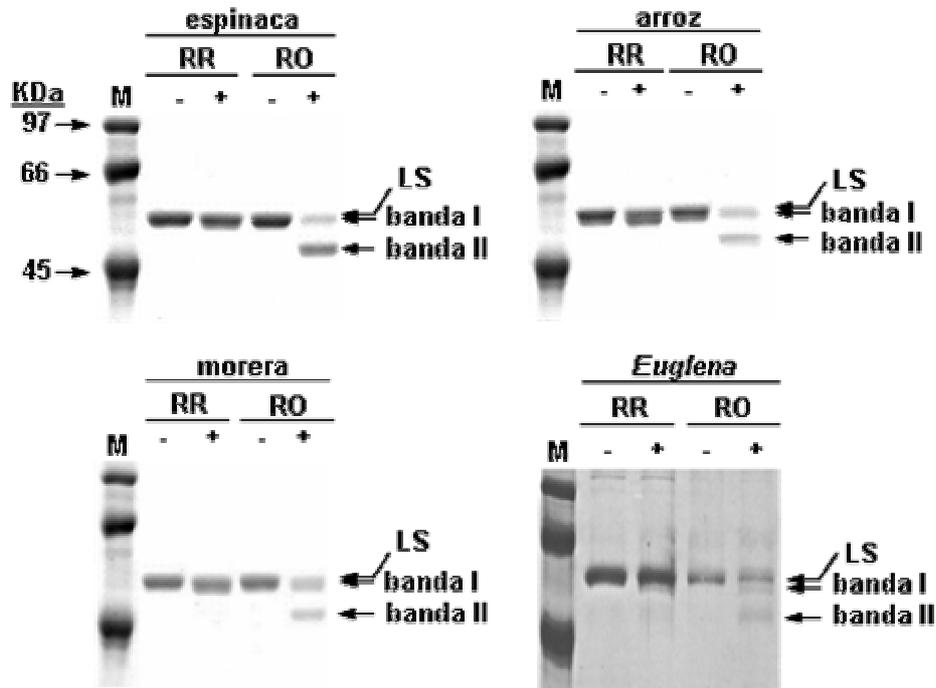


FIGURA 1.5: Patrón de proteólisis con subtilisina de la Rubisco reducida (RR) y oxidada (RO) de diferentes especies. Rubiscos purificadas (0,1 mg/ml en tampón de activación) de espinaca, arroz, morera y *E. gracilis* se incubaron a 30°C en ausencia (-) o presencia (+) de subtilisina 0,06 µg/ml (arroz, morera, *Euglena*) o 0,1 µg/ml (espinaca) durante 20 min (*Euglena*), 40 min (arroz y morera) o 50 min (espinaca). Las posiciones de la subunidad grande intacta (LS), así como de los fragmentos de degradación banda I y banda II, después de SDS-PAGE, están indicados con flechas.

3. Efecto de diferentes modificaciones de cisteínas sobre la accesibilidad proteolítica del sitio II: *El patrón de proteólisis diferencial puede ser inducido por diversas modificaciones de cisteínas.*

Para investigar si el cambio observado en el patrón proteolítico se produce sólo por la modificación oxidativa de las cisteínas a disulfuros o, más específicamente, a un disulfuro mixto con cistamina, la Rubisco se trató con diferentes agentes capaces de reaccionar con residuos de cisteína, y se sometió posteriormente a proteólisis con subtilisina.

Los agentes alquilantes como la iodoacetamida o el ácido iodoacético indujeron el cambio característico en el patrón proteolítico, produciendo la banda II en tiempos cortos de incubación con subtilisina, al igual que ocurría al tratar Rubisco con cistamina (Figura 1.7A). Dado que la iodoacetamida, el ácido iodoacético y la cistamina incorporan, respectivamente,

Resultados I

un grupo neutro, uno cargado negativamente y uno cargado positivamente a las cisteínas modificadas, se puede desechar un efecto específico de la carga como causa de la fragmentación diferencial.

A

<i>C. reinhardtii</i>	MVPQTETKAGAGFKAGVKDYRLTYTTPDYVVRDTDILAAF	40
<i>Spinacea oleracea</i>	-s-----sv-----k-----e-etl-----	40
<i>Oryza sativa</i>	-s-----sv-----k-----e-etk-----	40
<i>Morus alba</i>v-----k-----etk-----	30
<i>Euglena gracilis</i>	-s-----t-----q-se-----	40
	53 61 68	
<i>C. reinhardtii</i>	RMT P QLGVPPEE C GAAVA A ESSTGTWTTVWTDGLTSLDRY	80
<i>Spinacea oleracea</i>	-vs--p-----a-----n----	80
<i>Oryza sativa</i>	-v--p-----a-----	80
<i>Morus alba</i>	-v--p-----a-----	70
<i>Euglena gracilis</i>	---p--a-----q---	80
	84	
<i>C. reinhardtii</i>	KGR C YDIEPVPGEDNQYIAYVAYPIDLFEEGSVTNMFTSI	120
<i>Spinacea oleracea</i>	----h---a-e--- C ----l-----	120
<i>Oryza sativa</i>	----h---v-----l-----	120
<i>Morus alba</i>	----h---a-es-f-----l-----	110
<i>Euglena gracilis</i>	----l-----s-----ll---	120
<i>C. reinhardtii</i>	VGNVFGFKALRALRLEDLRIPPAYVKTFFVGPPHGIQVERD	160
<i>Spinacea oleracea</i>	-----v-----q-----	160
<i>Oryza sativa</i>	-----t-s--q-----	160
<i>Morus alba</i>	-----t-----q-----	150
<i>Euglena gracilis</i>	-----s--w-----	160
	172 192	
<i>C. reinhardtii</i>	KLNKYGRGLL C TIKPKLGLSAKNYGRAVYE C LRGGLDFT	200
<i>Spinacea oleracea</i>	-----p-----	200
<i>Oryza sativa</i>	-----p----- C -----	200
<i>Morus alba</i>	-----p-----	190
<i>Euglena gracilis</i>	r-----p-----	200
<i>C. reinhardtii</i>	KDDENVNSQPFMWRDRFLFVAEAIYKAQAETGEVKGHYL	240
<i>Spinacea oleracea</i>	----- C ---l-----i----	240
<i>Oryza sativa</i>	-----v- C ---s---i----	240
<i>Morus alba</i>	----- C -----i----	230
<i>Euglena gracilis</i>	-----s----- C -----t-----	240

FIGURA 1.6: Alineamiento de las secuencias de las subunidades grandes (A) y las subunidades pequeñas (B) de *C. reinhardtii*, *Spinacea oleracea*, *Morus alba*, *Oryza sativa* y *Euglena gracilis*. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos del NCBI y se alinearon con el programa DNAMAN. Los guiones bajo la secuencia de *C. reinhardtii* indican la conservación del residuo correspondiente. Los números a la derecha de los alineamientos indican la numeración de las secuencias de cada especie. Los residuos de cisteína de cada secuencia se indican en rojo, y se marcan con el número correspondiente a la secuencia de *C. reinhardtii* en rojo (residuos conservados) o en negro (residuos poco o no conservados). En (A) se resalta sobre fondo azul el lazo Ser61-Thr 68. En (B) se ha indicado con dos líneas inclinadas contiguas, al principio y al final del alineamiento, que la secuencia completa original se extiende más allá de esos límites. La secuencia de la subunidad pequeña de *M. alba* no está disponible en la base de datos del NCBI.

	247	256	
<i>C. reinhardtii</i>	NATAGT C EEMMKRAV C AKELGVPIIMHDYLTGGFTANTSL		280
<i>Spinacea oleracea</i>	-----d-----f-r-----v-----t-		280
<i>Oryza sativa</i>	-----i----f-r-----v-----		280
<i>Morus alba</i>	-----d-----f-r-----v-----		270
<i>Euglena gracilis</i>	-----y---sf-aqi-----		280
	284		
<i>C. reinhardtii</i>	AIY C RDNGLLLHIHRAMHAVIDRQRNHGIHFRVLAKALRM		320
<i>Spinacea oleracea</i>	sh-----k--m-----l		320
<i>Oryza sativa</i>	-h-----k--m-----		320
<i>Morus alba</i>	-h-----k--m-----		310
<i>Euglena gracilis</i>	-m-----t--		320
<i>C. reinhardtii</i>	SGGDHLHSGTVVGKLEGEREVTLGFVDLMRDDYVEKDRSR		360
<i>Spinacea oleracea</i>	----i-----di-----l---t-----		360
<i>Oryza sativa</i>	----i-a-----m-----l---fi---a-		360
<i>Morus alba</i>	----i-a-----i-----l---f-----		350
<i>Euglena gracilis</i>	-----a-----		360
	369	399	
<i>C. reinhardtii</i>	GIYFTQDW C SMPGVMPVASGGIHVWHMPALVEIFGDDA C L		400
<i>Spinacea oleracea</i>	-----s-v-t---l-----t-----sv-		400
<i>Oryza sativa</i>	--f----v----i-----t-----sv-		400
<i>Morus alba</i>	-----v----l-----t-----sv-		390
<i>Euglena gracilis</i>	-----g-g-t-----t-----		400
	427		
<i>C. reinhardtii</i>	QFGGGTLGHPWGNAPGAAANRVALEA C TQARNEGRDLARE		440
<i>Spinacea oleracea</i>	-----v-----v-----		440
<i>Oryza sativa</i>	-----v-----		440
<i>Morus alba</i>	-----v-----v-----		430
<i>Euglena gracilis</i>	-----s---v-----s--		440
	449	459	
<i>C. reinhardtii</i>	GGDVIRSA C KWSPELAAA C EVWKEIKFEFDTIDKL..		475
<i>Spinacea oleracea</i>	-nti--e-t-----pam-tv..		475
<i>Oryza sativa</i>	-nei-----i--a----epv---ds		477
<i>Morus alba</i>	-nei--e-s-----		459
<i>Euglena gracilis</i>	-----e-----e-----		475

FIGURA 1.6. (continuación)

B

<i>C. reinhardtii</i> (S1)MMVWTPVNNKMFETFSYLPPLTDEQIAAQVDYIVA	35
<i>C. reinhardtii</i> (S2)	//aqanq-----s-----	80
<i>Spinacea oleracea</i>	//slasnggrvqCmkvwptqnmkryetlsylppltttdqlarq	86
<i>Oryza sativa</i>	//lrqrqhgrirCmqvwpiegikkfetlsylpplttvedllk	73
<i>Euglena gracilis</i>	//tgekd-k--n----k-----s-a---k---m-i-	600
	41 65	
<i>C. reinhardtii</i> (S1)	NGWIPCLEFAEADKAYVSNESAIRFGSVSCLYYDNRYWTM	75
<i>C. reinhardtii</i> (S2)	-----s-----	120
<i>Spinacea oleracea</i>	vdyllnnkwvpClefetdhgfvvrehhnspeg---g-----	126
<i>Oryza sativa</i>	qieylapfqvvpClefsvkvgfvvrenhkspg---g-----	113
<i>Euglena gracilis</i>	k-ls-----apensfia-dntv--sgtaag-----	640
	83 96	
<i>C. reinhardtii</i> (S1)	WKLPMFGCRDPMQVLRREIVACTKAFPDAYVRLVAFDNQKQ	115
<i>C. reinhardtii</i> (S2)	-----	160
<i>Spinacea oleracea</i>	-----t--a---n-lee-k-ey-n-fi-iig--snr-	166
<i>Oryza sativa</i>	-----t-at--vk-leeak--y---f--iig---vr-	153
<i>Euglena gracilis</i>	-----t-as-----se-rr-y-qC-----a---sv--	680
<i>C. reinhardtii</i> (S1)	VQIMGFLVQRPKTARDFQPANKRSV.....	140
<i>C. reinhardtii</i> (S2)	-----s---w-----	185
<i>Spinacea oleracea</i>	--Cvs-iayk-agy.....	180
<i>Oryza sativa</i>	--lis-iayn-gCeesggn.....	172
<i>Euglena gracilis</i>	--vis-v---sgssswgmaamtgekdmkvwnpvnnkff//	720

FIGURA 1.6 (continuación)

La Rubisco tratada con glutatión oxidado no originó apenas banda II cuando se incubó posteriormente con subtilisina (Figura 1.7A), de forma similar a la Rubisco no tratada (Figura 1.7B). Este resultado está de acuerdo con observaciones anteriores en las que el glutatión no fue capaz de producir la inactivación ni la sensibilización proteolítica de la Rubisco (55, 133). Esta incapacidad se ha atribuido a la dificultad para acceder a las cisteínas críticas por parte de un disulfuro relativamente voluminoso (en comparación con la cistamina) como el glutatión oxidado.

El tratamiento con arsenito (reactivo de cisteínas vecinas que se inserta formando un puente entre ellas) generó también el fragmento característico de la Rubisco oxidada (Figura 1.7A). La intensidad de la banda II producida por arsenito se incrementó mediante un tratamiento simultáneo con un monotiol como la cisteamina (Figura 1.7A). Esto sugiere que el arsenito podría reaccionar con residuos de cisteína adyacentes que inicialmente están oxidados, probablemente a través de un disulfuro interno, en una fracción importante de las moléculas del enzima no tratado. Su reducción previa con cisteamina provocaría una modificación más extensiva con arsenito y la consecuente producción de banda II por subtilisina. Si esto fuera cierto, se podría deducir que, en el caso de estas cisteínas, la

oxidación a través de un disulfuro interno no es equivalente a la modificación por arsenito en cuanto a la generación del fragmento diferencial. Además, la acumulación de banda II después del tratamiento con arsenito en condiciones reductoras fue sensiblemente menor que la observada con cistamina (Figura 1.7A). Ello es debido probablemente a que la reactividad del arsenito está restringida a ditiolos, y sugiere que el cambio en el patrón proteolítico podría alcanzarse como resultado de una contribución parcialmente redundante de la oxidación de diferentes residuos de cisteína.

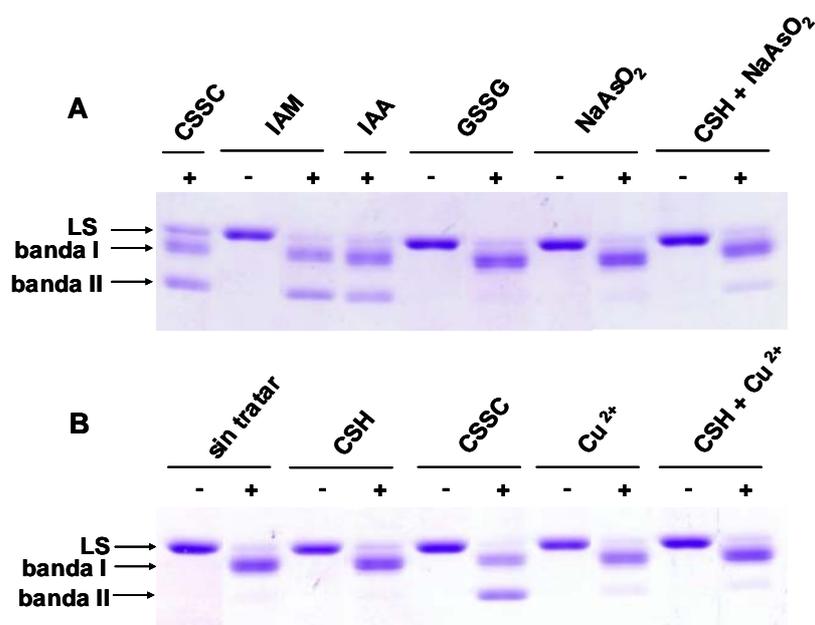


FIGURA 1.7: Proteólisis con subtilisina de la Rubisco de *C. reinhardtii* tratada previamente con diferentes agentes que modifican residuos de cisteína. Los tratamientos fueron (A) CSSC = cistamina 20mM; IAM = iodoacetamida 20mM; IAA = ácido iodoacético 20mM; GSSG = glutatión oxidado 20mM; NaAsO₂ = arsenito de sodio 2mM; NaAsO₂ + CSH = arsenito de sodio 2mM + cisteamina 40mM y (B) CSH = cisteamina 40mM, CSSC = cistamina 20mM, Cu²⁺ = sulfato de cobre 25μM, Cu²⁺ + CSH = sulfato de cobre 25μM + cisteamina 40mM. Las muestras de Rubisco purificada (0,1mg/ml en tampón de activación) se incubaron con los agentes indicados durante 2 h a 30°C en una atmósfera de nitrógeno. A continuación, las mezclas fueron incubadas con (+) o sin (-) subtilisina (a una concentración final de 0,5 μg/ml) a 30°C durante 1h (excepto para CSSC en (A) durante 20 min). Las posiciones de la subunidad grande intacta (LS) así como de los fragmentos de degradación banda I y banda II, después de SDS-PAGE, se indican con flechas.

Por último, el tratamiento de la Rubisco (en presencia o ausencia de cisteamina) con sulfato de cobre indujo la formación de banda II a niveles ligeramente superiores a los que se consiguieron con la Rubisco no tratada o reducida (Figura 1.7B). La menor acumulación de esta banda por el tratamiento con Cu²⁺ respecto al de cistamina probablemente refleja la modificación incompleta de la proteína (tal como se deduce del hecho de que en condiciones

similares, sólo se consigue una inactivación parcial de la Rubisco (133). La modificación oxidativa de la Rubisco mediada por radicales libres, generados por el Cu^{2+} en disolución, puede no restringirse sólo a los grupos tioles de la Rubisco (63), sino que podría afectar a una mayor variedad de residuos. Esta última posibilidad está apoyada por el hecho de que la adición simultánea de cisteamina 40mM no evita la formación de la banda II. Es decir, un gran exceso de grupos tioles externos respecto a los grupos tioles de la Rubisco (en el orden de micromolar) no consigue eliminar el efecto de los radicales libres generados por el Cu^{2+} en disolución ni revertir la modificación oxidativa inducida por el Cu^{2+} en la Rubisco.

En conjunto, estos resultados demuestran que el cambio en el patrón proteolítico no es el resultado de una derivatización concreta de las cisteínas sino que parece ser causado por una extensa variedad de modificaciones de grupos tioles o incluso por tratamientos que potencialmente oxidarían aminoácidos diferentes de la cisteína.

4. Delimitación de las zonas de corte accesibles a proteasas: *La proteólisis diferencial de la Rubisco oxidada es el resultado de un aumento de la accesibilidad de las proteasas a un lazo de 8 aminoácidos.*

La secuenciación N-terminal de los fragmentos derivados de la digestión con subtilisina de la Rubisco (oxidada) de *C. reinhardtii* (en el límite inferior de masa de cada banda) mostró que la banda II se genera por el corte entre Thr68 y Val69 de la subunidad grande (Figura 1.8B). La banda I proviene del corte tras la Lys18 (Figura 1.8A), tal como ya ha sido descrito en la digestión con tripsina de la Rubisco purificada de trigo (62). La proteólisis de la Rubisco reducida y oxidada con proteasas específicas de residuo (tripsina, quimotripsina y proteinasa V8) produjo en todos los casos un fragmento similar a la banda I, pero sólo la actuación de la quimotripsina sobre el enzima oxidado consiguió liberar un fragmento similar a la banda II (Figura 1.9). La tripsina cataliza la hidrólisis de proteínas en el grupo carbonilo de Arg y Lys, mientras que la quimotripsina corta preferencialmente enlaces peptídicos que implican Tyr, Phe y Trp, y la proteinasa V8 hidroliza enlaces en el lado carboxiterminal de Glu. La inspección de las dianas potenciales de estas proteasas sugiere que la banda I se produce por la eliminación del extremo N-terminal que se halla desestructurado hasta la Lys18. En esta zona (Figura 1.8A) se encuentran sitios de corte de la proteasa V8 (Glu 6), de tripsina (Lys 8, 14, 18) y de quimotripsina (Phe 17) que explicarían la generación de banda I, a partir tanto de la Rubisco reducida como de la Rubisco oxidada tras la incubación con cualquiera de estas proteasas (Figuras 1.9A, 1.9B, 1.9C). Ninguna ellas fue capaz de progresar más allá del límite de corte de la subtilisina desde el lado N-terminal hacia la región estructurada. Por otro lado, el incremento de la susceptibilidad proteolítica de la forma oxidada parece ser el resultado de un aumento en la accesibilidad de un lazo de 8 aminoácidos (desde la Ser61 hasta la Thr68)

localizado entre tramos de estructura secundaria que forman parte del dominio N-terminal de la Rubisco (Figura 1.8B). La accesibilidad de las proteasas a este lazo está delimitada por un elemento en α -hélice que termina en el Glu60 (donde la proteasa V8 fue incapaz de cortar, dado que no generó banda II, Figura 1.9C) y un tramo de hélice 3_{10} que comienza en la Val69 (residuo N-terminal de la banda II en el límite inferior de masa alcanzado por subtilisina). En este lazo no se encuentran sitios diana de la tripsina (que no originó banda II, (Figura 1.9A)) pero sí hay un posible sitio de corte para la quimotripsina (Trp 66), que generó la banda II a partir de la Rubisco oxidada (Figura 1.9B).

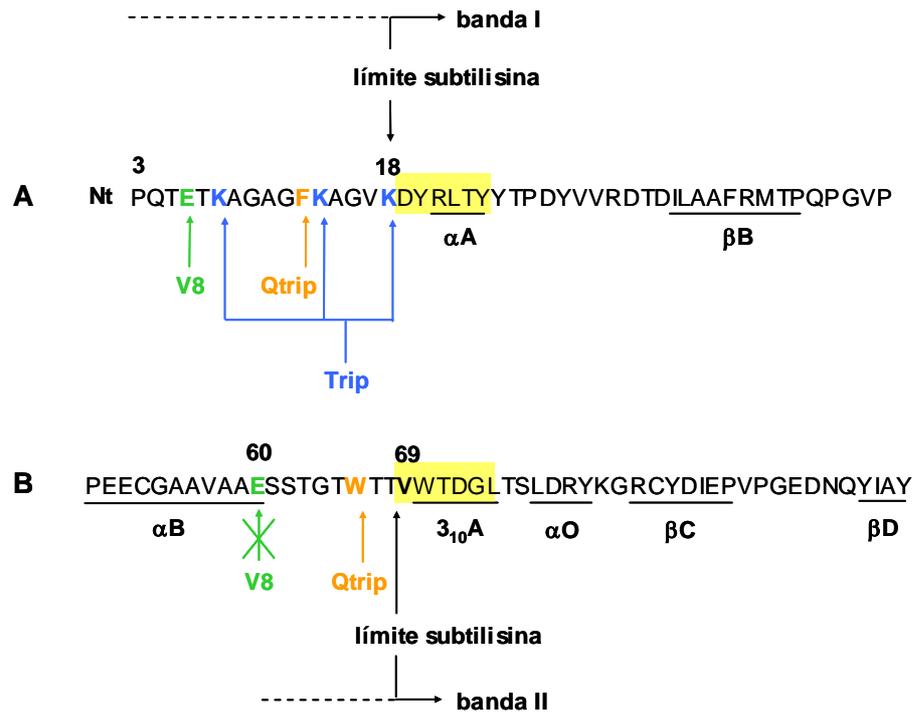


FIGURA 1.8: Secuencias parciales de la subunidad grande de la Rubisco de *C. reinhardtii* que muestran el extremo N-terminal de la banda I (A) y de la banda II (B) en el límite inferior de masa generado por la subtilisina. Las secuencias N-terminales determinadas para dichos fragmentos se señalan sobre fondo amarillo. Los elementos de estructura secundaria (tomados de (130)) están subrayados. Los presuntos sitios de corte (de acuerdo con la Figura 1.9) de la tripsina (Trip), quimotripsina (Qtrip) y proteasa V8 (V8), así como los límites de corte determinados para la subtilisina, se han indicado con flechas. Las secuencias sensibles a proteasas que originan la banda I y la banda II se han marcado con una línea horizontal a trazos. (A) Secuencia N-terminal de la subunidad grande madura (residuos 3-49). (B) Secuencia alrededor del sitio de corte para la banda II (residuos 50-100). El posible sitio de corte para la proteasa V8 en el Glu60 (donde no se observó corte, según la Figura 1.9C) está indicado por una flecha tachada.

Resultados I

La secuencia del lazo de la Ser61 a la Thr68, que no contiene cisteínas, y de las regiones adyacentes al mismo, está altamente conservada entre las Rubiscos eucariotas y se encuentra en el resto de especies ensayadas (Figura 1.6A).

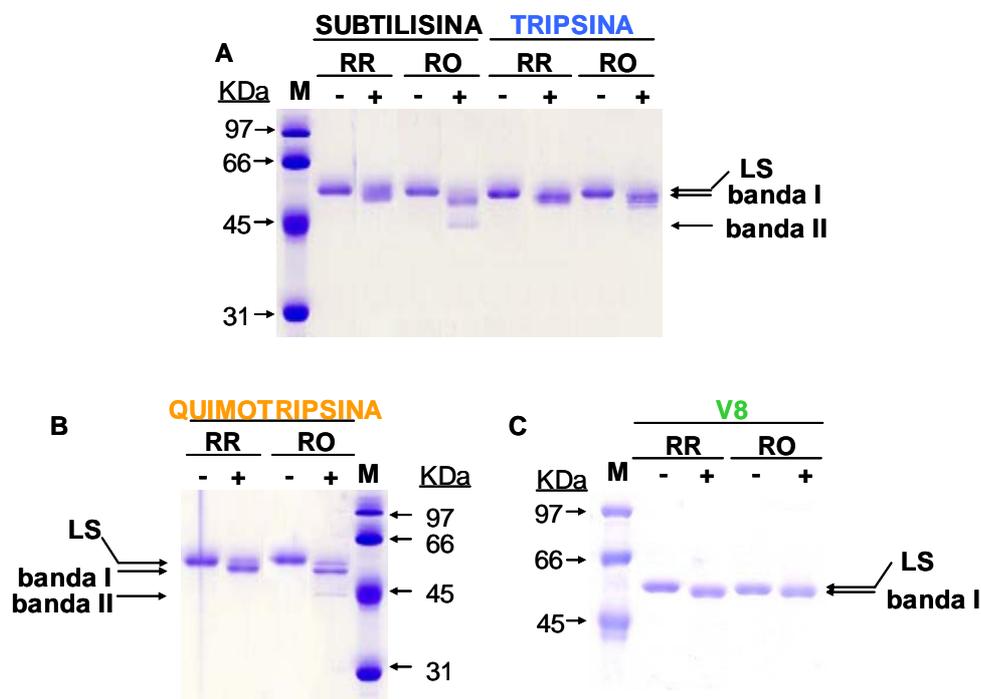


FIGURA 1.9: Proteólisis de la Rubisco reducida (RR) y oxidada (RO) de *C. reinhardtii* con proteasas específicas de residuo: tripsina (A), quimotripsina (B) y proteasa V8 (C). La proteólisis con subtilisina se ha incluido en (A) como referencia. La Rubisco purificada (0,1mg/ml en tampón de activación) se incubó a 30°C en presencia (+) o ausencia (-) de proteasa a 0,5 µg/ml (subtilisina, tripsina, quimotripsina) o 0,6µg/ml (V8) durante 40min (subtilisina, tripsina, quimotripsina) o 140 min (V8). Los productos de proteólisis se corrieron en SDS-PAGE junto con marcadores de peso molecular (M). Las posiciones de la subunidad grande intacta (LS) de la Rubisco, así como de los fragmentos de degradación banda I y banda II, se indican con flechas.

5. Estudio de la estabilidad estructural del holoenzima reducido y oxidado: *La oxidación de las cisteínas de la Rubisco disminuye la estabilidad del enzima.*

El incremento de accesibilidad de las proteasas al enzima oxidado puede ser resultado de un debilitamiento de la estructura de la Rubisco inducida por la oxidación de grupos tioles. Para investigar esta posibilidad, se incubaron preparaciones de Rubisco reducida y oxidada a diferentes temperaturas durante 12 minutos y se comprobó posteriormente la integridad del holoenzima mediante electroforesis no desnaturante en gradiente de poliacrilamida. Los geles de electroforesis mostraron que la Rubisco oxidada se desnaturizó completamente en

torno a 54°C en las condiciones experimentales utilizadas, mientras que la Rubisco reducida lo hizo a una temperatura unos 5°C superior (Figura 1.10A). Cabe destacar, sin embargo, que la Rubisco oxidada no mostró signos de termosensibilidad a 30°C, la temperatura a la que se efectuaron los ensayos de proteólisis.

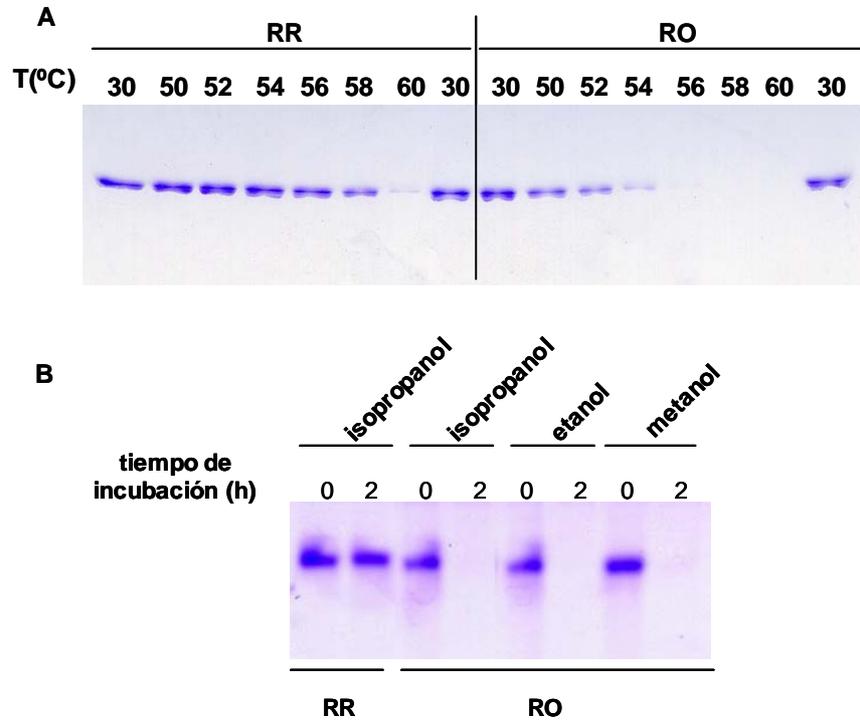


FIGURA 1.10: Estabilidad estructural del holoenzima de la Rubisco de *C. reinhardtii* reducida (RR) y oxidada (RO) determinada por electroforesis nativa en geles de poliacrilamida. (A) Las muestras de Rubisco purificada (0,13 mg/ml en tampón de activación) se incubaron a las temperaturas indicadas durante 12 min, se enfriaron en hielo durante 2 min y se corrieron en un gel de PAGE. (B) Las muestras de Rubisco purificada (0,13 mg/ml en tampón de activación + PMSF 2mM) se incubaron a 30°C durante los tiempos indicados con metanol, etanol o isopropanol al 10% (v/v) y se corrieron en un gel de PAGE al 7%.

