



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

REGULACION DEL ESTADO DE ACTIVACION DE LA
ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE HOJA
DE MAIZ POR SU SUSTRATO FOSFOENOLPIRUVATO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A:
Roberto López Pozos

Director de Tesis: Dra. Rosario A. Muñoz Clares

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron: Investigar si fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) de hoja de maíz existe en al menos dos estados conformacionales interconvertibles que difieran en sus características cinéticas, si su interconversión ocurre en forma lenta y cuales son los factores que regulan ese equilibrio; si la enzima muestra un comportamiento histerético y bajo que condiciones experimentales este aparece; si los cambios de las características cinéticas se acompañan con los cambios diurnos en la fisiología de la planta y discutir los resultados que se obtengan de estos estudios en función del papel que la enzima PEPC juegan en el metabolismo fotosintético de las plantas C_4 .

El estudio se realizó en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM durante 1986.

Se realizaron los experimentos con preparaciones de PEPC de hojas de maíz extraídas y desaladas rápidamente, para caracterizar el fenómeno de histéresis, que se refiere a cambios en la estructura de la enzima inducido por uno o varios ligandos y que se refleja en una fase de retraso en la acumulación de producto.

Se hicieron ensayos y extracciones en diferentes condiciones experimentales con luz y oscuridad y en presencia de activadores e inhibidores, todos los ensayos mostraron este fenómeno.

La duración de la fase de retraso depende de la concentración de PEP (sustrato), de glucosa-6P (activador) y malato (inhibidor). La concentración de los dos primeros es inversamente proporcional

al tiempo de la fase de retraso, y la del inhibidor es proporcional a esta. Todos los extractos de hojas de plantas mantenidas en oscuridad es mayor el periodo de retraso que las de hojas de plantas expuestas a luz. El análisis de la dependencia de la fase de retraso en la concentración de la enzima sugiere que al pasarla al ensayo de actividad sufre una dilución pasando a un dímero de poca actividad y que lentamente se agrega convirtiéndose en tetrámero activo. La adición de sustrato o activador promueve la asociación, el inhibidor la disociación.

El HCO_3^- , el otro sustrato de PEPC resultó ser uno de los más importantes para la estabilidad de la enzima en su forma activa - (tetrámero), en su ausencia la enzima pierde rápidamente casi toda la actividad y en concentraciones saturantes la actividad aumenta hasta más del doble. Pero la enzima en su forma activa es más inestable, por lo que pierde la actividad más rápido con respecto al - testigo (con HCO_3^- que normalmente va disuelto en las soluciones - 1.2 mM).

Los resultados obtenidos para PEPC con respecto a la histéresis en la activación e inactivación de la enzima son discutidos en relación al papel que la enzima PEPC juega en el metabolismo fotosintético de las plantas C_4 .

CONTENIDO

I. INTRODUCCION.....	1
1.1 Objetivos.....	2
1.1.1 Objetivo general.....	2
1.1.2 Objetivos parciales.....	2
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Ruta C_4 de Asimilación del CO_2 Atmosférico en Maíz....	3
2.2 Características de la PEPC de Hoja de Maíz.....	8
2.2.1 Reacción catalizada.....	8
2.2.2 Propiedades cinéticas: Isoenzimas.....	8
2.2.3 Propiedades físicas: Peso molecular y estado de agregación.....	10
2.2.4 Regulación de su actividad.....	11
2.2.4.1 Por síntesis de novo.....	11
2.2.4.2 Por su estado de actividad.....	13
2.2.4.2.1 Enzimas cuya regulación por - luz ha sido descrito.....	15
2.2.4.2.1 Enzimas cuya regulación por luz no sido aún aclarada.....	16
2.3 Histéresis.....	24
2.3.1 Definición.....	24
2.3.2 Mecanismos moleculares implicados en el fenómeno de histéresis.....	25
2.3.3 El fenómeno de la histéresis como regulador me- tabólico.....	29

2.3.4 Ejemplos de enzimas que presentan comportamien- to histerético.....	31
2.3.5 Comportamiento histerético de PEPC.....	35
III. MATERIALES Y METODOS.....	37
3.1 Materiales.....	37
3.1.1 Equipo.....	37
3.1.2 Reactivos.....	38
3.1.3 Material biológico.....	38
3.2 Métodos.....	38
3.2.1 Crecimiento de plantas.....	38
3.2.2 Tratamientos de luz y oscuridad a las plantas..	38
3.2.3 Eliminación del CO ₂ en los medios de ensayo....	38
3.2.4 Extracción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa.	39
3.2.5 Ensayo de la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa.....	39
3.2.6 Caracterización de la histéresis.....	42
IV. RESULTADOS.....	44
4.1 Curva de Progreso de la Reacción Catalizada por PEPC..	44
4.2 Comprobación del Fenómeno de Histéresis.....	44
4.3 Efecto del tiempo Transcurrido Tras la Extracción So- bre la Duración de la Fase de Retraso.....	48
4.4 Efecto de la Concentración de Enzima Sobre la Fase de Retraso.....	48
4.5 Efecto del Medio de Extracción de la Enzima Sobre la Fase de Retraso.....	52

4.6 Efecto de la Concentración de Fosfoenolpiruvato Sobre la Fase de Retraso.....	55
4.7 Efecto de la Concentración de Malato Sobre la Duración de la Fase de Retraso.....	57
4.8 Efecto de la Concentración de glucosa-6P Sobre la Duración de la Fase de Retraso.....	61
4.9 Efecto de la Preincubación Sobre la Duración de la Fase de retraso.....	62
4.10 Efecto de la Preincubación con Sustratos Sobre la Actividad y la Duración de la Fase de Retraso.....	65
4.11 Cinética de la Reactivación en el Medio de Ensayo...	67
V. DISCUSION.....	70
VI. CONCLUSIONES.....	80
VII.REFERENCIAS.....	81

I. INTRODUCCION

La regulación e integración de los procesos bioquímicos implicados en la asimilación fotosintética de CO_2 en las plantas C_4 no han sido aún elucidadas, aunque fué en 1966 cuando se propuso por primera vez la existencia de la ruta fotosintética C_4 (46) y a pesar de la relevancia que tiene este metabolismo en la productividad de las plantas bajo ciertas condiciones a añadido un extraordinario interés de tipo aplicado a su estudio.

Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E.C.4.1.1.31) es la primera de las dos enzimas carboxilantes implicadas en la fijación del CO_2 atmosférico en este tipo de plantas. Cataliza una reacción de β -carboxilación irreversible (86a) y tiene como sustrato a fosfoenolpiruvato que es, a la vez, un compuesto rico en energía y un importante intermediario en varias rutas metabólicas. Todo ello, es de creencia general que la actividad de esta enzima debe estar fuertemente sometida a control y existe un gran interés en describir los mecanismos regulatorios de su actividad.

Quizás el aspecto más importante de regulación es el efecto que las condiciones de iluminación a las que se somete la planta tiene a corto plazo sobre la actividad de PEPC de hoja. Este problema de regulación está siendo en la actualidad intensamente estudiado en varios laboratorios, pero no ha sido aún totalmente resuelto. Los resultados obtenidos hasta el momento de iniciar este trabajo en relación a la regulación a corto plazo por la luz del estado de activación de PEPC de hoja de maíz, despertaron el interés de caracterizar el comportamiento histerético que esta enzima pre-

sentaba en extractos crudos, como medio de llegar a profundizar - sobre las características de la enzima y sobre el mecanismo molecular responsable de esta regulación.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general.

Investigar si la PEPC de hoja de maíz existe en al menos dos estados conformacionales interconvertibles que difieran en sus características cinéticas, si su interconversión ocurre en forma lenta y cuales son los factores que regulan este equilibrio.

1.1.2 Objetivos parciales.

1. Investigar si la enzima muestra un comportamiento histeré tico y determinar bajo que condiciones experimentales aparece este.
2. Investigar si los cambios de las características cinéti- cas se acompañan con cambios diurnos de la planta.
3. Discutir los resultados que se obtengan de estos estudios, en función del papel que la enzima PEPC juega en el metabolismo fo tosintético de las plantas C_4 .

II. ANTECEDENTES

2.1 Ruta C_4 de Asimilación del CO_2 Atmosférico en Maíz

El maíz, al igual que la mayoría de las plantas C_4 , presenta dos tipos de células diferenciadas participando en el metabolismo fotosintético de la hoja (45, 62, 86, 89, 109). La Figura 1 muestra un esquema simplificado de metabolismo C_4 . Las células llamadas de mesófilo se encuentran cerca de la superficie externa de la hoja y toman CO_2 atmosférico directamente para asimilarlo en forma de oxalacetato (OAA) mediante la enzima PEPC. Este metabolito se transporta al interior del cloroplasto en donde se convierte en malato mediante la enzima málico deshidrogenasa (MDH), dependiente de NADP (NADP-MDH). El malato en intercambio con el OAA que se está produciendo es transportado en citoplasma para posteriormente ser llevado a células de vaina vascular, las cuales se localizan en la periferia de los haces vasculares (Figura 2), en donde se encuentran bastante aisladas del intercambio directo del CO_2 con la atmósfera. En las células de vaina vascular, el malato se descarboxila mediante la enzima málico deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP (enzima málica-NADP) y el CO_2 producido se utiliza para la síntesis de carbohidratos que, a través del Ciclo de Calvin, tienen lugar en estas células. El piruvato, producto de la descarboxilación regresa a las células del mesófilo y es transportado al interior del cloroplasto en donde produce fosfoenolpiruvato (PEP) en una reacción catalizada por la enzima piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK), con el consumo de dos equivalentes de ATP. El PEP resultante se transporta a citoplasma en intercambio con fosfato para

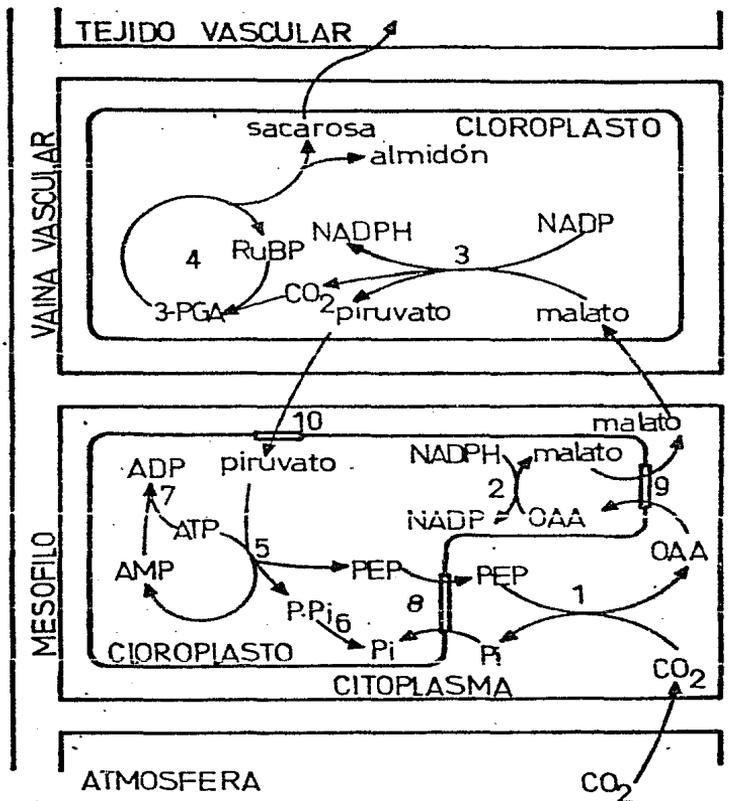


Figura 1. Esquema del metabolismo C₄ de maíz .

Enzimas: 1. Fosfoenolpiruvato carboxilasa; 2. NADP-malato deshidrogenasa; 3. enzima málica-NADP; 4. Ciclo de Calvin; 5. Piruvato ortofosfato dicinasa; 6. Pirofosfatasa; 7. Adenilato cinasa; 8. Translocador de PEP- fosfato; 9. Traslocador de dicarboxilatos; 10. Transportador de piruvato.

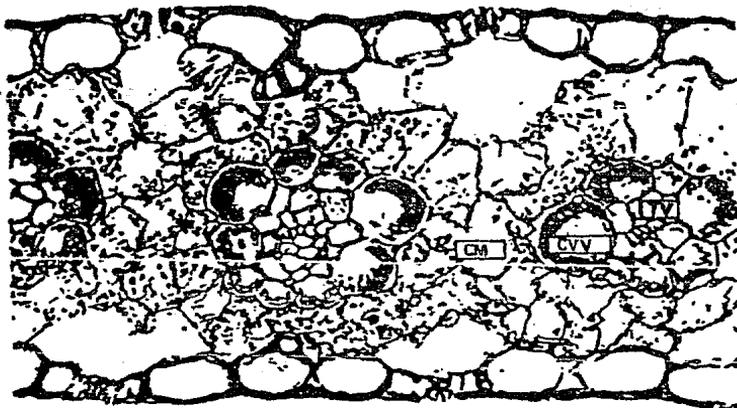


Figura 2. Corte transversal de una hoja de maíz mostrando la anatomía tipo Kranz, característica de las plantas C4. CM. Célula de mesófilo; CVV. Célula de la Vaina Vas-
cular; TV. Tejido vascular.

seguir alimentando esta ruta (25, 27, 43, 88, 89).

Las plantas que poseen ruta C_4 usan parte de la energía solar captada para mantener esta ruta extra, pero a pesar de ello su eficiencia fotosintética es superior a la de las plantas C_3 que solo poseen Ciclo de Calvin cuando las condiciones de temperatura e iluminación les son favorables. El sistema fotosintético C_4 además debe operar con pérdidas de agua menores, por dos razones: 1) Gracias a que la afinidad por CO_2 es superior en estas plantas, pueden mantener altas velocidades de fijación con apertura estomatal limitada, permitiendo así una fotosíntesis activa en condiciones de relativa aridez y con bajas concentraciones de CO_2 , condición frecuente esta última cuando las plantas están fotosintetizando activamente, ya que consumen con rapidez el CO_2 de las capas cercanas de la atmósfera, 11) Pueden intercambiar CO_2 por agua más eficientemente que las plantas C_3 , debido a que la concentración interna de CO_2 es mucho más baja que en estas últimas. Por otra parte debido a que la asimilación de CO_2 es más eficiente, las plantas C_4 poseen capacidad de aprovechar mayor cantidad de energía luminosa y crecer mejor bajo condiciones de alta intensidad lumínica. En consecuencia las plantas C_4 son bastante productivas, por lo que representan ser magníficos candidatos para incrementar la productividad (37).

Dado que en la ruta C_4 participan dos tipos de células y varios compartimientos celulares, los mecanismos de transporte inter e intracelulares, se revisten de un especial interés y es conveniente hacer una breve descripción de los mismos:

1) Transporte intercelular. Hasta la fecha las evidencias existentes indican que el transporte de metabolitos de las células de mesófilo a las células de vaina vascular y viceversa ocurre por difusión simplástica, a través de comunicaciones intercelulares aisladas por una capa de suberina bastante permeables a moléculas pequeñas y relativamente impermeables a gases que se denominan plasmodesmata (45, 62). De acuerdo con cálculos teóricos, esta superficie de intercambio tiene las características necesarias para justificar los flujos observados durante la fotosíntesis (45). Además los protoplastos aislados de mesófilo son bastante permeables a varios de los metabolitos implicados en el ciclo C_4 (47)

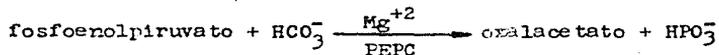
ii) Transporte intracelular. Debido a limitaciones de tipo metodológico, solamente los cloroplastos de mesófilo han sido aislados en forma íntegra con rendimientos suficientes para facilitar su estudio (45). Se han caracterizado tres transportadores de importancia en el metabolismo C_4 . Un traslocador de dicarboxilatos que intercambia malato, oxalacetato, glutamato, aspartato y oxoglutarato (26); un traslocador de PEP, 3-fosfoglicerato (3-PGA) y fosfato (Pi) (25, 48, 92) y un transportador de piruvato (29, 45). Este último es capaz de acumular piruvato en el interior del cloroplasto en contra de un gradiente de concentración cuando dicho organelo está iluminado, pero no lo hace ni en la oscuridad ni en presencia del desacoplante m-clorofenilhidrazona carbonil cianuro (CCCP) indicando que requieren de potencial electroquímico transmembranal, que se forma por el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones bajo condiciones de iluminación (29). No se han caracterizado aún otros transportadores involucrados en este meta-

bolismo, aunque es de esperar que existen varios más, por lo menos en el cloroplasto de vaina vascular.

2.2 Características de la PEPC de Hoja de Maíz

2.2.1 Reacción catalizada.

La enzima PEPC cataliza la carboxilación del fosfoenolpiruvato según la reacción formulada



la reacción tiene un cambio de energía libre muy alto ($\Delta G = -6$ a -8 Kcal/mol) y es prácticamente irreversible.

Esta actividad fue descubierta en tejidos de plantas por Bandurski (5, 6) quién además purificó parcialmente la proteína responsable de la actividad de PEPC y demostró que para la actividad catalítica se necesita la presencia de Mg^{+2} (4). Posteriormente Maruyama (74) demostró que la carboxilación de PEP por la enzima extraída de cotiledones de cacahuate utilizaba como sustrato bicarbonato (HCO_3^-) y no CO_2 , como ocurre con otras reacciones de carboxilación catalizadas enzimáticamente. Más aún, se ha demostrado que es la única carboxilasa conocida que no contiene biotina y usa HCO_3^- como sustrato (19, 77).

2.2.2 Propiedades cinéticas: Isoenzimas.

Se ha descrito que existen varias formas moleculares diferentes con actividad de PEPC (isoenzimas) asociadas a otras tantas diferentes funciones fisiológicas. Así, Ting y Osmond (100) han sugere-

rido que existen cuatro formas moleculares distintas de la enzima en plantas: fotosintética C_4 , fotosintética C_3 , fotosintética CAM y una no autótrofa. Los estudios de estos autores establecieron que la enzima de hoja de plantas C_3 difiere de la de C_4 en sus propiedades físicas y cinéticas e igualmente difiere de la enzima presente en hojas de plantas CAM (75, 100). La situación sin embargo, puede ser más compleja que la propuesta por ellos, puesto que dentro de las plantas C_3 se han descrito diferentes formas moleculares de esta enzima que han sido descritas a diferentes funciones metabólicas (78, 104).

