

00562

5

24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES BIOQUIMICAS E  
INMUNOLOGICAS DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA  
EN DIFERENTES TEJIDOS DE ZEА MAYS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
(BIOQUIMICA) PRESENTA EL QUIMICO  
MANUEL ANTONIO VASQUEZ TINEO

MEXICO, D.F.  
1988

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## RESUMEN

La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) ha sido purificada parcialmente de diferentes tejidos de Zea mays para establecer el grado de proximidad estructural entre las isoenzimas y a la vez conocer mejor la función de esta enzima en el metabolismo de las plantas. Se ha hecho un estudio bioquímico en base a criterios electroforéticos, cromatográficos e inmunológicos. De acuerdo a esos criterios y en base a los resultados de este trabajo, se ha concluido que en maíz existen dos poblaciones de isoenzimas de PEPC: PEPC-I y PEPC-II. Una de esas poblaciones es característica de tallo, raíz y callo de embriones (PEPC-II), mientras que la otra población corresponde a hojas de plantas verdes (PEPC-I). También se detectaron ambas formas en hojas de plantas etioladas, siendo la PEPC-I mayoritaria. Las diferencias estructurales entre las PEPC- y la PEPC-II son pronunciadas ya que no existen reacciones de reconocimiento inmunológico entre los anticuerpos de la PEPC-I y la isoenzima PEPC-II.

## ABSTRACT

Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) has been partially purified from different maize tissues and compared in order to establish its structural relationship and have a better knowledge of its in vivo activity. A biochemical study has been performed using electrophoretic, chromatographic and immunochemical criteria. According to results, it has been concluded that two populations of isoenzymes exist: PEPC-I and PEPC-II. One of these is characteristic of root, stem and embryo callus (PEPC-II), while PEPC-I corresponds to leaves from green plants. Both isoenzymes were also detected in etiolated leaves, being PEPC-I the major enzyme. Structural differences between the two must be important since no cross-reaction took place between the antibodies to PEPC-I and PEPC-II enzyme.

# I N D I C E

INTRODUCCION	1
I. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	5
I.1 PEPC en plantas	5
I.1.1 Reacción catalizada	6
I.1.2 Distribución y compartimentalización celular	6
I.1.3 Funciones Biológicas	7
I.1.4 Características de la enzima PEPC	17
I.1.5 Regulación	30
I.2. Objetivos	36
I.3 Hipótesis	37
I.4 Diseño Experimental	38
II. METODOS Y MATERIALES	39
II.1 Equipos	39
II.2 Reactivos y Materiales	40
II.3 Material Biológico	42
II.4 Métodos y Técnicas	43
II.4.1 Crecimiento de plántas e inducción de callos	43
II.4.2 Extracción de la enzima PEPC	44
II.4.3 Detrminación de proteínas	49

II.4.4	Purificación de la enzima PEPC	54
II.4.5	Determinación del peso molecular de la proteína nativa por cromatografía de filtración en gel	59
II.4.6	Técnicas de electroforesis	61
II.4.7	Técnicas inmunoquímicas	71
III	RESULTADOS	
III.1	Actividad de PEPC en diferentes tejidos de maíz	73
III.2	Purificación de la actividad de PEPC extraída de hoja de maíz	82
III.3	Comportamiento en cromatografía de intercambio iónico de la actividad de PEPC extraída de los diferentes tejidos de maíz	83
III.4	Determinación del peso molecular de las isoformas de PEPC por cromatografía de filtración en gel.	96
III.5	Comportamiento electroforético de la actividad PEPC extraída de los diferentes tejidos de maíz	99
III.6	Estudio inmunológico	112
IV	DISCUSION	120
V	CONCLUSIONES	130
	BIBLIOGRAFIA	132

## INTRODUCCION

## INTRODUCCION

La regulación e integración de los procesos bioquímicos implicados en la asimilación del  $\text{CO}_2$  fotosintético en el metabolismo  $\text{C}_4$  no son aún perfectamente conocidos, a pesar de que fue en el 1966 cuando se propuso por primera vez la existencia de esta ruta metabólica (88) y de que la relevancia del metabolismo  $\text{C}_4$  en la productividad de las plantas bajo ciertas condiciones ambientales ha añadido un extraordinario interés a su estudio.