La inestabilidad estructural de la Rubisco oxidada se manifestó también en su sensibilidad a efectos de disolvente, desensamblándose completamente tras 2 horas de incubación en un medio acuoso con un 10% de un alcohol de cadena corta (metanol, etanol, isopropanol), mientras que el holoenzima reducido no se vio afectado en las mismas condiciones (Figura 1.10B).

6. Estudio de los cambios en la estabilidad del holoenzima inducidos por el corte diferencial: *La proteólisis diferencial de la Rubisco oxidada induce el desensamblaje del holoenzima.*

Utilizando electroforesis nativa en geles en gradiente de poliacrilamida se pudo comprobar que la proteólisis de la Rubisco reducida y oxidada produjo una disminución progresiva del tamaño del holoenzima, alcanzando en ambos casos el mismo límite inferior de masa (Figura 1.11A). La pérdida del fragmento N-terminal desestructurado hasta la Lys 18 de las 8 subunidades grandes que componen el holoenzima podría explicar toda la reducción de masa observada. Ello sugiere que los sucesivos cortes proteolíticos en el lazo Ser61-Thr68 que experimenta la Rubisco oxidada no liberarían el fragmento N-terminal correspondiente hasta esta zona, sino que permanecería unido al hexadecámero hasta la proteólisis no restringida final. De hecho, al recuperar el holoenzima oxidado (tras varios tiempos de proteólisis con subtilisina) de las bandas electroforéticas del gel nativo en gradiente de poliacrilamida, desnaturalizarlo con SDS y correr las nuevas muestras en SDS-PAGE, se puso en evidencia que las subunidades grandes procesadas hasta banda II permanecen integradas en la estructura cuaternaria (Figura 1.11B). La pieza complementaria (desde el extremo N-terminal procesado hasta algún punto en el lazo Ser61-Thr68) es probablemente demasiado pequeña (menos de 8 KDa) para ser detectada como una banda en SDS-PAGE. Los datos de la estructura de la Rubisco de *C. reinhardtii* (130, 203) indican que esta región se encuentra plenamente integrada en la estructura del holoenzima (Figura 1.12) por lo que podría permanecer unida transitoriamente al core enzimático a pesar de haber perdido la conexión de enlaces peptídicos con el resto de la cadena de la subunidad grande (Figura 1.12A).

Por otro lado, se pudo observar en los geles no desnaturalizantes que la intensidad de la banda del holoenzima disminuía considerablemente con el tiempo de proteólisis de la Rubisco oxidada, mientras que la cantidad de Rubisco reducida apenas se vio afectada. Tal como se ha discutido antes, cabe esperar que la proteólisis no restringida, causante de esta disminución de la intensidad, tenga lugar sólo después del desensamblaje del holoenzima. Dado que la Rubisco oxidada no se desensambló a 30°C durante el tiempo del ensayo si no se sometía a proteólisis (ver carrera control en Figura 1.11A), se puede deducir que la disociación de subunidades debe estar promovida por los cortes proteolíticos. Además, el hecho de que la Rubisco reducida no se desensamblara incluso después de un procesamiento masivo a banda I (tras 100 minutos de proteólisis) sugiere que el desmantelamiento del holoenzima debe estar inducido específicamente por los cortes en el lazo Ser 61-Thr68, que son característicos de la Rubisco oxidada.

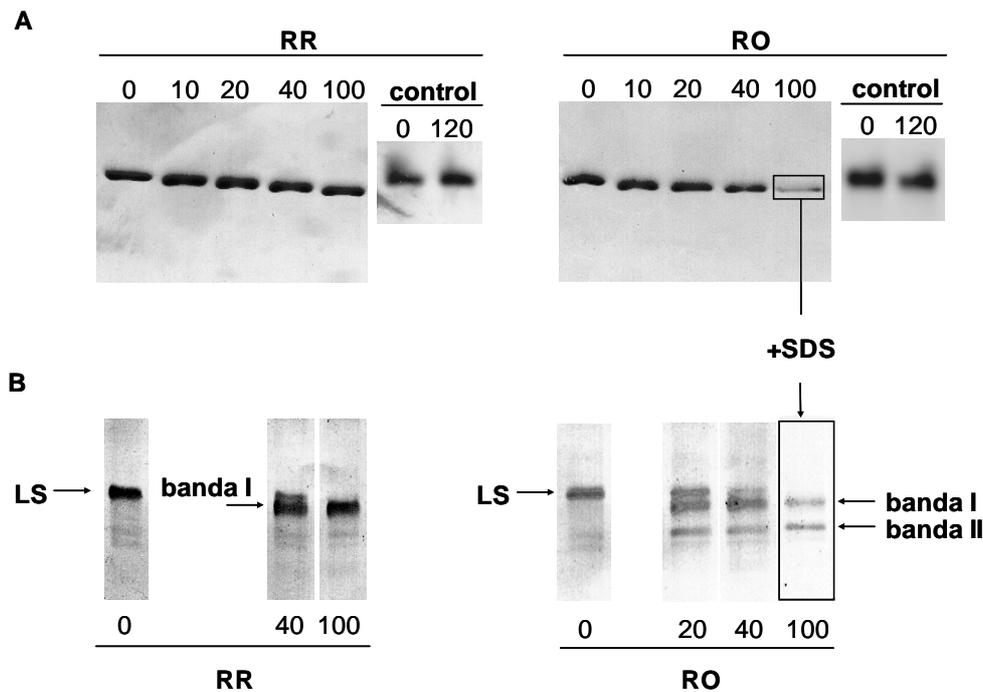


FIGURA 1.11: Proteólisis de la Rubisco de *C. reinhardtii* reducida (RR) y oxidada (RO) con subtilisina, seguida por PAGE (A) o por SDS-PAGE de los polipéptidos recuperados de las bandas del holoenzima obtenidas por PAGE (B). Distintas alícuotas de la Rubisco purificada (0,1 mg/ml en tampón de activación) se incubaron a 30°C con subtilisina (0,5 µg/ml), durante distintos tiempos y se corrieron en PAGE. Las bandas del holoenzima se cortaron del gel y se dejaron difundir los polipéptidos en tampón de carga con SDS. Los extractos obtenidos fueron sometidos a SDS-PAGE e inmunodetección. Los números indicados por encima (A) o por debajo (B) de cada carrera representan el tiempo de proteólisis en minutos. Los controles en (A) corresponden a la Rubisco incubada en las mismas condiciones sin subtilisina y corrida en PAGE al 7%.

7. Modelización del proceso proteolítico: *Un análisis cinético confirma que la proteólisis no restringida de la Rubisco depende de su procesamiento previo a banda II.*

Para caracterizar con mayor detalle la proteólisis de la Rubisco, se midieron las cantidades de subunidad grande (z) y de sus subproductos detectables, la banda I de 53 KDa (p_1) y la banda II de 47KDa (p_2), durante la degradación de la Rubisco por subtilisina, y se intentó ajustar los datos a un modelo cinético cuantitativo. Con esto, se pretendía reafirmar las conclusiones que se han esbozado hasta ahora integrándolas, junto con otros supuestos, en un mínimo de premisas matemáticas capaces de capturar los aspectos esenciales del proceso proteolítico ajustándose a los datos experimentales sin desviaciones sistemáticas.

Dado que la concentración de los enlaces que específicamente van a ser hidrolizados es relativamente baja, se supuso (tal como se suele hacer) que cada corte proteolítico debería seguir una cinética de primer orden. Bajo estas condiciones (concentración de sustrato mucho

Resultados I

más baja que la constante de Michaelis), la inhibición competitiva entre los diferentes sustratos proteolíticos sería despreciable y no es necesario considerarla. Las constantes aparentes de primer orden dependerían obviamente de la concentración de proteasa utilizada en el ensayo.

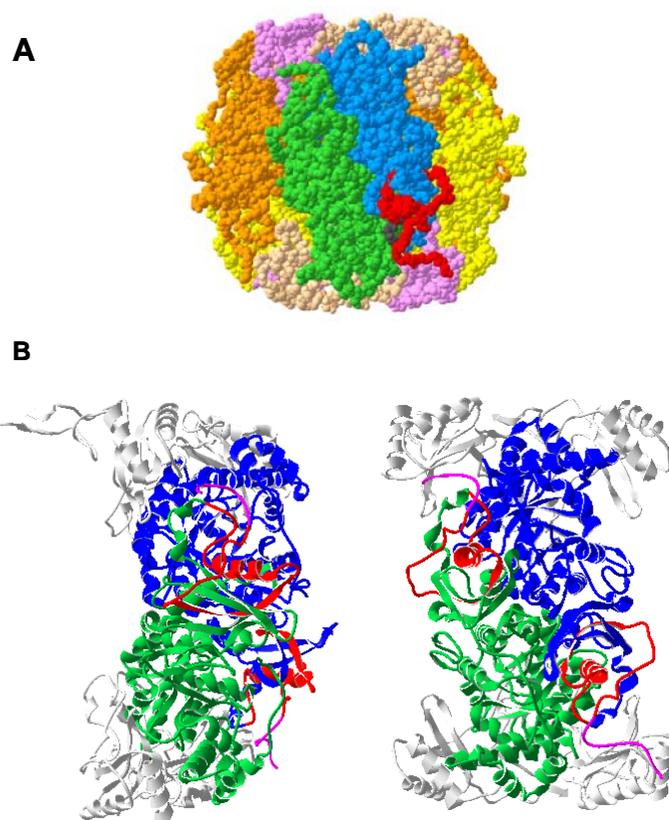


FIGURA 1.12: Localización estructural de la secuencia correspondiente a uno de los fragmentos de proteolisis de la Rubisco generado por el corte en el sitio II de la subtilisina, deducido como complementario de la banda II (desde el extremo N-terminal hasta el Glu 60). (A) Sobre el holoenzima, representado por la superficie de Van der Waals de sus aminoácidos, se indican en rojo los residuos correspondientes a este fragmento en una de las subunidades (en azul) que componen el dímero de subunidades grandes (verde/azul) que se observa frontalmente en la imagen. En negro se han marcado los residuos del lazo Ser61-Thr68 donde se produce el corte que genera la banda II. (B) Uno de los dímeros de subunidades grandes y cuatro subunidades pequeñas a su alrededor, visto desde dos perspectivas diferentes, representado esquemáticamente en diagrama de cintas que muestran los diferentes tramos de estructura secundaria. Se indica en rojo el fragmento complementario a la banda II y sobre él, en rosa, los residuos desde el extremo N-terminal hasta la Lys 18. La estructura de la Rubisco es la forma carbamilada y complejada con Mg^{2+} de *C. reinhardtii*, obtenida por (130) (número de acceso 1IR2 del Protein Data Bank).

Se llamó k_1 a la constante de primer orden para la rotura del fragmento N-terminal que produce la banda I y que actuaría sobre las subunidades intactas (es decir, z). El fragmento de 47 KDa (banda II en SDS-PAGE), que resulta del corte en el lazo Ser61-Thr68, puede provenir de la rotura de la subunidad grande intacta, o del procesado posterior de la banda I. Un ajuste tentativo de modelos alternativos a los datos experimentales sugirió de hecho que la banda II se genera por cualquiera de las dos vías. En principio, se asignaron constantes diferentes para el procesado directo de la subunidad grande intacta (k_2) y para la degradación de la banda I (k_2'). Además, la Rubisco sufre también degradación no restringida, probablemente como resultado del desensamblaje del holoenzima favorecido por el procesado previo de algunas subunidades a banda II. Este paso final de degradación afectaría tanto a la subunidad intacta (z) como a las procesadas (p_1 y p_2), dado que integran juntas las moléculas de holoenzima que se va a desensamblar, pero a una velocidad que dependerá de la cantidad relativa de p_2 . Por tanto, se supuso que esta degradación total sigue también una cinética de primer orden con una constante (k_3) modulada por un factor (Θ , con valores entre 0 y 1) que sería una función indeterminada pero monotónicamente creciente de f , la fracción promedio de subunidades procesadas a banda II dentro de una molécula [$f = p_2 / (z + p_1 + p_2)$]. Todo lo anterior se representa esquemáticamente en la Figura 1.13 y se resume en las siguientes ecuaciones:

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

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

y

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

Se probaron diferentes funciones de f para el factor Θ . Aunque la igualdad $\Theta = f$ dio ya un ajuste razonable a los puntos experimentales, se consiguió una considerable mejoría con $\Theta = f^2$. Dado que la probabilidad de encontrar ambos polipéptidos cortados en el lazo Ser61-Thr68 en un par concreto de subunidades grandes debería ser proporcional a f^2 , se interpretó este resultado como que el desensamblaje podría ser dependiente del corte de las dos subunidades que componen cualquiera de los 4 dímeros que integran el holoenzima. De forma tentativa se introdujo la inactivación de la proteasa (por autocorte) en el modelo, haciendo que las constantes de primer orden decayeran con el tiempo de acuerdo con ecuaciones auxiliares. Sin embargo, esta suposición adicional no mejoró significativamente el ajuste, dando siempre valores bajos para el para la velocidad de decaimiento proteolítico. Así pues, por simplicidad se consideró que la actividad de la proteasa permanece estable.

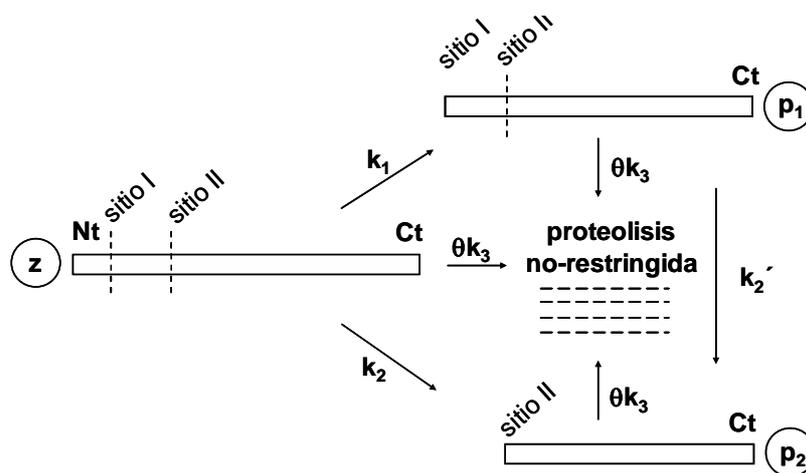


FIGURA 1.13: Representación esquemática del procesamiento proteolítico de la subunidad grande de la Rubisco por subtilisina, de acuerdo con el modelo cinético descrito por las ecuaciones 1-3. Las flechas (con las constantes cinéticas asociadas) indican las transformaciones postuladas entre la subunidad 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 degradación no-restringida (representados por pequeños trazos horizontales). Nt y Ct marcan el extremo N-terminal y C-terminal de la subunidad grande respectivamente. Los sitios I y II son los sitios de procesamiento para la generación de las bandas I y II, respectivamente.

El sistema de ecuaciones diferenciales (ecuaciones 1-3 con $\theta = f^2$) 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 dio un ajuste notablemente bueno, libre de desviaciones sistemáticas tanto para la Rubisco reducida como para la Rubisco oxidada (Figura 1.14) y con un coeficiente de determinación global mayor de 0.95 (es decir, el modelo explica más del 95% de la variación observada). La divergencia de los valores experimentales respecto a lo predichos por el modelo fue plenamente compatible con el error experimental (χ^2 de 17.2 y 23.2 respectivamente para la Rubisco reducida y oxidada, con 38 grados de libertad). La introducción de hipótesis alternativas, como cortes en los sitios I y II estrictamente secuenciales (Figura 1.15A) o alternativos (Figura 1.15B), una única constante para la generación de banda II (Figura 1.15C), o la supresión del factor θ (Figura 1.15D), produjo indefectiblemente un peor ajuste con una desviación sistemática de los puntos experimentales en todos los casos. En la Figura 1.15E se muestra también el ajuste obtenido cuando se supone que $\theta = f$. En este caso, el modelo predice una pendiente de decaimiento de banda II a tiempos largos ligeramente menor que la que se observa experimentalmente.

Los valores estimados de las constantes para la Rubisco reducida y oxidada se muestran en la Tabla 1.1. Los valores de k_1 para el enzima reducido y oxidado no fueron

significativamente diferentes, lo que indica que el estado redox no tiene un efecto sustancial en la susceptibilidad del corte N-terminal.

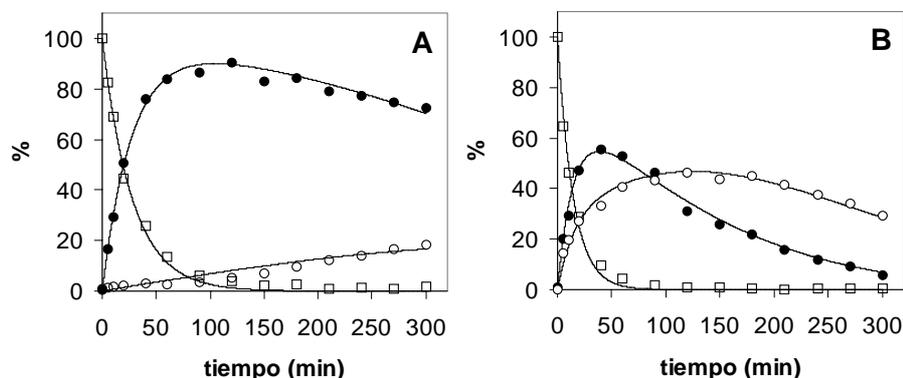


FIGURA 1.14: Evolución temporal de la subunidad grande intacta (\square), de la banda I (\bullet) y de la banda II (\circ) durante la proteólisis con subtilisina de la Rubisco de *C. reinhardtii* reducida (A) y oxidada (B). Las muestras de Rubisco purificada (0,1 mg/ml en tampón de activación) se incubaron con subtilisina (0,5 μ g/ml). Tras detener las mezclas de la reacción a diferentes tiempos (hasta 300 min), 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 Coomassie. 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 según el modelo descrito por las ecuaciones 1-3 (con $\theta=f^2$) después de ajustar los valores de las constantes cinéticas desconocidas minimizando la suma de las desviaciones al cuadrado.

Constante cinética	Rubisco reducida	Rubisco oxidada
k1	0,0358 \pm 0,0014	0,047 \pm 0,004
k2	0,0008 \pm 0,0006	0,022 \pm 0,003
k2'	0,00072 \pm 0,00012	0,0044 \pm 0,0003
k3	0,029 \pm 0,014	0,0092 \pm 0,0003

TABLA 1.1: Valores estimados para las constantes cinéticas de primer orden del modelo cinético de proteólisis de la Rubisco. 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 min^{-1} . Los valores de las constantes correspondientes a la Rubisco oxidada que son significativamente ($P < 0.01$) diferentes de las del enzima reducido se indican en negrita.

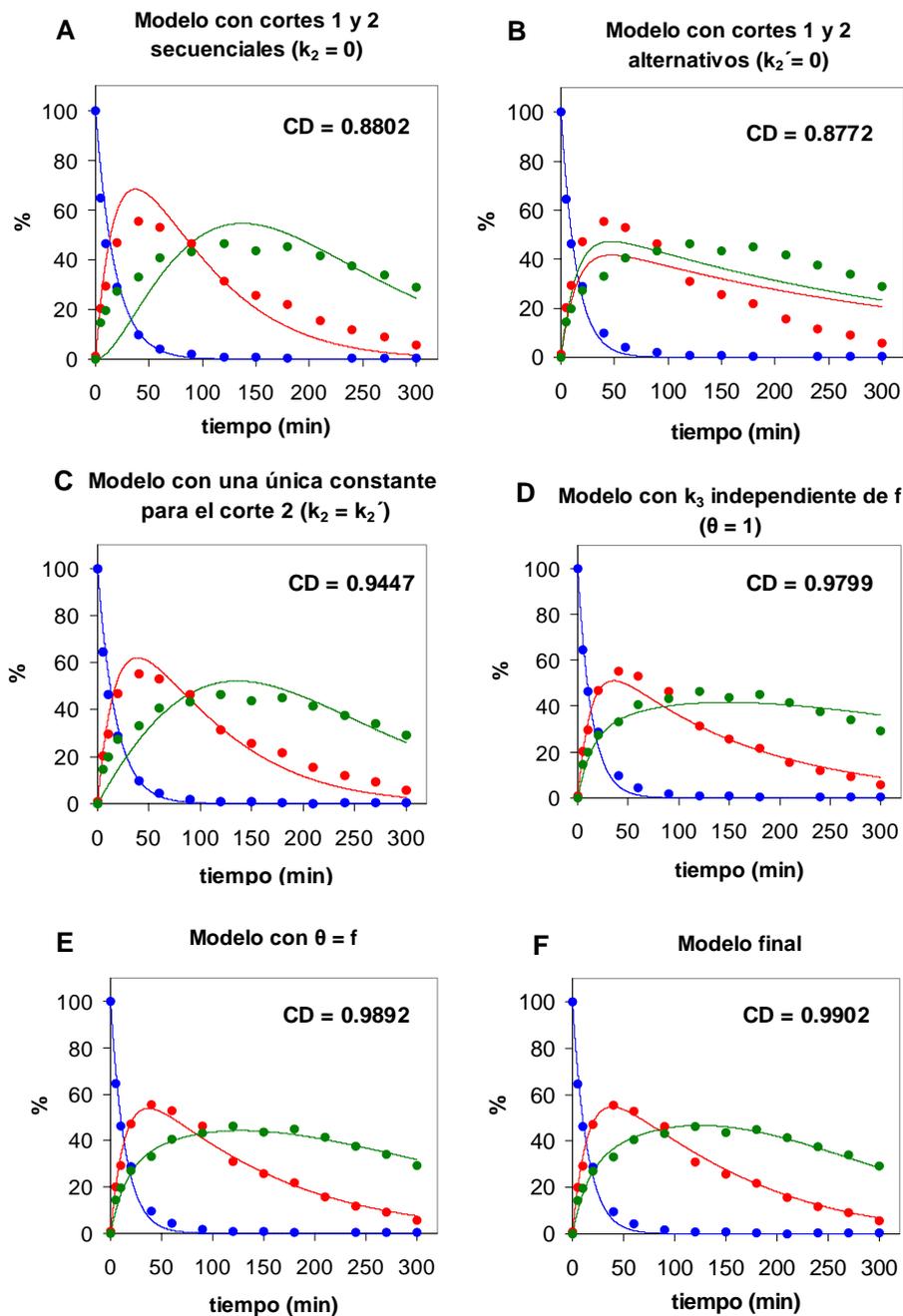


FIGURA 1.15: Diferentes ajustes a los datos experimentales de modelos alternativos al modelo de proteolisis finalmente propuesto (ecuaciones 1-3 con $\theta=f^2$). Los datos experimentales son los mismos que los de la Figura 1.14B. En cada uno de los modelos representados se ha variado alguno de los supuestos que se tienen en cuenta en el modelo final (incluido en (F) para facilitar la comparación con el resto). En (A) el corte en el sitio II sólo es posible después de que se haya dado el corte en el sitio I; en (B) el corte en el sitio II sólo se puede dar sobre la subunidad grande intacta; en (C) la constante cinética del corte en el sitio II es independiente de que la subunidad grande se haya procesado previamente en el sitio I; en (D) la constante k_3 no depende de la fracción de moléculas procesadas en el sitio II; en (E) la dependencia de θ de f es una simple igualdad. Sobre cada gráfica se indica el valor del coeficiente de determinación (CD) correspondiente a cada ajuste.

En contraste, los valores de k_2' y, especialmente, de k_2 fueron considerablemente mayores para la Rubisco oxidada, como era de esperar de la diferencia en el patrón proteolítico observado en las Figuras 1.1 y 1.2. El hecho de que k_2 sea considerablemente mayor que k_2' en ambos casos indica que la eliminación previa del fragmento N-terminal impone algún tipo de restricción al corte subsiguiente en el lazo Ser61-Thr68.

La constante k_3 representa la velocidad de proteólisis no restringida que se observaría si todas las subunidades grandes se cortaran previamente en el lazo Ser61-Thr68. Dado que la digestión de las subunidades debe ser muy rápida y eficiente tras su disociación del holoenzima, es probable que la constante k_3 sea de hecho una medida del paso limitante de desensamblaje. Aunque k_3 no pudo determinarse con precisión para la Rubisco reducida (debido a la baja proteólisis no-restringida que se observa en el estado reducido), no parece ser menor que el valor de k_3 para el enzima oxidado. Esto indica que el debilitamiento estructural de la Rubisco oxidada no juega un papel significativamente importante en el desmantelamiento del holoenzima a temperaturas fisiológicas. Por tanto, se puede concluir que el paso que es realmente crítico para el desensamblaje (y la posterior proteólisis no-restringida) es el corte en el lazo Ser61-Thr68.

DISCUSIÓN

La modificación oxidativa es un mecanismo habitual para la activación del recambio de proteínas en la célula (195). En el caso particular de la Rubisco, se ha observado que la oxidación de cisteínas a disulfuros incrementa la sensibilidad del enzima a las proteasas (55, 133). Parece probable que este cambio en la susceptibilización proteolítica de la Rubisco se deba a modificaciones estructurales promovidas por la oxidación.

En el presente trabajo se han utilizado proteasas de baja especificidad de secuencia como sondas estructurales para explorar los cambios conformacionales inducidos por la oxidación de cisteínas y, consecuentemente, identificar secuencias diana para la degradación de la Rubisco, que podrían ser utilizadas también *in vivo*. Además, se han estudiado las consecuencias del corte proteolítico en secuencias concretas para el desensamblaje del holoenzima y la degradación completa de las subunidades a aminoácidos. Todos estos aspectos se han integrado en un modelo matemático que se ajusta satisfactoriamente a los datos experimentales y proporciona datos cuantitativos de las constantes cinéticas que caracterizan los diferentes pasos del mecanismo proteolítico propuesto.

Se han identificado dos regiones en la subunidad grande de la Rubisco susceptibles a la hidrólisis por proteasas de baja especificidad. Una de ellas, localizada en el extremo N-terminal desestructurado (hasta la Lys 18), ya había sido descrita en estudios previos al someter la Rubisco a proteólisis con tripsina (62). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el corte proteolítico en esta zona no depende del estado redox de las cisteínas de la Rubisco. Así, los valores de k_1 para el enzima reducido y oxidado no son significativamente diferentes (Tabla 1.1). 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 (Figura 1.4). Las constantes características de este corte (k_2 y k_2') son alrededor de un orden de magnitud inferior para el enzima reducido (Tabla 1.1).

El aumento en la velocidad de procesamiento sobre el lazo Ser61-Thr68 no depende de una modificación oxidativa particular de la Rubisco, sino que diferentes modificaciones de cisteínas (por disulfuros, agentes alquilantes o arsenito) e incluso tratamientos oxidativos menos específicos, como el Cu^{2+} , inducen el mismo cambio cualitativo en el patrón proteolítico (Figura 1.7). Con el arsenito, que reacciona únicamente con parejas de cisteínas vecinas, y con el Cu^{2+} , se detecta una menor acumulación del fragmento diferencial respecto al resto de tratamientos (cistamina, iodoacético, iodoacetamida), que pueden modificar de forma más extensiva las cisteínas de la Rubisco. Esto podría reflejar cierta cooperación, o incluso una

posible redundancia, entre las modificaciones de diferentes residuos en cuanto a la extensión del cambio conformacional inducido por oxidación.

El mismo cambio en el patrón proteolítico dependiente del estado redox del enzima se ha observado en Rubiscos de diferentes especies que muestran divergencias de secuencia (Figuras 1.5 y 1.6). 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. Estos residuos son las cisteínas 84, 172, 192, 247, 284, 427 y 459 de la subunidad grande y la cisteína 83 de la subunidad pequeña (de acuerdo con la numeración de *C. reinhardtii*). De entre ellas, las cisteínas 84, 172 y 459 de la subunidad grande se localizan a menos de 10Å del lazo Ser61 - Thr68. En un segundo plano, las cisteínas 192 (a una distancia de la cisteína 172 compatible con la formación de un puente disulfuro) y 427 de la subunidad grande y la cisteína 83 de la subunidad pequeña se encuentran a menos de 20Å de este lazo. En general, las cisteínas de la Rubisco se distribuyen de forma homogénea sobre la estructura de cada dímero (Figura 1.16) formando una compleja red de posibles sensores redox que podrían transmitir cambios conformacionales desde unas regiones de la proteína a otras, a través de distancias relativamente grandes. Así, la sustitución de uno de estos residuos de cisteína (Cys 172 de la subunidad grande) por serina altera la susceptibilidad proteolítica de la Rubisco *in vitro* e *in vivo* (118, 133).

De una forma más global, los cambios conformacionales que induce la oxidación de cisteínas en la Rubisco, se ponen de manifiesto en una disminución de la termoestabilidad del holoenzima (Figura 1.10A) y en una mayor sensibilidad a efectos de disolvente (Figura 1.10B). Este debilitamiento estructural puede estar relacionado con la mayor exposición del lazo Ser61-Thr68 a la acción de proteasas, pero probablemente refleja también cambios en regiones diferentes que no son detectables por la sonda proteolítica. Se ha sugerido que la oxidación de residuos de cisteína puede desencadenar por sí misma la disociación en subunidades del holoenzima (118). Esta conclusión se basó en experimentos en los que se utilizó DTNB como agente oxidante para la modificación de cisteínas. Es probable que la disociación de las subunidades sea en este caso el resultado de impedimentos estéricos impuestos por los disulfuros mixtos con el voluminoso grupo tionitrobenzoato. De hecho, está bien establecido el hecho de que la derivatización de las cisteínas de la Rubisco con benzoatos (por ejemplo, la reacción con p-cloromercuribenzoato) disocia el holoenzima en subunidades (198). A pesar de todo ello, hay que destacar que la oxidación de la Rubisco con cistamina no indujo la pérdida de la estructura cuaternaria a 30°C, la temperatura a la que se han llevado a cabo los ensayos de proteolisis.