Por otra parte, se ha encontrado que las formas enzimáticas presentes en hojas etioladas, difieren de las presentes en hojas verdes tanto en plantas C_3 como en plantas C_4 (35, 36, 100, 103, 106). En un principio se sugirió que la forma de hoja verde procede de las hojas etioladas por una modificación postraduccional originada por la luz (35, 100, 103). Posteriormente varios autores han demostrado que ocurre síntesis "de novo" en respuesta a la luz y que esta proteína sintetizada corresponde a la forma enzimática típica de hojas verdes (30, 40, 59, 96, 107). Lo que no ha sido comprobado aún es el destino que sufre la forma típica de hojas etioladas, puesto que ya no se ha detectado en hojas verdes. Esta fué la razón de que los primeros estudios parecían seguir una transformación de una en otra, pero al demostrarse que esto no es así, hubo que pensar en una degradación adecuada y represión de la síntesis de la forma típica de hoja etiolada durante el proceso de enverdecimiento de la hoja.

Igualmente se han descrito isoformas en plantas CAM (11,100, 110, 73) sugiriéndose que la modificación de la composición isoenzimática podría ser un primer paso en la respuesta al fotoperíodo a nivel metabólico (11, 73).

2.2.3 Propiedades físicas: Peso molecular y estado de agregación.

Existe en la bibliografía significativa discrepancia en el dato referente al peso molecular de la enzima PEPC nativa, como puede observarse en la Tabla 1, que resume lo publicado en este respecto.

TABLA 1. PESOS MOLECULARES DE PEPC ENCONTRADOS EN DIFERENTES TEJIDOS DE ESPECIES C₄, C₃ Y CAM.

ESPECIE	TEJIDO	PESO MOLECULAR	REFERENCIA
<u>Saccharum officinarum</u> (C ₄)	Hoja verde	560 000	Goatly (34)
	Hoja etiolada	560 000	Goatly (34)
<u>Sorghum vulgare</u> (C ₄)	Hoja verde	400 000	Mares y Lebovlá(72)
	Hoja verde	275 000	Vidal y Gadal (96)
	Hoja etiolada	375 000	Vidal y Gadal (12)
<u>Panicum miliaceum</u> (C ₄)	Hoja verde	400 000	Mares y Lebovlá(72)
	<u>Zea mays</u> (C ₄)	Hoja verde	340 000
<u>Spiracea oleracea</u> (C ₃)	Hoja verde	400 000	Uedan y Sugiyama(101)
	Hoja verde	400 000	Mares y Lebovlá(72)
	Hoja verde	400 000	Mukerji (77)
	Hoja verde	225 000	Mizerko (75)
<u>Kalanchoe blossfeldiana</u> (CAM)	Hoja verde	174 000	Brulfert et.al.(13)
No constitutiva*	(día largo)		

continua...

<u>Kalanchoe blossfeldiana</u> (CAM)	Hoja verde (día corto)	184 000	Brulfert et.al.(11)
<u>Sedum morganianum</u> (CAM)	Hoja verde	232 000	Brulfert et.al.(11)
<u>Brophyllum pinna-tum</u> (CAM)	Hoja verde	300 000	Nott y Osmond (85)
<u>Brophyllum fedtschenkoii</u> (CAM)	Hoja verde	420 000	Jones et.al. (52)
<u>Kalanchoe diagraphnifolia</u> (CAM)	Hoja verde	250 000	Nott y Osmond (85)

* El metabolismo ácido crasuláceo se induce en estas plantas al cambiar el fotoperíodo de días largos a días cortos.

El diferente peso molecular obtenido por los distintos autores, a veces hasta para un mismo tejido podrían reflejar no solamente las diferentes técnicas empleadas para la determinación del peso molecular (cuantificación en gradiente de sacarosa, cromatografía de filtración en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de poro); sino también el hecho de que la enzima es fácilmente disociable y presenta varios estados de agregación en función de su propia concentración (52, 58, 101, 114, 115).

2.2.4 Regulación de su actividad.

2.2.4.1 Por síntesis de novo. Las plantas han desarrollado varios mecanismos de respuesta a variaciones del medio ambiente, de manera que su desarrollo se ha supeditado en gran medida a la aparición de estos cambios. Lógicamente una de las señales más importantes -- para el desarrollo de las plantas es la luz, que induce la síntesis de numerosas proteínas enzimáticas y estructurales necesarias para el establecimiento del organismo fotosintético adulto. Se han -

propuesto tres clases de fotorreceptores que median respuestas del desarrollo a la luz: Fotoclorofilidíol, fitocromo y varios receptores de luz azul y luz ultravioleta no bien caracterizado (18). Aún cuando la participación de los receptores de luz azul en la regulación de la síntesis de proteínas ha sido bien demostrada solamente para el caso de algas (39, 42, 54, 94), las evidencias señalan que estos juegan un papel importante también en plantas superiores (18, 32, 39, 66). Recientemente se ha demostrado que la biosíntesis de varias enzimas que participan en la síntesis de terpenoides, es regulada por luz ultravioleta aún cuando el o los receptores involucrados no se han identificado (18). De los anteriormente mencionados, sin duda el fotorreceptor mejor caracterizado y el único que ha sido aislado es fitocromo (17, 18). Se sabe que la estimulación de la planta por luz roja es capaz de inducir el establecimiento de la capacidad autotrófica, entendida como la capacidad de asimilación de carbono que se acompaña de un incremento en la actividad de varias enzimas participantes en el ciclo de Calvin, como son ribulosa bifosfato carboxilasa-oxigenasa (38, 59, 109), ribulosa-5-fosfato cinasa (38, 59), fructosa-1,6-bifosfatasa (38, 59, 96) y NADP-Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (13, 38, 59); de varias implicadas en el ciclo C_4 que son piruvato ortofosfato dicinasa (17, 38, 109), NADP-málico deshidrogenasa (51, 59), NADP-málico deshidrogenasa descarboxilante (18, 51, 59), adelnato cinasa (38, 109), pirofosfatasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa (23, 35, 43, 105, 109). Este incremento se acompaña de un aumento en los niveles de AEM mensajero específico, como se ha demostrado para NADP-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (18, 87), piruvato ortofog

fato dicinasa (18, 41), NADP-málico deshidrogenasa descarboxilante (18) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (18, 95); y en la cantidad de proteína específica, como ha sido demostrado para las enzimas ribulosa bifosfato carboxilasa-oxigenasa (20, 40, 95), fructosa-1,6-bisfosfatasa (17), NADP-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (20, 40, 95), NADP-málico deshidrogenasa descarboxilante (18) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (40, 105, 107). Estos efectos son revertidos por pulsos de luz rojo lejano indicando la participación del fitocromo (18, 38, 95).

Con respecto a PEPC la forma de la enzima cuya síntesis es inducida durante el proceso de enverdecimiento de plantas C₄ etioladas expuestas a la luz, es la que posee las características de la isoforma fotosintética, tanto en el caso de maíz (23), como también en el sorgo (107, 105).

Poco se sabe acerca del mecanismo molecular a través del cual fitocromo es capaz de transducir la señal luminosa, aunque se ha reportado que: 1) incrementa la degradación del ARN mensajero que codifica para sí mismo (87); 11) estimula la transcripción en nucleos aislados (90) y, 111) que media respuestas en organelos aislados, siendo en apariencia las membranas su sitio de acción (69, 71). Es por esto que se han propuesto varios mecanismos para explicar su participación en la regulación por luz de la expresión genética, pero ninguno de ellos está a la fecha apoyado por suficiente evidencia experimental (57).

2.2.4.2 For su estado de actividad. La necesidad de mecanismos de regulación de la actividad enzimática por luz, surge de la ausencia

relativa de compartimentalización tanto en el citoplasma como dentro del cloroplasto, que separe a las enzimas degradativas de las enzimas fotosintéticas, las cuales, de funcionar simultáneamente - darían lugar a ciclos inútiles, con el consecuente desperdicio de energía, esqueletos carbonados, nitrógeno, etc. (14). Por esto, no es sorprendente encontrar que además de regular la expresión genética, la luz puede regular la actividad enzimática a nivel post-traduccional (1, 14, 95), Algunas respuestas dependientes de luz azul o de luz roja que no están ligadas a la expresión genética podrían ser de este tipo (17, 60, 95). Sin embargo, los mecanismos de regulación de la actividad enzimática mejor estudiados son fosforilación-defosforilación de proteínas, el cual es dependiente de la fotofosforilación y oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo que es dependiente de la cadena de transporte de electrones, ambos procesos activos bajo condiciones de iluminación y capaces de modular "in vitro" e "in vivo" la actividad de un número considerable de enzimas de cloroplasto involucradas en el ciclo de Calvin (14, 64, 84, 112) y ruta C_4 (1, 2, 14, 113), así como enzimas cloroplásticas y citoplasmáticas que participan en glucólisis (1, 61, 112) y el ciclo de las pentosas fosfato. Estos dos mecanismos se describen a continuación en relación con la regulación de dos de las principales enzimas del metabolismo C_4 y dado que son de tal naturaleza que producen una modificación estructural relativamente estable de las enzimas, la cual va ligada a un cambio en la actividad, no deben confundirse con los efectos regulatorios de la luz mediados por cambios en la concentración de metabolitos, pH y/o iones.

2.2.4.2.1 Enzimas cuya regulación por luz ha sido descrita.-

Piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK). Esta es, a la fecha la única enzima fotosintética, para la cual está demostrado que se regula "in vivo" por un mecanismo de fosforilación-defosforilación. Esta proteína puede encontrarse en una forma fosforilada inactiva presente durante la noche y en una forma no fosforilada activa durante el día (2, 3, 28). Se ha identificado además una proteína capaz de catalizar la fosforilación de esta enzima (28, 44, 16) utilizando ADP como sustrato (2, 3, 61) y requiriendo bajas concentraciones de ATP como efector alostérico (2, 99). La misma proteína es también capaz de llevar a cabo la defosforilación de la PPDK fosforilada y al parecer esta actividad es dependiente de fosfato inorgánico (2,3, 28, 81).

Este mecanismo de regulación de la actividad enzimática por fosforilación-defosforilación regulada por luz podría ser más general, puesto que se ha reportado, que algunas cinasas de cloroplasto de plantas C_3 son capaces de fosforilar "in vitro" en presencia de luz, a polipéptidos no identificados (8, 67), y por otra parte Nimmo y colaboradores, trabajando con FEPC de plantas CAM han aportado datos experimentales que sugieren que dicho mecanismo podría ser operante también en citoplasma (83).

Málico deshidrogenasa dependiente de NADP (MDH-NADP). Esta es una enzima del estroma de cloroplasto de las células de mesófilo, que presenta un estado inactivo, (con ciertos grupos sulfhidrilo oxidados) que se presenta "in vivo" durante la noche y un estado activo (con los grupos sulfhidrilo antes mencionados en estado re-

ducido) presente durante el día (28, 53, 65, 80). Más conocido y - y mejor estudiado que el anterior, el mecanismo de oxidación-reduc ción de grupos sulfhidrilo da lugar a la regulación por luz de la actividad "in vivo" de un número considerable de enzimas tanto clo roplásticas como citoplasmáticas que sufren un cambio estructural reversible, ligado al cambio de sus características cinéticas, -- cuando ciertos puentes disulfuro son reducidos a sulfhidrilos - (Figura 3B, ref. 14). Se han aislado proteínas solubles llamadas - tiorredoxinas tanto en especies C_3 (14, 15, 54, 64), como de espe- cies C_4 (15), presentes en cloroplasto y también en citoplasma y - que contienen grupos sulfhidrilo de potencial redox muy negativos siendo por tanto, capaces de reducir "in vitro" con cierta especi- ficidad, los puentes disulfuro responsables del control de la acti- vidad de varias enzimas de las que se sabe que están sujetas "in - vivo" a este mecanismo regulatorio (14,15). Las tiorredoxinas pue- den a su vez, ser reducidas "in vitro" en presencia de luz, por - preparaciones crudas de la enzima tiorredoxina-reductasa dependien- te de ferredoxina obtenidas de organismos fotosintéticos (14). Se han aislado además sistemas membranales capaces de reducir "in vi- tro" en presencia de luz varias de las enzimas reguladas por oxida- ción-reducción de grupos sulfhidrilo (Figura 3A, ref. 1, 76). Es- tos sistemas membranales llamados LEMS (Light Effect Mediators) po- drían ser también operantes en la regulación "in vivo" de dichas enzimas, no habiéndose aclarado aún si ambos mecanismos operan "in vivo" simultaneamente ya sea en forma conjunta o independiente.

2.2.4.2.2 Enzimas cuya regulación por luz no ha sido aún aclarada.-

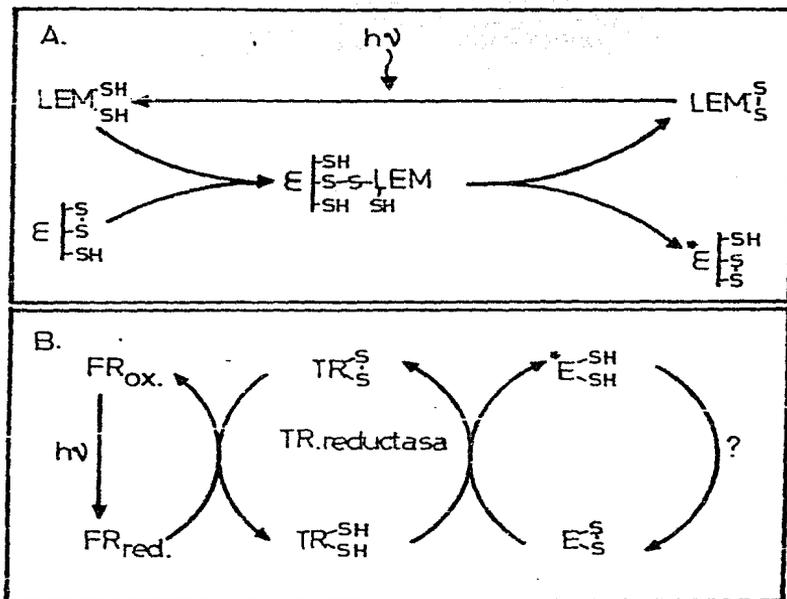


Figura 3. Mecanismos propuestos para explicar el mecanismo molecular de regulación de la actividad enzimática por oxidación-reducción de grupos sulfhidriilo. A. mecanismo propuesto por Anderson (1). LEM. proteína mediadora del efecto reductor de la luz; E. Enzima oxidada, forma de noche; E*. Enzima reducida, forma de día. B. Mecanismo propuesto por Buchanan (14). FR. Ferredoxina; TR. Tiorredoxina; E y E* igual que en la parte A.

Malato deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP. Esta es una enzima del estroma de cloroplasto de vaina vascular responsable de la descarboxilación de la mayor parte del malato que proviene del mesófilo, al menos en maíz (43, 45, 97). Hasta la fecha no hay reportes en la literatura de esta enzima obtenida de plantas C₄ sufra cambios en sus propiedades moleculares como consecuencia de la iluminación. La regulación de su actividad podría -- más bien ejercerse a través de los cambios de concentración de sustrato, cofactor y/o pH que ocurran en el estroma del cloroplasto al pasar de luz a oscuridad o viceversa.

Se sabe que el pH óptimo de esta enzima es de 7.5, y que a este pH la enzima muestra inhibición por el exceso de sustrato. Sin embargo, esta inhibición disminuye de modo gradual a medida que el pH se incrementa. El resultado de ambos fenómenos actuando simultáneamente es un cambio en el pH óptimo a concentración elevada de sustrato (51). Esta propiedad podría constituir un mecanismo regulatorio por luz (43) ya que el pH del estroma del cloroplasto oscila entre 7.5 (en oscuridad) y 6.2 (bajo intensa iluminación)(116). Puesto que las concentraciones de malato existentes en el estroma del cloroplasto de vaina vascular no han sido determinados todavía, no es posible concluir si dicho mecanismo es o no realmente operante "in vivo". Por otra parte, se ha demostrado que los cloroplastos aislados de células de vaina vascular de maíz descarboxilan (4¹⁴-C) malato con lentitud, tanto en luz como en oscuridad, a no ser que se les suministre un sustrato exógeno como 3-PGA. Este hecho indica que la iluminación no es el factor responsable de la regulación de la actividad de esta enzima en forma directa, sino que

la actividad de esta enzima se coordina con las actividades que consumen NADPH, posiblemente, a través de la disponibilidad del cofactor oxidado (45, 116). Esto no es sorprendente, en virtud de que el cloroplasto de vaina vascular es deficiente en fotosistema II y, por tanto, una parte importante del poder reductor empleado en este organelo durante la fotosíntesis proviene de la descarboxilación oxidativa de malato (45). Otros autores han propuesto, además, que los niveles de fructosa-1,6-difosfato, que es un inhibidor alostérico de esta enzima, podrían tener un efecto regulatorio de su actividad "in vivo" (9, 10). Sin embargo, dado que se ha reportado que las concentraciones de fructosa-1,6-difosfato, así como los otros azúcares fosfato, se incrementan durante los períodos de luz (7, 63, 98), es poco probable que este sea un factor regulatorio "in vivo".

Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). La acción concertada de la luz sobre la actividad de las enzimas PPK y MDH-NADP, ya discutida, parecería ser suficiente para explicar la regulación noche-día de la sección de la ruta C_4 que tiene lugar en la célula del mesófilo. No obstante, deben tenerse en cuenta los siguientes hechos:

1) La reacción catalizada por PEPC es prácticamente irreversible bajo las condiciones imperantes en la célula. Por tanto esta enzima actúa virtualmente como una bomba capaz de canalizar su sustrato hacia la formación de malato y/o aspartato, moléculas que actúan como transportadoras del CO_2 a las células de vaina vascular. Debido a que no existe reacción inversa, cuando el producto no es

requerido en esta ruta metabólica (la fijación de CO_2 esta detenida durante la noche (63, 93, 102)), la bomba debe estar apagada para evitar una acumulación de intermediarios (OAA, malato y aspartato).

ii) PEP el sustrato de PEPC es un metabolito central en el metabolismo general de las plantas (22)(Figura 4), siendo glucólisis una de las rutas más importantes en que participa. En varias plantas C_4 se ha demostrado que las enzimas glucolíticas enolasa y piruvato cinasa, cuyo sustrato es PEP, se encuentran al igual que PEPC en el citoplasma (24), y si bien hay reportes sobre la existencia de isoenzimas con estas actividades en cloroplasto (24, 79), en plantas C_4 , estas parecen ser minoritarias (47). Por tanto, durante la noche cuando la producción de PEP via PPDK se detiene (-PPDK se encuentra inactiva en la oscuridad), PEPC podría competir por el mismo sustrato con las enzimas glucolíticas, que sí están activas durante los períodos de oscuridad. Dada la gran cantidad de PEPC presente en el mesófilo de plantas C_4 (se ha reportado que constituye hasta el 15 % de la proteína total soluble de la hoja - en este tipo de planta (40)), que se traduce en una elevada capacidad catalítica (su velocidad máxima en extractos crudos de maíz, es aproximadamente diez veces superior a la isoforma no fotosintética presente en hojas de plantas C_3 (49, 108)), sería de esperar que en caso de que esta enzima tenga acceso al PEP citoplasmático producido por glicólisis, interfiera de manera notable con el funcionamiento de esta importante ruta alternativa de consumo de carbohidratos que reporta menor ganancia de energía y que además, pro

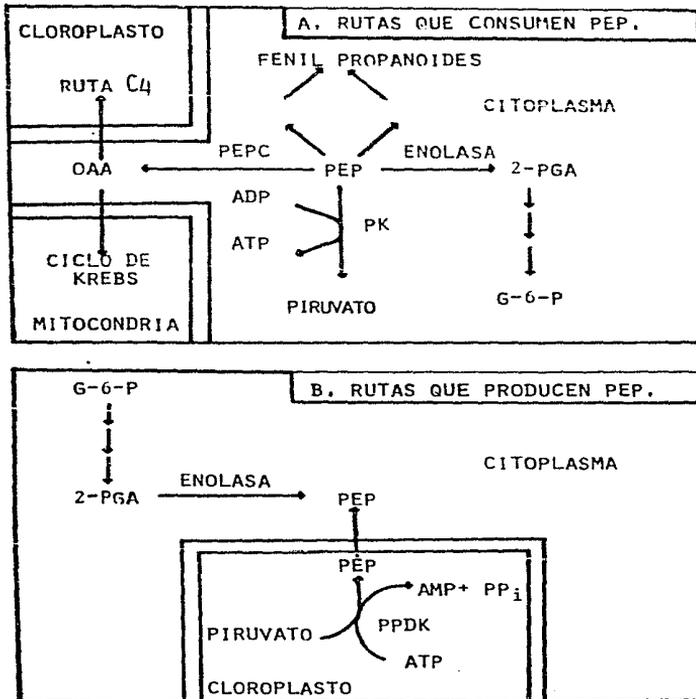


Figura 4. esquema de las rutas metabólicas que consumen (parte A) y que producen (parte B) fosfoenolpiruvato (PEP) en el metabolismo de las plantas C₄.

OAA, oxalacetato; 2-PGA, 2-fosfoglicerato; G-6-P, glucosa-6-fosfato. Otras abreviaturas se dan en el texto.

duce acumulación de intermediarios del ciclo de Krebs (Figura 5).

La existencia de una regulación por luz a corto plazo de esta enzima fué reportada como ya se ha mencionado por Karabourniotis y Col. para varias plantas C_4 (55, 56) y por Iglesias y Andreo para maíz (50). Sin embargo, los primeros no fueron capaces de detectar ningún cambio en la enzima extraída de hoja de plantas de maíz mantenidas en luz o en oscuridad, generando así serias dudas sobre el reporte de Iglesias y Andreo que es poco concluyente y sobre la necesidad de una regulación de la actividad de PEPC "in vivo", ya -- que tal parece no ser un fenómeno de ocurrencia general en plantas C_4 .

Iglesias y Andreo en su estudio con PEPC de hoja de maíz (50) proponen un mecanismo de regulación de la actividad de esta enzima basado en la oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo de la proteína, apoyados en el hecho de que tras la incubación de un extracto crudo, obtenidos de hojas mantenidos en oscuridad, con DTT, la actividad de PEPC se incrementa hasta los valores que obtuvieron cuando el extracto fué obtenido de hojas preiluminadas, sobre el que además, DTT no tenía ningún efecto. Karabourniotis y Col. (55, 56, 70) proponen un mecanismo similar para la regulación por luz de la actividad de PEPC en aquellas especies C_4 en que la detectaron. Más aún, estos autores reportan que el tratamiento de las hojas con DCMU (un inhibidor de la cadena de transporte de electrones) anula la fotoactivación de PEPC y concluyen de esta observación que el sistema de transporte de electrones del cloroplasto debe estar implicado en el mecanismo de regulación, probablemente

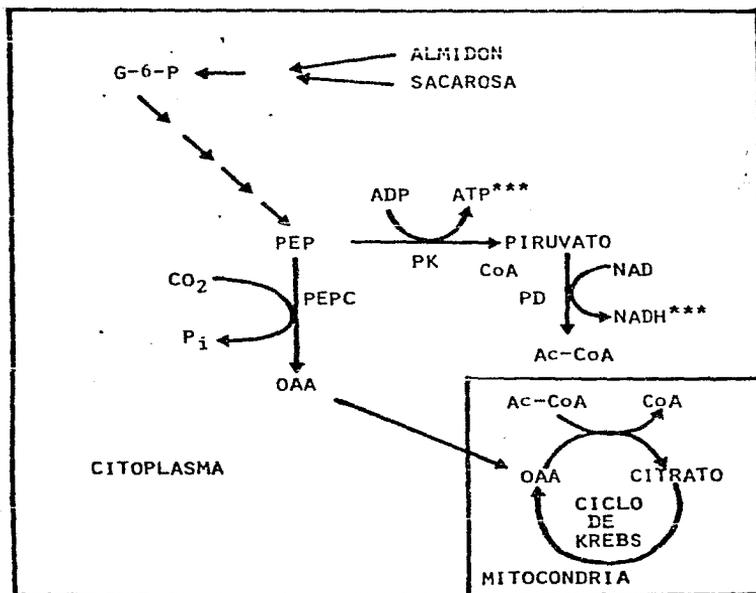


Figura 5. Esquema que ilustra la competencia que se presentaría si tanto glucólisis como PEPC estuvieran activas al mismo tiempo, con acceso a la misma poza metabólica de PEP.

***) Obsérvese la ganancia de energía. Esta no se presenta cuando PEP es convertido por PEPC en lugar de PK. PEP. fosfoenolpiruvato; PEPC fosfoenolpiruvato carboxilasa; PK. piruvato cinasa OAA. oxalacetato; Ac-CoA. acetil-coenzima A; G-6-P. Glucosa-6-fosfato; PD. piruvato deshidrogenasa.

porque prevée los equivalentes de reducción que finalmente producirían la actividad de PEPC al realizar un puente disulfuro específico, por otro lado, en las especies CAM, en las que PEPC también posee una función fotosintética, se ha demostrado de manera clara que la regulación de esta actividad por luz se realiza a través del paso de la forma de noche que es un tetramero activo, a una forma dimérica inactiva durante el día. La inactivación en este último caso, procede a través de una disociación inducida por un incremento en los niveles de malato (uno de los inhibidores más importantes de esta enzima) y un descenso en el pH citoplasmático (33, 114). Puesto que, a pesar de pertenecer a grupos de plantas diferentes, las propiedades moleculares de PEPC de hoja de plantas C₄ y CAM no parecen diferir notablemente (inmunológicamente presentan reactividad cruzada (21, 105, 107)), no resulta ilógico pensar que este mecanismo de regulación pudiera operar también en plantas C₄.

2.3 Histéresis

2.3.1 Definición.

Las enzimas histeréticas son definidas como las enzimas que responden lentamente (en términos de algunas características) a cambios rápidos en los ligandos a cualquier concentración de modificador o susstrato. Tales cambios lentos, definidos en términos de la reacción catalítica relativa y absoluta, resultan en un retraso en la respuesta de la enzima a cambios en el nivel de ligandos, que puede ser por varios mecanismos: isomerización, desplazamiento de dobles ligaduras por otros ligandos o por polimerización

o depolimerización. El cambio dependiente del tiempo en la actividad enzimática es similar para muchas enzimas diferentes, un gran número de ellas podrían caer en la categoría denominada histerética y tales enzimas son frecuentemente importantes en la regulación metabólica. El tiempo de conversión de una forma cinética a otra puede variar de algunos segundos a minutos (31).

2.3.2 Mecanismos moleculares implicados en el fenómeno de histeresis.

Posibles bases estructurales para cambios conformacionales.

Un cambio conformacional lento de una proteína difiere de uno rápido, solo en el hecho de que tiene mayor dificultad en atravesar la barrera al estado nuevo. En la transición conformacional lenta pueden existir varias posibilidades (ver Figura 6. ref.82).

La primera posibilidad podría ser una rotación o movimiento de dos α -helices con respecto una de otra, que permite entrar en contacto a dos regiones análogas en las intersubunidades y hacer una estructura más compacta sobre el sustrato ligado (Figura 6a).

Otra posibilidad es la isomerización cis-trans de residuos de prolina (cuya ocurrencia se ha demostrado), como ocurre en la renaturalización de la ribonucleasa, o en el cierre conformacional de concanavalina A en la presencia de cationes metálicos divalentes. Ambos fenómenos han sido la interpretación en términos de una isomerización entre conformación cis-trans de un residuo de prolina (Figura 6b).

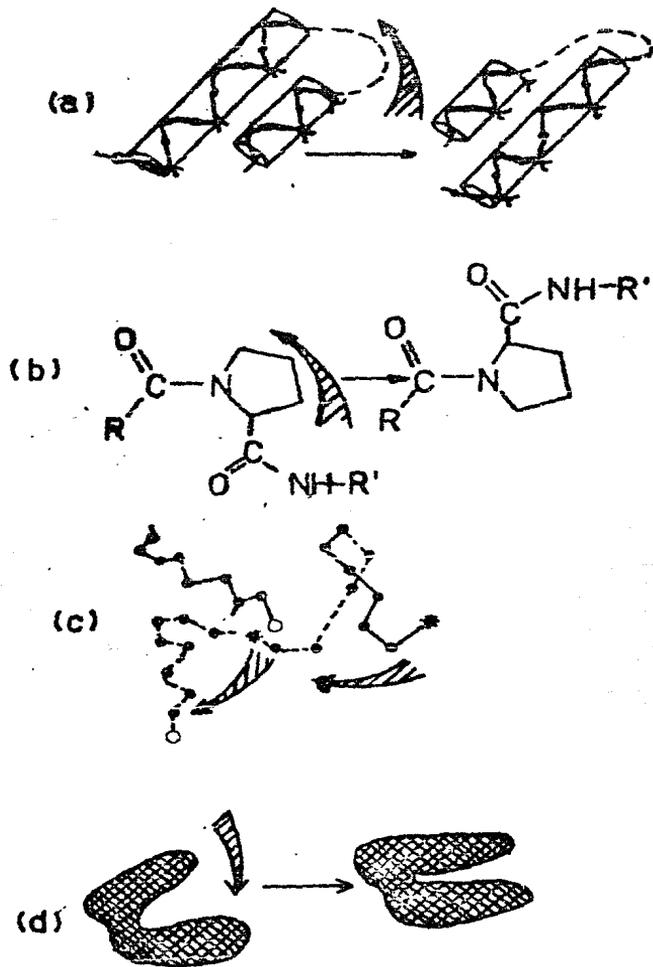


FIGURA 6. Posibles bases moleculares para cambios conformacionales lentos. (a) Rotación de 2 α -helices una respecto a otra. (b) Isomerización Cis-Trans de una ligadura. (c) Movimiento segmental de una porción larga de una cadena. (d) Movimiento giratorio del campo respecto a cada uno. (Ref.82).

La tercera posibilidad podría ser llamada como "rotación segmental" de una porción relativamente grande de la proteína sobre un residuo de prolina que puede ser ejemplificado por quimotripsina. El cambio conformacional es lento a valores de pH grandes y se ha propuesto que es el mecanismo que ocurre en la activación de quimotripsinógeno a quimotripsina (Figura 6c).

La cuarta posibilidad para un cambio conformacional lento podría ser llamado un "movimiento giratorio" de un domino respecto a otro. Esto parece ocurrir en hexocinasa cuando se une a glucosa, pero es sabido que la transición no es lenta en este caso, puesto que se requieren ambos sustratos para que ocurra. Un movimiento como este de "bisagra" sin embargo, podría ocurrir lentamente (Figura 6d).

Las cuatro transiciones anteriores comparten una de las propiedades más esperadas para un cambio conformacional, el formar o romper muchas interacciones simultáneamente; es decir, cargas de repulsión, impedimentos estéricos para el movimiento; o movilidad desfavorable alrededor de esas interacciones. Los estudios de cristalografía de rayos-X, reactividad química de grupos específicos, cambios en la fluorescencia y otras técnicas comunes en el estudio de estructura de proteínas serán herramientas útiles para determinar los detalles de cambios histeréticos (82).

Activación energética de cambios conformacionales lentos.

Estudios energéticos de la isomerización de enzimas nos pueden proveer de información acerca de los cambios moleculares que están ocurriendo y posiblemente del papel de la isomerización en

la función de la enzima. Las transiciones más lentas son caracterizadas por una gran energía de activación, pero la contribución de la entalpía de activación y entropía de activación podría diferenciar varios aspectos de las isomerizaciones enzimáticas. Se necesitan estudios de activación energética relacionados con cambios estructurales de la enzima para ver si existen correlaciones directas.

Sistemas de polimerización y depolimerización.

Las enzimas también pueden presentar histéresis cuando experimentan reacciones reversibles de asociación a formas de peso molecular más alto. Frecuentemente las constantes de equilibrio para la polimerización puede ser afectado por ligandos, los cuales son también sustratos o modificadores. La situación con respecto a la descripción para tales fenómenos podría ser considerablemente más complicada que la isomerización o mecanismos de desplazamientos considerados anteriormente, aunque bajo algunas condiciones la descripción global del mecanismo que sigue podría ser análoga.

La situación para un caso de polimerización que puede ser similar a la del caso de isomerización aunque más compleja, depende en todo caso de cual sea el paso determinante, si la asociación de monómeros o el cambio conformacional que sigue a la polimerización de la enzima. Cual sea el proceso limitante, podría depender de la concentración de proteína (una alta concentración de enzima favorecería la polimerización y viceversa)(31).

2.3.3 El fenómeno de la histéresis como regulador metabólico.

La respuesta de una enzima a cambios en concentración de ligandos es una condición inherente al modelo propuesto relacionado a las características regulatorias de las proteínas en varios casos. Las posibles consecuencias fisiológicas del mecanismo anterior han sido comúnmente abordadas en la literatura y podría proponerse una correlación entre las características cinéticas de una enzima y su papel en la regulación metabólica. Sin embargo los procesos regulatorios incluyen sistemas complejos con diferentes vías que utilizan intermediarios comunes, lo cual supone la existencia de enzimas regulatorias con una cinética compleja en los puntos clave para la regulación. Las consecuencias fisiológicas de una respuesta lenta puede ser muy distinta a las de una respuesta rápida y dichos mecanismos pueden ser importantes en la regulación total del complejo proceso metabólico.

Una de las más notables virtudes fisiológicas de la histéresis es que puede servir como un amortiguador para la inhibición por retroalimentación, por productos de varias rutas que de otro modo tendrían efectos profundos y rápidos en los flujos a través de esas rutas. Frieden (31) ha discutido las formas en el cual las enzimas histeréticas podrían contribuir al control del flujo de metabolitos en una secuencia o red de enzimas por efecto "amortiguador". Para una enzima alostérica normal si la concentración de algún efector retroalimentador se eleva hasta un nivel inhibitorio y permanece en esos niveles, la concentración de todos intermediarios y productos finales decrecerá a niveles más bajos, sin embargo, con

inhibición histerética, los niveles de los intermediarios y productos finales pueden continuar su nivel preinhibido por un tiempo - más largo. Por ejemplo, una respuesta histerética requerirá un - cierto tiempo para detenerse por el exceso del inhibidor retroalimentador antes de que decrezca la proporción de síntesis de otros intermediarios y productos finales de esa ruta metabólica. Si el - exceso inhibitor es transformado rápidamente, la enzima histerética puede presentar una respuesta mínima y no habrá cambios en la - concentración de sustratos o efectores. Para que esto sea efectivo el tiempo o constante de histeresis tendría que ser del mismo orden de magnitud que el período de oscilaciones inherentes a la ruta.

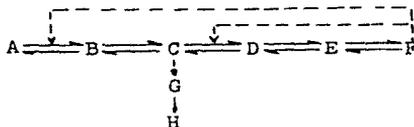


Figura 7. A y H son intermediarios en una ruta metabólica. Las líneas continuas indican la dirección del flujo en la ruta. Las líneas discontinuas indican inhibición por retroalimentación.

Bajo ciertas circunstancias los niveles de intermediarios podrían presentar un incremento temporal en respuesta a un incremento en el nivel del inhibidor antes de decrecer a su valor final. Si la inhibición por retroalimentación de F, anterior a la división de la vía (Figura 7 ref. 82), inhibe histeréticamente la conversión A-B y rápidamente inhibe C-D ó (D-E si C-D es reversible) el nivel de C y de H aumentará temporalmente hasta que la inhibición his-

terética se vuelva efectiva. Los aumentos temporales del nivel de H cuando F está en exceso podría ser benéfico, por ejemplo, en el caso de que H y F sean aminoácidos que debieran incorporarse a proteínas en una proporción específica. La ruta fotosintética de treonina (T) y lisina (L) en Escherichia coli deberá comportarse - de esta manera, debido a las dos transiciones histéricas de la - enzima bifuncional aspartocinasa-homoserina deshidrogenasa I.

Otro beneficio potencial fisiológico de la histéresis es generar cooperatividad cinética. Si una enzima muestra cooperatividad cinética positiva o negativa, entonces las respuestas se presentan en rangos de concentración muy amplios o muy reducidos, debido a interacciones que pueda tener.

2.3.4 Ejemplos de enzimas que presentan comportamiento histérico.

Muchas enzimas muestran propiedades histéricas y están ligadas a cooperatividad cinética, pueden clasificarse en cuatro subdivisiones de acuerdo al periodo de retraso o al tipo de cooperatividad que muestran.