Los mecanismos regulatorios de la actividad de la enzima Fosfoenolpiruvato Carboxilasa, (PEPC) (EC4.1.1.31) así como el control que esta actividad ejerza sobre el flujo de metabolitos a través de esta ruta  $\text{C}_4$ , deben ser factores de regulación claves. La enzima PEPC es la primera de las dos enzimas carboxilantes implicadas en la fijación de  $\text{CO}_2$  en este tipo de plantas y la reacción que cataliza es irreversible. Por ello es considerada por muchos como una enzima cuya actividad debe estar fuertemente sometida a control.

Hay que tener en cuenta, además que la función que esta actividad enzimática desempeña en el metabolismo de las plantas es doble: una función fotosintética, a la que hemos estado refiriéndonos hasta ahora, y una función anaplerótica. Ello sugiere que deben existir formas diferentes de esta enzima asociada a las diferentes funciones, siguiendo la estrategia general del metabolismo, que en es

tos casos desarrolla isoenzimas como medio de lograr una regulación diferencial.

En general, los estudios bioquímicos sobre las isoenzimas son importantes para conseguir la comprensión de su origen genético y evolutivo, así como de su papel en la fisiología de las células diferenciadas. Al mismo tiempo estos estudios pueden proporcionar valiosas informaciones acerca del control de la expresión genética durante el desarrollo de las células diferenciadas y sobre la naturaleza de los controles metabólicos en estas células.

En nuestro caso particular, estos estudios cobran una relevancia especial, dado que la búsqueda de un incremento de productividad en las plantas tipo  $C_3$ , por introducción en éstas de características propias de las plantas tipo  $C_4$ , plantea el problema central de conocer el grado de "parentesco" que existe entre las actividades enzimáticas clave del proceso asimilador de  $CO_2$  en los dos tipos de plantas (de "baja productividad" o plantas  $C_3$  y las de "alta productividad" o plantas  $C_4$ ). La eficiencia de este proceso es en gran medida la determinante de la productividad de una planta. Una de estas actividades claves es, sin duda, la de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y ello añade aún más interés a la tarea de investigar la naturaleza, función y operación de esta enzima.

Decidimos abordar este problema en una primera etapa en su forma más simple a nuestro juicio: haciendo un estudio comparativo entre la forma fotosintética de la enzima PEPC característica del metabolismo  $C_4$  y la (s) forma (s) no fotosintética (s) de esta enzima existente en la misma planta. Esta (s) última (s) supusimos deberían ser similares en cuanto a característica y función a la (s) forma (s) presente (s) en plantas  $C_3$ , puesto que de las especies  $C_3$  derivan todas las especies  $C_4$ . De esta forma, quisimos eliminar las diferencias interespecíficas, que habríamos de encontrar forzadamente en el caso de estudiar comparativamente la enzima de especies  $C_3$  y  $C_4$ . Las diferencias que pudiéramos encontrar entre las isoenzimas fotosintéticas y anapleróticas (s) podríamos con certeza asignarlas a una función metabólica específica y concluir sobre la proximidad genética de las formas encontradas.

En la bibliografía científica, existen varias publicaciones sobre la enzima PEPC de Zea mays (especie perteneciente al grupo de plantas  $C_4$  objeto de este trabajo), pero no existe un acuerdo sobre el tipo y número de isoenzimas presentes en los tejidos de esta planta.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, en el presente estudio nos propusimos reinvestigar el problema del polimorfismo de la enzima PEP carboxilasa en Zea mays usando técnicas bioquímicas convencionales y técnicas inmunológicas que no habían sido utilizadas anteriormente, con el fin de que los resultados encon-

trados arrojaran alguna luz sobre la homología estructural y de aquí sobre la proximidad genética de las isoenzimas encontradas.

## I. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

## 1.1 FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA EN PLANTAS

El papel central de esta enzima en el metabolismo intermediario de las plantas en general y su innegable importancia en el proceso fotosintético de asimilación del carbono en plantas  $C_4$  y en el metabolismo ácido crasuláceo (CAM) ha hecho su estudio interesante para numerosos investigadores. Los resultados de estos trabajos se han recopilado en varias revisiones más o menos completas (1,6,9b,33,71,101)

Para que sirva de marco de referencia al trabajo presentado en esta tesis incluimos una revisión actualizada de lo que se ha publicado acerca de las características físicoquímicas, inmunológicas y cinéticas de la enzima PEPC, así como de los mecanismos de regulación de esta actividad enzimática que han sido encontradas en plantas hasta la fecha.

### 1.1.1 Reacción Catalizada

La enzima PEPC (EC 4.1.1.31) 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 (3,4) quien además purificó parcialmente la proteína responsable de la actividad de PEP Carboxilasa y demostró que para la actividad catalítica se necesita la presencia de  $Mg^{+2}$  (5). Posteriormente Maruyama (44) demostró que la carboxilación de fosfoenolpiruvato (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 esta enzima es la única carboxilasa conocida que no contiene biotina y usa  $HCO_3^-$  como sustrato (7,58).