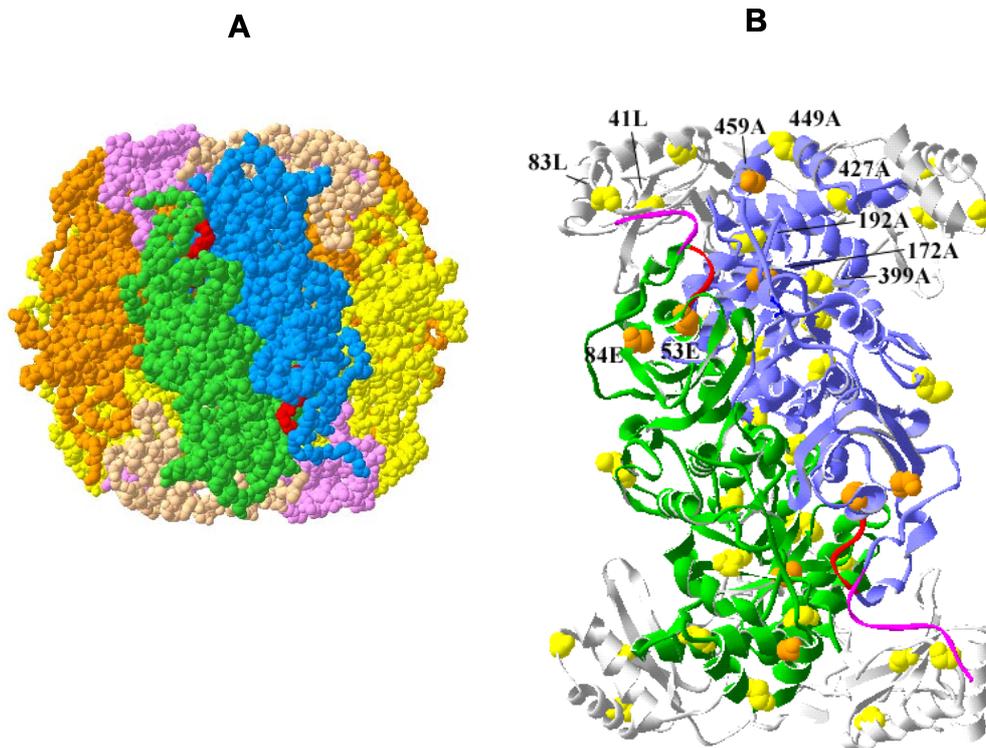


FIGURA 1.16: Localización estructural del lazo Ser 61-Thr68 en el holoenzima (A) y en un dímero de subunidades grandes (B) de la Rubisco de *C. reinhardtii*. La estructura de la Rubisco es la obtenida por (130) (número de acceso 1IR2 del Protein Data Bank) para la forma activa (carbamilada y complejada con Mg^{2+}). (A) El holoenzima de la Rubisco se representa por las superficies de Van der Waals de sus aminoácidos. Los residuos del lazo Ser61-Thr68 se señalan en rojo en las dos subunidades grandes (en azul y verde) que componen el dímero que se observa frontalmente en la imagen. (B) Se muestra el dímero compuesto por las subunidades A (en azul) y E (en verde) de acuerdo con la nomenclatura utilizada en el PDB, y cuatro subunidades pequeñas a su alrededor (llamadas I, L, M, N en el PDB, todas en gris). El fragmento N-terminal hasta la Lys 18 (liberado tras el corte proteolítico en el el sitio I) está destacado en rosa, y el lazo Ser61-Thr 68, en rojo. Los residuos de cisteína están indicados por sus superficies de Van der Waals, en naranja (aquellos a una distancia igual o menor de 10Å del lazo) o amarillo (aquellos alejados a más de 10Å del lazo). La localización específica de aquellos residuos de cisteína a menos de 20Å del lazo se ha indicado por el número del residuo y una letra que indica la subunidad a la que pertenecen.

Al estudiar la estabilidad del holoenzima tras el corte proteolítico se ha observado que el procesamiento del extremo N-terminal produce un núcleo resistente a una degradación posterior, tal como había sido descrito para la Rubisco de trigo (reducida) tras el corte triptico hasta la Lys 18 (62). Esta observación está además apoyada por los datos cristalográficos (130) que muestran que esta región está ampliamente desestructurada y tiene una movilidad (factor B) considerablemente alta (de hecho, sólo se consigue fijar las posiciones de los residuos a partir de la Lys8). Por el contrario, el procesamiento en el lazo Ser61 – Thr68 induce el desmantelamiento del holoenzima y, por tanto, la proteólisis total de las subunidades

liberadas. El análisis matemático realizado sobre los datos de la cinética de proteólisis de la Rubisco indica que la constante que dirige la proteólisis no restringida de la Rubisco (k_3) está modulada en todo momento por un factor Θ que depende de la fracción de subunidades grandes que han sido procesadas en el lazo Ser 61-Thr68 (f). Cuando este factor se elimina, la mejor aproximación del modelo resultante presenta desviaciones sistemáticas de los datos experimentales (Figura 1.15D). Por otro lado, la dependencia cuadrática de Θ respecto a f sugiere que el detonador del proceso pueda ser la coincidencia de cortes en un par dado de subunidades grandes. Parece plausible que esas dos subunidades sean aquellas que integran cualquiera de los cuatro dímeros que componen el núcleo holoenzimático en posiciones equivalentes. Esta conjetura está apoyada por la localización estructural del lazo Ser61 – Thr68 en la interfase entre las dos subunidades grandes que componen un dímero (Figura 1.16), de forma que una doble ruptura en esta zona de contacto intradimérico podría ser el desencadenante del proceso de desensamblaje del holoenzima. Los resultados obtenidos indican que los fragmentos generados por el corte en el lazo Ser61-Thr68 permanecen unidos al core holoenzimático hasta su desensamblaje (Figura 1.11). Entre estos fragmentos, el más pequeño (desde el extremo N-terminal -procesado o no en el sitio I- hasta algún punto en el lazo Ser 61-Thr68) está plenamente integrado en la estructura del dímero (Figura 1.12) por lo que la liberación espontánea de alguna de estas piezas provocaría muy probablemente el desmantelamiento de la estructura cuaternaria.

La diferencia entre los valores k_2 y k_2' (Tabla 1.1) indica que la eliminación del extremo N-terminal causa un cambio conformacional en la subunidad grande que dificulta el posterior procesamiento en el lazo Ser61-Thr68. Ello sugiere que, a pesar de plegarse de forma aparentemente desestructurada, el fragmento N-terminal de la subunidad grande ejerce una notable influencia sobre la conformación de la Rubisco. El hecho de que la eliminación de este fragmento mediante digestión triptica provoque la pérdida total de actividad enzimática (62), corrobora esta conjetura. Desde el punto de vista estructural, el extremo N-terminal se encuentra próximo al lazo Ser61-Thr68 en el enzima reducido (Figura 1.16B), por lo que la transmisión de cambios conformacionales entre estas dos regiones puede ser relativamente sencilla. El procesamiento proteolítico del extremo N-terminal de la subunidad grande es un evento de aparente trascendencia en la degradación de la Rubisco *in vitro*, tanto por la frecuencia con que se da (k_1 es mayor que las otras constantes proteolíticas, Tabla 1.1) como por su efecto de pérdida de función (62). Sin embargo, el posible papel fisiológico de este corte *in vivo* es incierto, ya que se ha demostrado que la Rubisco está protegida de éste por la ocupación del centro activo por el sustrato (27, 72, 137), por la unión de inhibidores naturales (93), y por modificaciones postraduccionales (en particular, la trimetilación de la Lys 14 observada en algunas especies) (76). En cualquier caso, el aprovechamiento de la Rubisco

como fuente potencial de nitrógeno y azufre, requiere una degradación exhaustiva del enzima a aminoácidos, más allá de la simple eliminación del extremo N-terminal, y en este sentido, son las constantes k_2 , k_2' y k_3 las que asumen una mayor relevancia.

La susceptibilización proteolítica que sufre la Rubisco debida a la oxidación de sus cisteínas ha sido repetidamente mencionada como un desencadenante muy plausible de la degradación del enzima durante procesos de senescencia o estrés *in vivo* (50, 56, 118, 133, 147). En el presente trabajo se desvelan los detalles moleculares del mecanismo de regulación redox de la proteólisis de la Rubisco *in vitro*. La implicación de este mecanismo en la degradación de la Rubisco *in vivo* puede ser difícil de establecer de forma conclusiva, ya que la alta eficiencia de la maquinaria proteolítica que opera en estas condiciones consigue habitualmente una degradación rápida y exhaustiva de la Rubisco, sin acumulación de fragmentos intermediarios de proteólisis. Los datos de la bibliografía a este respecto, tal como se ha discutido en la introducción (apartado 4.4), apuntan a multitud de posibles secuencias diana y por tanto, mecanismos de proteólisis diferentes, dependiendo de la especie utilizada y las condiciones en las que se estudia la degradación. A pesar de todo, se dispone de evidencias indirectas que indican que este proceso de sensibilización proteolítica a través de la oxidación de cisteínas pudiera ser fisiológicamente activo. En primer lugar, se ha demostrado que durante el envejecimiento y en diferentes situaciones de estrés, existen las condiciones redox necesarias para oxidar residuos de cisteína de la Rubisco (48, 56, 125). En segundo lugar, la sustitución dirigida de un único residuo conservado de cisteína (Cys 172) retrasa el recambio de la Rubisco *in vivo* en mutantes de *C. reinhardtii* (133) y de *Synechocystis* (118) sometidos a diferentes condiciones de estrés. Por tanto, al menos este residuo de cisteína debe jugar un papel en la regulación fisiológica del recambio de la Rubisco. En tercer lugar, en experimentos de degradación de la Rubisco con lisados vacuolares de hojas senescentes de judía se ha conseguido identificar un fragmento originado por el corte en el lado N-terminal de la Val69 (es decir, un fragmento homólogo a la banda II) (222). Esto pone en evidencia que los tejidos senescentes poseen la maquinaria endógena necesaria para procesar específicamente la Rubisco en el lazo Ser61-Thr68. En conclusión, aunque pueden existir diferentes rutas proteolíticas alternativas para la degradación de la Rubisco, las evidencias de las que se dispone apoyan la visión de que la proteólisis de la Rubisco desencadenada por la oxidación de cisteínas y mediada por el corte en el lazo Ser61-Thr68 puede representar una contribución significativa al recambio de la Rubisco *in vivo* durante los procesos de senescencia natural o inducida por estrés.

CAPÍTULO II

**Obtención de mutantes de Rubisco por
sustitución de residuos conservados de
cisteína**

RESULTADOS

1. Diseño de los oligonucleótidos para la mutagénesis dirigida de *rbcL* y *rbcS*.

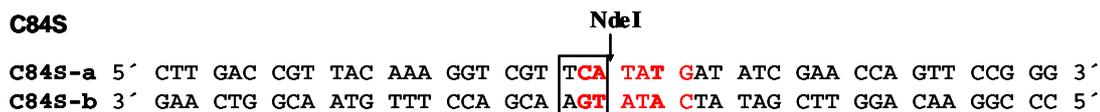
Para cada mutación se sintetizó una pareja de oligonucleótidos complementaria de la región donde se pretendía introducir el cambio. La mutación se situó en la zona central de cada oligonucleótido, con unas 10-15 bases complementarias a la secuencia original a cada lado de la misma. Los oligonucleótidos tenían un contenido de GC superior al 40% y una temperatura de fusión superior a 78°C (Tabla 2.1). Las sustituciones se escogieron de manera que el cambio introdujera o suprimiera un sitio de restricción. Se procuró además, que el codón de serina que sustituye al de cisteína no tuviera una baja frecuencia de uso en *C. reinhardtii*. En el gen *rbcL* los codones TCA y TCT, con frecuencias de uso del 53% y del 33% respectivamente, se prefieren a AGT y AGC (con una frecuencia del 7%), mientras que TCC y TCG son muy poco frecuentes en el genoma cloroplástico y no se utilizan en *rbcL* (66). Por otro lado, en el gen *rbcS1* se prefiere el codón TCC (con una frecuencia del 64%) a AGC (18%), TCT (9%) y TCG (9%) siendo TCA y TGT muy poco frecuentes en el DNA nuclear y no utilizados en *rbcS1*. En la Figura 2.1 se recogen las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para cada una de las diferentes mutaciones que transforman un codón cisteína en un codón serina, junto con los cambios en los sitios de restricción del DNA respecto a la secuencia original.

Subunidad	Mutante	Tm (°C)	N	%GC	%m
LS	C84S	79,9	47	46,81	6,39
	C247S	78,2	36	44,44	2,78
	C284S	79,3	44	43,18	4,54
	C427S	79,1	33	51,52	3,03
	C449S	80,2	42	47,62	4,76
	C459S	78,0	34	47,06	2,94
SS	C41S	81,1	34	61,76	5,88
	C83S	81,6	27	70,37	3,70

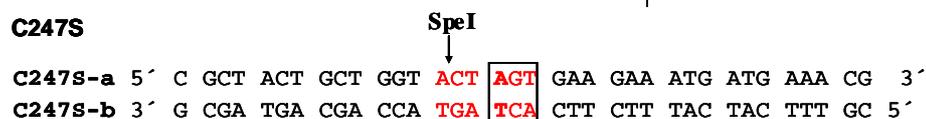
TABLA 2.1. Características de los oligonucleótidos diseñados para la mutagénesis dirigida de las cisteínas conservadas de la subunidad grande (LS) y de la subunidad pequeña (SS). Se indica la longitud (N) en número de nucleótidos, el contenido porcentual en guaninas y citosinas (%GC), y el porcentaje de bases que no hibridan con el DNA molde parental (%m). A partir de estos datos se ha calculado la temperatura de fusión de los oligonucleótidos utilizando la fórmula $T_m = 81.5 + 0.41 \cdot (\%GC) - 675/N - \%m$.

A) Subunidad grande

C84S



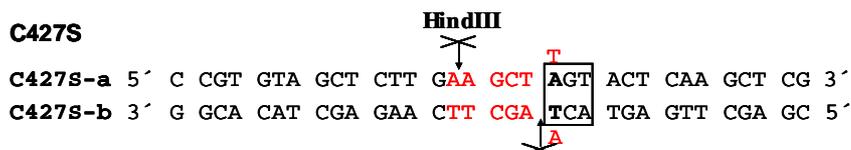
C247S



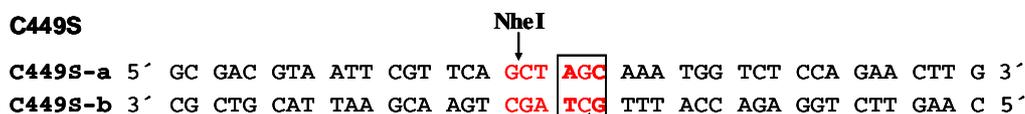
C284S



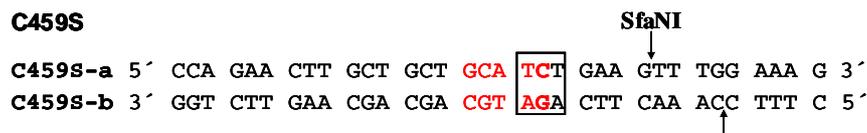
C427S



C449S

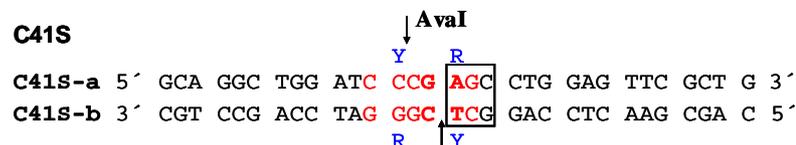


C459S



B) Subunidad pequeña

C41S



C83S

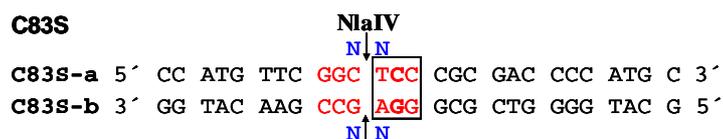


FIGURA 2.1. Secuencias de las parejas de oligonucleótidos diseñados para la mutagénesis dirigida de los residuos de cisteína de la subunidad grande (A) y de la subunidad pequeña (B). El codón correspondiente al residuo de serina que sustituye al de cisteína se halla encuadrado y las mutaciones introducidas respecto a la secuencia original se indican en negrita. Para cada pareja de oligonucleótidos se especifica el enzima de restricción característica. Se muestra, en rojo, la secuencia reconocida por el enzima, superimponiendo las posiciones que no coinciden con la secuencia del oligonucleótido. En azul se señalan las posiciones de reconocimiento ambiguas. Los sitios de corte del enzima introducidos por la mutación se indican por una flecha, y los sitios de corte que desaparecen por una flecha tachada.

Para introducir un sitio de restricción en el caso de los mutantes C84S de la subunidad grande y C41S de la subunidad pequeña, se realizó una mutación adicional en el triplete contiguo (Figura 2.1) que no cambia el aminoácido codificado (Tyr y Pro respectivamente) ni introduce un codón de baja frecuencia en el genoma (cloroplástico o nuclear) correspondiente.

2. Transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii*.

Los plásmidos mutados pC84S, pC247S, pC284S, pC427S, pC449S, pC459S y pC449S/C459S, conteniendo el gen *rbcl* con las mutaciones indicadas, se utilizaron para la transformación biolística del cloroplasto de un mutante no fotosintético (18-7G o 25-B1) de *C. reinhardtii*.

El número de colonias recuperadas en medio mínimo varió entre 1 y 35. Después de aislar el DNA de estas colonias, se amplificó el gen *rbcl* por PCR y se comprobó la presencia de la mutación por análisis de restricción, comparando el tamaño de los fragmentos obtenidos con el de los esperados (Tabla 2.2). De todas las transformaciones probadas se consiguió aislar al menos una colonia que contenía la mutación deseada. Dichas colonias se hallaron en un porcentaje mayor del 30% respecto al total de colonias analizadas. En la Figura 2.2 se muestra el análisis de restricción de los mutantes seleccionados, obtenido a partir de la 1ª ronda (Figura 2.2B, 2.2C y 2.2D), la 2ª ronda (Figura 2.2A) o la 3ª ronda (Figuras 2.2E y 2.2F) de selección de transformantes.

El número de copias del genoma cloroplástico de *C. reinhardtii* se encuentra en el orden de 80 (66) y, a pesar de que el tratamiento con fluordesoxiuridina previo a la transformación biolística reduce la ploidía del cloroplasto (218), existe la posibilidad de que no todas las copias de *rbcl* de los transformantes recuperados contengan la mutación introducida. La heteroplasmicidad puede deberse a la presencia de copias de *rbcl* con la mutación original del organismo receptor de la transformación, o de copias de *rbcl* silvestre originadas por recombinación homóloga entre las posiciones mutadas del gen *rbcl* introducido y del gen *rbcl* del organismo receptor. En los transformantes que provenían del mutante 25-B1 (C247S, C284S, C427S), la presencia o ausencia de la mutación original (una inserción de 0.48Kb en el sitio *Pst* I de *rbcl*) (140), se comprobó directamente a partir del tamaño del producto de PCR. En ninguno de los transformantes analizados se detectó el fragmento de PCR correspondiente al mutante receptor de la transformación. En las colonias recuperadas en medio mínimo después de la transformación, se observó generalmente un alto grado de homoplasmicidad, bien referido al *rbcl* silvestre (revertientes de la transformación) o bien, al *rbcl* con la mutación deseada. En la Figura 2.2B se muestra, como ejemplo, la digestión del producto de PCR de 2 colonias rechazadas (1 y 2) de la transformación con pC449S/C459S, junto con la cepa seleccionada. Uno de estos revertientes, proveniente de la transformación con el

Resultados II

plásmido pC459S (REV en la Figura 2.2A), y obtenido probablemente como resultado de la recombinación homóloga entre el codón 66 de *rbcl* de 18-7G y el codón 459 de *rbcl* C459S, se seleccionó para posteriores experimentos como control representativo de una cepa con el gen *rbcl* silvestre y el fondo genético de 18-7G.

	Mutación	Cebadores utilizados	Enzima utilizado	Fragmentos esperados (kb)	
				secuencia silvestre	secuencia mutada
LS	C449S	fwd1 rev16	NheI	1.70	1.29 0.41
	C459S	fwd1 rev16	SfaNI	1.70	1.33 0.38
	C84S	fwd15 rev16	Nde I	1.91	1.50 0.41
	C247S	fwd15 rev16	Spe I	1.91	1.02 0.89
	C284S	fwd1 rev8	PmlI	1.44	0.80 0.64
	C427S	fwd1 rev8	HindIII	0.89 0.33 0.22	1.11 0.33
SS	C41S	sfwd srev	AvaI	1.30	0.73 0.57
	C83S	sfwd srev	NlaIV	0.53 0.22 0.17 0.11 0.10 (...)	0.40 0.22 0.17 0.13 0.11 0.10 (...)

TABLA 2.2. Fragmentos esperados tras la digestión del producto de PCR (amplificado con los cebadores indicados) obtenido del DNA de los diferentes mutantes en la subunidad grande (LS) y en la subunidad pequeña (SS), y de las correspondientes secuencias silvestres, utilizando para cada mutación el enzima de restricción indicado. La digestión correspondiente a C83S origina una serie de fragmentos adicionales de tamaño inferior a 0.10Kb abreviados como (...).

En el caso del mutante C84S (Figura 2.2C) se observó que no todo el DNA amplificado por PCR se digirió con *NdeI*, que corta específicamente en el codón mutado, lo que podría indicar cierto grado de heteroplasmicidad en este caso. Sin embargo, en la digestión del producto de PCR del plásmido pC84S se observó una proporción similar de DNA no digerido, sugiriendo que la actividad del enzima de restricción no fue suficiente para completar la digestión. También se observaron fragmentos de restricción parcial con *HindIII* tanto con la secuencia silvestre como con la del mutante C427S (Figura 2.2F), pero la total ausencia de los

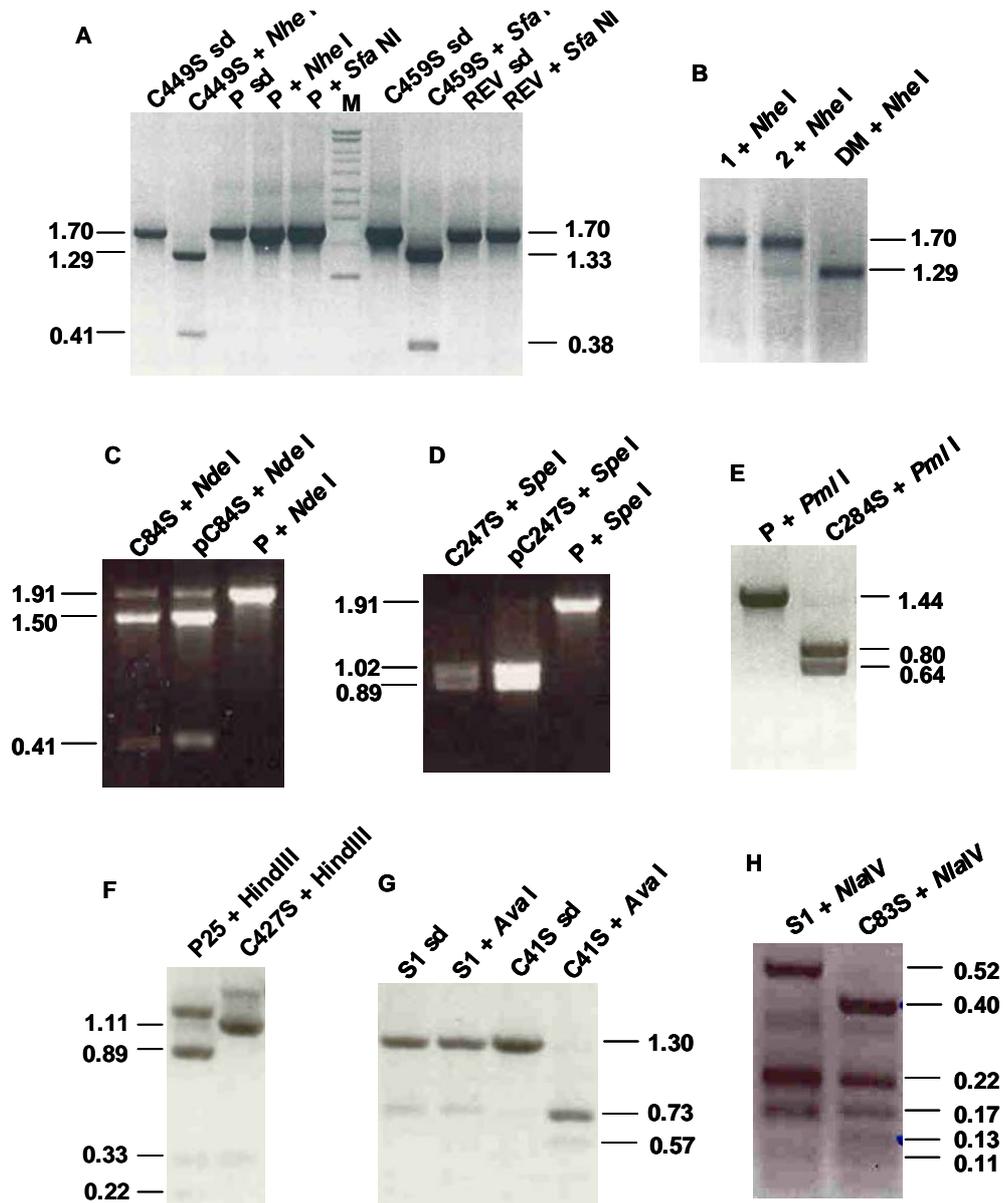


FIGURA 2.2. Detección de la mutación en los transformantes de *C. reinhardtii* por análisis de restricción diferencial. El DNA aislado de cada una de las colonias mutantes en la subunidad grande (A-F) y en la subunidad pequeña (H, I) así como del revertiente silvestre seleccionado (REV) se sometió a PCR utilizando las parejas de cebadores fwd1 y rev16 (A, B), fwd15 y rev16 (C, D), fwd1 y rev8 (E, F), sfwd y srev (G, H). El producto de PCR se digirió con el enzima de restricción indicado durante 1 h a 37°C en un volumen final de 10µl o se incubó en las mismas condiciones en ausencia del enzima (sd). Los productos de digestión se corrieron en un gel de agarosa al 1% (A-G) o al 3% (H). Se utilizaron como controles el producto de PCR del plásmido prbcIP (P), el de la cepa 25-B1 transformada con el gen *rbcl* silvestre (P25) y el de la cepa T-60 transformada con el gen *rbclS1* silvestre (S1). En (B) se muestra el producto de digestión de dos colonias rechazadas (1 y 2) y la finalmente seleccionada del mutante C449S/C459S (DM). En C y D se incluyen las digestiones de los productos de PCR de los plásmidos mutantes correspondientes (pC84S y pC247S respectivamente). En el lateral de cada panel se indican los tamaños de los fragmentos de restricción en kilobases. En (A) el marcador de peso molecular utilizado (M) muestra las bandas de 10.0, 8.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.5, 2, 1.5, 1.0 kb (Kilobase DNA Marker, Pharmacia).

Resultados II

fragmentos diferenciales de 0.89Kb y 0.22Kb, confirmó la homoplasmicidad del mutante. En el resto de casos (Figuras 2.2A, 2.2B, 2.2D, 2.2E), la digestión con el enzima de restricción característico de la mutación, fue completa. Estos resultados indican que los mutantes seleccionados presentaban, en todos los casos, un grado de homoplasmicidad elevado.

La secuenciación de la zona codificante del gen *rbcL* de los mutantes C449S, C459S y C449S/C459S y del revertiente con el fondo genético de 18-7G, verificó la presencia de las mutaciones introducidas y la ausencia de cambios no pretendidos.

3. Transformación del genoma nuclear de *C. reinhardtii*.

La transformación nuclear de *C. reinhardtii* se llevó a cabo con los plásmidos mutantes psC41S y psC83S. Se recuperaron en total más de 200 colonias en medio mínimo para cada mutación. De ellas se escogieron 10, al azar, para aislar el DNA y amplificar el gen *rbcS1* mediante PCR. La presencia de la mutación se comprobó por análisis de restricción (Figura 2.2G y 2.2H) coincidiendo el tamaño de los fragmentos obtenidos con el de los esperados (Tabla 2.2) en todas las muestras. La alta eficiencia de la mutación correcta en la transformación nuclear se justifica porque no existe la posibilidad de que se originen revertientes por el mecanismo de recombinación homóloga que se ha descrito en el caso del cloroplasto, ya que la cepa receptora carece de los dos genes de la familia *rbcS* de *C. reinhardtii*.

DISCUSIÓN

Los procedimientos utilizados de mutagénesis dirigida, transformación y selección de transformantes han permitido obtener mutantes en cisteínas conservadas de los genes *rbcL* y *rbcS* de la Rubisco. En el caso de *rbcL*, el alto grado de homoplasmicidad conseguido en la primera generación de transformantes (ya sea vencido hacia la secuencia silvestre o hacia la mutada) podría indicar que las células en las que se sintetizan simultáneamente subunidades grandes con secuencias diferentes presentan alguna desventaja en su crecimiento. Teniendo en cuenta que el holoenzima funcionalmente activo está compuesto por 8 subunidades grandes y 8 subunidades pequeñas, esto podría significar que el ensamblaje de holoenzimas híbridos compuestos por dos tipos de subunidades grandes puede presentar alguna dificultad o también, que las pequeñas asimetrías que puede generar la presencia simultánea de ambos tipos de subunidades pueden disminuir la actividad o la estabilidad del holoenzima.