Clase I. Funciones incidentales. Son algunas enzimas que pueden mostrar histéresis o cooperatividad histérica con ciertos - sustratos, los cuales no son relevantes para el funcionamiento de la enzima. Esto podría ser un simple reflejo de transición lenta - inducida por el sustrato desusual o combinación incidental, como - es el caso de quimotripsina y ribonucleasa, dos enzimas digestivas que parecen caer en esta categoría.

Clase II. Efecto amortiguador. Un papel potencialmente importante que la histéresis podría jugar en los organismos vivos, es el de amortiguar cambios rápidos en la respuesta al sustrato o efector, tales amortiguadores podrían prevenir a la célula de algunos cambios o fluctuaciones, cuando algún metabolito particular se incrementa y decrece en concentración en ciclos sucesivos. Para algunas enzimas estos fenómenos son difíciles de determinar, puesto que mediante el estudio de enzimas aisladas no se puede determinar la interacción con otras enzimas del sistema. Dos enzimas han sido propuestas como candidatos para tener una respuesta amortiguadora: fosfofructocinasa y aspartocinasa (segunda transición). El tetrámero de fosfofructocinasa se disocia reversiblemente a un dímero inactivo mediante una dilución a pH menor a 7, con un tiempo medio entre 10 y 90 minutos. La disociación es promovida por el pH bajo y temperaturas bajas y es dependiente de la concentración de la enzima. Es interesante que la fosfofructocinasa muestra además inactivación lenta por dilución, la cual no se acompaña de alteración en el peso molecular. Las propiedades alostéricas y cooperativas de la enzima muscular, se presentan en el tetrámero sugiriendo que la disociación lenta podría jugar un papel amortiguador en las fluctuaciones de metabolitos, particularmente cuando el pH del músculo llega a ser muy ácido durante la anaerobiosis.

Clase III. Cooperatividad de una enzima monomérica. Una función importante de la histéresis en una enzima monomérica, es la de poder conferirle cooperatividad cinética. Sin embargo, es difícil demostrar inequívocadamente, que la enzima es monomérica bajo condiciones fisiológicas. Dos enzimas: hexocinasa de germen de tri

go y glucocirasa de hígado de rata parecen satisfacer los criterios. El mecanismo mnemónico ha sido explicado mediante la histéresis y la cooperatividad negativa de la enzima. El concepto de "enzima mnemónica" describe un mecanismo cooperativo, en el cual la forma de la enzima liberada (monomérica) por la disociación del complejo enzima-producto de la reacción, se puede isomerizar a otra forma y en ambos estados la enzima libre puede combinarse con el sustrato.

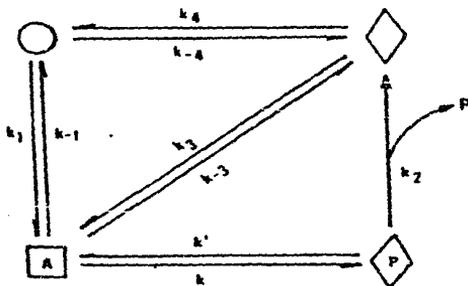


Figura 8. El mecanismo mnemónico para una enzima monomérica monosustrato. El círculo y rombo representa las dos conformaciones posibles de la enzima libre, si $K_1 > K_3$ se observaría cooperatividad negativa; si $K_1 < K_3$ se observaría cooperatividad positiva.

En la Figura 8 (82), el complejo enzimático glucosa-6-fosfato se disocia de la enzima dejando la forma representada por los rombos, esta forma puede entonces también isomerizarse lentamente a la forma representada por los círculos o combinarse con glucosa, -

ambas formas círculo-glucosa ó rombo-glucosa pueden isomerizarse a la forma representada por el cuadrado; esta forma puede entonces - combinarse con ATP, catalizar la reacción liberando ADP y liberando glucosa-6P, durante la acción catalítica seguida de la liberación del producto, la enzima es convertida nuevamente al estado - del rombo.

Clase IV. Alteración de la cooperatividad en una enzima oligomérica. Las enzimas oligoméricas pueden generar cooperatividad - a través de las interacciones entre los sitios para el ligando en diferentes subunidades. En tales casos, una alteración de cooperatividad pueden ocurrir como resultado de una disociación lenta que limite las interacciones sitio-sitio. La cinética de la enzima - aspartocinasa-homoserina deshidrogenasa I (AK-HSDH) de E. coli ha sido totalmente interpretado en términos de un mecanismo que involucra histéresis e interacciones cooperativas entre subunidades.

AK-HSDH ha mostrado sufrir dos transiciones histeréticas. La primera transición (R \rightarrow T) es asociada con la unión de treonina y - tiene una constante de tiempo del orden de 0.1 segundos. Esta primera transición ha demostrado ser una isomerización; esto produce un complejo enzimático de treonina el cual está 80-90 % inhibido - para ambas actividades de AK-HSDH. La segunda transición, (T \rightarrow U) - es una isomerización que ocurre en una escala de tiempo mucho más larga (del orden de minutos) y está relacionada con la unión de treonina a un segundo grupo de cuatro sitios de baja afinidad, esta isomerización no afecta la actividad de la HSDH, pero reduce la actividad de AK a cero.

El componente cinético de cooperatividad ha sido interpretado en términos de la primera transición ($R \rightarrow T$), la cual afecta solo a la actividad de AK, que parece no influir en la cooperatividad, pero podría ser importante para amortiguar las oscilaciones del flujo de metabolitos en E. coli (p.e. Clase II histéresis), así como un solo punto de ligamiento de sitios de treonina (gran afinidad).

2.3.5 Comportamiento histerético de PEPC.

Los únicos estudios de histéresis realizados hasta la fecha con PEPC son los de Wohl y Markus (111) en los que llegan a las siguientes conclusiones:

PEPC de E. coli, cepa B (ATCC 11303) sufre un retraso en la formación del producto y el período de retraso depende de las condiciones experimentales. El período de retraso es acortado por la adición progresiva de sustrato, también la presencia de activadores la acortan, en tanto que los inhibidores alargan este período. La actividad final está asociada con el período de retraso y también depende de los ligandos presentes en el medio de ensayo. Los efectos de los ligandos alostéricos sobre el período de retraso son rápida y completamente reversibles; la fase de retraso observada después de la adición del sustrato a preparaciones incubadas con inhibidores o activadores, es independiente del tiempo de incubación de la enzima con estos efectores. La concentración de la enzima es inversamente proporcional a la fase de retraso en ensayos que se mantienen en las mismas condiciones, esta dependencia indica que la fase de retraso es un proceso de agregación, previo al establecimiento de las condiciones de estado estacionario en el -

cual predomina la especie agregada que es más activa. Un período de retraso grande entonces significa: que al tiempo de la adición del sustrato, la enzima está muy disociada. El activador promueve la asociación y el inhibidor por supuesto promueve la disociación.

Puesto que la especie enzimáticamente activa es un tetrámero con subunidades idénticas de peso molecular de 100 000 cada una, el período de retraso podría corresponder a una dimerización de dos de las cadenas.

A concentraciones infinitas de sustrato, la fase de retraso llega a ser independiente de la concentración de la enzima, esto indica que la fase de retraso en estas condiciones no es originada por el proceso de asociación, sino que podría corresponder entonces a una reacción que ocurre entre el sustrato y la forma asociada de la enzima, misma que debería tomar lugar antes que la enzima pueda actuar a velocidad máxima.

Así, la fase de retraso consiste en dos componentes, uno de duración variable, correspondiente a el tiempo necesario para la asociación de subunidades, y uno constante que refleja una reacción entre la enzima asociada y el sustrato.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Equipo.

Para medir la actividad enzimática se empleó un espectrofotómetro Pye Unicam modelo SF 1800 de doble haz con control de temperatura constante y registrador integrado.

La balanza analítica utilizada para pesar los reactivos químicos fue Mettler modelo H6 (con capacidad de 160 ± 0.0001 gr).

La homogeneización de pequeñas cantidades de tejido se hizo en un politrón Jane & Kunkel ultra-turrax con pistilo 10 N. Para homogeneizar mayores cantidades de tejido se usó una licuadora marca Osterizer modelo Pulso-matic.

Para medir el pH se utilizó un potenciómetro Conductronic con precisión de ± 0.01 y un electrodo Beckman.

Para centrifugar se utilizó la centrífuga Beckman modelo J2-21 ó una microfuga Hawksley.

Las preparaciones químicas y soluciones que necesitaban temperaturas bajas de almacenamiento fueron guardadas en un refrigerador marca Benlix (4°C) o en un congelador (-20°).

Las microjeringas empleadas fueron marca Hamilton de 10 y 100 microlitros.

Para el ensayo de la actividad de PEPC se utilizaron celdas -

de cuarzo de 1 ml de capacidad.

Para la agitación de tubos se utilizó un Vortex Genie modelo K-550-G.

Se utilizaron platos magnéticos Corning modelo PC-351 para la agitación de soluciones.

Se utilizó Nitrógeno gaseoso de INFRA para la eliminación de CO₂ en los medios de ensayo.

3.1.2 Reactivos.

Los reactivos empleados en esta investigación, todos de grado analítico, fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales.

De Merck: Tris(-hidroximetilaminometano), fosfato de potasio monobásico y dibásico, glicerol, sulfato de amonio, ácido clorhídrico, cloruro de potasio, Trietanolamina (TEA), Etilendiaminotetracético (EDTA), Tricloroacético (TCA), Polietilenglicol 6000.

De Sigma Chemical Co. β -mercaptoetanol, Nicotinaminadenin-dinucleotido reducido (NADH en sal disódica), fosfoenolpiruvato (sal de monociclohexilamonio), Deshidrogenasa málica (MDH de corazón de cerdo), ditiotreitol, L-ácido málico (sal disódica), azul brillante G, albúmina sérica de bovino, tritón X-100.

De Técnica Química S. A.: Bicarbonato de sodio.

De Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex G-25, azul de dextran.

3.1.3 Material biológico.

Se usaron semillas de maíz (Zea mays L. var. Chalqueño) provenientes del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.

3.2 Métodos

3.2.1 Crecimiento de plantas.

Las semillas de maíz fueron germinadas en tierra en un invernadero a una temperatura de 28-30°C con fotoperíodo natural. Para los experimentos se usaron siempre la cuarta y quinta hoja de plantas de aproximadamente un mes de edad.

3.2.2 Tratamientos de luz y oscuridad a las plantas.

Las plantas fueron guardadas en oscuridad absoluta ó iluminadas (40 000 - 50 000 lux) por tres horas antes de la extracción de la enzima. Los tratamientos en luz y oscuridad siempre fueron precedidos por un período de cuatro horas bajo luz natural.

Cuando la enzima fué extraída de plantas sometidas a oscuridad, esta se mantuvo en oscuridad hasta el ensayo.

3.2.3 Eliminación de CO₂ en los medios de ensayo.

Para la incubación de la enzima en algunos medios de ensayo libres de CO₂ se lleva a cabo el siguiente procedimiento: La solución amortiguadora para la determinación de la actividad se sumerge en baño a 30-35°C y se hace burbujear N₂ (gaseoso) por una hora, posteriormente se pone al vacío por 10 minutos. Esto se repite de

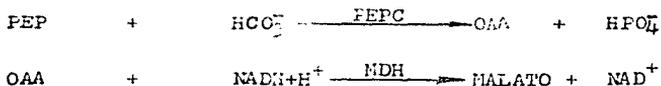
nueve a diez veces, siempre agitando suavemente. El volumen de agua evaporada debe reponerse periódicamente con agua libre de CO_2 . Decimos que esta libre de CO_2 cuando se hace el ensayo de actividad sin NaHCO_3 en las celdas herméticamente cerradas con atmósfera de N_2 (gaseoso) y no se detecta desaparición de NADH.

3.2.4 Extracción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa.

Se cortó y pesó la cantidad de hojas deseada, se lavaron y cortaron en trocitos eliminando la nervadura central. Este tejido se homogeneizó en un Politrón a máxima velocidad durante 40 segundos en una solución amortiguadora de extracción de TEA-HCl 100 mM a pH 7.0 y EDTA 4 mM, en una proporción de 1:10 (p/v). El homogenizado obtenido se filtró inmediatamente a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó en la microfuga (10 000 g) durante 30 segundos. El sobrenadante se desaló en una columna de G-25 previamente equilibrada con el mismo amortiguador de extracción. La muestra estuvo comprendida entre el 5 y 10 % del volumen de cámara así conseguir su desalamiento completo. Todo este procedimiento se llevó a cabo a 4°C en un cuarto frío y se realizaba en tiempos inferiores de cinco minutos.

3.2.5 Ensayo de actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa.

Se utilizó un sistema acoplado a la enzima málico deshidrogenasa (MDH E.C. 1.1.1.37) dependiente de NADH según el método descrito por Uedan (101). En este sistema el oxalacetato resultante de la carboxilación del fosfoenolpiruvato es reducido a malato gracias a la actividad de la enzima málico deshidrogenasa, que paralelamente oxida NADH a NAD^+ , según el siguiente esquema de reacciones



La cantidad de oxalacetato producido durante el transcurso de la reacción puede así medirse siguiendo el descenso de la densidad óptica a 340 nm debido a la conversión del NADH a NAD⁺. El amortiguador utilizado para determinar la actividad enzimática consistió en Trietanolamina-HCl 100 mM, sulfato de magnesio 10 mM a pH 7.0.

La composición del medio de reacción es el siguiente:

Reactivos	Volumen (ml)	Concentración final (mM) en el medio de ensayo
Amortiguador + MgSO ₄	0.500	100 + 10
NADH (20 mM)	0.010	0.2
DTT (200 mM)	0.010	2.0
NaHCO ₃ (1N)	0.010	10.0
PEP (200 mM)	0.005	1.0
MDH (300 unidades)	0.010	3 unidades
H ₂ O	El volumen necesario para completar	
Volumen final	$\frac{1 \text{ ml.}}{1.00 \text{ ml}}$	

Todas las celdas preparadas de esta manera se preincubaban durante 5 minutos para que alcanzaran la temperatura a la que se llevaba a cabo la reacción (30°C). La reacción se iniciaba añadiendo el volumen deseado de la preparación enzimática (casi siempre 50 µl).

La pendiente obtenida (cambio de densidad óptica/minuto) se midió en los primeros tres minutos de la reacción, donde se obtenía una adecuada linealidad de cambios de absorbancia frente a tiempo, con la excepción de aquellos casos en los que se observó reactivación, en estos casos se dejaban hasta cinco minutos. La reacción enzimática es de orden cero durante ese tiempo en nuestras condiciones experimentales. Para verificar la especificidad de la reacción se realizaron controles que consistían en registrar cambios de absorbancia en ausencia de PEP o de la preparación enzimática. En ambos casos no se observaron cambios de absorbancia.

La actividad enzimática de PEPC se calculó con la siguiente expresión:

$$A = \frac{(\Delta DO) \times v}{\epsilon \times V \times d}$$

En donde:

ΔDO = cambio de densidad óptica por minuto

v = volumen final de la mezcla de reacción

V = volumen de la preparación enzimática utilizada en cada determinación

ϵ = coeficiente de extinción molar de NADH a 340 nm
6.22 cm²/micromol

d = distancia del paso de luz en la celda (las celdas usadas fueron de 1 cm).

La actividad se expresó como los micromoles de PEP transformados en oxalacetato / minuto / ml de preparación enzimática. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzi

ma que carboxila 1 micromol de PEP / minuto bajo nuestras condiciones de ensayo (pH 7.0 a 30°C).

3.2.6 Caracterización de la histéresis.

La velocidad a tiempo cero, es decir, velocidad inicial (V_i), la velocidad de estado estacionario (V_{ee}), la duración de la fase de retraso (E) y la constante de velocidad aparente para la transición entre las dos velocidades (τ) se determinaron usando el método descrito por Neet y Ainslie (121). La curva de progreso de la reacción permite el cálculo de la velocidad inicial, que es la pendiente de la tangente a esta curva a tiempo cero. Así mismo las velocidades de la reacción durante el periodo de la transición y la final del estado estacionario pueden calcularse por las pendientes de las tangentes a la curva a diferentes tiempos (vease Figuras 9 A y B en resultados). La fase de retraso la definimos en este trabajo como el intersepto en el eje de las abscisas de la porción del estado estacionario de la curva de progreso, es decir, se puede calcular directamente extrapolando la región lineal de la reacción (Figura 9A). Esta fase de retraso (E) está relacionada con la V_i , la V_{ee} y por la siguiente expresión matemática:

$$R = \frac{(V_{ee} - V_i)\tau}{V_{ee}}$$

La forma de la curva de progreso para la reacción se describe mediante la ecuación:

$$V_t = V_{ee} - (V_{ee} - V_i) e^{-t/\tau} \quad (I)$$

En donde:

V_t = velocidad a tiempo t

V_{ee} = velocidad de estado estacionario

V_i = velocidad inicial

τ^{-1} = constante aparente de velocidad para la transición entre las dos velocidades.

La ecuación I puede expresarse en forma lineal:

$$\ln (V_{ee} - V_t) = \ln (V_{ee} - V_i) - t/\tau$$

por tanto una gráfica de

$$\ln (V_{ee} - V_t) \text{ vs } t$$

nos permite el cálculo de τ^{-1} que se obtiene a partir de la pendiente cuando se trata de un proceso de primer orden; V_t se determina a partir de las tangentes de la curva de progreso a intervalos sucesivos a lo largo de la fase no lineal. Todas las velocidades de estado estacionario se determinan en la fracción lineal de la curva de progreso de la reacción. Los datos se analizaron usando el método de mínimos cuadrados para obtener la línea de mejor ajuste a partir de la cual se determinó la pendiente negativa (τ^{-1}) (vease Figura 17 en resultados).

IV. RESULTADOS

4.1 Curva de Progreso de la Reacción Catalizada por PEPC

Cuando se usa una preparación de PEPC de hoja verde de maíz - recién extraída y desalada (descrito en Métodos) se observa una clara fase de retraso en la reacción catalizada por esta enzima. La velocidad de formación del producto es inicialmente baja, incrementándose paulatinamente hasta alcanzar una velocidad de estado estacionario más alta. En la Figura 9A se muestra la curva de progreso de un experimento típico así como la duración de la fase de retraso, determinada por extrapolación de la porción lineal del estado estacionario al eje de las abscisas. En la Figura 9B se muestra la evolución con el tiempo de la velocidad de la reacción catalizada por PEPC graficada en 9A. Como puede observarse se llega a un verdadero equilibrio ya que la velocidad del estado estacionario permanece constante por un periodo considerable. La duración de la fase de retraso es variable, habiéndose observado que puede ser del orden de segundos a varios minutos. Ello depende, entre otros factores, de las condiciones del ensayo de actividad, como se expondrá más adelante. Estas fases de retraso se deben a cambios conformacionales de la enzima, inducidos por la unión de un ligando, que llevan a la aparición de una estructura con diferentes propiedades cinéticas (31). Este fenómeno se denomina histéresis y puede ser caracterizado como se describió en Métodos.