El hecho de que todos los mutantes obtenidos mantengan su competencia fotosintética (ya que se seleccionaron en un medio sin una fuente de carbono adicional) indica que ninguno de los residuos de cisteína conservados es esencial para la actividad del enzima ni para la estabilidad estructural de la proteína a temperatura ambiente. Sin embargo, el alto grado de conservación evolutiva que presentan estos residuos es un claro indicio de que deben cumplir una función fisiológica relevante. Dados los antecedentes que demuestran que el estado redox de los residuos afecta a la actividad y a la degradabilidad del enzima *in vitro* (55, 147) parece razonable considerar a estos residuos como candidatos a participar en la regulación redox de la Rubisco *in vivo*. Por otro lado, la inactivación y susceptibilización proteolítica de la Rubisco tienen lugar *in vitro* a potenciales redox críticos distintos (55), lo que sugiere que los residuos de cisteína implicados en ambos procesos son diferentes. De hecho, se ha comprobado que la mutación de la cisteína 172 no afecta a la inactivación redox del enzima *in vitro* pero sí a su degradación inducida por oxidación *in vitro* e *in vivo* (133). Ante la perspectiva de un control múltiple, por parte de diferentes residuos conservados de cisteínas, en la regulación redox de la Rubisco, se abre un amplio abanico de posibilidades en cuanto a futuros objetos de estudio en este tema. Cabe esperar que la caracterización de los mutantes obtenidos pueda desvelar el papel concreto que cada uno de estos residuos pueda desempeñar en el control redox del enzima.

CAPÍTULO III

**Estudio del papel del par Cys 449-Cys459
en la modulación redox de la Rubisco**

RESULTADOS

1. Caracterización de las Rubiscos mutantes C449S, C459S y C449S/C459S *in vitro*.

Con objeto de detectar posibles cambios debidos a las mutaciones que pudieran afectar a la eficiencia catalítica, la estabilidad estructural o la regulación redox del enzima, se realizaron diversos ensayos en los que se comparó el comportamiento de la Rubisco purificada de los mutantes C449S, C459S y C449S/C459S de *C. reinhardtii* con el del enzima silvestre, obtenido de la cepa revertiente.

1. 1. Determinación de la actividad específica y las constantes cinéticas: *Las mutaciones C449S, C459S y C449S/C459S no provocan cambios apreciables en el centro activo del enzima en estado reducido.*

El valor de actividad específica intrínseca del enzima, determinado para la Rubisco silvestre en las condiciones estándar del ensayo, fue de alrededor de 2 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg enzima})$, lo que coincide con valores publicados (133). Los valores obtenidos para los mutantes fueron del mismo orden, con diferencias estadísticamente no significativas (Tabla 3.1).

	actividad específica
REV	2,02 \pm 0,08
C449S	2,13 \pm 0,07
C459S	1,94 \pm 0,06
C449S/C459S	1,98 \pm 0,09

TABLA 3.1. Actividad específica de la Rubisco purificada obtenida del revertiente silvestre (REV) y de los mutantes C449S, C459S y C449S/C459S. Se muestra la media \pm la desviación típica de un ensayo realizado por triplicado, expresada en $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg enzima})$.

Con objeto de realizar un análisis más detallado del efecto de las mutaciones en el centro activo del enzima, se midió la actividad en series de ensayos en los que se variaba la cantidad de CO_2 en un rango de concentraciones limitantes para la reacción de carboxilación, bajo una atmósfera de 100% N_2 o 100% O_2 . De esta manera se calcularon las constantes de Michaelis para la carboxilación y oxigenación, así como la velocidad máxima de carboxilación. Además, se realizó una determinación independiente del factor de especificidad por el método del doble marcado.

Resultados III

	Ω	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
REV	61 ± 4	130 ± 23	50 ± 5	761 ± 51	$15,0 \pm 1,5$
C449S	62 ± 3	137 ± 30	52 ± 4	776 ± 106	15 ± 3
C459S	58 ± 4	151 ± 29	69 ± 25	798 ± 143	12 ± 4
C449S/C459S	59 ± 4	121 ± 28	51 ± 7	849 ± 95	17 ± 4

TABLA 3.2. Factor de especificidad y constantes cinéticas de la Rubisco obtenida del revertiente silvestre (REV) y de los mutantes C449S, C459S y C449S/C459S. Los valores mostrados para el factor de especificidad (Ω) son las medias \pm las desviaciones típicas de tres determinaciones independientes. Los valores de las constantes cinéticas (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) corresponden a la medias \pm la desviación típica de cinco determinaciones independientes. Los valores de la columna K_o/K_c se calcularon a partir de las dos columnas anteriores.

El factor de especificidad obtenido para la Rubisco silvestre fue de alrededor de 60, en consonancia con los valores publicados para la Rubisco de *C. reinhardtii* determinados por el mismo método (38, 191). Las constantes cinéticas medidas para el enzima silvestre a partir de cinco purificaciones diferentes ($K_c \sim 50 \mu\text{M CO}_2$, $K_o \sim 760 \mu\text{M O}_2$) fueron superiores a los datos publicados ($K_c \sim 34 \mu\text{M CO}_2$, $K_o \sim 540 \mu\text{M O}_2$) (38, 191), pero mantuvieron una relación K_o/K_c (~ 15) consistente con la bibliografía. El valor de V_{max} calculado por extrapolación en este ensayo ($2,2 \pm 0,4 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg enzima})$) es similar a la actividad específica que se muestra en la Tabla 3.1, obtenida como medida directa en un ensayo con una concentración de CO_2 ($\sim 190\mu\text{M}$) varias veces superior a K_c .

Las Rubiscos purificadas de las cepas mutantes mostraron valores de factor de especificidad y constantes cinéticas similares al enzima silvestre (Tabla 3.2). Aunque la estructura de la Rubisco permite la transmisión de modificaciones a larga distancia (39), los resultados obtenidos indican que la sustitución de las cisteínas 449 y 459 (situadas a 22Å y 17Å, respectivamente, del centro catalítico) no provoca cambios apreciables en la función catalítica del enzima en estado reducido.

1. 2. Estudio de la estabilidad térmica de los enzimas mutantes: La termosensibilidad de las Rubiscos mutantes indica una ligera desestabilización estructural.

Se determinó la sensibilidad térmica de los enzimas mutantes en paralelo al revertiente silvestre midiendo la actividad carboxilasa tras 20 minutos de calentamiento a diferentes temperaturas (entre 50 y 62°C). Al aumentar la temperatura de incubación, se produjo una pérdida progresiva de la actividad carboxilasa, mostrando el enzima silvestre una temperatura crítica de inactivación (temperatura a la que la actividad se reduce al 50% de la inicial) en

torno a 57.5 °C (Figura 3.1). En las mismas condiciones, los enzimas mutantes C459S y C449S/C459S presentaron una temperatura crítica de inactivación alrededor 1 °C inferior a la del silvestre mientras que la del C449S fue sólo 0,5 °C más baja (Figura 3.1).

Este resultado sugiere que la sustitución de cisteína por serina en las posiciones 449 y 459 supone una ligera desestabilización de la estructura nativa que no llega a tener consecuencias funcionales a temperaturas fisiológicas.

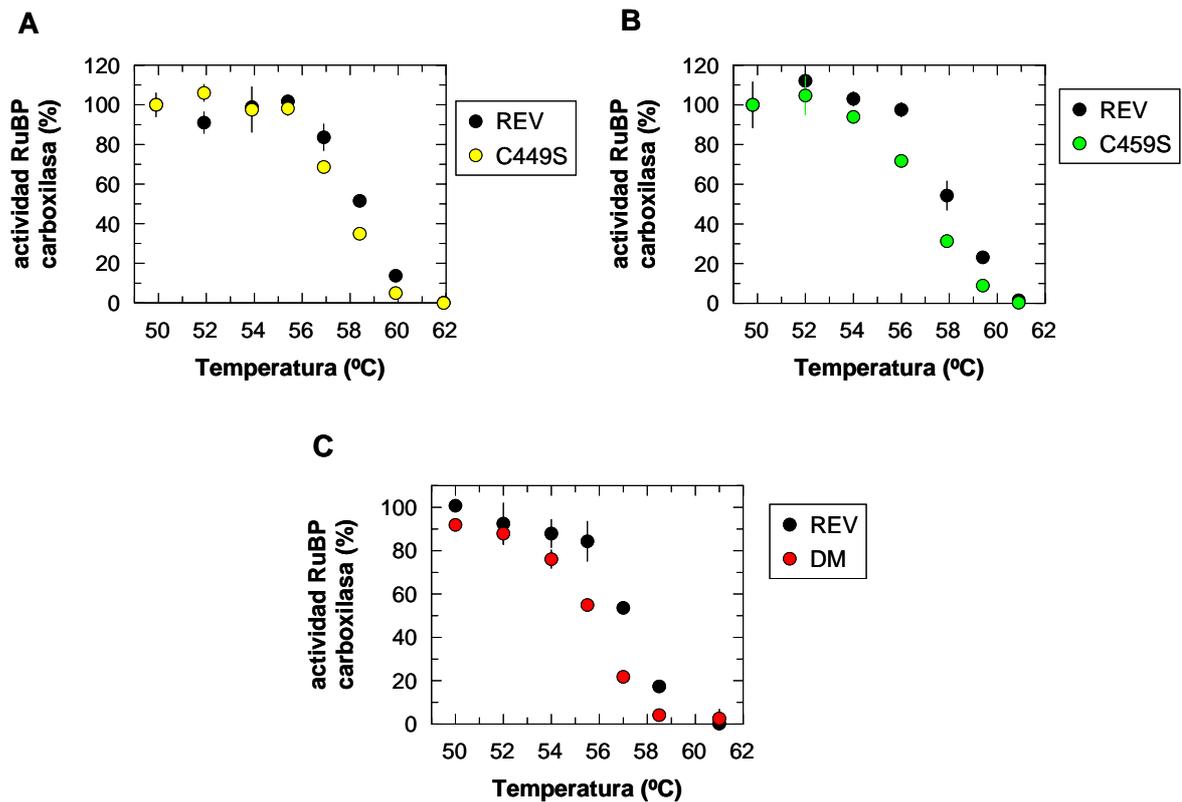


FIGURA 3.1. Termosensibilidad de las Rubiscos mutantes C449S (A), C459S (B) y C449S/C459S (DM) (C) comparada en cada caso con la Rubisco silvestre (REV). La Rubisco purificada (0,2 mg/ml en tampón de activación) de las diferentes cepas de *C. reinhardtii* se incubó durante 20 minutos a diferentes temperaturas (de 50 a 62 °C) y a continuación se midió la actividad residual directamente (A, B) o enfriando previamente las muestras en hielo durante 6 min (C). Se representa el porcentaje de actividad residual de los enzimas revertiente (●), C449S (●), C459S (●) y C449S/C459S (●) a cada temperatura, respecto a la actividad medida después de incubarse a 50 °C (A, B) o respecto a la actividad del enzima sin calentar (C). Las barras de error indican la desviación típica de triplicados.

1.3. Inactivación de las Rubiscos mutantes en tampones redox con potenciales de oxidación variables: *Las mutaciones C449S y C459S impiden una inactivación total del enzima en condiciones fuertemente oxidantes.*

Se ha descrito que cuando se incubaba la Rubisco purificada en tampones redox constituidos por crecientes relaciones molares (r) de cistamina (oxidante de tioles) /cisteamina (reductor de tioles) se produce una disminución progresiva de la actividad del enzima hasta anularla completamente (55, 133). La exposición del enzima silvestre (purificado de la cepa revertiente) a los diferentes tampones redox produjo efectivamente la inactivación progresiva del enzima con una transición en torno a una r de 1.5, que condujo a la pérdida total de actividad para valores de r superiores a 10 (Figura 3.2).

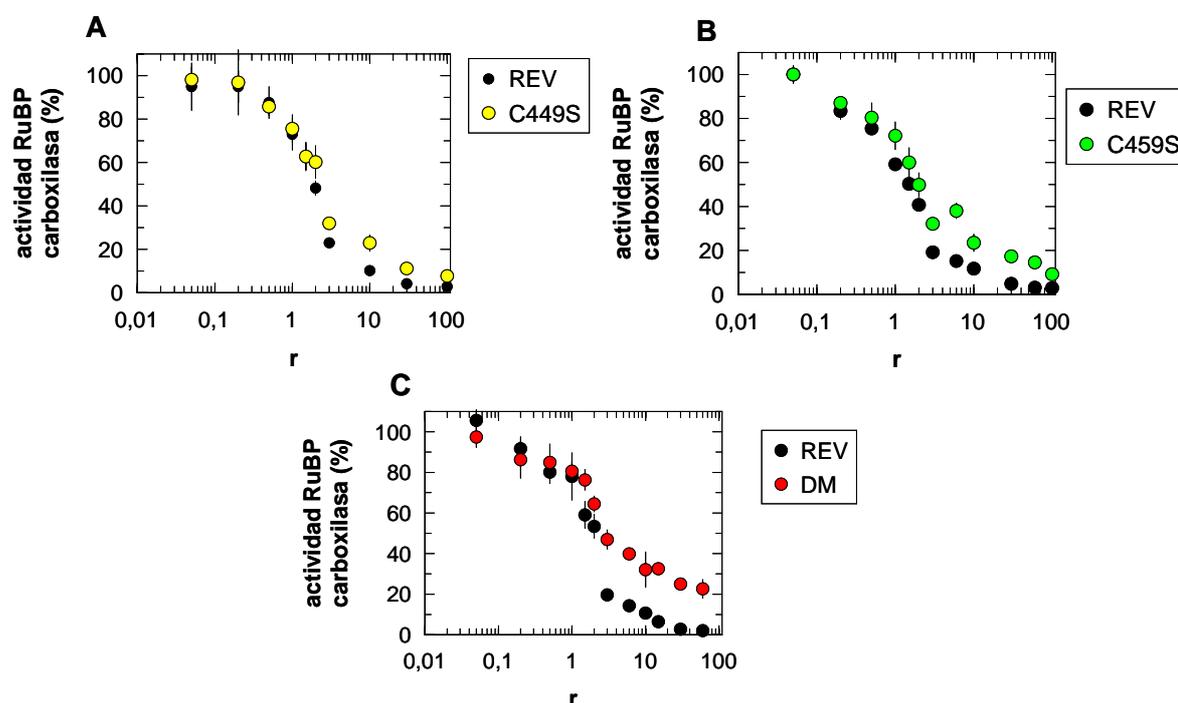


FIGURA 3.2. Inactivación de las Rubiscos obtenida del revertiente silvestre (REV) y de los mutantes C449S (A), C459S (B) y C449S/C459S (DM) (C) en tampones con potenciales de oxidación crecientes. Se prepararon tampones redox como mezclas de CSH y CSSC (en tampón de activación) con diferentes relaciones molares ($r = [\text{CSSC}] / [\text{CSH}]$) desde $r = 0$ hasta $r = 100$ y concentración monomérica ($[\text{CSH}] + 2 \cdot [\text{CSSC}]$) constante e igual a 40mM. La Rubisco purificada (0,13 mg/ml) de las cepas revertiente y mutantes de *C. reinhardtii* se incubó 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 actividad de los enzimas revertiente (●), C449S (●), C459S (●) y C449S/C459S (●) respecto a la actividad del mismo enzima totalmente reducido (con $r = 0$). Las barras de error indican la desviación típica de los triplicados del ensayo de actividad.

Los enzimas de los mutantes simples C449S y C459S mostraron un comportamiento similar al revertiente en condiciones reductoras o débilmente oxidantes, pero conservaron una actividad superior a la del revertiente en tampones redox con una r mayor de 3 (Figuras 3.2A y 3.2B). Esta diferencia fue considerablemente mayor en el doble mutante (Figura 3.2C), donde no se consiguió inactivar el enzima por debajo del 20% de la actividad inicial, incluso en condiciones fuertemente oxidantes.

1.4. Efecto de diferentes agentes oxidantes sobre la actividad: *Las mutaciones C449S y C459S protegen parcialmente a la Rubisco de la inactivación con algunos agentes oxidantes como el Cu^{2+} o la cistamina.*

Se incubó la Rubisco purificada con diferentes agentes oxidantes de grupos sulfhidrilo (arsenito, sulfato de cobre, glutatión oxidado, cistamina, iodoacetamida o DTNB) durante 2h en una atmósfera inerte de N_2 y se midió la actividad carboxilasa tras cada tratamiento (Figura 3.3). Como controles se determinó en paralelo la actividad de la Rubisco purificada sin tratar y de la Rubisco reducida con cisteamina.

El arsenito (agente específico de ditioles) provocó una pérdida escasa (de un 20% aproximadamente) de actividad, tanto en la Rubisco silvestre como en los enzimas mutantes (Figura 3.3). Se realizó una incubación adicional con arsenito en presencia de cisteamina para reducir posibles disulfuros intramoleculares y hacerlos así accesibles a la modificación por este agente. En estas condiciones, el arsenito produjo una mayor inactivación, provocando una pérdida de un 90% de la actividad, pero de nuevo tuvo un efecto similar en los mutantes y en el revertiente (Figura 3.3).

El Cu^{2+} , que en disolución acuosa genera radicales libres (63), inactivó la Rubisco revertiente silvestre hasta el 20% de la actividad inicial mientras que los mutantes retuvieron aproximadamente el 65% de la misma en las mismas condiciones (Figura 3.3). La presencia de cisteamina simultáneamente al tratamiento con Cu^{2+} , no tuvo apenas efecto en la recuperación de la actividad. Ello indica por un lado, que una concentración de tioles en el medio (40mM de cisteamina) relativamente alta, en relación a la concentración de tioles procedentes de la Rubisco (en el orden de μM), no consigue tamponar el efecto de los radicales libres generados por el Cu^{2+} ; y por otro lado, que la modificación oxidativa que este agente origina en el enzima no es reversible por cisteamina.

La iodoacetamida y el DTNB (reactivos específicos de grupos tioles) anularon por completo la actividad tanto de la Rubisco revertiente como de las mutantes (Figura 3.3). La actividad residual de la Rubisco tras el tratamiento con cistamina fue el doble de la del silvestre en el caso de los mutantes simples de la Rubisco y unas diez veces mayor en el caso del doble mutante (Figura 3.3B). A diferencia de la cistamina, otro disulfuro, el glutatión

Resultados III

oxidado, no produjo una inactivación apreciable ni de los enzimas mutantes ni del silvestre. Esta incapacidad del glutatión para ejercer una modulación redox de la Rubisco (tanto en forma oxidada como reducida) ha sido ya descrita (55, 133) y se ha atribuido a posibles dificultades estéricas para acceder a los residuos críticos de cisteína.

En conclusión, las cisteínas 449 y 459 contribuyen a la sensibilidad de la Rubisco a ciertos agentes oxidantes, en particular la cistamina y el Cu^{2+} , pero no a todos. Es posible que aquellos agentes que no producen un efecto diferencial no reaccionen con las cisteínas 449 y 459, o que la reacción no afecte a la función catalítica, o que tenga un efecto redundante con la modificación de algún otro residuo de cisteína.

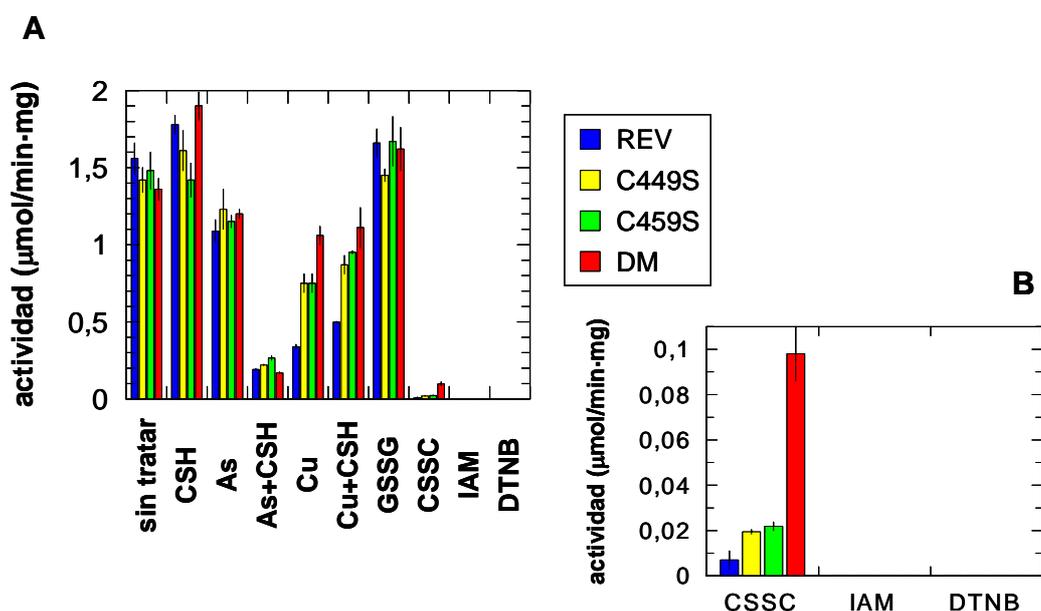


FIGURA 3.3. Inactivación de las Rubiscos obtenidas del revertiente silvestre (REV) y de los mutantes C449S, C459S y C449S/C459S (DM) por tratamientos con diferentes agentes oxidantes. Rubisco purificada (0,13 mg/ml en tampón de activación) se incubó durante 2h a 30°C en una atmósfera inerte de nitrógeno con diferentes agentes oxidantes (As, arsenito de sodio 2mM; Cu, sulfato de cobre 75µM; GSSG, glutatión oxidado 20mM; CSSC, cistamina 20mM; IAM, iodoacetamida 40mM; DTNB, ditionitrobenzoato 2mM), o con un reductor (CSH, cisteamina 40mM), o se mantuvo en tampón de activación (sin tratar). A continuación se midió la actividad específica residual de las Rubiscos silvestre (en azul) y de los mutantes C449S (amarillo), C459S (verde) y C449S/C459S (rojo). Las barras de error muestran la desviación típica de los triplicados del ensayo de actividad. En (B) se muestra una ampliación de la escala de actividad para los tratamientos de cistamina (CSSC), iodoacetamida (IAM) y ditionitrobenzoato (DTNB).

1. 5. Susceptibilización proteolítica inducida por oxidación: *Las cisteínas 449 y 459 participan de forma redundante en la exposición del lazo Ser61-Thr68 al corte por subtilisina.*

Con objeto de estudiar el papel de los residuos de cisteína 449 y 459 en el control redox de la susceptibilización proteolítica de la Rubisco, se incubaron los enzimas mutantes y el silvestre en tres condiciones redox diferentes ($r = 0, 5$ e infinito), y se sometieron posteriormente a proteólisis con subtilisina. Las cinéticas de degradación se ajustaron al modelo proteolítico desarrollado en el capítulo 1, para calcular las correspondientes constantes k_1 , k_2 , k_2' y k_3 .

Los puntos experimentales se ajustaron al modelo propuesto tanto en condiciones de reducción y oxidación extremas como en condiciones intermedias ($r=5$), obteniéndose en todos los casos un coeficiente de determinación mayor del 95%.

Los mutantes simples C449S y C459S no mostraron diferencias significativas con el revertiente en ninguna de las constantes cinéticas en las condiciones de oxidación estudiadas (Tabla 3.3). Sin embargo, el doble mutante presentó valores de k_2 y k_2' significativamente inferiores a los del revertiente silvestre en condiciones de oxidación intermedias ($r=5$). Esta diferencia entre los enzimas doble mutante y silvestre se mantuvo en condiciones fuertemente oxidantes en el caso de k_2' , aunque los valores de k_2 llegaron a ser semejantes (Tabla 3.3). Las constantes k_1 y k_3 del doble mutante fueron, en las tres condiciones redox ensayadas, similares a las del silvestre (Tabla 3.3).

Los datos obtenidos indican que, en el enzima doble mutante, tanto la subunidad grande intacta como el fragmento de 53KDa (banda I) son más resistentes al corte en el lazo Ser61-Thr68 que origina el fragmento de 47 KDa (banda II). Dado que estas diferencias no se ponen de manifiesto en ninguno de los mutantes simples, estos resultados sugieren una cierta redundancia en la contribución de las cisteínas 449 y 459 a la exposición a la subtilisina del lazo Ser61-Thr68 inducida por oxidación.

2. Caracterización de los mutantes C449S, C459S y C449S/C459S de *C. reinhardtii* in vivo.

2.1 Curvas de crecimiento y análisis bioquímico de los mutantes: *El doble mutante, a diferencia de los mutantes simples, presenta un mayor contenido en Rubisco, proteínas totales y pigmentos fotosintéticos por célula.*

Se crecieron los mutantes de *C. reinhardtii* C449S, C459S y C449S/C459S en distintas condiciones: fotoheterotróficas (medio con acetato como fuente de carbono alternativa y luz), heterotróficas (medio con acetato, en oscuridad) y fotoautotróficas (medio mínimo - sin fuente de carbono - y luz), determinando la densidad celular durante la fase de crecimiento hasta la

		REV	DM	C449S	C459S
r = 0	k₁	0,040 ± 0,003	0,040 ± 0,003	0,0363 ± 0,0017	0,038 ± 0,003
	k₂	0	0	0	0
	k₂'	0,0006 ± 0,0002	0,00077 ± 0,00012	0,00086 ± 0,00008	0,00099 ± 0,00013
	k₃	0,1 ± 0,2	0,06 ± 0,03	0,007 ± 0,009	0,00 ± 0,02
r = 5	k₁	0,040 ± 0,002	0,043 ± 0,003	0,047 ± 0,004	0,045 ± 0,004
	k₂	0,0134 ± 0,0017	0,0087 ± 0,0015	0,009 ± 0,002	0,011 ± 0,003
	k₂'	0,0052 ± 0,0006	0,0039 ± 0,0003	0,0050 ± 0,0005	0,0054 ± 0,0007
	k₃	0,0082 ± 0,0008	0,0100 ± 0,0010	0,0083 ± 0,0010	0,0086 ± 0,0018
r = inf	k₁	0,054 ± 0,010	0,052 ± 0,010	0,054 ± 0,004	0,052 ± 0,010
	k₂	0,0337 ± 0,010	0,033 ± 0,007	0,032 ± 0,007	0,042 ± 0,008
	k₂'	0,0056 ± 0,0010	0,0032 ± 0,0006	0,0043 ± 0,0008	0,0042 ± 0,0008
	k₃	0,0078 ± 0,0008	0,0087 ± 0,0010	0,0065 ± 0,0015	0,0082 ± 0,0006

TABLA 3.3. Valores estimados para las constantes cinéticas k_1 , k_2 , k_2' y k_3 (del modelo descrito en el capítulo I), en la proteólisis con subtilisina de la Rubisco obtenida de las cepas revertiente silvestre (REV), C449S, C459S y doble mutante C449S/C459S (DM). Las muestras de Rubisco purificada (0,13 mg/ml) se incubaron en tampones redox de $r = 0, 5$ o infinito, como se indica en la Figura 3.2. A continuación, se digirieron con subtilisina (0,5 $\mu\text{g/ml}$) durante diferentes tiempos (0, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 y 300 min). La subunidad grande de la Rubisco intacta y sus fragmentos de proteólisis (banda I y banda II) se cuantificaron de geles de SDS-PAGE teñidos con azul Coomassie y se corrigieron los valores obtenidos por la pérdida de masa. Las curvas teóricas descritas por las ecuaciones 1-3 del capítulo 1 se ajustaron a los puntos experimentales determinados para la evolución cinética de la subunidad grande intacta (z), banda I (p_1) y banda II (p_2), con el objeto de calcular los valores de las constantes cinéticas minimizando la suma de las desviaciones al cuadrado. Se indican los valores de las constantes \pm el error estándar expresados en min^{-1} . Se resaltan en negrita aquellas constantes de las Rubiscos mutantes que muestran diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) respecto al enzima silvestre.

estabilización de la concentración celular en la fase estacionaria. El crecimiento de los mutantes simples C449S y C459S fue similar al de la cepa revertiente silvestre en todas las condiciones ensayadas (Figuras 3.4A-C, 3.5A-C). El doble mutante, en cambio, a pesar de mantener una velocidad de crecimiento similar a la del revertiente durante la fase logarítmica, alcanzó la fase estacionaria con una densidad celular de saturación inferior, tanto en medio acetato con luz (Figura 3.6A), como en medio acetato sin luz (Figura 3.6B), como en medio mínimo (Figura 3.6C).

Se realizó una caracterización bioquímica general de los mutantes en la fase estacionaria, determinando la cantidad y actividad de la Rubisco por célula, el contenido de proteínas totales y el contenido de clorofilas. En el caso de los mutantes simples C449S y C459S, todos los parámetros evaluados en este análisis fueron similares a los del revertiente silvestre en las tres condiciones de crecimiento (Figuras 3.4D-G; 3.5D-G). El doble mutante, sin embargo, presentó un incremento en la cantidad y actividad de Rubisco por célula respecto al revertiente (Figuras 3.6D,E), paralelo a un aumento en el contenido de proteínas totales (Figura 3.6F) y de clorofilas (Figura 3.6G). El hecho de que este incremento de la biomasa por célula coincida con una menor concentración celular sugiere una posible infravaloración artefactual del número de células del doble mutante durante la fase estacionaria de crecimiento. Esto podría deberse a que las células del doble mutante en fase estacionaria formaran agregados que resistieran la sonicación previa al conteo sin disgregarse, de manera que cada uno de estos agregados se contaría en el analizador Coulter como una sola célula. Sin embargo, la observación al microscopio de los cultivos, así como la exploración de tamaños en el contador Coulter, no reveló una formación preferencial de agregados en el doble mutante. Por tanto, cabe considerar que las células del doble mutante acumulan efectivamente mayor biomasa por célula. A casusa de ello, la densidad celular máxima alcanzada en la fase estacionaria sería menor en el doble mutante ya que los recursos nutritivos del medio se invertirían, en este caso, en generar una mayor cantidad de biomasa por célula a costa de una menor densidad celular. De hecho, el contenido de Rubisco, proteínas totales y pigmentos fotosintéticos por volumen del cultivo fue similar en el revertiente y el doble mutante en las tres condiciones de crecimiento.

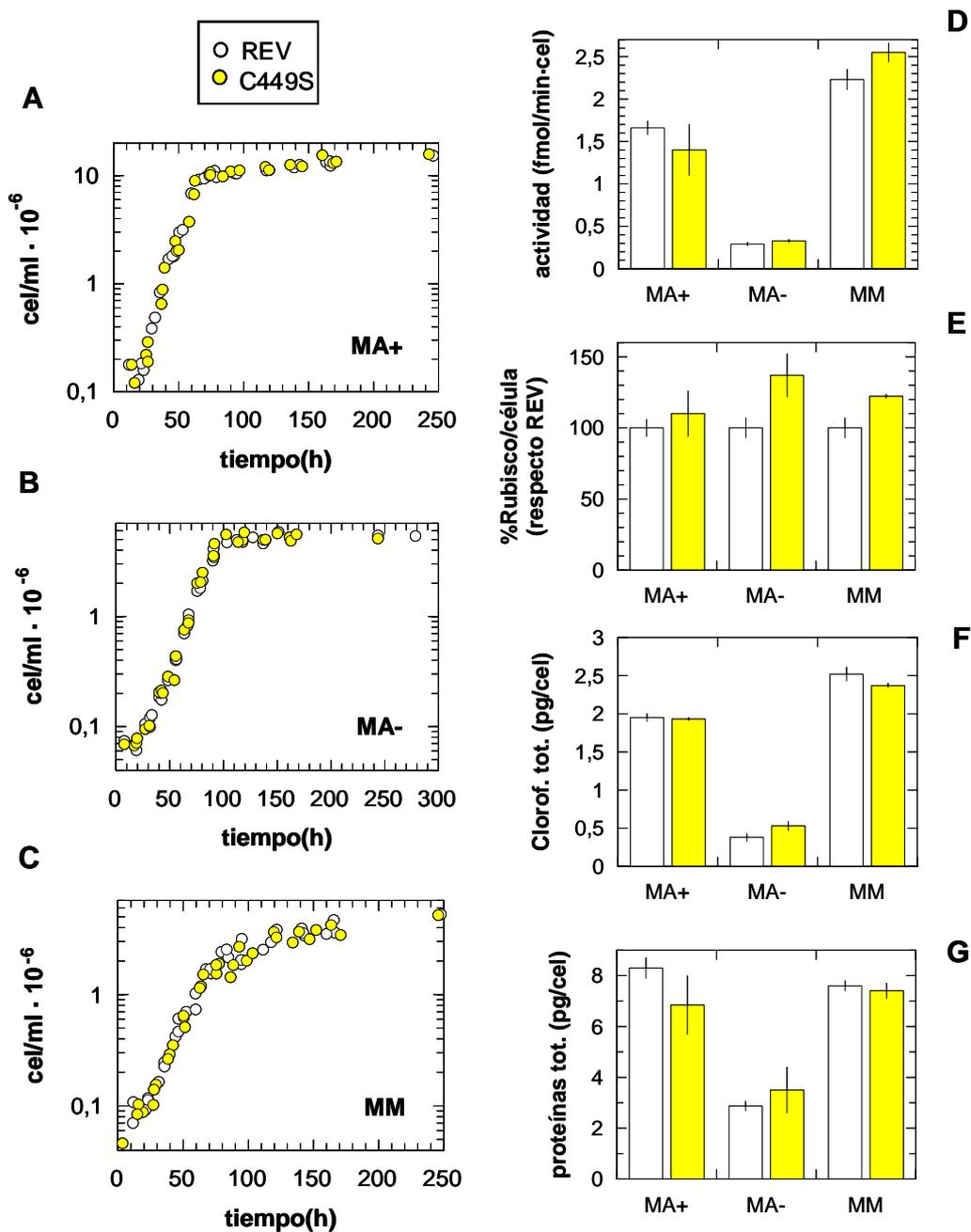


FIGURA 3.4. Curvas de crecimiento y análisis bioquímico del mutante C449S de *C. reinhardtii* en comparación con la cepa revertiente silvestre (REV). Se siguió el incremento de la densidad celular de las dos cepas crecidas en medio acetato con luz (MA+) (A), medio acetato sin luz (MA-) (B) y medio mínimo (MM) (C). Asimismo, se analizó la actividad (D) y cantidad (E) de Rubisco por célula, junto con el contenido celular de clorofilas (F) y proteínas totales (G) en la fase estacionaria de cada una de las condiciones de crecimiento. Las barras de error indican la desviación típica de triplicados.

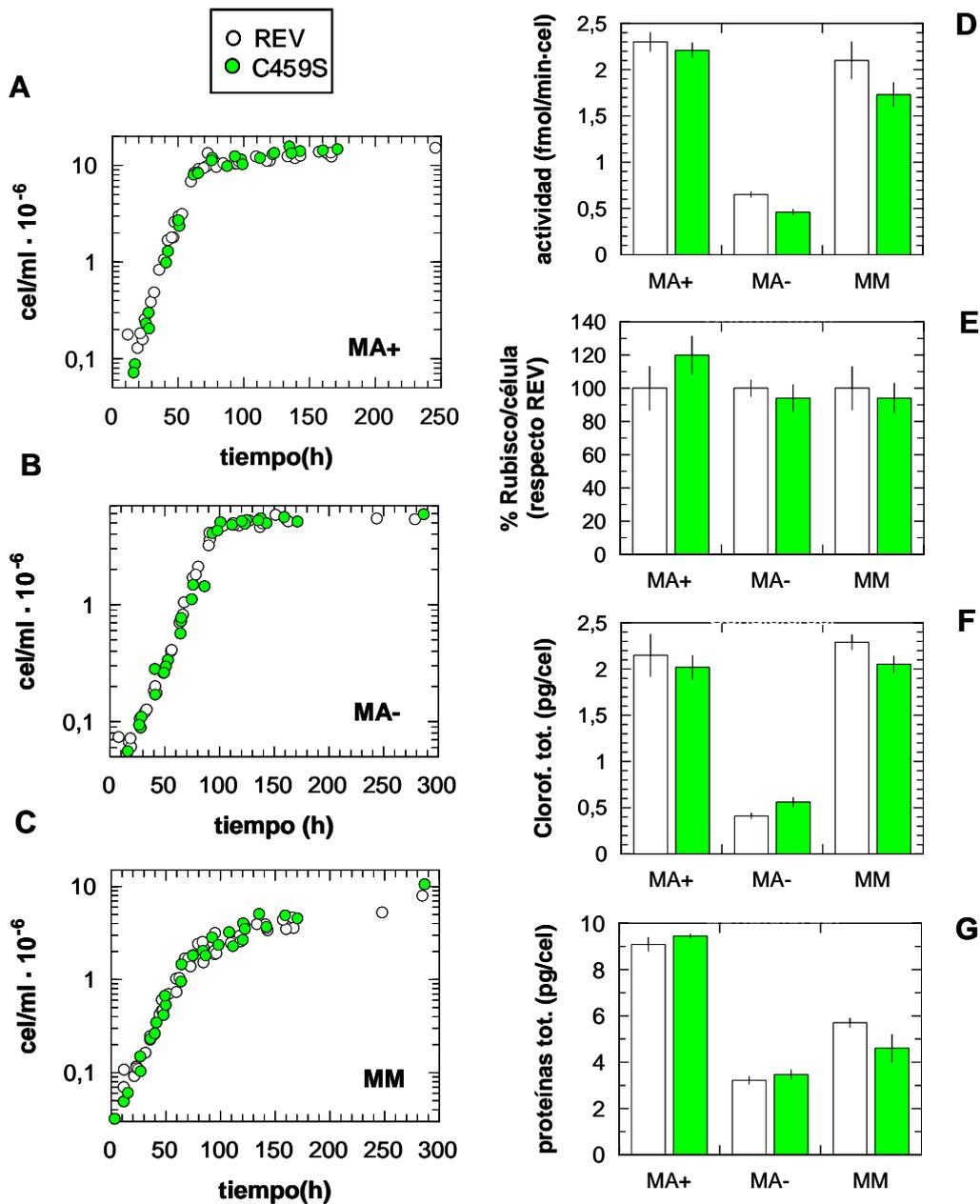


FIGURA 3.5. Curvas de crecimiento y análisis bioquímico del mutante C459S de *C. reinhardtii* en comparación con la cepa revertiente silvestre (REV). Se siguió el incremento de la densidad celular de las dos cepas crecidas en medio acetato con luz (MA+) (A), medio acetato sin luz (MA-) (B) y medio mínimo (MM) (C). Asimismo, se analizó la actividad (D) y cantidad (E) de Rubisco por célula, junto con el contenido celular de clorofilas (F) y proteínas totales (G) en la fase estacionaria de cada una de las condiciones de crecimiento. Las barras de error indican la desviación típica de triplicados.

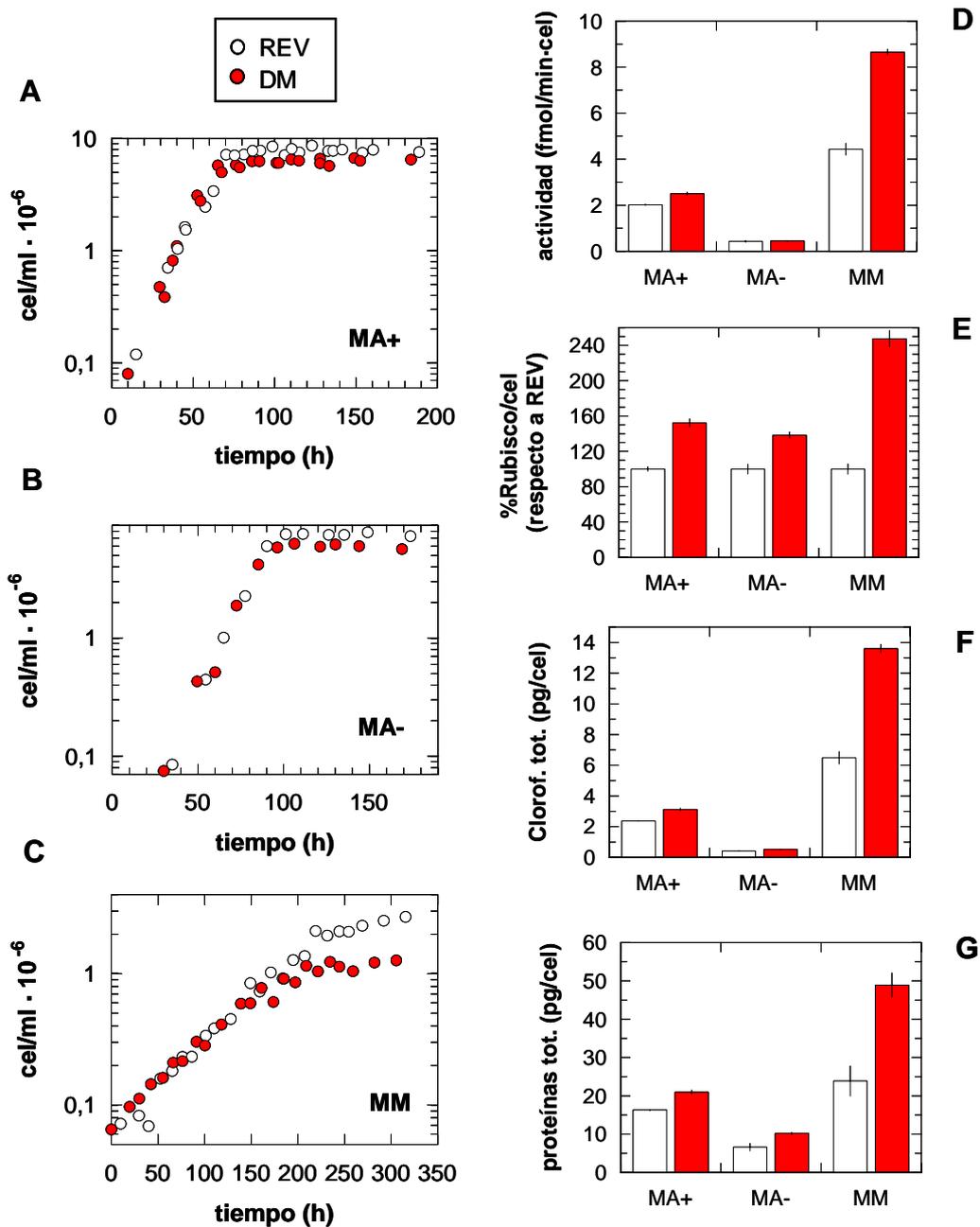


FIGURA 3.6. Curvas de crecimiento y análisis bioquímico del doble mutante C449S/C459S (DM) de *C. reinhardtii* en comparación con la cepa revertiente silvestre (REV). Se siguió el incremento de la densidad celular de las dos cepas crecidas en medio acetato con luz (MA+) (A), medio acetato sin luz (MA-) (B) y medio mínimo (MM) (C). Asimismo, se analizó la actividad (D) y cantidad (E) de Rubisco por célula, junto con el contenido celular de clorofilas (F) y proteínas totales (G) en la fase estacionaria de cada una de las condiciones de crecimiento. Las barras de error indican la desviación típica de triplicados.

2. 2. Estudio de la respuesta a estrés salino de los mutantes.

Como proceso modelo para el estudio de la función de las cisteínas 449 y 459 en condiciones que inducen la degradación de Rubisco, se escogió el estrés salino con NaCl 0.3M. Este tratamiento supone simultáneamente un estrés osmótico, que es un desencadenante de la oxidación de grupos sulfhidrilo de la Rubisco *in vivo* (50). Se ha demostrado además que, en cloroplastos, el estrés salino provoca un incremento en el contenido de H₂O₂ y en la peroxidación de lípidos, indicativos de un estrés oxidativo (69).

2. 2. 1. Degradación de la Rubisco: *El doble mutante presenta una cinética de disminución de la Rubisco en respuesta al estrés salino más rápida que la del silvestre.*

Se siguió la desaparición de la Rubisco durante unas 11 horas tras la aplicación del estrés salino (NaCl 0,3M) a las cepas C449S, C459S, C449S/C459S y revertiente silvestre. Simultáneamente se midió la evolución en la cantidad de clorofilas y de proteínas totales, como controles internos del efecto general del estrés aplicado (Figuras 3.7, 3.8, 3.9). Las condiciones iniciales de los cultivos fueron similares en cuanto a contenido en proteínas totales y clorofilas (Figuras 3.7A, 3.8A, 3.9A).

En los tres experimentos llevados en paralelo a cada uno de los mutantes (Figuras 3.7, 3.8, 3.9), la Rubisco del cultivo revertiente silvestre disminuyó progresivamente a lo largo de las 11 horas de estrés hasta un 20-40% de la cantidad inicial, mientras la proteína total descendió hasta un 40-60%, poniéndose en evidencia en todos los casos cierta preferencia en la degradación de la Rubisco respecto al resto de proteínas. Esta degradación proteica estuvo acompañada de una reducción muy limitada de las clorofilas, lo que indica que en el intervalo de estrés estudiado no se produjo un dismantelamiento apreciable de las estructuras tilacoidales del cloroplasto.

La cinética de desaparición de la Rubisco, así como la degradación de proteínas totales y clorofilas, de los mutantes C449S y C459S no mostró diferencias significativas respecto a la del revertiente (Figuras 3.7 y 3.8). Por el contrario, el doble mutante C449S/C459S fue más sensible al estrés, perdiendo el 50% de la cantidad inicial de Rubisco unas 3 horas antes que el revertiente (Figura 3.9B). La degradación de proteínas totales (incluyendo a la Rubisco) fue también algo más rápida en el doble mutante, alcanzando el 50% de la degradación final unas 2h antes que el revertiente (Figura 3.9C), mientras que la degradación de clorofilas siguió un ritmo similar al control silvestre (Figura 3.9D).

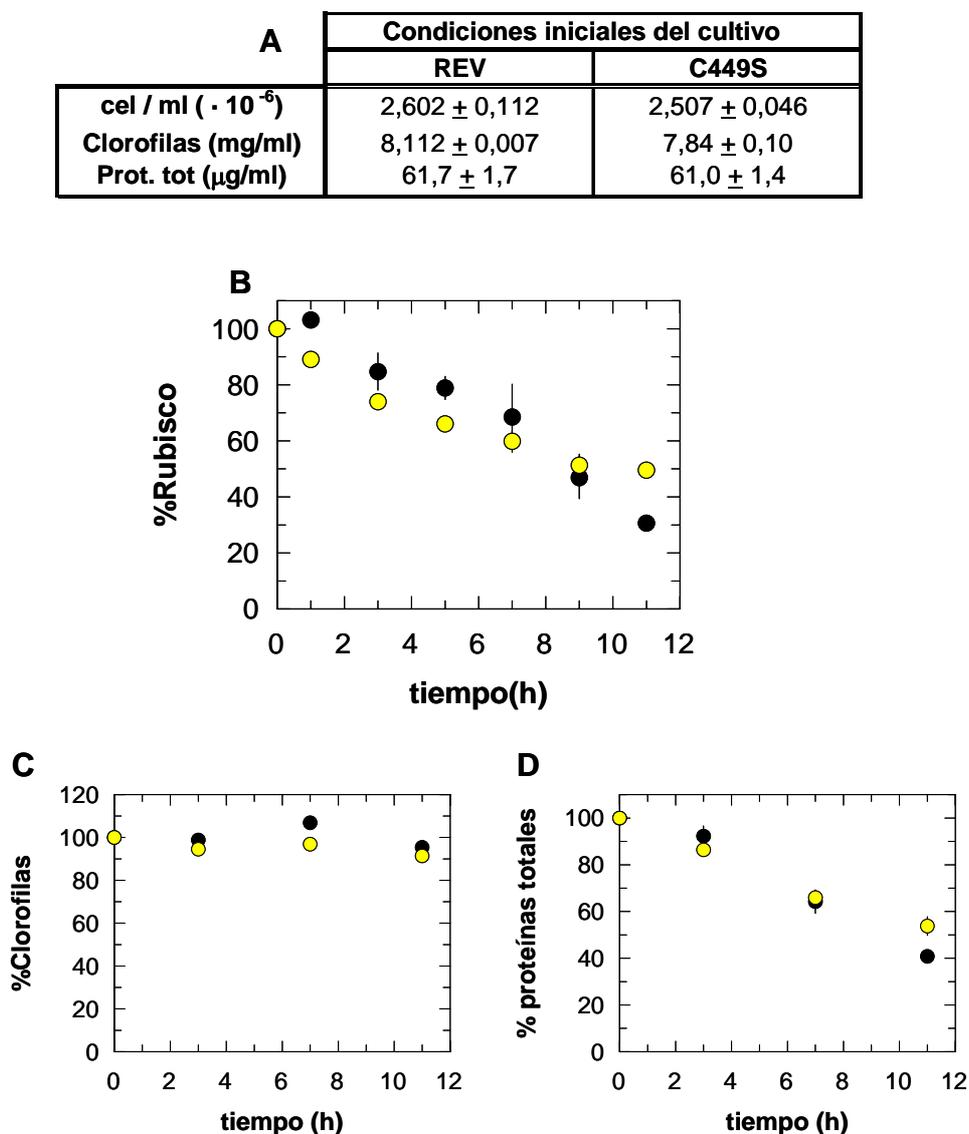


FIGURA 3.7. Degradación de Rubisco (B), clorofilas (C) y proteínas totales (D) en respuesta a estrés salino del mutante de *C. reinhardtii* C449S (●) y de la cepa revertiente silvestre (●). Se representa la media \pm la desviación típica de duplicados expresada como porcentaje de la cantidad inicial de cada parámetro analizado. En (A) se indican las condiciones iniciales de los cultivos en cuanto a densidad celular, contenido en clorofilas y cantidad de proteínas totales, indicados como la media de dos réplicas \pm la desviación típica.

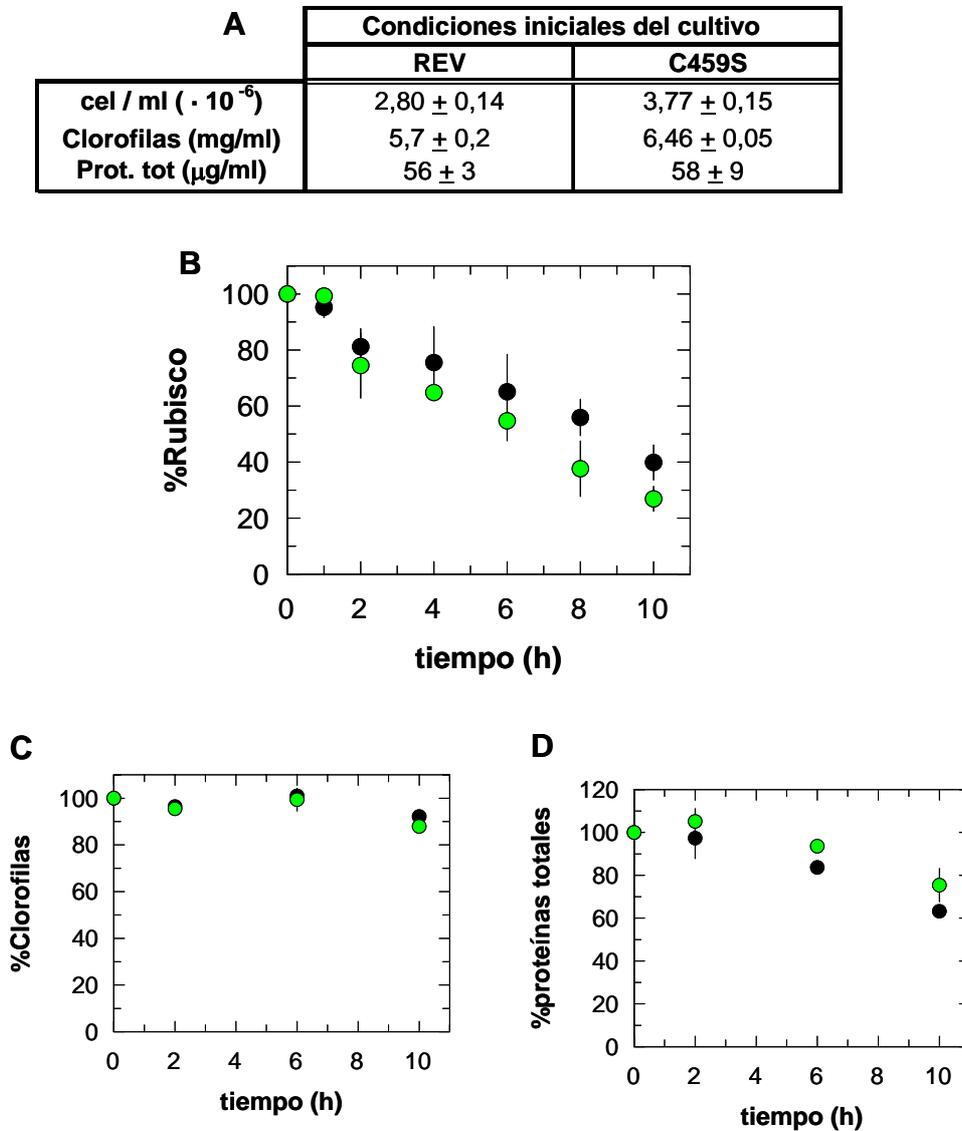


FIGURA 3.8. Degradación de Rubisco (B), clorofilas (C) y proteínas totales (D) en respuesta a estrés salino del mutante de *C. reinhardtii* C459S (●) y de la cepa revertiente silvestre (●). Se representa la media \pm la desviación típica de duplicados expresada como porcentaje de la cantidad inicial de cada parámetro analizado. En (A) se indican las condiciones iniciales de los cultivos en cuanto a densidad celular, contenido en clorofilas y cantidad de proteínas totales, indicados como la media de dos réplicas \pm la desviación típica.

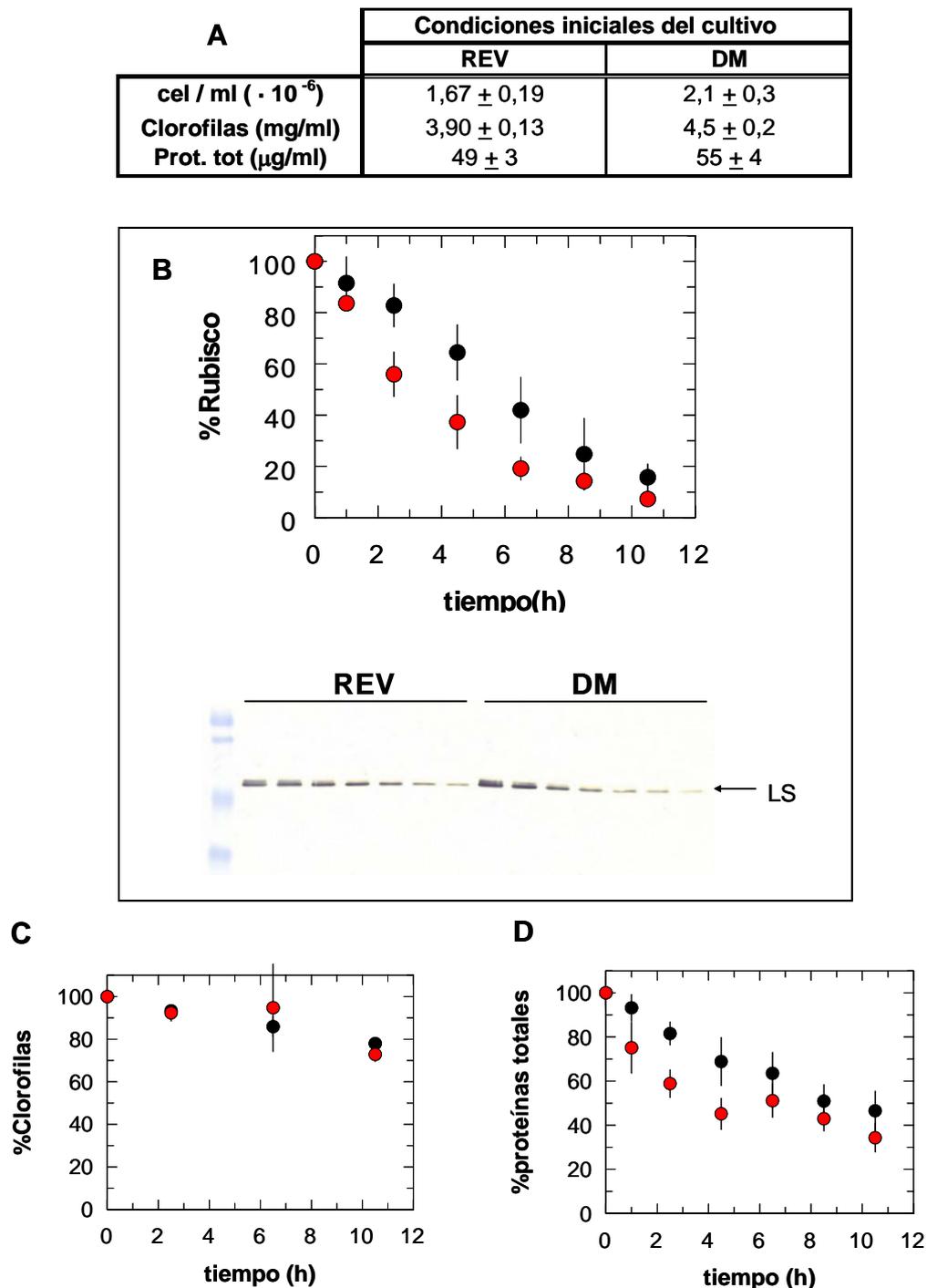


FIGURA 3.9. Degradación de Rubisco (B), clorofilas (C) y proteínas totales (D) en respuesta a estrés salino del doble mutante de *C. reinhardtii* C449S/C459S (●) y de la cepa revertiente silvestre (●). Se representa la media \pm la desviación típica de triplicados expresada como porcentaje de la cantidad inicial de cada parámetro analizado. En la parte inferior de (B) se muestra el resultado del inmunorevelado de la subunidad grande de la Rubisco (LS) en muestras obtenidas del revertiente (REV) y doble mutante (DM) a las 0, 1, 2.5, 4.5, 6.5, 8.5 y 10.5 h de estrés (de izquierda a derecha). En (A) se indican las condiciones iniciales de los cultivos en cuanto a densidad celular, contenido en clorofilas y cantidad de proteínas totales, indicados como la media de tres réplicas \pm la desviación típica.

Estos resultados sugieren de nuevo una cierta redundancia en la función de las cisteínas 449 y 459 en cuanto a la desaparición de la Rubisco en respuesta a estrés salino, de manera que la presencia de cualquiera de ellas contribuiría a un mantenimiento de la proteína durante el estrés.

Con objeto de analizar con mayor profundidad el papel del par Cys 449-Cys459 en las modificaciones de la Rubisco durante el estrés salino, se realizaron experimentos adicionales (que se describen a continuación) centrándose exclusivamente en el estudio comparado del doble mutante y del revertiente silvestre.

2. 2. 2. Formación de agregados de alto peso molecular y movilización de la Rubisco a la fracción membranosa: *La mutación de los residuos 449 y 459 facilita la formación de agregados de alto peso molecular y la movilización de la Rubisco a la fracción membranosa.*

Cuando se aumentó la señal para la detección de la Rubisco en el inmunorevelado (cargando una cantidad 20 veces mayor de la habitual), se observó una acumulación progresiva a lo largo del estrés salino de agregados de alto peso molecular y de fragmentos de degradación procedentes de la subunidad grande (Figura 3.10). Este acúmulo fue mucho mayor en el doble mutante C449S/C459S que en el revertiente silvestre, coincidiendo con una desaparición más rápida en el doble mutante del monómero de la subunidad grande de la Rubisco (Figura 3.9B), y de la señal correspondiente a la subunidad pequeña (Figura 3.10).

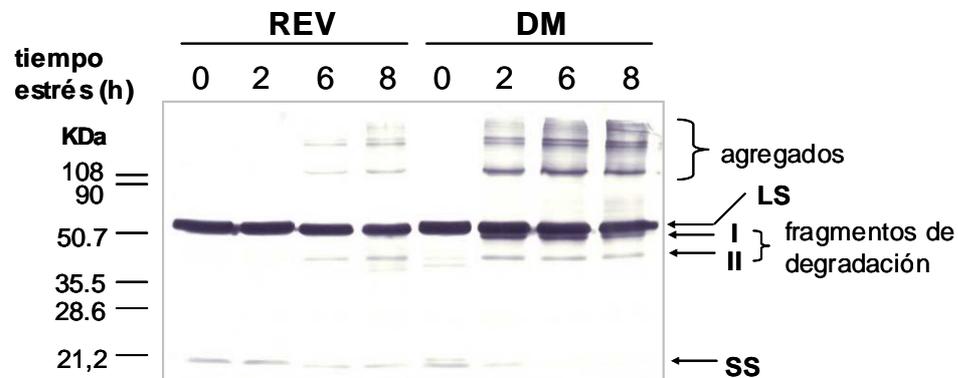


FIGURA 3.10. Formación de agregados de alto peso molecular de la Rubisco en las cepas revertiente silvestre (REV) y doble mutante C449S/C459S (DM) durante el estrés salino. La posición de la subunidad grande (LS) y pequeña (SS) de la Rubisco, así como de los agregados de alto peso molecular y de los posibles fragmentos de degradación (llamados I y II) se indica con flechas y llaves. A la izquierda, se muestra la posición de los marcadores de peso molecular. Las cantidades de muestra cargadas en el gel se normalizaron, igualando el contenido inicial de la Rubisco a tiempo cero de estrés (cuantificado previamente a partir de una membrana donde la señal de la Rubisco se encontraba dentro de los límites de linealidad de la inmunodetección).