4.2. Comprobación del Fenómeno de Histéresis

La fase de retraso no puede atribuirse a cambios en la tempe-

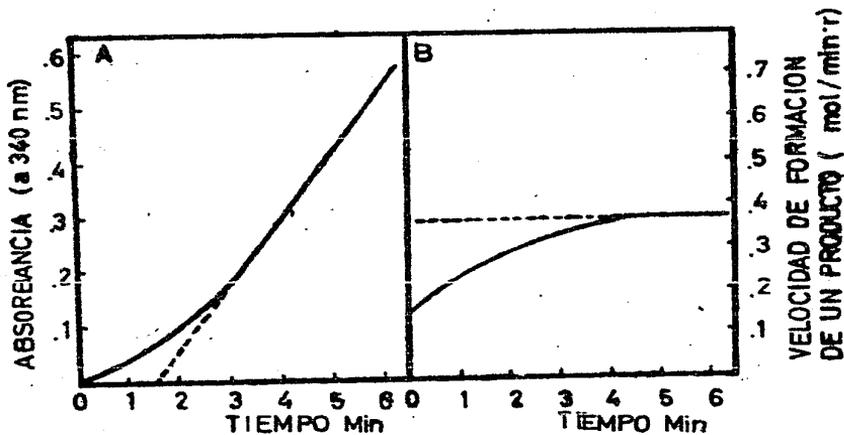


FIGURA 9. A. CURVA DE PROGRESO DE LA REACCION CATALIZADA POR PEPC EN EXTRACTOS CRUDOS DE HOJA DE MAIZ. EL ENSAYO DE ACTIVIDAD SE HIZO EN TRIETANOLAMINA-HCL 100 mM A pH 7.0, $MgCl_2$ 10 mM, NADH 0.2 mM, PEP 1 mM, $NaHCO_3$ 1.0 mM, MDH 3 UNIDADES Y SE EMPEZABA LA REACCION CON 50 μ l DE PREPARACION ENZIMATICA. B. EVOLUCION DE LA VELOCIDAD DE LA REACCION CATALIZADA POR PEPC. LOS DATOS EXPERIMENTALES CORRESPONDEN A LOS DE LA FIGURA 9A.

ratura, en el pH o en la composición del amortiguador en que se encuentra la enzima, puesto que el ensayo se realiza bajo condiciones similares a las de extracción, a excepción de la presencia de sustratos y efectores como se muestra en la Tabla 2.

Para comprobar que este comportamiento cinético de PEPC en extractos crudos de hoja de maíz es una propiedad de la enzima, reflejo de cambios reales en su estructura, inducidos por alguno(s) de sus ligandos y no es artificial, es decir, no es simulado por alguna limitación del método de ensayo de actividad utilizado. Se hicieron las siguientes pruebas:

1. En el caso de ensayos de actividad en los que se usa acoplada a la reacción catalizada por una segunda enzima, como el uso en este trabajo para medir la actividad de PEPC, puede aparecer una fase de retraso en la reacción si se usa una concentración insuficiente de la enzima acoplada (82). Ello es debido a que tiene que alcanzar una concentración finita del producto antes que sea observable la velocidad máxima. Lógicamente, estas fases de retraso no son motivadas por un proceso histerético. Para eliminar esta posibilidad, en estos casos se comprobó que con la adición de concentraciones crecientes de málico deshidrogenasa (MDH) no disminuía la duración de la fase de retraso (Tabla 3), demostrándose así que la concentración de esta, usada en los ensayos no era limitante.

2. Como prueba de histéresis se recomienda que tras alcanzar la velocidad de estado estacionario, se adicione una segunda alícuota de la enzima, debiéndose observar una nueva fase de retraso (82). Sin embargo, en estos casos no se pudo detectar esta segunda fase

TABLA 2. COMPARACION ENTRE EL MEDIO DE EXTRACCION Y EL ENSAYO DE ACTIVIDAD DE PEPC.

Condiciones de extraccion	Condiciones de ensayo de actividad
Temperatura ambiente (20°C)	30°C
TEA-HCl 100 mM a pH 7.0	TEA-HCl 100 mM a pH 7.0
EDTA 4 mM	----
----	PEP 1 mM
----	NaHCO ₃ 10 mM
----	MgCl ₂ 10 mM
----	enzima 20 veces menos concentrada que en el medio de extracción.

TABLA 3. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE MALICO DESHIDROGENASA SOBRE LA ACTIVIDAD Y LA DURACION DE LA FASE DE RETRASO DE PEPC*

Málico deshidrogenasa unidades/ml	R (minutos)	Vee unidades/ml
1	1.4	0.268
3	1.5	0.257
6	1.5	0.254

* Se usaron extractos crudos de hoja de maíz y las determinaciones de actividad se hicieron en un medio que contenía TEA-HCl 100 mM a pH 7.0, MgCl₂ 10 mM, NADH 0.2 mM, PEP 1 mM, NaHCO₃ 10 mM, MDH concentraciones variables y la reacción se iniciaba con una alícuota de 50 µl de extracto.

de retraso, por el contrario, la actividad medida después de la segunda adición de enzima era inferior a la inicial produciéndose una rápida inactivación (no motivada por el agotamiento de sustrato), de forma que nunca se produjo el esperado incremento de actividad (Tabla 4).

4.3. Efecto del Tiempo Transcurrido Después de la Extracción Sobre la Duración de la Fase de Retraso

La duración de la fase de retraso va disminuyendo a medida -- que transcurre el tiempo después de la extracción de la enzima (Figura 10), tanto en los extractos de plantas iluminadas como en los de plantas mantenidas en oscuridad. Esto se acompaña de una reactivación de la enzima, es decir, las velocidades iniciales medidas -- van siendo cada vez más altas mientras que se mantienen constantes las velocidades de estado estacionario (Figura 11 A y B). Ello descarta la posibilidad de que la pérdida de la fase de retraso se deba a inactivación irreversible (por ejemplo, por proteólisis) de la forma reactivable de la enzima.

En base a estos resultados, todos los estudios que se realizan posteriormente y que se describen a continuación se hicieron sobre extractos recién hechos, cuando la duración de la fase de -- retraso es máxima.

4.4 Efecto de la Concentración de Enzima Sobre la Fase de Retraso

Se conoce que fenómenos de agregación o disociación inducidos por la unión o liberación de un ligando a la enzima son los respon-

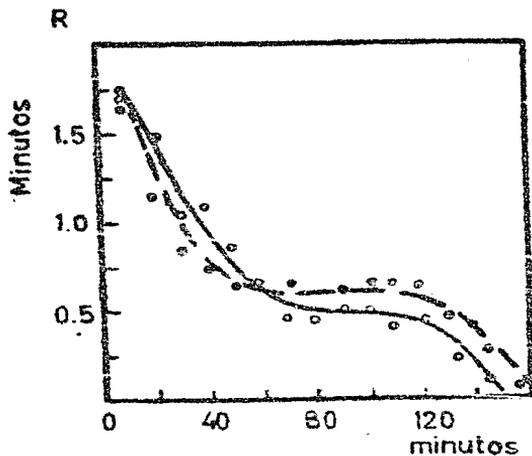


FIGURA 10. PERDIDA DE LA FASE DE RETRASO CON RESPECTO AL TIEMPO DE EXTRACCION DE PEPYC DE EXTRACTOS CRUDOS DE HOJA DE MAIZ. EL ENSAYO DE ACTIVIDAD SE HIZO EN UN MEDIO QUE CONTENIA TEA-HCl 100 mM, A pH 7.0, MgCl₂ 10 mM, NADH 0.2 mM, PEP 1 mM, NaHCO₃ 10 mM, MDH 3 UNIDADES Y SE EMPEZABA LA REACCION CON 50 μ l DE PREPARACION ENZIMATICA.

○—○ PLANTAS ILUMINADAS. ●—● PLANTAS SOMETIDAS A OSCURIDAD.

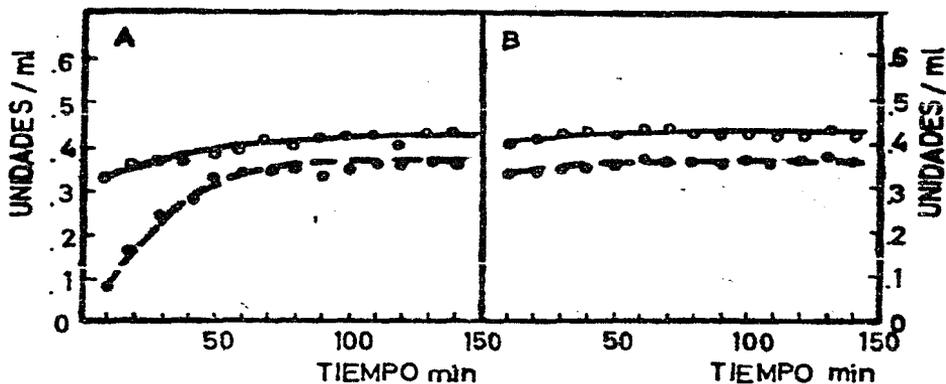


FIGURA 11. A. EVOLUCION DE LAS VELOCIDADES INICIALES Y B. DE ESTADO ESTACIONARIO CON RESPECTO AL TIEMPO DESPUES DE LA EXTRACCION. EL ENSAYO DE ACTIVIDAD SE HIZO EN UN MEDIO QUE CONTENIA TEA-HCl 100 mM A pH 7.0, MgCl₂ 10 mM, NADH 0.2 mM, PEP 1 mM, NaHCO₃ 10 mM, MDH 3 UNIDADES. LA REACCION SE INICIABA CON 50 μ l DE PREPARACION ENZIMATICA. ○—○ PLANTAS ILUMINADAS. ●—● PLANTAS SOMETIDAS A OSCURIDAD.

TABLA 4. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC* Y SOBRE LA FASE DE RETRASO DE LA ADICION DE ENZIMA A UNA REACCION EN CURSO

Condiciones de extracción	1 ^a alícuota (ml)	actividad** unidades/ml	2 ^a alícuota (ml)	actividad** unidades/ml
Luz	50	0.199	50	0.161
Oscuridad	50	0.102	50	0.077

* Se usaron extractos crudos de hoja de maíz y se hicieron las determinaciones de actividad en un medio de ensayo que contenía TEA-HCl 100 mM a pH 7.0, MgCl₂ 10 mM, NADH 0.2 mM, PEP = 1 mM, NaHCO₃ 10 mM, MDH 3 unidades y la reacción se iniciaba al agregar la preparación enzimática.

** La actividad incluida corresponde a la velocidad de estado estacionario.

sables de la aparición de las fases de retraso en el ensayo de actividad (36a, 77, 82). Para comprobar si este era el caso, se hicieron medidas de la duración de la fase de retraso variando la concentración de la enzima en el medio de reacción manteniendo fijas el resto de las condiciones del medio de ensayo. Se encontró que la duración de la fase de retraso es inversamente proporcional a la concentración de la enzima (Figura 12 A y B) lo que indica que está ocurriendo una dimerización. Porque en general, al tiempo de reacción t , que corresponde a cualquier momento de la reacción, es inversamente proporcional a a_0^{n-1} , en donde a_0 es la concentración total de cualquier n reactante equimolar, que se combina estequiométricamente para dar lugar al producto (en nuestro caso se trata de la propia enzima) y n es el orden de la reacción (68). Por tanto, una relación lineal entre t y el inverso de la concentración de enzima se obtiene solo si n es igual a dos. Dos fue el resultado en la regresión lineal del inverso de la concentración de la enzima contra la fase de retraso. Puesto que la especie enzimáticamente activa es un tetramero de cuatro cadenas polipeptídicas de 100 000 de peso molecular (101), el período de retraso debe corresponder a una dimerización de dos dobles cadenas.

4.5 Efecto del Medio de Extracción de la Enzima Sobre la Fase de Retraso

La inclusión de glicerol al 30 % (v/v) o de polietilenglicol 6000 al 6 % (p/v) en el medio de extracción, abolía totalmente la fase de retraso de la reacción catalizada por FEPC (Tabla 5). Las velocidades iniciales de la reacción eran superiores a las encon-

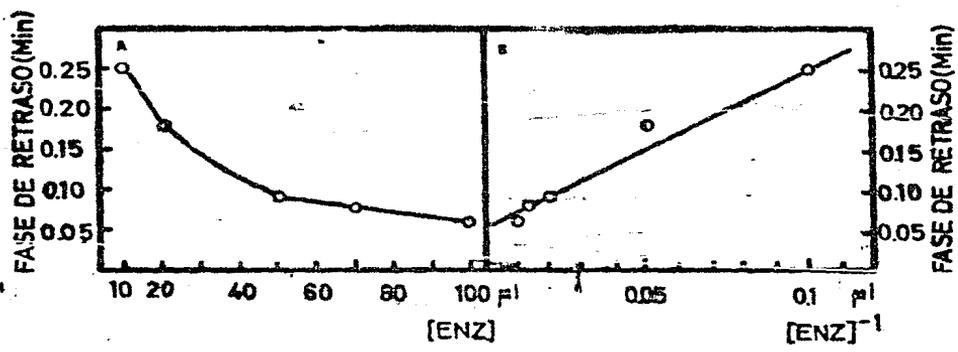


FIGURA 12. A. FASE DE RETRASO DE LA ACTIVIDAD DE PEPC EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE LA ENZIMA. B. RELACION INVERSA ENTRE EL PERIODO DE RETRASO Y LA CONCENTRACION DE LA ENZIMA EXTRAIDA DE PLANTAS SOMETIDAS A LUZ NATURAL.

TABLA 5. EFECTO DEL MEDIO DE EXTRACCION DE LA ENZIMA PEPC* SOBRE LA FASE DE RETRASO

Medio de extracción	R(min)	Velocidad inicial u/ml	Velocidad de estado estacionario u/ml
Control	1.0	0.132	0.179
" + glicerol al 15 %	0.3	0.175	0.195
" + glicerol al 30 %	0.0	0.184	0.184
" + polietilenglicol al 6 %	0.0	3.130	3.130

*- La preparación enzimática usada fue una extracción de PEPC como se describe en Métodos, pero al medio se le adicionaba el compuesto a la concentración deseada antes de extraer y posteriormente se leía la actividad en una solución amortiguadora de TEA-HCl 100 mM a pH 7.0, MgCl₂ 10 mM, NADH 0.2 mM, PEP 1 mM NaHCO₃ 10 mM, MDH 3 unidades y se iniciaba la reacción adicionando una alícuota de 50 µl.

Se utilizaron hojas de plantas que estuvieron bajo luz natural.

tradas en extractos hechos en ausencia de estos compuestos y se man tie zen constantes por un tiempo considerable hasta que la con ce n tra ci ó n de sustratos se hacía limitante.

Este resultado confirma que el proceso de reactivación que se es ta es t u d i a n d i o es dependiente de la concentración de la enzima. - I g u a l m e n t e la adición de glicerol a extractos obtenidos en su a u s e n c i a, hace que disminuya la duración de la fase de retraso, m o s t r a n d o as í, que estos compuestos favorecen el paso de la forma a la i n a c t i v a.

4.6 Efecto de la Concentración de Fosfoenolpiruvato

Sobre la Fase de Retraso

La duración del período de retraso mostró una dependencia cl a r a de la concentración de PEP en el medio de ensayo a con ce n tra ci ó n e s at u r a n t e s de HCO_3^- y Mg^{+2} , haciéndose mayor a medida que d is m i n u y e la concentración de este sustrato (Figura 13A). Cuando se g r a f i c a n o s o g r a n o s o b s e r v a u n a l i n e a r e c t a, sino curva. Por o t r a p a r t e, existen claras diferencias entre los e x t r a c t o s de plantas mantenidas en oscuridad y las de plantas iluminadas. En las ú l t i m a s, no nos f u é p o s i b l e d e t e r m i n a r l a f a s e d e r e t r a s o a con ce n tra ci ó n e s d e PEP inferiores a 0.5 mM debido a que estas con ce n tra ci ó n e s la enzima muestra i n a c t i v a c i ó n durante el ensayo. Sin embargo, la enzima extraída de plantas sometidas a oscuridad f u é m u c h o m á s estable y por ello f u é p o s i b l e m e d i r l a d u r a c i ó n e s d e r e t r a s o de la re a c i ó n a concentraciones de PEP tan bajas como 0.15 mM.

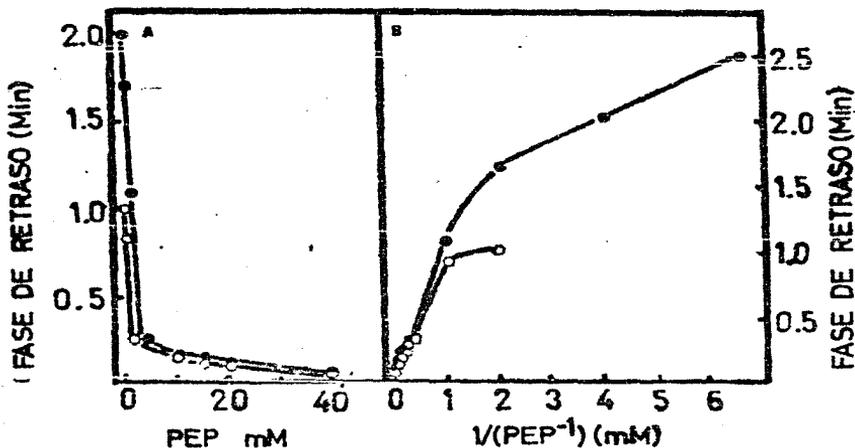


FIGURA 13. A. FASE DE RETRASO DE LA ACTIVIDAD DE PEP DE HOJA DE MAIZ EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO PEP. B. FASE DE RETRASO VS EL INVERSO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO. PLANTAS EXPUESTAS A LUZ. ● PLANTAS MANTENIDAS EN OSCURIDAD. LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD CONTENIAN TEA-HCl 100 mM A pH 7.0, MgCl₂ 10 mM, NADH 0.2 mM, NaHCO₃ 10 mM, MDH 5 UNIDADES, LAS CONCENTRACIONES DE PEP ERAN VARIABLES. PARA INICIAR LA REACCION SE AGREGABAN 50 μ l DE PREPARACION ENZIMATICA.