Resultados III

Los pesos moleculares estimados de los fragmentos de degradación I (49KDa) y II (42KDa) fueron similares a los de la banda I y la banda II (productos de la proteólisis *in vitro* con subtilisina) respectivamente, pero su identidad no ha podido ser confirmada. La detección de estos fragmentos de degradación sugiere que la desaparición de la Rubisco monomérica se puede explicar por una combinación del proceso de polimerización y de la proteólisis celular. Resulta difícil asignar qué parte de esta desaparición corresponde a degradación y qué parte corresponde a polimerización, dado el riesgo que supone cuantificar estos agregados de alto peso molecular en comparación con el monómero de la subunidad grande (a causa de la menor eficiencia en la electrotransferencia y a las posibles diferencias de inmunoreactividad).

La formación de agregados de alto peso molecular se ha asociado con la movilización de la Rubisco a la fracción membranosa (70), lo que sugiere que en el doble mutante, donde la polimerización de la Rubisco durante el proceso de estrés está acelerada respecto al revertiente, esta relocalización hacia las membranas podría ocurrir también más rápidamente. Por ello, se tomaron muestras a diferentes tiempos de estrés y, tras sonicar las células se centrifugó el extracto crudo, separando la fracción soluble y el sedimento, que contenía los restos de membranas celulares. La proporción de Rubisco procedente de la cepa revertiente en este sedimento aumentó al progresar el estrés, pero en un valor considerablemente menor de lo que lo hizo la Rubisco del doble mutante (Figura 3.11). A la fracción insoluble se asociaron tanto la forma monomérica de la Rubisco como los agregados de alto peso molecular (detectados a las 8h de estrés para el doble mutante).

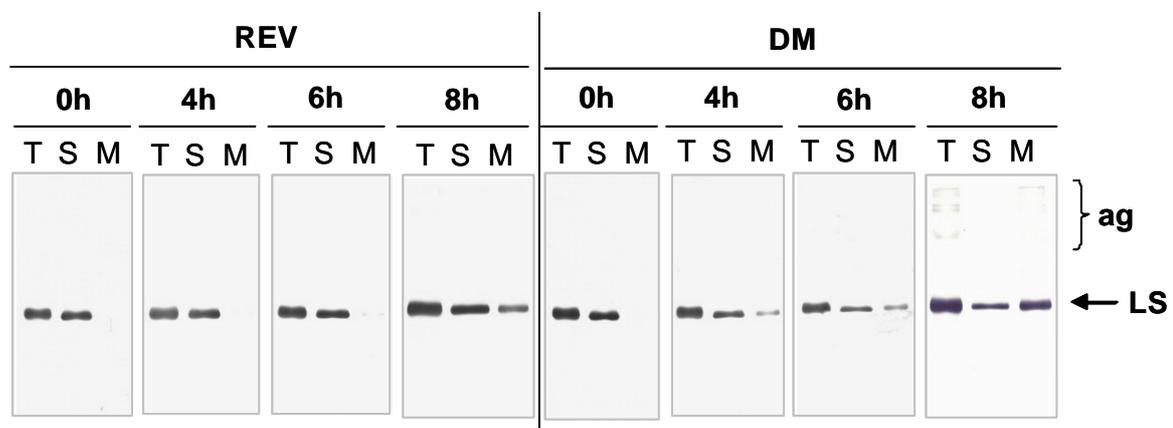


FIGURA 3.11. Reparto de la Rubisco obtenida de las cepas revertiente silvestre (REV) y doble mutante C449S/C459S (DM) entre sobrenadante y sedimento (1500g x 5min) durante el estrés salino. Se muestra la inmunodetección de la Rubisco total (T), soluble (S) y asociada al sedimento (M) tras la sonicación de las células a diferentes tiempos (indicados en la parte superior del panel) de estrés salino y centrifugación del extracto crudo. La posición de la subunidad grande de la Rubisco (LS) se indica con una flecha y la de los agregados de alto peso molecular (ag) con una llave.

Con objeto de confirmar la localización de la Rubisco precipitable por centrifugación en una fracción membranosa, se purificó esta fracción a diferentes tiempos de estrés (0, 4 y 8h), mediante ultracentrifugación en medios de diferente concentración de sacarosa y lavados exhaustivos con tampones de alta y baja fuerza iónica. Se observó efectivamente que la movilización de la Rubisco a la fracción membranosa fue más rápida en el doble mutante que en el revertiente silvestre (Figura 3.12A), con un porcentaje de Rubisco monomérica asociada a la membrana superior al revertiente en todos los tiempos de estrés ensayados (Figura 3.12B). El inmunorevelado confirmó además que los agregados se encontraban mayoritariamente asociados a la fracción membranosa (Figura 3.12A).

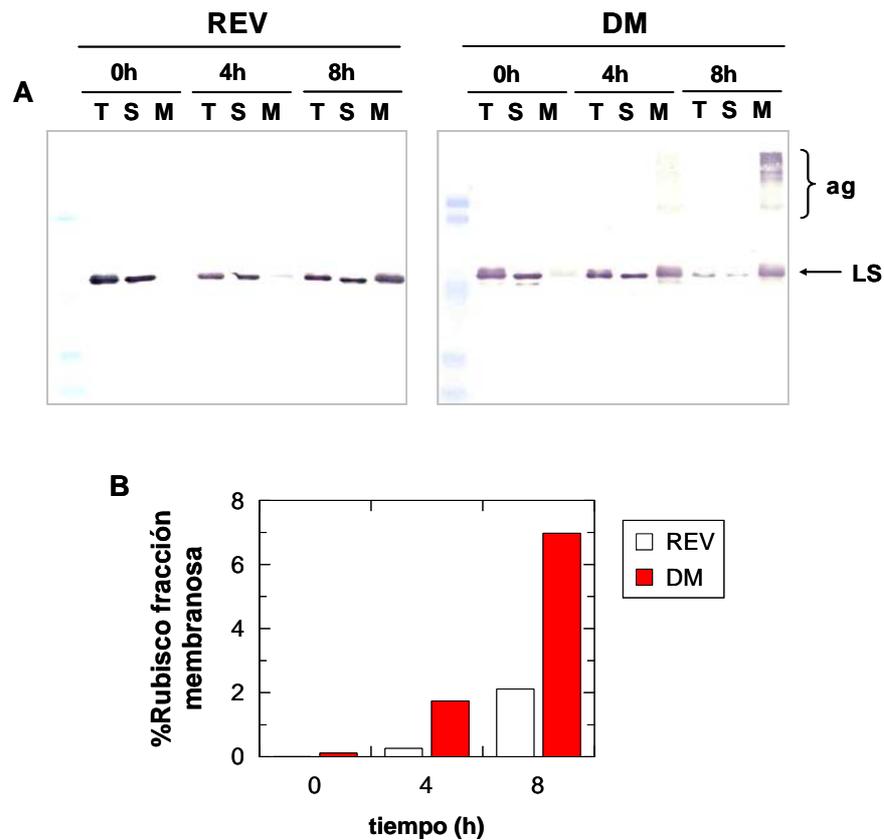


FIGURA 3.12. Movilización a la fracción membranosa de la Rubisco del revertiente silvestre (REV) y del doble mutante C449S/C459S (DM) durante el estrés salino. (A) Inmunodetección de la Rubisco total (T), soluble (S) y fuertemente asociada a la fracción membranosa (M) a diferentes tiempos de estrés (indicados en la parte superior). La posición de la subunidad grande de la Rubisco (LS) se indica con una flecha y la de los agregados de alto peso molecular (ag), con una llave. (B) Porcentaje de Rubisco asociada fuertemente a la fracción membranosa respecto a la Rubisco total para cada tiempo de estrés, calculado a partir de la cuantificación de la banda LS de las carreras T y M en (A), después de corregir por las diferentes cantidades cargadas en la electroforesis, normalizando a un mismo volumen del cultivo inicial.

2. 2. 3. Variación de la fijación fotosintética de carbono: *El doble mutante C449S/C459S experimenta una mayor pérdida de capacidad de fijación fotosintética en respuesta a estrés salino.*

Se estudió también el efecto de la doble mutación C449S/C459S de Rubisco sobre la fijación fotosintética medida *in vivo* mediante la adición de $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ a los cultivos (de forma simultánea al comienzo del estrés) y determinación de la radiactividad fijada a diferentes tiempos de estrés salino.

En los cultivos control (sin estrés), se observó un incremento lineal del CO_2 fijado con el tiempo, indicativo de un ritmo de fijación constante (tal como cabía esperar de una situación estacionaria en ausencia de estrés). Los cultivos de las cepas revertiente y doble mutante mostraron en estas condiciones una actividad de fijación fotosintética similar (Figura 3.13A). Al aplicar el estrés sobre ambos tipos de cultivos, se produjo de forma prácticamente instantánea una detención de la actividad fotosintética, que se fue recuperando progresivamente, dando lugar a una fase de latencia o retardo de aproximadamente 1 h. A continuación, la cantidad de C fijado siguió aumentando, aunque a un ritmo decreciente, hasta detenerse prácticamente a las 4 horas de estrés (Figura 3.13B). Una representación más clara de esta evolución se muestra en la Figura 3.13C, donde se ha calculado para cada intervalo la actividad de fijación fotosintética (pendiente entre puntos consecutivos en B) observada a lo largo del estrés, expresada en porcentaje respecto a la actividad control (pendiente de la recta en A). La actividad de fijación de CO_2 en presencia de estrés salino alcanzó un máximo en torno a los 80 minutos de estrés, pero fue siempre mucho menor (inferior al 5%) que la mostrada en ausencia de estrés, tanto para el revertiente como para el doble mutante. Por otro lado, en presencia de estrés, la actividad relativa del doble mutante fue siempre muy inferior a la del revertiente.

La evolución de la actividad fotosintética durante el estrés puede estar influida por varios factores. Por un lado, el estrés podría tener un efecto directo sobre Rubisco en fases avanzadas del estrés, al aumentar las condiciones oxidantes en el cloroplasto. La modificación (oxidativa) del enzima causaría su inactivación y favorecería los procesos ya mencionados de degradación, movilización a membrana y polimerización. Todo esto tendría como consecuencia la pérdida progresiva de capacidad de fijación fotosintética de carbono y justificaría, quizás, la inactivación tardía. Por otro lado, la detención inicial, parcialmente reversible, de la asimilación de carbono al aplicar el estrés salino resulta más difícil de explicar como efecto directo de un cambio sobre la Rubisco. La rapidez de esta respuesta sugiere un efecto transitorio sobre elementos esenciales del proceso fotosintético (como, por ejemplo, la cadena de transporte electrónico) que pueden ser afectados por el cambio brusco en la osmolaridad y fuerza iónica del medio.

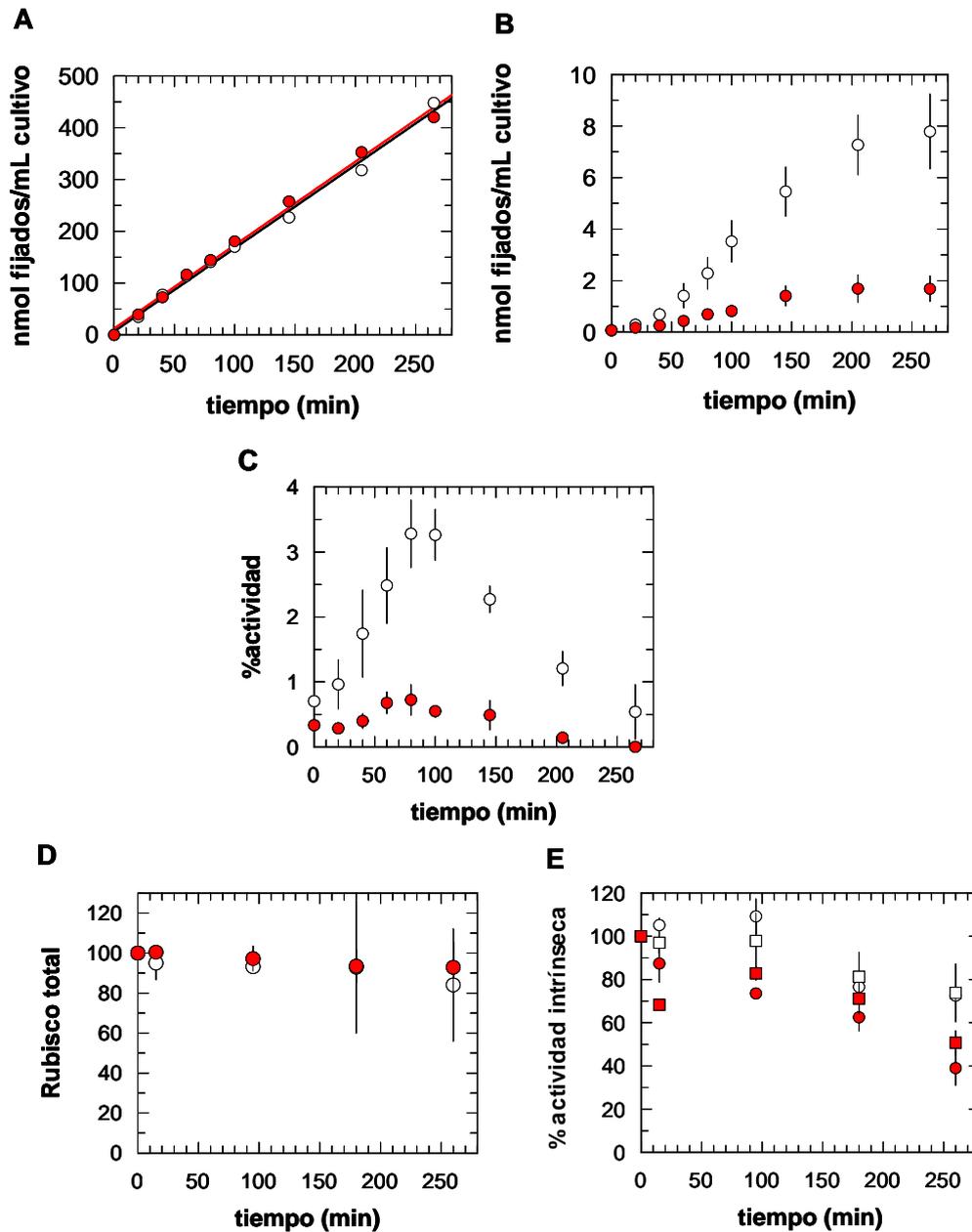


FIGURA 3.13. Fijación fotosintética de CO₂ de los cultivos revertiente silvestre y doble mutante (C449S/C459S) de *C. reinhardtii* durante el estrés salino. Se midió la fijación acumulada de CO₂ a lo largo del tiempo en cultivos control, no estresados (A), y en cultivos estresados con NaCl 0,3M (B) de las cepas revertiente (○) y doble mutante (●). (C) Actividad de fijación fotosintética a diferentes tiempos de estrés, en porcentaje respecto a la actividad en ausencia de estrés, calculado a partir de la pendiente de la curva de la gráfica (B) dividida por la pendiente de la recta correspondiente a la gráfica (A). (D) Evolución de la cantidad de Rubisco en cultivos estresados expresada como porcentaje de la cantidad a tiempo cero de estrés. (E) Evolución de la actividad intrínseca de la Rubisco localizada en fracción soluble (○, ●) y sedimento (□, ■) de extractos obtenidos a partir de cultivos estresados de *C. reinhardtii* revertiente (○, □) y doble mutante (●, ■) tras sonicar las células y centrifugar. Las barras de error representan la desviación típica de triplicados correspondientes a cultivos independientes.

Para investigar este punto, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos del estrés, en paralelo al experimento de fijación *in vivo*, para la medida de la cantidad y actividad de Rubisco en las fracciones soluble y asociada al sedimento, obtenidas tras sonicación de las células y centrifugación.

Se observó que la cantidad de la Rubisco total no varió durante las 4h de estrés (Figura 3.13D), lo que indica que no se produjo una degradación ni una polimerización significativas del enzima durante este intervalo. Asimismo, la fracción de Rubisco asociada al sedimento después de sonicar las células (un 15% de la Rubisco total en el caso del revertiente, y un 20% en el caso del doble mutante) se mantuvo aproximadamente constante durante las 4 horas de estrés tanto en el revertiente como en el doble mutante. Ello contrasta con el comportamiento descrito en el apartado anterior (en el que tanto la formación de agregados como la movilización de la Rubisco al sedimento eran más acusados al cabo de 4h de estrés) y sugiere que las diferencias en las condiciones experimentales empleadas para la medida de la fijación fotosintética (ausencia de agitación orbital continua y distinta intensidad luminosa) producen un efecto más atenuado que las aplicadas en los puntos II.2.1 y II.2.2. Por tanto, habrá que interpretar los resultados en este apartado como una situación de intensidad de estrés diferente al anterior.

A los 15 minutos de estrés, la actividad intrínseca de la Rubisco silvestre (calculada como cociente entre actividad enzimática e intensidad de la señal de inmunorevelado), tanto en forma soluble como en la forma asociada al sedimento, fue idéntica a la obtenida en ausencia de estrés (Figura 3.13E). Por otro lado, al progresar el estrés, la actividad específica de la Rubisco silvestre en ambas fracciones descendió lentamente conservando un 70% de la actividad inicial a las 4 horas de estrés (Figura 3.13E), cuando la fijación fotosintética medida *in vivo* se había detenido casi completamente (Figura 3.13C). En el caso del doble mutante, la actividad intrínseca de la Rubisco (soluble y asociada al sedimento) siguió una evolución paralela aunque fue, desde fases muy tempranas del estrés, ligeramente inferior a la de la Rubisco silvestre (Figura 3.13E). Esta pequeña diferencia no resulta suficiente para explicar la menor fijación fotosintética del cultivo doble mutante (Figura 3.13C).

Por tanto, no parece que una modificación directa e irreversible de la Rubisco pueda justificar la detención de la actividad fotosintética observada durante la fase de latencia, ni la pérdida progresiva de la capacidad de fijación producida en fases avanzadas del estrés. Tampoco explica la especial sensibilidad de la cepa doble mutante a la inactivación *in vivo* durante el estrés salino. Sin embargo, esta mayor pérdida de capacidad de fijación fotosintética en el doble mutante sugiere la implicación de los residuos de cisteína 449 y 459 y, por tanto, de la Rubisco en esta respuesta.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha mostrado que las cisteínas 449 y 459 juegan un papel relevante tanto en la inactivación y susceptibilización proteolítica promovidas por la oxidación de la Rubisco *in vitro*, como en los procesos de inactivación, insolubilización y movilización a membranas asociados al catabolismo de la Rubisco en una situación de estrés *in vivo*.

La mutación de los residuos 449 y 459 no parece tener ningún efecto sobre el funcionamiento del centro activo del enzima en el estado reducido (Tablas 3.1 y 3.2). Sin embargo, la ausencia de estas cisteínas disminuye la inactivación oxidativa del enzima por agentes como la cistamina (Figuras 3.2 y 3.3B), o el Cu^{2+} (Figura 3.3A). Ello sugiere que la oxidación de los residuos de cisteína 449 y 459 contribuye de forma directa o indirecta a los cambios en el centro catalítico que producen la inactivación oxidativa del enzima silvestre. Sin embargo, el hecho de que los enzimas mutantes C449S, C459S y C449S/C459S puedan ser completamente inactivados por reactivos como la iodoacetamida o el DTNB (Figura 3.3B) indica que deben existir vías alternativas de inactivación de la Rubisco por modificación de cisteínas en las que no intervienen los residuos 449 y 459.

Las curvas de inactivación térmica (Figura 3.1), muestran que la sustitución de las cisteínas 449 y 459 produce algún cambio estructural que se refleja en un ligero descenso de la estabilidad del enzima a temperaturas elevadas. El papel estructural de estos residuos a una temperatura fisiológica se manifiesta también en las cinéticas de proteólisis del enzima, en las que se pone en evidencia que la presencia de las cisteínas 449 y 459 favorece de forma redundante la transición conformacional inducida por oxidación que expone el lazo Ser61-Thr68 a la acción de proteasas. Efectivamente, cuando el enzima doble mutante se oxida, presenta valores significativamente inferiores al silvestre para las constantes correspondientes al corte en este lazo (k_2 y k_2' , en un estado de oxidación intermedio, y k_2'' cuando se completa su oxidación) (Tabla 3.3). Dado que el procesamiento en el lazo Ser61-Thr68 induce el desensamblaje y la consecuente degradación no-restringida de la Rubisco *in vitro*, la doble mutación de los residuos 449 y 459 dificulta estos procesos.

En cualquier caso, es obvio que otras cisteínas, además de la 449 y 459, deben contribuir tanto a la inactivación como a la susceptibilización proteolítica del enzima ya que ambos efectos se atenúan, pero no desaparecen, en la Rubisco doble mutante.

El comportamiento *in vivo* de las cepas mutantes pone de manifiesto de nuevo una cierta redundancia funcional de las cisteínas 449 y 459, ya que los fenotipos observados (tanto a nivel de crecimiento y acumulación de biomasa por célula, como de respuesta al estrés salino) se encuentran fuertemente potenciados en el doble mutante respecto a los mutantes

simples, en los que las características fenotípicas se hallan muy disminuídas o incluso ausentes. Así, por ejemplo, la velocidad de desaparición del monómero de la subunidad grande observado en los mutantes simples sometidos a estrés salino es similar a la del revertiente (Figuras 3.7B y 3.8B), mientras que en el doble mutante, esta desaparición se acelera (Figura 3.9B) como resultado de la intensificación conjunta de los procesos de degradación y polimerización. Aunque los experimentos de proteólisis *in vitro* indican que la Rubisco doble mutante es, en principio, más difícilmente degradable que el enzima silvestre, los resultados parecen indicar que esta dificultad no es relevante *in vivo*. La desaparición de la señal de la subunidad pequeña de la Rubisco podría deberse a los mismos procesos de degradación y polimerización que afectan a la subunidad grande. Cabe destacar, en este sentido, que en estas condiciones de estrés no se detecta la formación del dímero p65 (resultado de la unión covalente entre una subunidad grande y una subunidad pequeña, a través de un enlace no disulfuro), descrito como un intermediario en el proceso de polimerización de la Rubisco en *Lemna minor* sometida a estrés osmótico u otras condiciones que dañan la membrana (50, 54). Esto sugiere que el sistema enzimático de la Rubisco oxidasa, que funciona en estos casos en *L. minor* catalizando la formación del dímero p65, no está presente en *C. reinhardtii* o no se induce en las condiciones de estrés salino utilizadas.

Las cisteínas 449 y 459 parecen estar implicadas también en la movilización de la Rubisco a la fracción membranosa en respuesta a estrés salino, ya que la sustitución de ambos residuos por serina acelera esta translocación (Figura 3.12). Esta asociación no se revierte en presencia de un reductor en el medio de extracción ni con lavados de alta o baja fuerza iónica. Una de las vías por las que se puede promover una fuerte asociación de las proteínas hacia las membranas es la modificación postraduccional de cisteínas por palmitoilación (206). En el interior del cloroplasto ha sido demostrada la palmitoilación de la proteína D1 del fotosistema II en *Spirodela* (121). La posibilidad de palmitoilación de la Rubisco en *C. reinhardtii* ha sido examinada y rechazada en un estudio en que se utilizaron cultivos no estresados (150), por lo que cabe considerar la hipótesis de que esta modificación se produzca exclusivamente en condiciones de estrés. Por otro lado, existe la posibilidad de que la llamada fracción membranosa incluya vesículas de pequeño tamaño que podrían ser resistentes al tratamiento por ultrasonidos utilizado para romper las células. En hojas de trigo senescentes se ha detectado la formación de un tipo de cuerpos esféricos (de entre 0.4-1.2µm de diámetro) rodeado de una doble membrana derivada de la envoltura del cloroplasto y que contiene Rubisco en su interior (29). Estos cuerpos se localizan en el citoplasma y en la vacuola y se les ha propuesto como una vía por la que la Rubisco podría entrar en contacto con las proteasas vacuolares. Una tercera posibilidad es que la Rubisco se asocie a membranas por interacción con el RNA de los polisomas tilacoidales. Se ha descrito recientemente que el dominio N-

terminal de la subunidad grande de la Rubisco presenta cierta homología con proteínas de unión a RNA y se ha demostrado que, cuando se oxida, la Rubisco puede unirse a mensajeros de RNA en un proceso cuya función fisiológica sería la regulación de su propia traducción (221). Cabe imaginar que la oxidación de las cisteínas 449 y 459 podría jugar un papel en la transición a la forma que tiene afinidad por el RNA, y que la mutación de estos residuos produciría un enzima en el que dicha transición estuviera desregulada.

Junto a esta movilización a la fracción membranosa, el estrés salino provoca la insolubilización del enzima (Figura 3.11), que fue también más rápida en el doble mutante que en el revertiente. Esta asociación de la Rubisco a una fracción precipitable no se explica únicamente por una fuerte asociación del enzima a las membranas, ya que ésta se limita a un 7% de la Rubisco doble mutante total a las 8h de estrés (Figura 3.12), mientras que para ese mismo tiempo de estrés se puede llegar a precipitar el 50% de la Rubisco total (Figura 3.13). Por tanto, el estrés promueve una serie de modificaciones adicionales del enzima que favorecen su asociación a esta fracción precipitable. Así, por ejemplo, la oxidación podría dar lugar a una forma de Rubisco con una mayor afinidad por los restos de membranas; o aumentar su coeficiente de sedimentación mediante la formación de agregados a través de enlaces disulfuro (no detectados por electroforesis en condiciones reductoras) o de interacciones facilitadas por la exposición parcial (inducida por la oxidación) de zonas hidrofóbicas de la proteína. En todo caso, la sustitución de las cisteínas 449 y 459 aumentaría la sensibilidad de la Rubisco a estas modificaciones.

A la vista de estos resultados, se puede aventurar que estas cisteínas podrían constituir una señal que retrasa los procesos asociados al catabolismo de la Rubisco, de manera que, cuando sus grupos sulfhidrilo desaparecen (por mutación u oxidación), se potencia la degradación, polimerización y movilización a la fracción membranosa del enzima. De esta manera, la pareja de cisteínas 449-459 actuaría como un sensor redox que contribuiría (junto con otras señales) a desencadenar los procesos catabólicos mencionados.

En las condiciones utilizadas, el estrés salino provoca inicialmente una brusca detención de la fijación de CO₂, que no parece deberse a una inactivación directa de la Rubisco (Figuras 3.13C y 3.13E). Se ha descrito que un estrés osmótico (como lo es el estrés salino) provoca daños en las membranas (54), y esto podría afectar directamente al funcionamiento de la cadena de transporte electrónico y en consecuencia a la fijación fotosintética. Las células poseen mecanismos de adaptación a estrés salino, sintetizando solutos compatibles (17) e internalizando el exceso de iones hacia el interior de la vacuola a través de transportadores y canales iónicos (181). Esto permitiría una recuperación transitoria de la capacidad fotosintética de las células (Figura 3.13C). Sin embargo, si el estrés se prolonga, el aumento de las condiciones oxidantes en el cloroplasto puede provocar la inactivación progresiva de cualquiera

de los elementos esenciales en el aparato de fijación fotosintética. El hecho de que esta inactivación tardía esté acentuada en la cepa doble mutante respecto a la cepa revertiente silvestre (Figura 3.13), con la que comparte el mismo fondo genético, sugiere que la Rubisco debe estar implicada de una manera u otra en este proceso. La medida simultánea de la actividad *in vitro* descarta una modificación directa e irreversible de la Rubisco como la única causa de la inactivación fotosintética observada en fases avanzadas del estrés. Sin embargo, no se excluyen otros mecanismos de inactivación de la Rubisco que no se manifiestan en el ensayo *in vitro*. Por ejemplo, una posible inactivación oxidativa por disulfuros (55, 133) podría revertirse parcialmente en las condiciones empleadas en este ensayo (extracción en presencia de 2-mercaptoetanol 5mM). Sin embargo, esto no explicaría el fenotipo diferencial del doble mutante, ya que el comportamiento de la Rubisco *in vitro* indica que a cualquier relación de cistamina/cisteamina, la actividad del enzima doble mutante es igual o mayor que la del silvestre (Figura 3.2). Otra posibilidad es que un aumento en la concentración de NaCl intracloroplástico podría disminuir la actividad carboxilasa de la Rubisco y su factor de especificidad, como se ha descrito que ocurre *in vitro* (184). Una alternativa más sería que el proceso de activación de la Rubisco por la Rubisco activasa estuviera limitado de alguna manera en condiciones de estrés, lo que tampoco sería detectable en el ensayo de actividad *in vitro*. En cualquier caso, las cisteínas 449 y 459 jugarían un papel importante en la inactivación de la fotosíntesis inducida por estrés salino, de manera que cuando se sustituyen ambos residuos, se acelera dicha inactivación (Figuras 3.13C y 3.13E).

Por tanto, los residuos de cisteína 449 y 459 contribuyen de forma apreciable a la modulación redox de los cambios conformacionales del enzima y a los procesos de inactivación, degradación, polimerización y asociación a la fracción membranosa de la Rubisco inducidos por estrés. Los resultados obtenidos refuerzan además la idea de que existen múltiples puntos de control en la estructura de la Rubisco implicados en la regulación redox de todos los procesos asociados al catabolismo del enzima.

CONCLUSIONES

1. La oxidación de las cisteínas conservadas de la Rubisco induce un cambio conformacional progresivo que favorece la exposición del lazo Ser60-Thr68 de la subunidad grande a la acción de proteasas exógenas. El corte proteolítico en este lazo promueve el desensamblaje y la digestión completa del enzima.
2. La proteólisis de la Rubisco por subtilisina puede modelizarse mediante un sistema de tres ecuaciones diferenciales acopladas. El modelo describe correctamente la cinética de proteólisis y puede utilizarse como herramienta para detectar cambios conformacionales y comportamientos anómalos en enzimas mutantes.
3. Los procedimientos utilizados de transformación cloroplástica y nuclear de *Chlamydomonas reinhardtii* han permitido la obtención de mutantes fotosintéticamente activos de cisteínas conservadas de la subunidad grande (C84S, C247S, C284S, C427S, C449S, C459S y C449S/C459S) y de la subunidad pequeña (C41S, C83S) de la Rubisco.
4. Los residuos de cisteína 449 y 459 de la subunidad grande de la Rubisco son necesarios para inactivar completamente el enzima a potenciales redox elevados y favorecen la exposición del lazo Ser60-Thr68 a la acción de proteasas exógenas *in vitro* en condiciones oxidantes.
5. Las cisteínas 449 y 459 tienen un papel aparentemente redundante de forma que su relevancia funcional sólo se pone de manifiesto *in vivo* al sustituir ambos residuos. El doble mutante acumula una mayor cantidad de biomasa por célula en la fase estacionaria de crecimiento y responde al estrés salino intensificando los procesos de agregación, movilización a la fracción membranosas e inactivación, relacionados con el catabolismo del enzima.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Las cepas silvestre (2137 mt+) y mutantes no fotosintéticas (18-7G mt+, 25-B1 mt+ y T60-3) de *Chlamydomonas reinhardtii* fueron proporcionadas por el Dr. Robert Spreitzer (Universidad de Nebraska, Lincoln). Los medios de cultivo para *C. reinhardtii* se basaron en el medio TAP (66), a excepción de las concentraciones de KH_2PO_4 y KH_2PO_4 , que fueron de 0,1434g/l y 0,0725g/l respectivamente, y de 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 igual al anterior eliminando la fuente de carbono al que se denominó medio mínimo. Los medios sólidos se prepararon añadiendo Bacto-agar (Difco) (15g/l).

La concentración celular se determinó, en todos los casos, a partir de una alícuota del cultivo a la que se añadió formaldehído al 3.6%, se diluyó en 10ml de tampón Isoton (Coulter), se sonicó (3-4 pulsos de 5s, 40W) para desaglomerar posibles agregados celulares, y se analizó en un contador Coulter Z2 (con un diámetro de apertura de 100 μm).

Para el seguimiento de las cinéticas de crecimiento de cada mutante (C449S, C459S y C449S/C459S) en paralelo al revertiente silvestre, se inocularon $50 \cdot 10^3$ células/ml de cada cepa 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 el caso de los mutantes simples o por 1 tubo de 20W, a 20cm, en el caso del doble mutante). 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).

Para los experimentos de estrés salino, los cultivos de los mutantes y el revertiente control se crecieron previamente en condiciones controladas, con el objeto de homogeneizar la situación de partida de los cultivos. Las cepas C449S y C459S se crecieron en medio acetato a 28°C en un baño de agua, con agitación por burbujeo de aire filtrado y aplicando ciclos de 12h luz (suministrada por 4 tubos de 15W, a 20cm de los cultivos) / 12h oscuridad, hasta alcanzar una densidad celular superior a $7 \cdot 10^6$ células/ml. En el caso del doble mutante C449S/C459S, los cultivos se inocularon por triplicado y se crecieron en medio acetato a 28°C con agitación orbital continua y aplicando ciclos de 12h luz (de 3 tubos de 30W, a 30cm de los cultivos) / 12h oscuridad, hasta alcanzar una densidad celular de unos $5 \cdot 10^6$ células/ml. Se realizaron dos diluciones de aproximadamente 1/3 (con medio acetato) de estos cultivos, dejando transcurrir entre ambas un nuevo ciclo de luz/oscuridad. 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 $6,8 \cdot 10^6$ células/ml (en el caso del C449S y C459S) o a $4 \cdot 10^6$ células/ml (en el caso del C449S/C459S).

Para la purificación de 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). *Euglena gracilis* (cepa Z Pringsheim) se obtuvo de la Colección de Cultivos de Algas de Göttingen (Universidad de Göttingen, Alemania) y se creció en un medio Euglena broth (DIFCO, Detroit, MI) a la misma intensidad de luz, y condiciones de temperatura y agitación que *C. reinhardtii*. Las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*), arroz (*Oryza sativa*) y morera (*Morus alba*) se obtuvieron de cultivos locales.

2. Obtención de mutantes de *C. reinhardtii*.

2.1. Mutagénesis dirigida de los genes *rbcL* y *rbcS* de *C. reinhardtii*.

Para la mutagénesis de *rbcL*, se partió del plásmido prbcIP 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 prbcIP comprende desde 743pb antes del inicio de la zona codificante de *rbcL* hasta 499pb después del codón final. Para la mutagénesis de *rbcS* se utilizó el plásmido pSS1 que contiene el fragmento EcoRI de 5Kb del genoma nuclear, que incluye el gen *rbcS1*, clonado en pUC19.

La mutagénesis dirigida se llevó a cabo utilizando el kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis de Stratagene, basado en la amplificación *in vitro* sobre un plásmido molde a partir de oligonucleótidos sintéticos mutados, complementarios a la región que se desea mutageneizar, 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. El doble mutante C449S/C459S se obtuvo por el mismo protocolo utilizando como molde de partida el plásmido con la mutación C459S e introduciendo sobre él la mutación C449S. La reacción de amplificación y la transformación de las células de *E. coli* con el DNA resultante se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante del kit de mutagénesis. De las colonias recuperadas se aisló el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (16) y se confirmó la presencia de la mutación mediante un análisis diferencial con el enzima de restricción correspondiente en cada caso. Los plásmidos seleccionados se nombraron como pC84S, pC247S, pC284S, pC427S, pC449S, pC459S y pC449S/C459S (para los mutantes en *rbcL*) y psC41S, psC83S (para los mutantes en *rbcS1*).

Los plásmidos mutantes se purificaron con el kit QIAquick Gel extraction de Qiagen, se cuantificaron espectrofotométricamente (suponiendo que 1 unidad de densidad óptica equivale a 50µg/ml de DNA) y se utilizaron para la transformación de *C. reinhardtii*.

2.2. Transformación de *C. reinhardtii*.

2.2.1. Transformación del cloroplasto.

La transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* (en el caso de los mutantes de *rbcL*) se realizó de acuerdo con el procedimiento de Boynton *et al.* (20) mediante bombardeo de microproyectiles de tungsteno cargados con los plásmidos mutantes utilizando el dispositivo biolístico PDS-1000/He (Bio-Rad). Como organismo receptor se utilizó una cepa no fotosintética de *C. reinhardtii*, bien 18-7G (que posee una mutación sin sentido en el codón 66 de *rbcL*) (193), en el caso de las mutaciones C84S, C449S, C459S y C449S/C459S, o bien 25B-1 (que posee una inserción de 0.48Kb en el sitio PstI de *rbcL*, que coincide con el codón 418) (140), en el caso de las mutaciones C247S, C284S y C427S. Previamente a la transformación, se redujo la ploidía del cloroplasto de la cepa receptora (crecida en medio acetato en oscuridad) mediante un tratamiento con 5-fluor-2´desoxiuridina 1mM durante aproximadamente 7 divisiones celulares (218), para dificultar la generación de revertientes por recombinación. Tras este tratamiento, se concentraron las células por centrifugación en botellas estériles (2500g x 5min), y se extendieron en placas de medio acetato (aproximadamente $0.8 \cdot 10^8$ células/placa), dejándolas secar durante 2h en oscuridad.

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 se resuspendieron 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 CaCl₂ 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 sedimento 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. Dos horas después de la transformación, cada placa se dividió en 2 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 tres muestras se resembraron en diferentes placas de medio mínimo y se dejaron crecer las colonias transformantes durante más de 20 días.

La transformación de ambas cepas no fotosintéticas con todas las construcciones mutadas dio lugar a colonias fotosintéticamente competentes (capaces de crecer en un medio de selección iluminado sin fuente de carbono). Se purificó el DNA de estas colonias (1ª ronda de transformantes) utilizando un protocolo establecido en (192), y se amplificó el gen *rbcL* por la reacción en cadena de la polimerasa (167), utilizando como cebadores diferentes combinaciones de los oligonucleótidos fwd1 (bases de +54 a +68) y fwd15 (bases -159 a -142) en 5´ con rev8 (+1498 a +1484) y rev16 (bases +1756 a +1732) en 3´. Las condiciones de la reacción fueron una preincubación a 94°C durante 5min seguida de 35 ciclos de tres segmentos (1min a 94°C, 1min a 50°C y 2min a 72°C) y con un tiempo de extensión final de 10min a 72°C. Para facilitar la reacción de PCR de *rbcL* se digirió previamente el DNA con *Hae*III (secuencia reconocida GGCC) en el caso de los mutantes con el fondo genético de 18-7G o *Nla*IV (secuencia reconocida GGNNCC) con los mutantes obtenidos de 25-B1, enzimas que no cortan en el interior de *rbcL*. La presencia de la mutación se detectó por análisis de restricción del producto de PCR. Se realizaron rondas sucesivas de aislamiento y resiembra de las colonias en medio mínimo hasta alcanzar la homoplasmicidad, confirmada por análisis de restricción. Una de las colonias seleccionadas en medio mínimo a partir de la transformación con el plásmido pC459S, 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 los experimentos con los mutantes obtenidos en 18-7G. Por último, en el caso de los mutantes C449S, C459S, C449S/C459S y en el caso del revertiente silvestre se comprobó la presencia de la mutación deseada y la ausencia de mutaciones adicionales en la región codificante de *rbcL* completa mediante secuenciación 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 espaciados unos 200pb, que cubren toda la región codificante de *rbcL*, siete en sentido de 5´ a 3´ y siete en sentido de 3´ a 5´, de manera que se obtuvieron al menos dos lecturas de cada región.

2.2.2. Transformación nuclear.

La transformación nuclear de *C. reinhardtii* (en el caso de los mutantes de *rbcS*) se realizó mediante electroporación de la cepa T60-3, en la que se han eliminado los dos genes (*rbcS1* y *rbcS2*) correspondientes a la familia génica de la subunidad pequeña de Rubisco en

C. reinhardtii (94). Las células de T60-3 se crecieron en 200ml de medio acetato en oscuridad hasta una densidad de $2 \cdot 10^6$ células/ml, se sedimentaron por centrifugación (1000g x 4min) y se resuspendieron en 0.8ml de medio acetato con sacarosa 50mM. Se tomaron 250 μ l de la suspensión celular y se añadieron 2.5 μ g del plásmido mutante purificado en una cubeta de electroporación de 4mm de anchura. La electroporación se llevó a cabo a 25 μ F de capacitancia y 0.75 kV. A continuación, se mantuvo la cubeta durante 10min a temperatura ambiente y se añadieron 500 μ l del medio acetato con sacarosa 50mM, transfiriendo después el contenido de la cubeta a un matraz erlenmeyer con 50ml de medio acetato, donde se dejaron recuperar las células durante 2 días en oscuridad. De cada uno de los cultivos se sembraron 10 placas de medio mínimo (200 μ l/placa) y se dejaron crecer los transformantes durante 30 días. De las colonias recuperadas en el medio de selección, se purificó el DNA y se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (utilizando como cebadores la pareja sfwd (5´GCC CGG CCC GCT CCA GCG TG 3´) y srev (5´GCG TTT GGG GGA AAC CAA TAG 3´). Las condiciones de la reacción fueron una preincubación durante 10min a 95°C seguida de 35 ciclos de tres segmentos (1min a 95°C, 2min a 57°C y 2min a 72°C), con una extensión final de 10min a 72°C. La presencia de la mutación se confirmó por análisis de restricción del producto de PCR.

La cepa T-60 transformada con el gen *rbcS1* silvestre y la 25-B1 transformada con el gen *rbcL* silvestre, fueron cedidas por el Dr. Robert Spreitzer (Departamento de Bioquímica, Universidad de Nebraska, Lincoln).

3. Purificación de la Rubisco.

Las células de *C. reinhardtii* y de *E. gracilis* se sedimentaron mediante centrifugación (3000g x 5min), se lavaron en agua destilada y se congelaron en nitrógeno líquido, almacenándose a -80°C hasta el momento de utilizarlas. Inicialmente se resuspendieron unos 6-10g de peso fresco de células (aproximadamente $5 \cdot 10^{10}$ células) en tampón de homogeneización (Tris-H₂SO₄ 100mM, MgSO₄ 10mM, β -mercaptoetanol 20mM, pH 8) en una proporción de 5ml/g de peso fresco. Las células se sonicaron (12 pulsos de 30s, 75W, separados 30s) en un baño de hielo. Alternativamente, la Rubisco de hojas de espinaca, arroz y morera recién recogidas (unos 10g) se extrajo en un triturador de cuchillas con tampón de homogeneización (4ml/g de peso fresco) y se filtró a través de muselina. En todos los casos, 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 (NH₄)₂SO₄ entre el 35 y el 60% de saturación. El precipitado de la centrifugación final (15000g x 15min) se resuspendió en 2.5ml de tampón G (Tris-H₂SO₄ 10mM, MgSO₄ 10mM, NaHCO₃ 10mM, β -mercaptoetanol 1mM, pH 8) y se desaló en una columna de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia), equilibrada con el mismo 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 G, aplicando aproximadamente 1.75ml sobre cada uno de ellos. A continuación los gradientes se centrifugaron a 132000g x 4h en un rotor de ángulo fijo (55.2 Ti, Beckman). Al finalizar la centrifugación se fraccionaron los gradientes pasándolos por 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 de DEAE celulosa equilibrada con tampón Tris-H₂SO₄ 10mM pH 7.8. La muestra diluida 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 (NH₄)₂SO₄ (0-0.15M, en tampón de equilibrado).

De forma alternativa a la cromatografía en DEAE-celulosa, se realizó una cromatografía líquida de resolución rápida (FPLC) en una columna de intercambio aniónico Resource Q (Amersham-Pharmacia) de 1ml, equilibrada previamente con Tris-HCl 20mM pH 7.5, y cargada con el volumen total de las muestras fraccionadas 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 2ml/min y se recolectó directamente el pico de la Rubisco detectado espectrofotométricamente a la salida de la columna.

Finalmente, las muestras correspondientes al pico de la Rubisco fueron transferidas a tampón de activación (Tris-HCl 100mM, MgCl₂ 10mM, NaHCO₃ 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, tomando un $\epsilon^{1\%} = 15.7$ a 280nm (basado en los datos revisados por (49)). El análisis electroforético indicó que la Rubisco constituía más del 95% de la proteína contenida en la preparación final.

En los experimentos de determinación del factor de especificidad y de constantes cinéticas se utilizó un protocolo de purificación de Rubisco diferente:

C. reinhardtii se creció en 250ml de medio acetato sin luz hasta saturación, añadiendo entonces 250ml de medio acetato, y dejando crecer los cultivos durante 1 día más. Las células se sedimentaron a 2000g x 15min y el sedimento se resuspendió en 1.5ml de tampón de extracción (Bicina 50mM, MgCl₂ 10mM, NaHCO₃ 10mM, DTT 1mM, pH 8). La lisis celular se llevó a cabo mediante sonicación (6 pulsos de 30s separados 30s), y después de centrifugar 30000g x 15min para eliminar los restos celulares, se cargó un 1ml del sobrenadante sobre un gradiente de sacarosa (10-30% (p/v), en tampón de extracción). Se centrifugó a 90000g x 20h en un rotor basculante (SW 41Ti, Beckman) y posteriormente se procedió al fraccionamiento del gradiente. Se recogió el pico correspondiente a la Rubisco y se pasó a tampón de ensayo

(Bicina 50mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM pH 8.3) mediante desalado en una columna Sephadex G-25 (NAP-10, Amersham-Pharmacia), equilibrada con el mismo tampón. La proteína se concentró por centrifugación en un tubo Centricon (modelo YM-100, Millipore) hasta 2mg/ml. La cuantificación de la Rubisco se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford (con el reactivo de Bio-Rad) utilizando seroalbúmina bovina como patrón. Para la determinación del factor de especificidad, la proteína se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C, mientras que, para el ensayo de las constantes cinéticas, se utilizó inmediatamente.

4. Determinación de la actividad carboxilasa.

La Rubisco purificada (20µl) o procedente de un extracto crudo (50 µl) se incubó durante 10 minutos a 30°C en tampón de activación (Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 10mM, NaHCO₃ 10mM pH 8.2) en un volumen final de 200µl. La reacción se inició añadiendo 50µl de una mezcla de Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 10mM, [¹⁴C]-NaHCO₃ 55mM (1,5·10⁹ 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 NaHCO₃ no fijado se evaporó como CO₂ en una estufa con conexión a vacío a 90°C. El residuo seco se resuspendió en 200µl de H₂O, se evaporó de nuevo en las mismas condiciones y finalmente se redisolvió en 200µl de H₂O. Se añadieron 3ml de mezcla de centelleo (Cocktail-22 Normascint, Scharlau) y se midió la radiactividad del ¹⁴C 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, a los 50µl de la mezcla radiactiva con la que se inició el ensayo, se les añadieron 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 contó su radiactividad.

5. Determinación del factor de especificidad de la Rubisco.

Se utilizó el método de Jordan y Ogren (85), basado en la determinación simultánea de las actividades carboxilasa y oxigenasa con [1-³H]RuBP y NaH¹⁴CO₃. Se preincubó la Rubisco (20µg/reacción) con NaH¹⁴CO₃ (5Ci/mol) 20mM (en tampón Bicina 50mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM, pH 8.3) durante 15min a 25°C en un volumen de 490µl en un tubo cerrado y previamente insuflado con O₂ 100% a través de un tapón de goma. La reacción se inició mediante la adición de 10µl de [1-³H]RuBP (7.2 Ci/mol) 2.87mM y se mantuvo a 25°C durante 30min hasta ser detenida con 100 µL de ZnSO₄ 50mM en HCl 0,5M. La mezcla se neutralizó con 100µl de cacodilato de sodio 1.5M antes de añadir 100µl de una mezcla de 3-fosfoglicerato 0.2M y 2-fosfoglicolato 0.5mM. A continuación se añadieron 100µl de fosfoglicolato fosfatasa (0.25 unidades, en tampón cacodilato de sodio 1.5M, ZnSO₄ 2mM, citrato de sodio 10mM, pH

6.3) y se dejó incubar la mezcla durante 30min a 30°C, deteniéndose la reacción con 900µl de ácido fórmico 1N.

Se tomó una alícuota de 750µl, a la que se añadieron 100µl de HCl 1M y se evaporó el exceso de NaHCO₃ a 80°C durante una noche. La actividad carboxilasa se determinó directamente midiendo la radiactividad fijada en forma de ¹⁴C en esta alícuota en un contador de centelleo.

Otra alícuota de 750µl de la mezcla de reacción 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 (derivado del 2-fosfoglicolato) lavando la columna 4 veces con 750µl de ácido fórmico 1N, se liofilizó una alícuota de 1.5ml del eluido. La actividad oxigenasa se determinó a partir de la radiactividad de ³H en medida en esta muestra en un contador de centelleo.

6. Determinación de las constantes cinéticas de la Rubisco.

Las constantes de Michaelis para el CO₂ y O₂, así como la velocidad máxima para la reacción de carboxilación se determinaron midiendo la fijación de ¹⁴C a partir de NaH¹⁴CO₃. La Rubisco previamente activada con NaHCO₃ 10mM a 4°C durante una noche, se incubó (5µg/reacción) durante 1min a 25°C, con diferentes concentraciones de NaHCO₃ (de 0 – 16mM) en un tampón Bicina 50mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM, RuBP 0.76mM, pH 8.5 en dos condiciones diferentes: en un medio equilibrado con 100% de N₂ o con 100% de O₂. De la representación de dobles inversos de la actividad carboxilasa (medida en condiciones anoxigénicas) frente a la concentración de CO₂ (calculada a partir de la de NaHCO₃, tomando pKa = 6.1352, (220)) se obtuvieron la velocidad máxima y las constantes de Michaelis para la carboxilación. A partir de las relaciones de la velocidad de carboxilación en ausencia de oxígeno respecto a la velocidad de carboxilación en presencia de oxígeno, a las diferentes concentraciones de CO₂ del ensayo, se calculó la constante de Michaelis para el O₂.

7. 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 0.2 mg/ml en tampón de activación (Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 10mM, NaHCO₃ 10mM pH 8.2) se incubó habitualmente con cisteamina 40mM o cistamina 20mM, respectivamente, durante 2h a 30°C bajo una atmósfera de nitrógeno en una estufa de vacío.

En el caso de los tratamientos específicos con diferentes agentes oxidantes (arsenito de sodio, sulfato de cobre, glutatión oxidado, cistamina, iodoacetamida, ácido iodoacético, ditionitrobenzoato) a las concentraciones especificadas en cada caso, las incubaciones de la

Rubisco se realizaron en las mismas condiciones utilizadas en el tratamiento con cistamina o cistamina.

8. Proteolisis de la Rubisco.

8. 1. Ensayo de proteolisis.

Para la digestión con subtilisina y proteinasa K, se mezclaron 80 μ l de la Rubisco reducida u oxidada con 20 μ l de proteasa (2.5 μ g/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 μ 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 electroforesis. Para la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), se añadieron 55 μ l de tampón de carga SDS 3X [Tris-HCl 0.188M, β -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 5min. Para la electroforesis nativa en gradiente de poliacrilamida (PAGGE), se añadieron 55 μ l de tampón de carga no desnaturizante 3X [Tris-HCl 0.2M, β -mercaptoetanol 0.6M, glicerol 25% (p/v), azul de bromofenol 0.075% (p/v), pH 8] sin hervir.

En el caso del resto de proteasas (tripsina, quimiotripsin y proteasa V8), el procedimiento fue el mismo excepto por que la reacción se detuvo directamente añadiendo 50 μ l del tampón de carga SDS 3X, e hirviendo inmediatamente después. Las concentraciones finales de las proteasas se dan en los pies de figura.

Además, en el caso de las proteasas sensibles al ambiente redox (tripsina y quimiotripsina), el exceso de cistamina y cisteamina de las Rubiscos reducida y oxidada se eliminó antes del ensayo de proteolisis, pasando el enzima por una columna de Sephadex G-25 (NAP-10, Amersham-Pharmacia Biotech) equilibrada con el tampón de activación.

8.2. Ajuste matemático al modelo de proteolisis.

Los sistemas de ecuaciones diferenciales (ecuaciones 1-3 y las otras alternativas consideradas en el apartado de *Resultados* del capítulo I) 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 test de χ^2 (utilizando una estimación independiente de la variabilidad analítica a partir de duplicados independientes de 26 muestras) y con el coeficiente de determinación (26). El error estándar

de las constantes se calculó utilizando el procedimiento de remuestreo virtual conocido como jackknife (43).

9. Electroforesis, transferencia a membranas e inmunorevelado de la Rubisco.

La SDS-PAGE discontinua se realizó como se ha descrito previamente (55) utilizando geles resolutivos del 10% o del 14% de poliacrilamida. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con Coomassie R-250 0.1% en una mezcla de metanol 46% (v/v) y ácido acético 8% (v/v). En otros casos, las proteínas se electrotransfirieron desde los geles a membranas de polivinildifluorideno (PVDF, Bio-Rad) a 20V durante una noche 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 contra la Rubisco purificada de *Euglena gracilis* (56) y, como secundario, un anticuerpo 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). Para la secuenciación N-terminal, las proteínas se electrotransfirieron a membranas PVDF de grado de secuenciación (Immobilon P^{SO}, Millipore) y se tiñeron brevemente con azul Coomassie R-250, como se ha descrito antes. Las bandas de proteína seleccionadas se cortaron y se enviaron a los servicios de secuenciación del Laboratorio de Proteómica perteneciente al Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) o del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Nebraska en Lincoln.

La electroforesis de la Rubisco nativa se llevó a cabo tanto en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida (PAGE) como en geles de gradiente de poliacrilamida (PAGGE). Los geles no desnaturalizantes para PAGE 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. La electroforesis se corrió durante una noche a 35V con Tris-glicina 50mM pH 8.3 como tampón del electrodo.

Los geles de gradiente de poliacrialmida del 5-30% se prepararon en tampón Tris-HCl 0.375M, pH 8.9. La PAGGE se llevó a cabo en tampón Tris-glicina 50mM pH 8.3 hasta 2000V·hora. Los geles se tiñeron con azul Coomassie R-250 como se ha descrito antes. De forma alternativa, para la identificación de los polipéptidos ensamblados en el complejo holoenzimático, los geles se tiñeron con azul Coomassie R-250 al 1% (p/v) en agua. Las bandas de holoenzima se recortaron del gel, se dividieron en dos y se mezclaron en un tubo Eppendorf con 30µl de tampón de carga SDS 1X [Tris-HCl 63mM, β-mercaptoetanol 0.2M, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0.025% (p/v)] hirviéndolas durante 5 minutos. Tras dejar difundir los polipéptidos desde el gel durante 72h a temperatura ambiente,

la mezcla se centrifugó (1500g x 1min) y una alícuota del sobrenadante se corrió en SDS-PAGE.

Las electroforesis de DNA en agarosa se corrieron en tampón TAE (Tris 0.04M, ácido acético 0.02M, Na₂EDTA 2mM) durante aproximadamente 1h a 90V, preparando previamente las muestras con tampón de carga 6x (Na₂EDTA 0.06M pH 8, Ficoll 400 12%, SDS 0.6%, azul de bromofenol 0.15%, xilencianol 0.15%).

10. Análisis bioquímico de *C. reinhardtii*.

10.1. Toma de muestras.

De los cultivos crecidos hasta la fase estacionaria en diferentes condiciones (medio acetato con luz, medio acetato sin luz y medio mínimo) se tomaron alícuotas de 0.2ml por duplicado de cada cultivo para la determinación de la densidad celular. A la vez, se tomaron alícuotas por triplicado de 1ml para la determinación de clorofilas y de 1.5 ml para el resto de los análisis. Las células de esta última alícuota se sedimentaron por centrifugación (1500g x 2min) y se resuspendieron en 350 µl de tampón de extracción (Tris-HCl 100mM, MgCl₂ 20mM, EDTA 1mM, pH 7.8). Posteriormente se sonicaron (4pulsos de 5s, 75W) y, después de sedimentar los restos celulares por centrifugación (1500g x 5min, 4°C), se tomaron diferentes alícuotas del sobrenadante: 50µl para la determinación de actividad carboxilasa por duplicado, 40µl para la cuantificación de la Rubisco por SDS-PAGE, transferencia a membrana e inmunorevelado, y entre 90-160µl para la medida de proteínas totales.

10.2. Determinación del contenido en clorofilas.

Se partió de alícuotas de 1ml de cultivo, de donde 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: Clorofilas totales (µg/ml) = 20,2 · Abs(645nm) + 8.02 · Abs(663nm) (11).

10.3. Determinación de la cantidad de proteínas.

Las proteínas de los extractos se precipitaron con TCA al 10% a 4°C durante una noche y se determinaron por el método de Lowry (113). Para ello, el precipitado se recogió por centrifugación (1500g x 10min, 4°C), se lavó con 200µl de acetona, para eliminar los restos de ácido, y tras una segunda centrifugación (1500g x 5min, 4°C), se resuspendió en 0,5ml de Lowry A (Na₂CO₃ 2%(p/v) en NaOH 0,1M). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y se les añadió 0,5ml de Lowry C, preparado como una mezcla 50:1:1 de

LowryA/LowryB1(CuSO₄·5H₂O 0,5% (p/v) en H₂O)/LowryB2(Na/K tartrato 1%(p/v) en H₂O). Las mezclas se incubaron de nuevo a temperatura ambiente durante 10min, y el color se desarrolló finalmente con 0,1ml de Lowry D (mezcla 1:1 de H₂O/ reactivo de Folin-Ciocalteu, Panreac). Se dejó completar la reacción a temperatura ambiente durante 30 min, los restos celulares se sedimentaron por centrifugación (1500g x 5min) y se midió la absorbancia a 700nm. Como patrón se utilizó seroalbúmina bovina (0-80µg).

11. Seguimiento del estrés salino.

El estrés salino (NaCl a una concentración final de 0.3M en medio acetato) se aplicó por duplicado en el caso de los mutantes simples (C449S y C459S) y por triplicado en el doble mutante (C449S/C459S). 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 (11 h) se tomaron periódicamente muestras para la determinación de la cantidad de Rubisco total, proteínas totales (de las células resuspendidas directamente en tampón de carga de electroforesis SDS1X) y clorofilas. Asimismo, se determinó el reparto de la Rubisco total (T) entre una fracción soluble (S) y otra sedimentable (M) por centrifugación a 1500g x 5min de un extracto crudo obtenido por sonicación (4 pulsos de 5s, 75W) de alícuotas (2.7ml) de los cultivos. Las muestras T, S y M se cargaron en un gel de SDS-PAGE en cantidades correspondientes al mismo volumen de cultivo.

Para la purificación de la fracción membranosa se tomaron muestras de 35ml de cultivo, se sedimentaron las células (1100g x 9min) y se congeló el sedimento, sumergiéndolo en N₂ líquido y guardándolo a -80°C, hasta su posterior procesamiento.