En ambas series de extractos, el período de retraso no se elimina a concentraciones infinitas de PEP, como puede verse por la extrapolación de la gráfica 13B, la línea corta al eje de las ordenadas en un punto superior a cero. Aún cuando PEPC en ambos tipos de extractos difiere en la duración de la fase de retraso de la reacción que cataliza, el porcentaje de reactivación en el medio de ensayo no fué significativamente diferente (Tabla 6).

4.7 Efecto de la Concentración de Malato Sobre la Duración de la Fase de Retraso

Como se muestra en la Figura 14A y B, la inclusión de concentraciones crecientes del inhibidor de PEPC malato en el medio de reacción, conlleva un incremento en la duración de la fase de retraso de la reacción catalizada por esta enzima, tanto en extractos de plantas iluminadas como en las de plantas mantenidas en la oscuridad. La concentración de sustrato PEP usadas en este experimento fueron variables, (Figura 15 A y B), pero siempre en el rango en el cual la enzima extraída de plantas iluminadas no muestra inactivación. Las concentraciones del otro sustrato de la reacción, HCO_3^- y del cofactor Mg^{+2} siempre se mantuvieron saturantes. Como es de esperar, el efecto de este inhibidor, competitivo con el sustrato PEP al pH en que se hicieron estos experimentos, fué máximo a las concentraciones más altas del inhibidor y más bajas del sustrato PEP.

La respuesta de los extractos de luz fué cualitativa y cuantitativamente diferente a la respuesta de los extractos de oscuridad. En los primeros, el incremento en la duración de la fase de retraso fué directamente proporcional al incremento en la concentración del

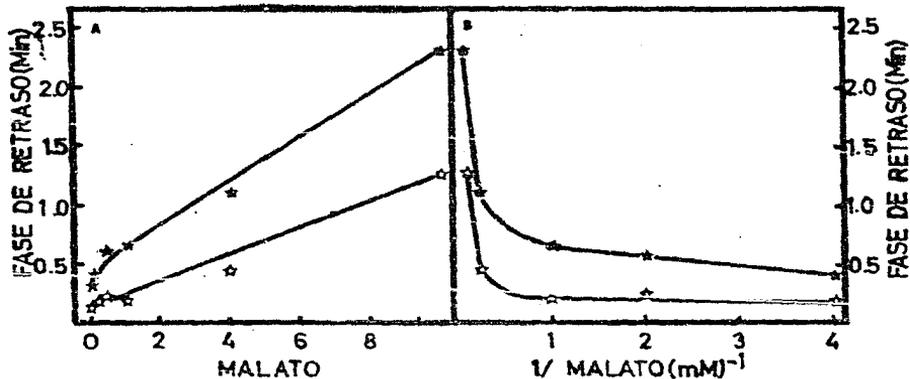


FIGURA 14. FASE DE RETRASO DE LA ACTIVIDAD DE PEPC DE EXTRACTOS CRUDOS DE HOJA DE MAIZ A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MALATO. A. FASE DE RETRASO VS CONCENTRACION DE MALATO. B. FASE DE RETRASO VS RECIPROCA DE CONCENTRACION DE MALATO. ★ PLANTAS SOMETIDAS A LUZ. △ PLANTAS MANTENIDAS EN OSCURIDAD. LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD CONECTIVAN TEA-HCl 100 mM A pH 7.0, MgCl 10 mM, NADH 0.2 mM, PEP 4 mM, NaHCO₃ 10 mM Y MDH 3 UNIDADES.

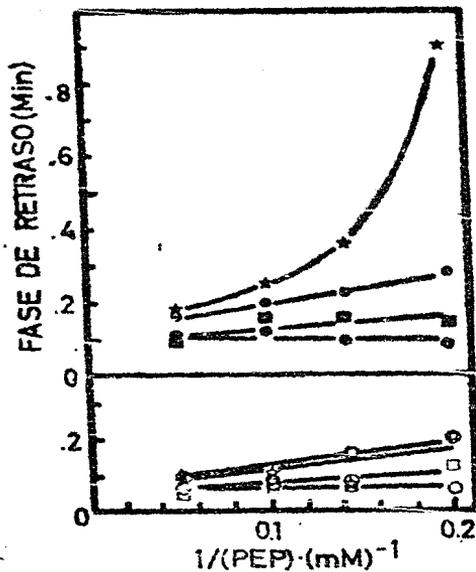


FIGURA 15. FASE DE RETRASO DE LA ACTIVIDAD DE PEP DE EXTRACTOS CRUDOS DE HOJA DE MAIZ EN FUNCION DEL INVERSO DE LA CONCENTRACION DE PEP A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MALATO. ○ CONTROL; □ CON MALATO 2.5 mM; ● CON MALATO 6 mM; ★ CON MALATO 10 mM. LOS SIMBOLOS VACIOS SON DE PLANTAS ILUMINADAS, LOS SIMBOLOS LLENOS CORRESPONDEN A PLANTAS MANTENIDAS EN OSCURIDAD. LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD CONTENIAN TRIS-HCl 100 mM A pH 7.0, MgCl₂ 10mM NADH 0.2 mM, NaHCO₃ 10 mM, MDH 3 UNIDADES Y VARIAS CONCENTRACIONES DE PEP, SE UTILIZARON 50 μl DE EXTRACTO ENZIMATICO.

TABLE 6. EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ILUMINACION DE LA PLANTA SOBRE LAS VELOCIDADES INICIALES Y DE ESTADO ESTACIONARIO DE LA REACCION CATALIZADA POR PEP*

Condiciones de extracción	V_i^{**}	V_{ee}^{**}	% reactivación
Luz	0.122 ± 0.047	0.275 ± 0.038	225
Oscuridad	0.047 ± 0.007	0.108 ± 0.010	230

* Se usaron extractos crudos de hoja de maíz y se hicieron las de terminaciones de actividad en un medio de ensayo que contenía TEA-HCl 100 mM a pH 7.0, MgCl₂ 10 mM, NADH 0.2 mM, PEP 1 mM, - NaHCO₃ 10 mM, MDH 3 unidades y la reacción se iniciaba al agregar 50 μ l de preparación enzimática.

** Los resultados son promedios de cinco repeticiones.

inhibidor, mientras que en los segundos se obtuvo una línea curva, siendo el grado de desviación de la linealidad máximo a las concentraciones mas bajas de sustrato y más altas de inhibidor. Se confir mó así que las condiciones de iluminación de la planta previas a la extracción de la enzima, determinan en que forma se encuentra - esta, siendo la forma de oscuridad mucho más sensible al inhibidor malato.

Para descartar la posibilidad de que el efecto observado de - malato sobre la reacción de PEPC no fuese real, sino motivado por un efecto de este compuesto sobre la enzima málico deshidrogenasa usada como enzima acoplada en el método de determinación de activi dad, se hizo el ensayo de la actividad de esta enzima en la direc ción de formación de malato bajo las mismas condiciones en que se realiza el ensayo de PEPC (véase Métodos) en presencia y ausencia de malato 20 mM. La velocidad de la reacción catalizada por máli co deshidrogenasa no se afecto por la presencia de esta concentra ción del producto de la reacción, lo que permitió confirmar que el malato estaba realmente ejerciendo su acción sobre PEPC. Este re-- resultado era de esperarse, puesto que la constante de equilibrio de de la reducción de oxalacetato a malato catalizada por málico des- hidrogenasa es de 2.6×10^{-12} (39a).

4.8 Efecto de la Concentración de Glucosa-6P

Sobre la Duración de la Fase de Retraso

La inclusión del activador alostérico de PEPC, glucosa-6P, - una concentración 5 ml en el medio de ensayo conteniendo concentra ciones saturantes de HCO_3^- y Mg^{+2} y concentraciones variables de -

PEP, tiene como consecuencia una disminución notable de la fase de retraso tanto en los extractos de plantas iluminadas, como en los de plantas mantenidas en oscuridad (Figura 16). El efecto de glucosa-6P aparece así como aditivo al efecto del sustrato PEP.

Por otra parte la presencia de glucosa-6P evita la inactivación de la enzima en el medio de ensayo de extractos de plantas iluminadas que tiene lugar a bajas concentraciones de PEP en ausencia de este activador. Ello permitió determinar la fase de retraso a bajas concentraciones de PEP.

4.9 Efecto de la Preincubación Sobre la Duración de la Fase de Retraso

Puesto que el procedimiento de extracción de la enzima se realiza en presencia de EDTA y en ausencia de Mg^{+2} y de agentes reductores de grupos sulfhidrilo que han sido postulados por otros autores como necesarios para el mantenimiento de la forma activa de la enzima (33, 50), se quiso investigar si alguno de esos factores era capaz de activar la enzima durante una preincubación anterior al ensayo de actividad.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 7. Como puede observarse, la preincubación con Mg^{+2} no afecta la duración de la fase de retraso, por lo tanto, el fenómeno de histéresis que se observa no se debe a que al unirse este metal a la enzima se produzca una reactivación lenta. Por otra parte la preincubación con agentes reductores de grupos sulfhidrilo como β -mercaptoetanol no solo elimina la duración de la fase de retraso, sino

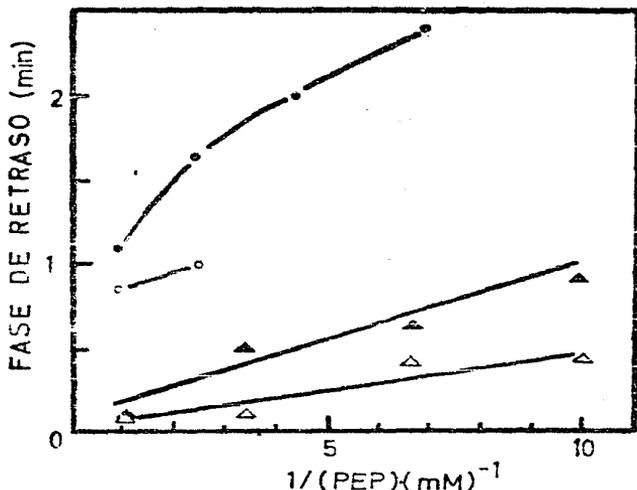


FIGURA 16. FASE DE RETRASO DE LA ACTIVIDAD DE PEPC DE EXTRACTOS CRUDOS DE RAÍZ DE MAÍZ EN FUNCIÓN DEL INVERSO DE LA CONCENTRACION DE PEP A UNA CONCENTRACION DE GLUCOSA-6P 5 mM. (SIMBOLOS VACIOS CORRESPONDEN A PLANTAS ILUMINADAS, SIMBOLOS LLENOS A PLANTAS MANTENIDAS EN OSCURIDAD.) LOS ENVAYOS DE ACTIVIDAD CONTENIAN TEA-HCl 100 mM A pH 7.0, MgCl₂ 10 mM, NADH 0.2 mM, NaHCO₃ 10 mM, MDH 3 UNIDADES, VARIAS CONCENTRACIONES DE PEP Y LA REACCION SE INICIABA AGREGANDO 50 μ l DE PREPARACION ENZIMATICA. ● CONTROL. ▲ CON GLUCOSA-6P

TABLA 7. EFECTO DE VARIAS CONDICIONES DE PREINCUBACION DE PEPC*
SOBRE LA DURACION DE LA FASE DE RETRASO

Condiciones de preincubación	R (minutos)
Control	0.400
PEP 1 mM y Mg^{+2} 20 mM	0.300
β-mercaptotanol	0.080
Triton X-100 1%	0.075

* Se usaron extractos crudos de hoja de maíz preincubados cinco minutos a 20°C en TEA-HCl 100 mM a pH 7.0 y EDTA 4 mM. La adición del compuesto indicado en la tabla era después de la extracción, de estas muestras se tomaba una alícuota de 50 µl para iniciar la reacción en un ensayo de actividad que contenía TEA-HCl 100 mM a pH 7.0, $MgCl_2$ 10 mM, NADH 0.2 mM, $NaHCO_3$ 10 mM, PEP 1 mM y MDH 3 unidades.

Se utilizaron hojas de plantas que estuvieron bajo luz natural.

que considerablemente la incrementan. Es de destacar que el mismo efecto lo poseen los detergentes como Triton X-100 que actúa aumentando el grado de disociación de la enzima y por consiguiente incrementando la duración de la fase de retraso.

4.10 Efecto de la Preincubación con Sustratos Sobre la Actividad y la Duración de la Fase de Retraso

Los resultados descritos anteriormente, sugerían que PEP, o el complejo PEP-Mg^{+2} que parece ser el verdadero sustrato de la reacción (75), era el compuesto que inducía el paso de la forma inactiva a la activa. Para confirmar o descartar esta sugerencia, se hicieron preincubaciones de la enzima en el medio de ensayo en presencia de alguno de los sustratos, la reacción se iniciaba luego con la adición del sustrato faltante. Puesto que el medio de ensayo contiene HCO_3^- resultado de la disolución del CO_2 atmosférico en equilibrio con las soluciones, se hicieron dos tipos de experimentos. En los primeros se usaron soluciones que contenían este HCO_3^- ($(1.22 \pm 0.2 \text{ mM})(74a)$) y en los segundos en los que se eliminó este compuesto por el tratamiento descrito en Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Como era de esperarse, cuando los ligandos presentes fueron PEP-Mg^{+2} en un medio conteniendo HCO_3^- , hubo reacción durante el periodo de preincubación, por lo que aunque se abolía la fase de retraso, estos resultados no permitían concluir si efectivamente era el complejo PEP-Mg^{+2} el agente reactivante. Sin embargo, cuando la preincubación se hacía sin adicionar ningún sustrato se observó

TABLA 8. EFECTO DE LA PREINCUBACION DE PEPC* SOBRE EL PERIODO DE RETRASO CON DIFERENTES LIGANDOS

Ligando presente	Tiempo de preincubación (min)	Periodo de retraso % control	Actividad de PEPC % control **
Ninguno	5	342 (0.7)	5 (0.321)
	10	171 (0.7)	4 (0.321)
PEP 1 mM, MgCl ₂ 10 mM	10	166 (0.6)	1 (0.322)
	20	133 (0.6)	1 (0.322)
NaHCO ₃ ***, PEP 1 mM	10	66 (0.4)	69 (0.219)
NaHCO ₃ ***, MgCl ₂ 10 mM	10	30 (1.0)	75 (0.065)
NaHCO ₃ ***, MgCl ₂ 10 mM, PEP 1 mM	10	-- (0.4)	95 (0.223)
	25	-- (0.4)	20 (0.223)
NaHCO ₃ ±0 mM	10	-- (1.5)	390 (0.184)

* Extractos crudos de PEPC de hoja de maíz, se preincubaron a 30°C en TEA-HCl 100 mM a pH 7.0 y los ligandos indicados en la Tabla.

** Los valores de actividad control de cada experimento se determinan usando el medio de ensayo estandar y comenzando la reacción con la adición del extracto enzimático.

*** NaHCO₃ disuelto en el medio (1.22 ± 0.2 mM por el equilibrio del CO₂ atmosférico. Las reacciones se llevan a cabo a pH 7.0 y PEP 1 mM.

Se utilizaron hojas de plantas que estuvieron bajo luz natural.

que no solo la fase de retraso disminuía mucho, sino que la actividad enzimática de la enzima preincubada era superior a la del control en la que la reacción se iniciaba por adición de la enzima al medio de ensayo completo. Si la preincubación se hacía en presencia solo de concentraciones saturantes de HCO_3^- y la reacción se iniciaba por adición de PEP y Mg^{+2} , la fase de retraso no existía y la actividad medida era superior que en el caso anterior. Estos resultados mostraron que el verdadero agente reactivante era el otro sustrato de la reacción, el ión HCO_3^- . El segundo tipo de experimentos confirmó esta conclusión, puesto que en la preincubación en ausencia de HCO_3^- no solo no elimina la fase de retraso, sino que inactiva casi totalmente a la enzima, aún cuando esta preincubación se halla en presencia de PEP-Mg^{+2} . Por tanto, el ión HCO_3^- , ó CO_2 , es necesario para el mantenimiento de la enzima activa.

4.11 Cinética de la Reactivación en el Medio de Ensayo

Los fenómenos de histéresis pueden caracterizarse por la determinación de la constante aparente de velocidad de la transición entre la velocidad inicial y la de estado estacionario (τ^{-1}), que se determina en gráficas semilogarítmicas, como se describió en Métodos.

Analizando nuestros datos de esta forma, encontramos que el proceso de reactivación de PEPC en el medio de ensayo no es de primer orden simple, sino que implica al menos dos fases, pudiéndose aproximar cada una de ellas a un primer orden, con constantes de -

velocidad aparentes que difieren claramente (Figura 17). Estas fases son difíciles de correlacionar directamente con cambios moleculares específicos de la enzima, pero al menos alguno de ellos debe corresponder al proceso de dimerización.

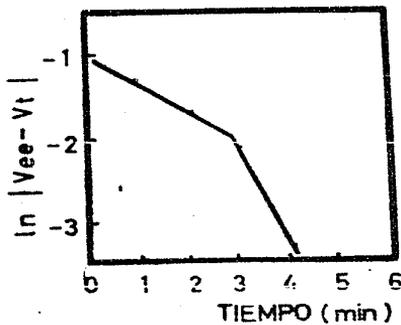


FIGURA 17. CONSTANTE APARENTE DE VELOCIDAD PARA LA TRANSICION ENTRE LA VELOCIDAD INICIAL Y DE ESTADO ESTACIONARIO. LOS DATOS EXPERIMENTALES CORRESPONDEN A LOS DE LA FIGURA 9 A.