12. Purificación de la fracción membranosa de *C. reinhardtii*.

Las células se resuspendieron en 1ml de tampón de extracción (+ β-mercaptoetanol 5mM) y se sonicaron (9-13 pulsos de 5s, 70W). Para la purificación de la fracción membranosa se utilizó un protocolo, adaptado a partir del descrito en (56), por el que se eliminaron previamente las células no rotas por la sonicación para sustraerlas de la medida de la Rubisco total y, a continuación, se separó la fracción soluble de la membranosa mediante ultracentrifugaciones sucesivas sobre sacarosa al 40% y al 20%, y lavados exhaustivos de la fracción membranosa con tampones de alta y baja fuerza iónica. Se emplearon tubos de centrifuga Ultra-Clear (13x51mm, Beckman) de 5ml. Inicialmente, se aplicaron 840µl del extracto total sobre 4ml de sacarosa al 40% (en tampón MOPS 10mM, MgCl₂ 4mM, pH 7.8) y se centrifugaron a 72000g durante 60min (4°C). En este paso, las células intactas sedimentaron en el fondo del tubo, mientras que la fracción membranosa no penetró en el medio con sacarosa al 40%. Se tomaron 2ml de la fase superior y se diluyeron con 2ml de

tampón MOPS 10mM, MgCl₂ 4mM, pH 7.8 separando de aquí una muestra para cuantificar la Rubisco total. El resto de la mezcla (3.7ml) se aplicó sobre 1.2ml de sacarosa 20% (en tampón MOPS 10mM, MgCl₂ 4mM, pH 7.8), y se centrifugó a 72000g durante 2h (4°C). Tras este paso, la fracción membranosa sedimenta en el fondo del tubo, mientras que la Rubisco soluble permanece en el sobrenadante. Se tomaron 4ml de la parte superior para la cuantificación de la Rubisco soluble y el volumen restante se descartó. El sedimento se resuspendió en 1ml de NaCl 300mM (en tampón de extracción + 5mM β-mercaptoetanol) mediante sonicación (2 pulsos de 1s, 75W). Se completó el volumen del tubo con 3.9ml más de NaCl 300mM y se centrifugó a 100000g durante 30min (4°C). Se repitió de nuevo el lavado con NaCl 300mM de la misma manera y el sedimento se resuspendió después en 5ml de tampón Tris 10mM pH 7.8. Tras una última centrifugación (100000g x 30min, 4°C) el sedimento se resuspendió finalmente en 120μl de Tris-HCl 10mM pH 7.8, y se utilizó para cuantificar la Rubisco asociada fuertemente a la fracción membranosa. Las muestras obtenidas de la Rubisco total, soluble y asociada a membrana se cargaron en un gel en una relación 1 : 0.75 : 67 correspondiente al volumen de cultivo inicial, y se corrieron en SDS-PAGE para su posterior transferencia a membrana e inmunodetección.

13. Ensayo de fijación de CO₂ *in vivo* durante el estrés.

El estrés salino (NaCl 0,3M en medio acetato) se aplicó por triplicado (sobre cultivos crecidos independientemente) en tubos de cultivo de 5ml iluminados por una bombilla de luz blanca de 100W situada a 25cm. Los tubos se mantuvieron en un baño de agua a 30°C y fueron 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 se inició añadiendo 1450μl del cultivo (4.5·10⁶ células/ml) sobre una mezcla preparada con 150μl de [¹⁴C]-NaHCO₃ 40mM (5·10⁹ dpm/mmol) y 2.5ml de NaCl 0,9M en medio acetato (o 2,5ml de medio acetato en el caso del control). 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 NaHCO₃ se evaporó como en el ensayo de actividad carboxilasa *in vitro* y se midió la radiactividad fijada de la misma manera.

La radiactividad específica del CO₂ fijado se calculó a partir de la medida de radiactividad correspondiente a 12.5μl de la disolución [¹⁴C]-NaHCO₃ 40mM, añadiendo 3ml de la mezcla de centelleo alcalina.

Para la medida simultánea de la cantidad y actividad de la Rubisco en el extracto, se dispuso, en paralelo, una segunda fila de tubos de cultivo de 15ml. En este caso el estrés se inició añadiendo 2.5ml de NaCl 0,9M en medio acetato (o medio acetato en el caso del control) a una mezcla de 4530μl de células (4.5·10⁶ células/ml) y 470μl de NaHCO₃ 40mM.

Materiales y métodos

Periódicamente, se tomaron alícuotas para la cuantificación de la Rubisco total y para la determinación de la actividad específica de la Rubisco. En este último caso, las células correspondientes a 1.5ml de cultivo, se sedimentaron (1500g x 1min), se resuspendieron en 350µl de tampón de extracción (+ β-mercaptoetanol 5mM) y se sonicaron (4 pulsos de 5s, 75W). Después de centrifugar a 1500g x 5min (4°C) se tomaron 200µl del sobrenadante, utilizando 2 x 50µl para ensayar la actividad por duplicado y 60µl para cuantificar la Rubisco soluble. El resto del sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 200µl de tampón de activación. En el sedimento resuspendido se midió la actividad carboxilasa y la cantidad de Rubisco como en la fracción soluble. Las actividades de la Rubisco soluble y asociada al sedimento se dividieron por la cantidad de Rubisco determinada por SDS-PAGE, transferencia a membrana e inmunodetección, para calcular la actividad específica intrínseca de la Rubisco de cada fracción.

BIBLIOGRAFÍA

1. **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.
2. **Adam, Z. y Clarke, A. K.**(2002) Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends Plant Sci.* **7**: 451-456.
3. **Aizawa, K. y Miyachi, S.**(1986) Carbonic anhydrase and CO₂ concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria. *FEMS Microbiol.Lett.* **39**: 215-233.
4. **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.
5. **Andersson, I.**(1996) Large structures at high resolution: the 1.6 Å crystal structure of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase complexed with 2-carboxyarabinitol bisphosphate. *J.Mol.Biol.* **259**: 160-174.
6. **Andersson, I. y Taylor, T. C.**(2003) Structural framework for catalysis and regulation in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Arch.Biochem.Biophys.* **414**: 130-140.
7. **Andrews, T. J. y Ballment, B.**(1983) The function of the small subunits of ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase. *J.Biol.Chem.* **258**: 7514-7518.
8. **Andrews, T. J. y Lorimer, G. H.**(1978) Photorespiration: still unavoidable? *FEBS Lett.* **90**: 1-9.
9. **Andrews, T. J. y Lorimer, G. H.**(1985) Catalytic properties of a hybrid between cyanobacterial large subunits and higher plant small subunits of ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase. *J.Biol.Chem.* **260**: 4632-4636.
10. **Andrews, T. J. y Lorimer, G. H.** (1987) Rubisco: Structure, mechanisms and prospects for improvement. En *The Biochemistry of Plants, Vol. 10* (Hatch, M. D. and Boardman, N. K., Eds.) pp 131-218, Academic Press, San Diego.
11. **Arnon, D. I.**(1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**: 1-15.
12. **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.
13. **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.

14. **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.
15. **Bhalla, P. L. y Dalling, M. J.**(1986) Endopeptidase and carboxypeptidase enzymes of vacuoles prepared from mesophylls protoplasts of the primary leaf of wheat seedlings. *J.Plant Physiol.* **122**: 289-302.
16. **Birnboim, H. C.**(1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**: 243-255.
17. **Bohnert, H. J., Nelson, D. E., y Jensen, R. G.**(1995) Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell* **7**: 1099-1111.
18. **Boston, R. S., Viitanen, P. V., y Vierling, E.**(1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol.Biol.* **32**: 191-222.
19. **Bowes, G., Ogren, W. L., y Hageman, R. H.**(1971) Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **45**: 716-722.
20. **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.
21. **Buchanan, B. B., Schurmann, P., y Jacquot, J. P.**(1994) Thioredoxin and metabolic regulation. *Semin.Cell Biol.* **5**: 285-293.
22. **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.
23. **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.
24. **Casano, L. M. y Trippi, V. S.**(1992) The effect of oxygen radicals on proteolysis in isolated oat chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **33**: 329-332.
25. **Cercós, M., Carrasco, P., Granell, A., y Carbonell, J.**(1992) Biosynthesis and degradation of Rubisco during ovary senescence and fruit development induced by gibberellic acid in *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum* **85**: 476-482.
26. **Chatfield, C.** (1983) *Statistics for technology* Chapman and Hall, London.
27. **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.
28. **Chen, Z. X. y Spreitzer, R. J.**(1989) Chloroplast intragenic suppression enhances the low CO₂/O₂ specificity of mutant ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J.Biol.Chem.* **264**: 3051-3053.

29. **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.
30. **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.
31. **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.
32. **Day, A. G., Chene, P., y Fersht, A. R.**(1993) Role of phenylalanine-327 in the closure of loop 6 of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* **32**: 1940-1944.
33. **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.
34. **Desimone, M., Wagner, E., y Johannngmeier, U.**(1998) Degradation of active-oxygen-modified ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by chloroplastic proteases requires ATP-hydrolysis. *Planta* **205**: 459-466.
35. **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.
36. **Dirk, L. M., Williams, M. A., y Houtz, R. L.**(2001) Eukaryotic peptide deformylases. Nuclear-encoded and chloroplast-targeted enzymes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 97-107.
37. **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.
38. **Du, Y. C., Hong, S., y Spreitzer, R. J.**(2000) *RbcS* suppressor mutations improve the thermal stability and CO₂/O₂ specificity of *rbcL*- mutant ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **97**: 14206-14211.
39. **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.
40. **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.
41. **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.

42. **Edwards, G. E., Ku, M. S. B., y Monson, R. K.** (1985) C₄ photosynthesis and its regulation. En *Photosynthetic mechanisms and the environment* (Barber, J. and Baker, N. R., Eds.) pp 289-327, Elsevier Science Publishers, New York.
43. **Efron, B.** (1982) *The jackknife, the bootstrap and other resampling plans* SIAM, Philadelphia.
44. **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.
45. **Ezaqui, 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*. *J. Biol. Chem.* **274**: 5078-5082.
46. **Feller, U. y Fischer, A.**(1994) Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences.* **13**: 241-273.
47. **Feller, U. K., Soong, T.-S. T., y Hageman, R. H.**(1977) Leaf proteolytic activities and senescence during grain development of field-grown corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiol* **59**: 290-294.
48. **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.
49. **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.
50. **Ferreira, R. B. y Shaw, N. M.**(1989) Effect of osmotic stress on protein turnover in *Lemna minor* fronds. *Planta* **179**: 456-465.
51. **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.
52. **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.
53. **Ford, D. M. y Shibles, R.**(1988) Photosynthesis and other traits in relation to chloroplast number during soybean senescence. *Plant Physiol* **86**: 108-111.
54. **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.
55. **Garcia-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.

56. **Garcia-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.
57. **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.
58. **Giglione, C. y Meinel, T.**(2001) Organellar peptide deformylases: universality of the N-terminal methionine cleavage mechanism. *Trends Plant Sci.* **6**: 566-572.
59. **Gingrich, J. C. y Hallick, R. B.**(1985) The *Euglena gracilis* chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase gene. I. Complete DNA sequence and analysis of the nine intervening sequences. *J.Biol.Chem.* **260**: 16156-16161.
60. **Gutteridge, J. M. y Halliwell, B.**(1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem.Sci.* **15**: 129-135.
61. **Gutteridge, S. y Gatenby, A. A.**(1995) Rubisco Synthesis, Assembly, Mechanism, and Regulation. *Plant Cell* **7**: 809-819.
62. **Gutteridge, S., Millard, B. N., y Parry, M. A.**(1986) Inactivation of ribulose-bisphosphate carboxylase by limited proteolysis. *FEBS Lett.* **196**: 263-268.
63. **Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C.** (1989) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford.
64. **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.
65. **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.
66. **Harris, E. H.** (1989) *The Chlamydomonas sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use*. Academic Press, Inc., San Diego.
67. **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.
68. **Hattori, T. y Margulies, M. M.**(1986) Synthesis of large subunit of ribulosebisphosphate carboxylase by thylakoid-bound polyribosomes from spinach chloroplasts. *Arch.Biochem.Biophys.* **244**: 630-640.
69. **Hernandez, J. A., Olmos, E., Corpas, F. J., Sevilla, F., y del Río, L. A.**(1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.* **105**: 151-167.
70. **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.
71. **Hortensteiner, S. y Feller, U.**(2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J.Exp.Bot.* **53**: 927-937.
 72. **Houtz, R. L. y Mulligan, R. M.**(1991) Protection of tryptic-sensitive sites in the large subunit of ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase by catalysis. *Plant Physiol* **96**: 335-339.
 73. **Houtz, R. L., Poneleit, L., Jones, S. B., Royer, M., y Stults, J. T.**(1992) Posttranslational modifications in the amino-terminal region of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from several plant species. *Plant Physiol* **98**: 1170-1174.
 74. **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.
 75. **Houtz, R. L., Royer, M., y Salvucci, M. E.**(1991) Partial purification and characterization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit ³²S-methyltransferase. *Plant Physiol* **97**: 913-920.
 76. **Houtz, R. L., Stults, J. T., Mulligan, R. M., y Tolbert, N. E.**(1989) Post-translational modifications in the large subunit of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**: 1855-1859.
 77. **Huner, N. P. A., Carter, J. V., y Wold, F.**(1982) Effects of reducing agent on the conformation of the isolated subunits of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase from cold hardened and hardened rye. *Z.Pflanzenphysiol.* **106**: 69-80.
 78. **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.
 79. **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.
 80. **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.
 81. **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.
 82. **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.

83. **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.
84. **Jordan, D. B. y Chollet, R.**(1983) Inhibition of Ribulose bisphosphate carboxylase by substrate ribulose 1,5-bisphosphate. *J.Biol.Chem.* **258**: 13752-13758.
85. **Jordan, D. B. y Ogren, W. L.**(1981) A sensitive assay procedure for simultaneous determination of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and oxygenase activities. *Plant Physiol* **67**: 237-245.
86. **Jordan, D. B. y Ogren, W. L.**(1981) Species variation in the specificity of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Nature* **291**: 513-515.
87. **Jordan, D. B. y Ogren, W. L.**(1984) The CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: Dependence on ribulosebisphosphate concentration, pH and temperature. *Planta.* **161**: 308-313.
88. **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.
89. **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.
90. **Kaplan, A., Friedberg, D., Schwarz, R., Ariel, R., Seijffers, J., y Reinhold, L.** (1989) The CO₂ concentrating mechanisms of cyanobacteria: physiological, molecular and theoretical studies. En *Photosynthesis* (Briggs, W. R., Ed.) pp 243-255, Alan R. Liss, Inc., New York.
91. **Kawashima, N. y Wildman, S. G.**(1970) Fraction I protein. *Annu.Rev.Plant Physiol.* **21**: 325-256.
92. **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.
93. **Khan, S., Andralojc, P. J., Lea, P. J., y Parry, M. A.**(1999) 2'-carboxy-D-arabinitol 1-phosphate protects ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase against proteolytic breakdown. *Eur.J.Biochem.* **266**: 840-847.
94. **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.
95. **Kim, J. y Mayfield, S. P.**(1997) Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science* **278**: 1954-1957.
96. **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.

97. **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.
98. **Klein, R. R., Mason, H. S., y Mullet, J. E.**(1988) Light-regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of *psaA-psaB*, *psbA*, and *rbcl* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J.Cell Biol.* **106**: 289-301.
99. **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.
100. **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.
101. **Kozaki, A. y Takeba, G.**(1996) Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* **384**: 557-560.
102. **Landry, L. G. y Pell, E. J.**(1993) Modification of Rubisco and altered proteolytic activity in O₃-stressed *Hybrid Poplar (Populus maximowizii x trichocarpa)*. *Plant Physiol* **101**: 1355-1362.
103. **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.
104. **Lang, K., Schmid, F. X., y Fischer, G.**(1987) Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* **329**: 268-270.
105. **Larimer, F. W., Lee, E. H., Mural, R. J., Soper, T. S., y Hartman, F. C.**(1987) Intersubunit location of the active site of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase as determined by *in vivo* hybridization of site-directed mutants. *J.Biol.Chem.* **262**: 15327-15329.
106. **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.
107. **Lee, E. H., Soper, T. S., Mural, R. J., Stringer, C. D., y Hartman, F. C.**(1987) An intersubunit interaction at the active site of D-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase as revealed by cross-linking and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **26**: 4599-4604.
108. **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.
109. **Liu, X. Q. y Jagendorf, A. T.**(1986) Neutral peptidases in the stroma of pea chloroplasts. *Plant Physiol* **81**: 603-608.
110. **Lorimer, G. H.**(1981) The carboxylation and oxygenation of ribulose 1,5-bisphosphate: the primary events in photosynthesis and photorespiration. *Annu.Rev.Plant Physiol.* **32**: 349-383.

111. **Lorimer, G. H., Andrews, T. J., Pierce, J., y Schloss, J. V.**(1986) 2'-carboxy-3-keto-D-arabinitol 1,5-bisphosphate, the six-carbon intermediate of the ribulose bisphosphate carboxylase reaction. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **313**: 397-407.
112. **Lorimer, G. H. y Mizioro, H. M.**(1980) Carbamate formation on the epsilon-amino group of a lysyl residue as the basis for the activation of ribulosebisphosphate carboxylase by CO₂ and Mg²⁺. *Biochemistry* **19**: 5321-5328.
113. **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.**(1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
114. **Luo, S., Ishida, H., Makino, A., y Mae, T.**(2002) Fe²⁺-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.
115. **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.
116. **Makino, A. y Osmond, B.**(1991) Solubilization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from the membrane fraction of pea leaves. *Photosynth. Res.* **29**: 79-85.
117. **Mallick, N. y Mohn, F. H.**(2000) Reactive oxygen species: response of algal cells. *J. Plant Physiol.* **157**: 183-193.
118. **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.
119. **Martinoia, E., Heck, U., Dalling, M. J., y Matile, P.**(1983) Changes in chloroplast number and chloroplast constituents in senescing barley leaves. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **178**: 147-155.
120. **Matile, P.** (1997) The vacuole and cell senescence. En *Advances in botanical research, Vol. 25* (Callow, J. A., Ed.) pp 87-112, Academic Press, San Diego.
121. **Mattoo, A. K. y Edelman, M.**(1987) Intramembrane translocation and posttranslational palmitoylation of the chloroplast 32-kDa herbicide-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **84**: 1497-1501.
122. **Mayfield, S. P., Yohn, C. B., Cohen, A., y Danon, A.**(1995) Regulation of chloroplast gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 147-166.
123. **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.
124. **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.
125. **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.

126. **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.
127. **Minamikawa, T., Toyooka, K., Okamoto, T., Hara-Nishimura, I., y Nishimura, M.**(2001) Degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase by vacuolar enzymes of senescing French bean leaves: immunocytochemical and ultrastructural observations. *Protoplasma* **218**: 144-153.
128. **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.
129. **Miziorko, H. M.**(1979) Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase. Evidence in support of the existence of distinct CO₂ activator and CO₂ substrate sites. *J.Biol.Chem.* **254**: 270-272.
130. **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.
131. **Mizusawa, N., Tomo, T., Satoh, K., y Miyao, M.**(2003) Degradation of the D1 protein of photosystem II under illumination in vivo: two different pathways involving cleavage or intermolecular cross-linking. *Biochemistry* **42**: 10034-10044.
132. **Moreno, J., Peñarrubia, L., y Garcia-Ferris, C.**(1995) The mechanism of redox regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase turnover. A hypothesis. *Plant Physiol.Biochem.* **33**: 121-127.
133. **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.
134. **Morita, E., Abe, T., Tsuzuki, M., Fujiwara, S., Sato, N., Hirata, A., Sonoike, K., y Nozaki, H.**(1998) Presence of the CO₂-concentrating mechanism in some species of the pyrenoid-less free-living algal genus *Chloromonas* (*Volvocales, Chlorophyta*). *Planta* **204**: 269-276.
135. **Mott, K. A. y Woodrow, I. E.**(1993) Effects of O₂ and CO₂ on nonsteady-state photosynthesis (further evidence for Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Limitation). *Plant Physiol* **102**: 859-866.
136. **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.
137. **Mulligan, R. M., Houtz, R. L., y Tolbert, N. E.**(1988) Reaction-intermediate analogue binding by ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase causes specific changes in proteolytic sensitivity: the amino-terminal residue of the large subunit is acetylated proline. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**: 1513-1517.

138. **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.
139. **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.
140. **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.
141. **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.
142. **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.
143. **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.
144. **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.
145. **Paech, C.** (1986) The major protein of chloroplast stroma, ribulose bisphosphate carboxylase. En *Modern Methods of Plant Analysis* (Linskens, H. F. and Jackson, J. F., Eds.) pp 199-230, Springer Verlag, Berlin.
146. **Parry, M. A., Madgwick, P., Parmer, S., Cornelius, M. J., y Keys, A. J.**(1992) Mutations in loop six of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase affect substrate specificity. *Planta* **187**: 109-112.
147. **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.
148. **Pfannschmidt, T.**(2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci.* **8**: 33-41.
149. **Pfannschmidt, T., Nilsson, A., y Allen, J. F.**(1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**: 625-628.
150. **Picaud, A., Hours, M. C., y Tremolieres, A.**(1993) Five palmitoylated polypeptides in the 50 kDa range are not recognized by an antibody against ribulose-bisphosphate-carboxylase-oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **197**: 298-303.

151. **Pierce, J.**(1988) Prospects for manipulating the substrate specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Physiol.Plant.* **72**: 690-698.
152. **Pierce, J.** (1989) Rubisco: Mechanism and their possible constraints on substrate specificity. En *Photosynthesis* (Briggs, W. R., Ed.) pp 149-159, Alan R. Liss, Inc., New York.
153. **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.
154. **Portis, A. R., Jr.**(1990) Partial reduction in ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activity by carboxypeptidase A. *Arch.Biochem.Biophys.* **283**: 397-400.
155. **Portis, A. R., Jr.**(1990) Rubisco activase. *Biochim.Biophys.Acta* **1015**: 15-28.
156. **Portis, A. R.**(1992) Regulation of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* **43**: 415-437.
157. **Ramage, R. T., Read, B. A., y Tabita, F. R.**(1998) Alteration of the alpha helix region of cyanobacterial ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase to reflect sequences found in high substrate specificity enzymes. *Arch.Biochem.Biophys.* **349**: 81-88.
158. **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.
159. **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.
160. **Read, B. A. y Tabita, F. R.**(1994) High substrate specificity factor ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase from eukaryotic marine algae and properties of recombinant cyanobacterial RubiSCO containing "algal" residue modifications. *Arch.Biochem.Biophys.* **312**: 210-218.
161. **Robinson, C. y Ellis, R. J.**(1984) 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.
162. **Robinson, C. y Ellis, R. J.**(1984) 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.
163. **Rodermel, S.**(1999) Subunit control of Rubisco biosynthesis - a relic of an endosymbiotic past? *Photosynth.Res.* **59**: 105-123.
164. **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.

165. **Roulin, S. y Feller, U.**(1998) Light-independent degradation of stromal proteins in intact chloroplasts isolated from *Pisum sativum* L. leaves: requirement for divalent cations. *Planta* **205**: 297-304.
166. **Roulin, S. y Feller, U.**(2003) Dithiothreitol triggers photooxidative stress and fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in intact pea chloroplasts. *Plant Physiol.Biochem.* **36**: 849-856.
167. **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.
168. **Salvador, M. L. y Klein, U.**(1999) The redox state regulates RNA degradation in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **121**: 1367-1374.
169. **Salvucci, M. E.**(1989) Regulation of Rubisco activity *in vivo*. *Physiol.Plant.* **77**: 164-171.
170. **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.
171. **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.
172. **Schlicher, T. y Soll, J.**(1997) Chloroplastic isoforms of DnaJ and GrpE in pea. *Plant Mol.Biol.* **33**: 181-185.
173. **Schneider, G., Lindqvist, Y., y Branden, C. I.**(1992) RUBISCO: structure and mechanism. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* **21**: 119-143.
174. **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.
175. **Schneider, G., Lindqvist, Y., y Lundqvist, T.**(1990) Crystallographic refinement and structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from *Rhodospirillum rubrum* at 1.7 Å resolution. *J.Mol.Biol.* **211**: 989-1008.
176. **Schreuder, H. A., Knight, S., Curmi, P. M., Andersson, I., Cascio, D., Sweet, R. M., Branden, C. I., y Eisenberg, D.**(1993) Crystal structure of activated tobacco rubisco complexed with the reaction-intermediate analogue 2-carboxy-arabinitol 1,5-bisphosphate. *Protein Sci.* **2**: 1136-1146.
177. **Schreuder, H. A., Knight, S., Curmi, P. M., Andersson, I., Cascio, D., Sweet, R. M., Branden, C. I., y Eisenberg, D.**(1993) Crystal structure of activated tobacco rubisco complexed with the reaction-intermediate analogue 2-carboxy-arabinitol 1,5-bisphosphate. *Protein Sci.* **2**: 1136-1146.
178. **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.

179. **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.
180. **Seemann, J. R., Berry, J. A., Freas, S. M., y Krump, M. A.**(1985) Regulation of ribulose biphosphate carboxylase activity *in vivo* by a light-modulated inhibitor of catalysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**: 8024-8028.
181. **Serrano, R. y Rodriguez-Navarro, A.**(2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr.Opin.Cell Biol.* **13**: 399-404.
182. **Shtilerman, M., Lorimer, G. H., y Englander, S. W.**(1999) Chaperonin function: folding by forced unfolding. *Science* **284**: 822-825.
183. **Silva, P., Thompson, E., Bailey, S., Kruse, O., Mullineaux, C. W., Robinson, C., Mann, N. H., y Nixon, P. J.**(2003) FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis sp* PCC 6803. *Plant Cell* **15**: 2152-2164.
184. **Sivakumar, P., Sharmila, P., y Pardha, Saradhi P.**(2000) Proline alleviates salt-stress-induced enhancement in ribulose-1, 5-bisphosphate oxygenase activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **279**: 512-515.
185. **Smith, M. D., Ghosh, S., Dumbroff, E. B., y Thompson, J. E.**(1997) Characterization of Thylakoid-Derived Lipid-Protein Particles Bearing the Large Subunit of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Plant Physiol* **115**: 1073-1082.
186. **Spalding, M. H.** (1998) CO₂ acquisition. Acclimation to changing carbon availability. En *The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas* (Rochaix, J. D., Goldschmidt-Clermont, M., and Merchant, S., Eds.) pp 529-547, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
187. **Spreitzer, R. J.**(1993) Genetic dissection of Rubisco structure and function. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* **44**: 411-434.
188. **Spreitzer, R. J.** (1998) Genetic engineering of Rubisco. En *The molecular biology of chloroplast and mitochondria in Chlamydomonas reinhardtii*. (Rochaix, J. D., Goldschmidt-Clermont, M., and Merchant, S., Eds.) pp 515-527, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
189. **Spreitzer, R. J.**(1999) Questions about the complexity of chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Photosynth.Res.* **60**: 29-42.
190. **Spreitzer, R. J.**(2003) Role of the small subunit in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Arch.Biochem.Biophys.* **414**: 141-149.
191. **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-bisphosphate carboxylase/oxygenase: substitution at Arg-71 affects thermal stability and CO₂/O₂ specificity. *Biochemistry* **40**: 5615-5621.
192. **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 ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**: 5460-5464.

193. **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.
194. **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.
195. **Stadtman, E. R.**(1990) Covalent modification reactions are marking steps in protein turnover. *Biochemistry* **29**: 6323-6331.
196. **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.
197. **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.
198. **Sugiyama, T., Nakayama, N., Ogawa, M., Akazawa, T., y Oda, T.**(1968) Structure and function of chloroplast proteins. II. Effect of p-chloromercuribenzoate treatment of the ribulose 1,5-diphosphate carboxylase activity of spinach leaf fraction I protein. *Arch.Biochem.Biophys.* **125**: 98-106.
199. **Takamiya, K. I., Tsuchiya, T. y Ohta, H.**(2000) Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? *Trends Plant Sci.* **5**: 426-431.
200. **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.
201. **Taylor, T. C. y Andersson, I.**(1997) Structure of a product complex of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biochemistry* **36**: 4041-4046.
202. **Taylor, T. C. y Andersson, I.**(1997) The structure of the complex between rubisco and its natural substrate ribulose 1,5-bisphosphate. *J.Mol.Biol.* **265**: 432-444.
203. **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.
204. **Terzaghi, B. E., Laing, W. A., Christeller, J. T., Petersen, G. B., y Hill, D. F.**(1986) Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. Effect on the catalytic properties of changing methionine-330 to leucine in the *Rhodospirillum rubrum* enzyme. *Biochem.J.* **235**: 839-846.
205. **Thayer, S. S. y Huffaker, R. C.**(1984) Vacuolar localization of endoproteins EP₁ and EP₂ in barley mesophyll cells. *Plant Physiol* **75**: 70-73.
206. **Thompson, G. A., Jr. y Okuyama, H.**(2000) Lipid-linked proteins of plants. *Prog.Lipid Res.* **39**: 19-39.
207. **Trebitsh, T., Levitan, A., Sofer, A., y Danon, A.**(2000) Translation of chloroplast *psbA* mRNA is modulated in the light by counteracting oxidizing and reducing activities. *Mol.Cell Biol.* **20**: 1116-1123.

208. **Uemura, K., Anwaruzzaman, Miyachi, S., y Yokota, A.**(1997) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from thermophilic red algae with a strong specificity for CO₂ fixation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **233**: 568-571.
209. **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.
210. **Wang, P., Royer, M., y Houtz, R. L.**(1995) Affinity purification of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit epsilon N-methyltransferase. *Protein Expr.Purif.* **6**: 528-536.
211. **Wang, Y. L., Zhou, J. H., Wang, Y. F., Bao, J. S., y Chen, H. B.**(2001) Properties of hybrid enzymes between *Synechococcus* large subunits and higher plant small subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in Escherichia coli. *Arch.Biochem.Biophys.* **396**: 35-42.
212. **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.
213. **Watson, G. M. F. 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.
214. **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.
215. **Whitney, S. M. y Andrews, T. J.**(1998) The CO₂/O₂ specificity of single-subunit ribulose-bisphosphate carboxylase from the dinoflagellate, *Amphidinium carterae*. *Aust.J.Plant Physiol.* **25**: 131-138.
216. **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.
217. **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.
218. **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.
219. **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.
220. **Yokota, A. y Kitaoka, S.**(1985) Correct pK values for dissociation constant of carbonic acid lower the reported K_m 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.
221. **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.
222. **Yoshida, T. y Minamikawa, T.**(1996) Successive amino-terminal proteolysis of the large subunit of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase by vacuolar enzymes from French bean leaves. *Eur.J.Biochem.* **238**: 317-324.
223. **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.
224. **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.
225. **Zhu, G. y Jensen, R. G.**(1991) Fallover of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity (Decarbamylation of catalytic sites depends on pH). *Plant Physiol* **97**: 1354-1358.
226. **Zhu, G. y Spreitzer, R. J.**(1996) Directed mutagenesis of chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Loop 6 substitutions complement for structural stability but decrease catalytic efficiency. *J.Biol.Chem.* **271**: 18494-18498.