V. DISCUSION

Los trabajos llevados a cabo anteriormente en nuestro laboratorio relativos a la regulación por luz de la actividad de PEPC de hoja verde de maíz había llevado a los siguientes resultados, descritos en forma resumida:

a. Cuando el tiempo transcurrido entre la extracción de la enzima y el ensayo de actividad es corto, se pueden detectar dos formas de PEPC con diferente cinética de saturación por PEP, una de ellas predominante en extractos de plantas mantenidas en la luz (PEP-día) y otra en aquellas de plantas mantenidas en oscuridad (PEP-noche)(90).

b. La forma PEPC-día difiere notablemente de la forma PEPC-noche en cuanto a su sensibilidad a los efectores más importantes de esta enzima: malato, inhibidor y glucosa-6P activador alostérico (91).

c. La reacción catalizada por PEPC, de plantas iluminadas o mantenidas en oscuridad presentaba una clara fase de retraso, incrementándose su velocidad a medida que transcurría el ensayo hasta alcanzar una velocidad fija de estado estacionario.

Las diferencias encontradas entre ambas formas de PEPC permiten concluir que la actividad de esta enzima en hoja verde de maíz esta regulada por luz, de tal forma que es totalmente activa durante el día y parcial o totalmente inactiva durante la noche. Por otra parte, de acuerdo con nuestros resultados (90), el mecanismo molecular de esta regulación no parecía consistir en oxidación-re-

ducción de grupos sulfhidrilo, como es el caso de otras enzimas fotosintéticas (14).

En este trabajo se trató de caracterizar el fenómeno de reactivación de la enzima en el medio de ensayo con el fin de comprobar si estaba o no relacionado con el mecanismo de su regulación por luz, y en caso afirmativo pudiese servir para dilucidar las bases moleculares de este mecanismo.

La relación inversa encontrada entre el período de retraso de la reacción y la concentración de la enzima, establece que esta ocurriendo una dimerización. Varias enzimas en las que curiosamente interviene CO_2 como sustrato o producto de la reacción, presentan un similar comportamiento histerético causado por un lento proceso de asociación (36a, 77). Fenómenos similares de histéresis causados por cambios en el estado de agregación de la enzima han sido descritos en estudios sobre PEPC de E. coli (111) y de Crassula (114), una especie vegetal con metabolismo ácido crasuláceo.

Otro resultado de este trabajo en relación con lo anterior, es el que la presencia de glicerol o plietilenglicol en el medio de extracción de la enzima, impide la detección del proceso de reactivación puesto que ambos compuestos a las concentraciones usadas poseen el mismo efecto que una elevación en la concentración de proteína, por lo que no es de extrañar que eviten la disociación de la forma tetramérica y/o promuevan la asociación de la forma dimerica, de manera que en su presencia la especie predominante debe ser el tetramero activo. Además, estos resultados sugieren que "in vivo" existen ambas formas de la enzima, la tetramérica y la dimé-

rica y no que la forma dimérica aparece en el extracto como consecuencia de la dilución de la enzima que conlleva el procedimiento de la extracción.

La dependencia de la duración de la fase de retraso de la concentración de PEP, claramente está indicando la participación de este sustrato en el proceso de reactivación, ya sea inducido al unirse a la enzima un cambio conformacional en esta, que la hace agregarse y dar lugar a la aparición de una forma más activa y/o desplazando un equilibrio que existe entre dos formas interconvertibles con diferente afinidad por este sustrato hacia la forma de mayor afinidad que será, además, la más activa. En cualquier caso, el proceso de interconversión de una forma en otra es lento en relación con la catálisis, por lo que puede detectarse reactivación durante el curso de un ensayo.

Resulta interesante el hecho de que tanto las extracciones de plantas mantenidas en oscuridad, como las de plantas previamente iluminadas presentan reactivación. Sin embargo, la fase de retraso siempre fue más larga en los primeros que en los últimos, lo que puede deberse a que la forma PEPC-noche posee una menor afinidad por PEP que la forma PEPC-día o a que en extractos de plantas mantenidas en oscuridad es mayor la proporción de dímero.

Por otra parte, la duración de la fase de retraso mostró una dependencia no lineal de la concentración de PEP, que se manifiesta sobre todo a bajas concentraciones de este sustrato, en ambos tipos de extractos, parece por tanto, existir una cooperatividad -

negativa histerética y es de destacar que PEPC en los mismos extractos mostró una cooperatividad negativa en la unión al sustrato PEP en un rango de concentración de este equivalente al que estamos considerando aquí. Ello parece indicar que ambos procesos, reactivación y lógicamente catálisis, dependen de la unión de este sustrato a la forma activa de la enzima. Sin embargo, el hecho de que en los extractos de plantas expuestas a luz no se pudiera detectar reactivación alguna a bajas concentraciones de PEP, por el contrario se observa inactivación en el medio de ensayo lo que sugiere una cooperatividad negativa histerética no basada en las características de la unión del sustrato a la enzima. Si la inactivación observada a bajas concentraciones de PEP ocurre también a concentraciones mayores de este sustrato, la duración del proceso de reactivación será menor de la esperada, puesto que estos dos procesos opuestos pueden llegar al equilibrio antes de que concluya la reactivación. Así, PEP no solo interviene en el proceso de reactivación, sino que incrementa la estabilidad de la enzima frente a un proceso de inactivación en el medio de ensayo, de naturaleza aún desconocida, en forma también dependiente de su concentración. La incubación de la enzima en un medio de reacción sin PEP por un período igual o superior al de duración del ensayo de actividad, no conlleva pérdidas en su actividad, por el contrario se observa reactivación si de este medio no ha sido previamente eliminado el CO_2 . Este resultado descarta que la inactivación a bajas concentraciones de PEP se deba a la dilución que la enzima sufre al pasar al medio de ensayo. Además sugiere una característica de la enzima que no había sido detectada previamente. Pudiera ser que después de que

una molécula de enzima ha realizado catálisis se produzca en ella un cambio conformacional, tal que lo haga ser altamente inestable si no encuentra otra molécula de sustrato (PEP). Por ello, la inactivación se manifiesta a bajas concentraciones de este sustrato, - cuando una proporción cada vez mayor de moléculas de enzima no encuentran sustrato, después de haber realizado al menos un ciclo ca^ltalítico. Apoyando esta explicación, está el resultado obtenido en este trabajo, que tras la adición de una segunda alícuota de enzima a un medio de reacción, conteniendo una concentración no saturante de PEP después de un cierto tiempo de comenzada esta, no se produce el esperado incremento de actividad proporcional, al incremento de la cantidad de la enzima, sino que la actividad permanece igual, o incluso disminuye.

Los razonamientos anteriores son aplicables tanto para los extractos de plantas iluminadas como para los de plantas mantenidas en oscuridad, aún cuando es evidente que de ser válidos, la enzima de extractos de plantas sometidas a oscuridad es mucho más estable que los de luz.

Los resultados anteriores no permiten concluir si las diferencias a nivel molecular entre PEPC-día y PEPC-noche consisten en - que la primera es un tetrámero y la segunda un dímero, como ha sido propuesto para la enzima de Crassula (114, 115) ó que ambas formas existen como dímero o tetrámero. En el primer caso, los extractos de plantas sometidas a luz contendrían una elevada proporción de tetrámero, mientras que en los de oscuridad el dímero sería el predominante. Además la forma tetramérica sería inestable a bajas

concentraciones de PEP, puesto que la inactivación se observa en los extractos de plantas sometidas a iluminación. La segunda de - las dos posibilidades apuntadas no permite especular acerca de la proporción relativa de dímero y tetrámero presentes en ambos tipos de extractos. Si la primera de las hipótesis planteadas fuese cierta deberían existir claras diferencias en el porcentaje de reactivación, entre los extractos de plantas expuestas a luz y los extractos de plantas sometidas a oscuridad, ya que las velocidades iniciales de estos últimos serían menores y deberían alcanzarse iguales velocidades de estado estacionario. Sin embargo este no fué el caso, lo que unido a la diferente estabilidad en el medio de ensayo de PEPC de ambos tipos de extractos, nos induce a pensar que la segunda hipótesis es la más probable.

Otro aspecto interesante de la influencia de la concentración de PEP sobre la fase de retraso, es que a altas concentraciones de este sustrato, la duración de esta fase es constante e independiente de la concentración de sustrato. Así la fase de retraso nunca - alcanza un valor de cero, bajo las condiciones de nuestro ensayo. Ello implica que la unión de este sustrato no es el paso lento el responsable de la histéresis, porque de serlo, debería existir una relación lineal a cualquiera de las concentraciones de PEP. El paso lento, limitante de la velocidad de reactivación, debe ser el proceso de dimerización.

En cuanto al efecto del inhibidor malato sobre la duración de la fase de retraso se puede llegar a dos conclusiones importantes. La primera, es la configuración de las diferencias existentes en-

tre la forma de PEPC-día y PEP-noche, como lo muestra claramente - la diferente respuesta de la duración de la fase de retraso a in-crementos en la concentración de malato. La segunda, compete al me-canismo de reactivación y se origina de la cooperatividad histeré-tica positiva encontrada para este compuesto. Así concentraciones crecientes de malato incrementan la duración de la fase de retraso en forma no lineal, lo cual podría explicarse si existieran dos lu-gares de unión para este inhibidor de diferente naturaleza y con - diferente afinidad. De hecho, ha sido postulada la existencia de - estos dos lugares de unión sobre la misma forma de esta enzima, pa-ra explicar la inhibición no lineal por este compuesto de la acti- vidad de PEPC purificada (36a). Sin embargo, en base a estos resul- tados es posible que la razón de este comportamiento, tanto histe-rético: como cinético, podría más bien estar en la diferente afini-dad por malato de la forma tetramérica y dimérica. Así, se sabe -- que malato puede unirse a la primera en forma competitiva con PEP, que evitaría la acción estabilizadora sobre el tetrámero que tiene este sustrato, retardando así, el proceso de reactivación. Por o-- tra parte, si su unión a la forma dimérica estabiliza al dímero, - impidiendo su paso a tetrámero, la suma de los dos efectos daría lugar a una cinética no lineal como la observada.

Obviamente se requieren estudios adicionales que escapen al - propósito de este trabajo, para confirmar o rechazar esta hipótesis. Aún cuando en estos experimentos no se encontró cooperatividad histe-rética positiva en los extractos de plantas sometidas a ilumina-- ción, no se puede descartar que esta aparezca a concentraciones de malato superiores a las empleadas.

Por lo que respecta al activador alostérico glucosa-6P, este disminuye notablemente la duración de la fase de retraso, tanto en extractos de plantas sometidas a luz como los de oscuridad, lo que era de esperarse dado su conocido efecto de disminuir la K_m (PEP) (36a, 77). Un resultado interesante, fué que glucosa-6P estabiliza notablemente el tetrámero de día, permitiendo medir la fase de retraso a concentraciones de PEP a las que no se podía en su ausencia. Por tanto, este compuesto está ejerciendo al igual que el propio sustrato PEP, una acción estabilizadora sobre la forma activa de la enzima.

Un importante resultado de este trabajo, fué el efecto que el ión HCO_3^- ó la molécula CO_2 , tiene sobre el estado de activación de PEPC. La preincubación de la enzima en el medio de reacción en ausencia de PEP y Mg^{+2} , pero en presencia de concentraciones saturantes de HCO_3^- no solo eliminó totalmente la fase de retraso, sino -- además la actividad enzimática medida después de la adición de los sustratos faltantes en la preincubación, fué superior a las actividades de estado estacionario encontradas cuando no se llevó a cabo dicha preincubación. Por otra parte, la preincubación de la enzima en el medio de reacción sin HCO_3^- produce una rápida pérdida de actividad, aún cuando esta preincubación se haga en presencia de PEP y Mg^{+2} . Eso claramente está implicando a HCO_3^- (ó a CO_2) como responsable del mantenimiento de la forma activa de PEPC, tanto en extractos de plantas tratadas con luz como en oscuridad. Este resultado explica porque la enzima se va lentamente reactivando en el medio de extracción, de tal forma que transcurrido un tiempo -- más o menos largo después de la extracción, ya no es posible detec

tar la fase de retraso. El HCO_3^- contenido en este medio debe ser el agente reactivante. La reactivación parece así no requerir Mg^{+2} , puesto que el medio de extracción no contiene este metal y sí una importante concentración del compuesto quelante EDTA. El papel de PEP parece ser el de acelerar, pero no inducir, el proceso de reactivación al unirse y estabilizar la forma tetramérica activa. El hecho de que PEP en ausencia de HCO_3^- no sea capaz de evitar la inactivación de la enzima, apoya la conclusión de que este compuesto por sí solo no puede realizar la reactivación.

Aún cuando es prematuro elaborar una hipótesis detallada sobre el posible significado fisiológico de este proceso de activación de PEPC por bicarbonato, se puede especular que durante los períodos de oscuridad, la concentración intracelular de este compuesto baje por el cierre de los estomas, produciendo una inactivación total o parcial de la enzima. Durante el día cuando la planta tiene sus estomas abiertos y la concentración de CO_2 es máxima, se debe producir el cambio inverso, con el consiguiente incremento de la fotosíntesis C_4 .

La concentración intracelular de CO_2 , aparece así como un posible factor clave de regulación "in vivo" de la actividad de esta enzima y es de destacar que este interesante hecho no había sido detectado con anterioridad.

En el siguiente esquema está sintetizado el mecanismo molecular más simple de regulación de la actividad de PEPC por los sustratos y efectores estudiados, propuesto en base a los resultados que se acaban de discutir.

VI. CONCLUSIONES

1. La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz - sufre un proceso reversible de asociación-disociación, que se acompaña de cambios de actividad catalítica. Así puede encontrarse en forma de tetrámero (activo) o de dímero (total o parcialmente inactivo).

2. El compuesto reactivante, inductor del paso de la forma dimerica a la tetramérica es el ión HCO_3^- , o el CO_2 en equilibrio con aquel.

3. La interconversión de ambas formas de la enzima esta regulada por el sustrato PEP y por los efectores glucosa-6P (activador) y malato (inhibidor), aún cuando estos compuestos no son capaces de inducir por sí solos dicha interconversión.

4. Tanto la forma PEPC-día como la forma PEPC-noche, parecen existir "in vivo" como tetrámero y dímero. Las diferencias a nivel molecular entre estas formas no parecen, por tanto, consistir al menos no en forma única en su estado de agregación.

VII. REFERENCIAS

1. Anderson, L. E. 1979. Interaction between photochemistry and activity of enzymes. En: Photosynthesis IV. Photosynthetic carbon metabolism and related processes. Encyclopaedia of Plant Physiol. Ed. M. Gibbs y E. Latsko. 6, 271-281.
2. Asthon, A. H., Burrell, J. N. y Hatch, M. D. 1984. Regulation of C₄ photosynthesis: inactivation of pyruvate, P_i, dikinase by ADP-dependent phosphorylation and activation by phosphorolysis. Arch. Biochem. Biophys. 230(2), 492-505.
3. _____ y Hatch, M. D. 1983. Regulation of C₄ photosynthesis: Regulation of pyruvate, P_i, dikinase by ADP-dependent phosphorylation and dephosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 115(1), 53-60.
4. Bandurski, R. S. 1955. Further studies on the enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphoenolpyruvate and carbon dioxide. J. Biol. Chem. 217, 137-150.
5. _____ y Greiner, C. M. 1953. The enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphoenolpyruvate and carbon dioxide. J. Biol. Chem. 204, 781-786.
6. _____ y Bonner, J. 1953. Enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate to oxalacetate. Fed. Proc. 12, 17.
7. Bassham, J. A. 1977. The reductive pentose and its regulation en: Encyclopaedia of Plant Physiol. New Series. Ed. M. Gibbs y E. Latsko. 6, 9-31. Springer New York.
8. Bennett, J. 1977. Phosphorylation of chloroplast membrane polypeptides. Nature 269, 344-346.
9. Bhagwat, A. S., Mitra, J. y Sane, P. V. 1977. Studies on enzymes of C₄ pathway: Part-III regulation of malic enzyme of Zea mays by Fructose-1,6-diphosphate and other metabolites. Indian J. Exp. Biol. 15, 1009-1012.

10. Bhagwat, A. S. y Sans, P.V. 1977. Studies on enzymes of C_4 pathway: Part IV-comparative study of inhibitors of malic enzyme isolated from CAM, C_4 and C_3 plants. Indian J. Exp. Biol. 15, 1013-1015.
11. Brulfert, J., Arracaba, M. C. y Guerrier, O. 1979. Changes in the isozymic pattern of phosphoenolpyruvate carboxylase. An early step in photoperiodic control of Crassulacean Acid Metabolism level. Planta 146, 129-133
12. _____, Guerrier, D. y Queiron, O. 1975. Photoperiodism and enzyme rhythms: Kinetic characteristics of the photoperiodic induction Crassulacean Acid Metabolism. Planta 125, 33-34.
13. _____, Muller, D., Kluge, M. y Queiroz, O. 1982. Photoperiodism and Crassulacean Acid Metabolism. I. Immunological and kinetic evidences for different patterns of phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in photoperiodically inducible and non-inducible Crassulacean Acid Metabolism. Planta 154, 326-331.
14. Buchanan, B. B. 1980. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31, -341-374.
15. _____, Wolosiuk, R. A. y Schurmann, P. 1979. Thioredoxin and enzymes regulation. Trends. Biochem. Sci. 4, 93-96.
16. Burnell, J. N. y Hatch, M. D. 1983. Dark-light regulation of pyruvate, P_i, dikinase in C_4 plant: Evidence that the same protein catalyses activation and inactivation Biochem. Res. Comm. 111(1), 288-293.
17. Checa, A., Lazaro, J.S. y George, J. L. 1984. Light-induced nuclear synthesis of spinach chloroplasts fructose-1, 6-bisphosphatase. Plant Physiol. 75, 539-541.
18. Collins, P. D. y Hague, D. R. 1983. Light-stimulated synthesis of NADP-malic enzymes in leaves of maize. J. Biol. Chem. 258(6), 4012-4018.
19. Cooper, T. G. y Wood, H. G. 1971. The Carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate. The active species of

- "CO₂" utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase - and pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 246, 5488-5490.
20. Coruzzi, G., Broglie, B., Edwards, C. y Chua, N.-H. 1984. Tissue-specific and light-regulates expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase. *EMBO J.* 3(8) 1671-1679.
 21. Cretin, C., Ferrot-Rechenman, C., Vidal, J., Gadal, P., Loubinx, B. y Tabach, S. 1983. Study on plant phosphoenolpyruvate carboxylase sensitivity to herbicides and immunochemical reactivity. *Physiol. Veg.* 21(5), 927-933.
 22. Davies, D. D. 1979. The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20, -131-158.
 23. Deleens, E. y Brulfert, J. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase capacity and establishment of autotrophy in maize seedlings. *Physiol. Veg.* 21(5), 827-834.
 24. Dennis, D. T. y Miernyk, J.A. 1982. Compartamentation of non-photosynthetic carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 27-50.
 25. Day, D. A. y Hatch, M. D. 1981. Transport of 3-phosphoglyceric acid, phosphoenolpyruvate, and inorganic phosphate in maize mesophyll chloroplasts, and the effect of 3-phosphoglyceric acid on malate and phosphoenolpyruvate production. *Arch. Biochem. Biophys.* 21(2), 743-749.
 26. _____ y _____. 1981. Dicarboxylate transport in maize mesophyll chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 211(2), 738-742.
 27. Edwards, C.E. y Huber, S. C. The C₄ pathway. *En: The biochemistry of plants*, ed. M. D. y N. K. Boardman. 8, 237-281. Academic Press, New York.

28. Edwards, G. E., Nakamoto, H., Burnell, J.M. y Hatch, M. D. 1985. Pyruvate, PEP dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C_4 photosynthesis: Properties and mechanism of light/dark regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 225-186.
29. Flugge, U. P., Stilt, M. S. y Heldt, H. W. 1985. Light-driven uptake of pyruvate into mesophyll chloroplasts from maize. *FEBS Lett.* 182(2), 335-339.
30. Francis, K. 1979. Photosynthesis by isolated chloroplasts of Sorghum vulgare. *Experientia* 35, 1324-1326.
31. Frieden, C. 1970. Kinetic aspects of regulation of metabolic processes: The hysteretic enzyme concept. *J. Biol. Chem.* 245, 5788-5799.
32. Gaba, V. y Black, M. 1979. Two separate photoreceptors control hypocotyl growth in green seedlings. *Nature* 278, 51-54.
33. Cavalas, N. A., Caravatas, S. y Manetas, Y. 1982. Factors affecting a fast and reversible inactivation of photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase. *Photosynthetica* 16, 49-58.
34. Goatly, M. B. 1974. Differential properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from etiolated and green sugar cane. *Planta* 117, 67-73.
35. _____, Coombs, J. y Smith, H. 1975. Development of C_4 photosynthesis in sugar cane: Change in properties of PEP carboxylase during greening. *Planta* 125, 15-24.
36. _____ y Smith, H. 1974. Differential properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from etiolated and green sugar cane. *Planta* 117, 67-73.
- 36.a. Gonzales P. H., Iglesias A. A. y Andreo S. C. 1984. Under regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity from maize leaf by $-L$ -malate effect of pH. *J. Plant Physiol.* 116, 425-434.

37. Good, M. E. y Bell, D. H. 1980. Photosynthesis, plant productivity and crop yield. en: The biology of crop - productivity. Ed. F. S. Carlson. pp. 3-51. Academic Press, New York.
38. Graham, D., Hatch, M. D., Slack, C. R. y Smile, R. M. 1970. Light induced formation of enzymes of the C_4 -dicarboxylic acid pathway of photosynthesis in detached leaves. *Phytochem.* 2, 521-532.
39. Gressel, J. 1980. Blue light and transcription. En: The blue light syndrome. pp. 133-153. Ed. H. Senger. Springer, Berlin/Heidelberg/New York.
- 39 a. Gutman, I. y Wahlefeld, A. W. 1974. L(-) malate determination with malate dehydrogenase and NADH. En: *Bergmeyer, H.U. Ed. Methods of Enzymatic Analysis*, pp. 1585-1589. Verlag Chemie. Weinheim, Academic Press, New York.
40. Hague, D. R. y Sims, T. L. 1980. Evidence for light-stimulated synthesis of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of maize. *Plant Physiol.* 66, 505-509.
41. _____, Uhler, M. y Collins, P. D. 1983. Cloning of c-DNA for pyruvate-Pi-dikinase from maize leaves. *Nucleic Acids. Res.* 11, 4853-4865.
42. Hase, E. 1980. Effects of blue light on greening in microalgae. En: The blue light syndrome. pp. 512-540. Ed. H. Senger. Springer, Berlin/Heidelberg/new York.
43. Hatch, M. D. 1978. Regulation of enzymes of C_4 metabolism. En: *Current Topics in cellular regulation*. 14, 1-27. Academic Press. U. S. A.
44. _____ y Burnell, J. N. 1983. Regulation of C_4 photosynthesis: Stability and other characteristics of the ATP-ADP-dependent inactivation of pyruvate, Pi, dikinase in maize chloroplast extracts. *Aust. J. Plant Physiol.* 10, 179-186.
45. _____ y Osmond, C. B. 1976. Compartmentation and transport in C_4 photosynthesis. En: *Encyclopaedia of Plant Physiol. New Series*, Ed. M. Gibbs y E. Latsko. 2, 144-184. Springer. New York.

46. Hatch, M. y Slack, C. P. 1968. Photosynthesis by Sugar-Cane leaves: A new carboxylation reaction and pathway of sugar formation. *Biochem. J.* 101, 103-111.
47. Huber, S. C. y Edwards, G. E. 1975. Light-dependent CO₂ fixation by mesophyll cell, protoplasts and protoplasts extracts of *Digitaria sanguinalis*. *Plant Physiol.* - 55, 835-844.
48. _____ y _____. 1977. Transport in C₄ mesophyll chloroplasts: evidence for exchange of inorganic phosphate and phosphoenolpyruvate. *Biochem. Biophys. Acta.* 462, 603-612.
49. _____ y _____. 1975. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase of C₄ plants by malate and aspartate. *Can. J. Bot.* 53, 1925-1923.
50. Iglesias, A. A. y Andreo, C. S. 1984. On the molecular mechanism of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activation by thiol compounds. *Plant Physiol.* 75, 983-987.
51. Johnson, H. S. y Hatch, M. D. 1970. Properties and regulation of leaf nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-malate dehydrogenase and malic enzyme in plants with the C₄ dicarboxylic acid pathway. *Biochem. J.* 119, 273-280.
52. Jones, R., Wilkins, M. B., Coggins, J. R., Newson, C. A. y Malcom, A. D. B. 1978. Phosphoenolpyruvate carboxylase from the Crassulacean plant *Bryophyllum fedtschenkoi*. Hamet et Ferrier. Purification, molecular and kinetic properties. *Biochem. J.* 175, 391-406.
53. Kagawa, T. y Hatch, M. D. 1977. Regulation of C₄ photosynthesis: Characterization of a protein factor mediating the activation and inactivation of NADP-malate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 184, 290-297.
54. Kamiya, A. D. y Shigetoh, M. 1975. Blue light-induced formation of phosphoenolpyruvate carboxylase colorless *Chlorella* mutant cells. *Plant Cell. Physiol.* 16, -729-736.

55. Karabuorniotis, G., Mametas, Y, y Gavalas, N. A. 1985. Detecting photoactivation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄ plants. An effect of pH. *Plant Physiol.* 77, 300-302.
56. _____ y _____. 1983. Photoregulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Salsola soda* L. and other C₄ plants. *Plant Physiol.* 72, 735-739.
57. Kendrick, R. E. y Frankland, B. 1983. *Phytochrome and plant growth.* 2^a ed. Edward Arnold Publishers. Ltd. London.
58. Ker, M. R. y Robertson, A. 1971. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize leaves. *Biochem. J.* 125, 34.
59. Kobayashi, H., Asamis, S. y Akasawa, T. 1980. Development of enzymes involved in photosynthetic carbon assimilation in greening seedling of maize (*Zea mays*). *Plant Physiol.* 65, 198-203.
60. Kowallick, W. 1982. Blue light effects on respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 51-72.
61. Krachru, R. B. y Anderson, L. E. 1975. Inactivation of pea leaf phosphofructokinase by light and DTT. *Plant Physiol.* 52, 199-202.
62. Laetsch, W. M. 1974. The C₄ syndrome: A structural analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 27-52.
63. Leegood, R. C. y Furbank, R. T. 1984. Carbon metabolism and gas exchange in leaves of *Zea mays* L. Changes in CO₂ fixation chlorophyll a fluorescence and metabolite levels during photosynthetic induction. *Planta* 162, 450-456.
64. _____ y Walker, P. A. 1982. Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase activity in leaves. *Planta* 156, 449-456.
65. _____ y _____. 1983. Modulation of NADP-malate dehydrogenase activity in maize mesophyll chloroplasts. *Plant Physiol.* 71, 523-518.

66. Lichenthaler, H. K., Busman, C. y Bahmsdorf, V. 1980. The importance of blue light for development of Sun-type chloroplasts. En: The blue light syndrome. pp. 455-494. Ed. H. Senger Springer, Berlin/Heilderberg/New York.
67. Lucero, H. A., Lin, Z.-F. y Racker, P. 1982. Protein kinases from spinach chloroplasts. J. Biol. Chem. 257, 12157-12160.
68. Mahler, H. F. y Cordes, E. H. 1966. Biological Chemistry. p. 222. Harper and Row, Publishers Inc. New York.
69. Manabe, K. y Furuya, M. 1974. Phytochrome-dependent reduction of nicotinamide nucleotides in the mitochondrial fraction isolated from etiolated pea epicotyls. Plant Physiol. 52, 343-347.
70. Manetas, Y. y Cavalas, N. A. 1983. Post-translational regulation of C4 and CAM phosphoenolpyruvate carboxylase. Physiol. Veg. 21(5), 911-917.
71. Marme, D. 1977. Phytochrome: membranes as possible sites of primary action. Ann. Rev. Plant. Physiol. 28, 173-198.
72. Mares, J. y Lebovlá, S. 1980. Phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of maize, sorghum and millet. Photosynthetica 14, 25-41.
73. Market. 1975. Biology of isozymes in: Isozymes. I. Molecular structure. C. L. Market, Ed. Academic Press. pp. 1-10.
- 74a. Metcalf y Eddy Inc. 1979. Wastewater engineering: Treatment, disposal reuse. 2^a ed. Ed. F. J. Cerra y J.W. Malsel p-66. Mc. Graw-Hill Book Co. N. Y. New York.
74. Maruyama, H., Easterday, R. C., Chama, H. C. y Lane, M. D. 1966. The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate carboxylase. J. Biol. Chem. 241, 2405-2412.

75. Mizioroko, H. M., Mowak, T. y Milduam, A. S. 1974. Spinach leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. Purification, properties, kinetic studies. Arch. Biochem. Biophys. 163, 378-379.
76. Mohamed, A. H. y Anderson, L. E. 1981. Extraction of chloroplast Light Effect Mediators and reconstitution of light activation of NADP-linked malate dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. 209(2), 606-612.
77. Mukerji, S. K. 1977. Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Purification and properties of two isoenzymes. Arch. Biochem. Biophys. 182, 343-351.
78. _____ y Ting, J. P. 1971. Phosphoenolpyruvate carboxylase isoenzymes: Separation and properties of three forms cotton leaf tissue. Arch. Biochem. Biophys. 143, 297-317.
79. Murphy, D. V. y Leech, R. M. 1977. Lipid biosynthesis from (14-C)-bicarbonate, 2-(14-C)-pyruvate and 1-(14-C)-acetate during photosynthesis by isolated chloroplasts. FEBS Lett. 77, 164-168.
80. Nakamoto, H. y Edwards, G. E. 1983. Influence of oxygen and temperature on the dark inactivation of pyruvate, P_i, dikinase and NADP-malate dehydrogenase in maize. Plant Physiol. 71, 568-575.
81. _____ y Sugiyama, T. 1982. Partial characterization of the "in vitro" activation of inactive pyruvate, P_i, dikinase from darkened maize leaves. Plant Physiol. 69, 749-753.
82. Neet, K. E. y Ainslie, B. G. 1980. Hysteretic Enzymes. Methods Enzymol. 64, 193-227.
83. Nimmo, G. A., Nimmo, H. G., Fewson, C. A. y Wilkins, M. B. 1984. Diurnal changes in the properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Bryophyllum* leaves: a possible covalent modification. FEBS Lett. 178, 199-203.

84. Nishizawa, A. N. y Buchanan, B. B. 1981. Enzyme regulation in C₄ photosynthesis. Purification and properties of thioredoxin-linked fructose biphosphatase from corn leaves. *J. Biol. Chem.* 256(12), 6119-6126.
85. Nott, D. L. y Osmond, C. B. 1982. Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from plants with Crassulacean Acid Metabolism. *Aust. J. Plant Physiol.* 2, 409-422.
86. Oshugi, R. y Murata, T. 1980. Leaf anatomy post-illumination CO₂ burst and NADP-malic enzyme activity of Panicum dichotomiflorum. *Plant Cell Physiol.* 21(7) 1329-1333.
- 86a. O'Leary M. 1982. Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's view. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 297-315.
87. Quail, P. H. 1984. Phytochrome: a regulatory photoreceptor that controls the expression of its own gene. *Trends. Biochem. Sci.* 9(10), 450-453.
88. Bathman, C. K. M. 1978. C₄-Photosynthesis: The pathway of carbon in bundle sheath cells. *Sci. Prog. Oxf.* 65, 409-435.
89. Ray, T. B. y Black, C. C. 1979. The C₄ pathway and its regulation. *En: Encyclopedia of Plant Physiology. New Series.* Ed. M. Gibbs y E. Latsko. 6, 77-99. Springer. New York.
90. Rodriguez, S. B. y Muñoz, C. R. 1986. Short-term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by light. *Plant Physiol.* Sometido a publicación.
91. Rodriguez, S. B. y Muñoz C. R. 1986. Studies of the "in vivo" activity of maize leaf of PEPC-light the night-day. *Plant Physiol.* Sometido a publicación.
92. Rumpfo, M. E. y Edwards, G. E. 1984. Inhibition of 3-phosphoglycerate-dependent O₂ evolution by phosphoenolpyruvate in C₄ mesophyll chloroplasts of Digitaria sanguinalis. *Socp. Plant Physiol.* 76, 711-718.

93. Samejima, M. y Miyachi, S. 1978'. Photosynthetic and light enhanced dark fixation of carbon-14 dioxide from the ambient atmosphere and 14-C-bicarbonate infiltrates through vascular bundles in maize leaves. *Plant Cell Physiol.* 19, 907-916.
94. Senger, H., Klein, C., Durnemann, D. y Perra, R. J. 1980. The action blue light on 5-aminolevulinic acid Formation. *En:* Springer, Berlin/Heilderberg/New York.
95. Shopfer, P. 1977. Phytochrome control of enzymes. *Ann.Rev. Plant Physiol.* 28, 223-252.
96. Sims, T. L. y Hague, D. R. 1981. Light-stimulated increase of translatable mRNA for PEP carboxylase in leaves of maize. *J. Biol. Chem.* 256, 8252-8257.
97. Slack, C. E., Hatch, M. D. y Goodchild, D. C. 1969. Distribution of enzymes in maize leaves in relation to the C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem. J.* 114, 489-498.
98. Stilt, M., Virts, W. y Heldt, H. W. 1980. Metabolite levels during induction in the chloroplast compartment of spinach protoplasts. *Biochem. Biophys. Acta.* 593, 85-102.
99. Sugiyama, T. y Hatch, M. D. 1981. Regulation of C₄ photosynthesis: Inactivation of pyruvate, P_i, dikinase in leaf and chloroplast extracts in relation to dark-light regulation "in vivo". *Plant Cell Physiol.* 22 (1), 115-126.
100. Ting, I. F. y Osmond, C. B. 1973. Multiple forms of plant phosphoenolpyruvate carboxylase associate with different metabolic pathways. *Plant Physiol.* 51, 448-453.
101. Uedan, K. y Sugiyama, T. 1976. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiol.* 57, 906-910.
102. Usuda, H. y Edwards, G. E. 1984. Is photosynthetic during the induction period in maize limited by the availability of intracellular carbon dioxide? . *Plant Sci. Lett.* 37, 41-45.

103. Vidal, J. y Cavalie, C. 1976. Etude de la phosphoenol-pyruvate carboxylase du haricot et sorgho electrophorese sur gel de polyacrilamide. Plant Sci. Letter 7, 265-270.
104. _____, _____ y Gadal, F. 1974. Mise en évidence - de formes isofonctionnelles de la PEP carboxylase chez Phaseolus vulgaris L. Physiol. Veg. 12, 175-188.
105. _____, Cretin, C. y Gadal, F. 1983. The mechanism of - photocontrol of phosphoenolpyruvate carboxylase in sorghum leaves. Physiol. Veg. 21(5), 977-986.
106. _____ y Gadal, F. 1983. Influence of light on phospho-pyruvate carboxylase in sorghum leaves. I. Identifi-cation and properties of two isoforms. Physiol. Plant. 57, 119-123.
107. _____ y _____. 1983. Influence of light on phospho-enolpyruvate carboxylase in Sorghum leaves. II. In-munochemical study. Physiol. Plant. 57, 124-128.
108. Von Willert, D. J., Treichel, S., Kirst, G. O. y Curdts, E. 1976. Phytochem. 15, 1435-1436.
109. Welkie, G. W. y Coldwell, M. 1970. Leaf anatomy of species in some dicotyledonean families as related to the C₃ or C₄ pathways of carbon fixation. Can. J. Bot. 48, 2135-2146.
110. Wilkinson, M. J. y Smith, H. 1976. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase activity during the endoge-nous rhythm of carbon dioxide output. Plant Sci. Lett. 6, 319-324.
111. Wohl, R. C. y Markus. 1972. Phosphoenolpyruvate carboxy-lase of Escherichia coli: Purification and some pro-perties. J. Biol. Chem. 247, 5785-5792.
112. Wolosiuk, R. A. y Buchanan, B. B. 1978. Activation of - chloroplast NADP-linked gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the ferredoxin/thioredoxin system. Plant Physiol. 61, 669-671.

113. Wolosiuk, R. A., Buchanan, B. B. y Crawford, N. A. 1977. Regulation of NADP-malate dehydrogenase by the light-activated ferredoxin/thioredoxin system of Chloroplast. FEBS Lett. 81(2), 253-258.
114. Wu, M-X. y Wedding, R. T. 1985. Diurnal regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from Crassula. Plant Physiol. 77, 667-675.
115. _____ y _____. 1985. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from Crassula by interconversion of oligomeric forms. Arch. Biochem. Biophys. 240, 655-662.
116. Ziegler, I. 1974. Malate dehydrogenase in Zea mays. Properties and inhibition by sulfite. Biochem. Biophys. Acta. 364, 28-37.