### I.1.2 Distribución y Compartimentalización Celular

La enzima PEPC está presente en todos los tejidos vegetales en los que se ha buscado; igualmente algunas bacterias contienen enzimas con actividad de PEPC. Sin embargo, está ausente en tejidos animales. (6).

En cuanto a su ubicación celular, la mayoría de los autores sitúan a la PEPC en el compartimiento citoplasmático (37,38,49,49a) aunque algunos sostienen que está asociada a cloroplastos, tanto en plantas  $C_4$  (50) como en plantas CAM (51).

### I.1.3 Funciones biológicas

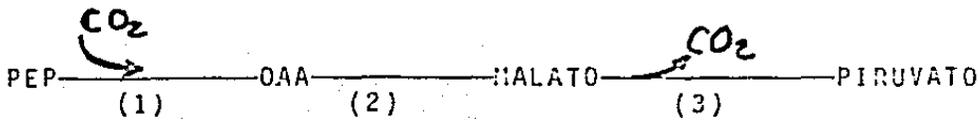
La enzima PEPC presente en tejidos de plantas cataliza la fijación del  $\text{CO}_2$  y la síntesis concomitante de ácidos dicarboxílicos, pero la función que esta reacción desempeña dentro del metabolismo depende del tipo y fisiología del tejido en que se encuentre.

I.1.3.1 En tejidos no fotosintéticos. Aún cuando la carboxilación no asociada al proceso fotosintético (catalizada por PEPC) es ubicua en las plantas, existe relativamente poca información con respecto al significado de esta fijación de  $\text{CO}_2$  no fotosintético. Se cree sin embargo, que esta carboxilación pudiera ser integrante de un (a) mecanismo de regulación del pH y de un (b) proceso anaplerótico.

a) Mecanismo de regulación del pH. El movimiento de iones puede producir cambios importantes en el equilibrio ácido-base; sin embargo, el citoplasma requiere mantenerse a un pH constante; se ha sugerido que un control fino de pH citoplásmático puede alcanzarse mediante un balance entre carboxilación y descarboxilación:



De acuerdo con esta idea, Davis (9) propuso un mecanismo metabólico regulador del pH citoplásmático, que implicaría, por un lado, a la actividad de PEPC en asociación con la malato deshidrogenasa disminuyendo el pH celular al generar ácidos orgánicos mediante la fijación del  $\text{CO}_2$ , y por el otro lado, a la enzima málica que tendría efectos opuestos al descarboxilar al malato.



(1) PEPC                      (2) MALATO DESHIDROGENASA      (3) ENZIMA MALICA

En consecuencia, los niveles de metabolitos y de  $H^+$  modularían estas actividades metabólicas antagónicas. La sensibilidad de este mecanismo regulador de pH estaría determinada por la pendiente de las curvas de actividad frente al pH de las enzimas implicadas y sería aumentado por efectores que actuarían de manera opuesta a las enzimas. Los siguientes tres procesos fisiológicos pudieran explicarse en base a esta hipótesis: Movimiento de los estomas; estimulación del crecimiento por auxinas y síntesis de malato para lograr balance iónico .

i) Movimiento de los estomas. En las células guarda de epidermis donde PEPC se bastante activa (21) se ha reportado un incremento en la concentración de malato durante la apertura de los estomas (11). Se sabe que la base del hinchamiento de las células guardas, cuando los estomas se abren, es el gran potencial osmótico negativo que resulta de la captación del ion  $K^+$  (10) que es equilibrado eléctricamente por la liberación de iones  $H^+$  durante la formación de malato y citrato (26); de ahí la importancia que tiene la actividad de la enzima PEPC en el funcionamiento de los estomas. Las características cinéticas de esta enzima de células guardas de Vicia faba concuerdan con la función asignada a esta enzima en el citoplasma durante el flujo de  $H^+$

ii) Estimulación del crecimiento por auxinas. La adición de auxinas a muchos tejidos vegetales se traduce en una salida de  $H^+$  a la pared celular (12) incrementando la extensibilidad de esta, ya sea por activación de enzimas o por rupturas de enlaces "ácidos-lábiles" (128, 129). Al mismo tiempo se registra una acumulación de  $K^+$  y malato (13, 14) y un incremento significativo en la velocidad de fijación de  $CO_2$  en la oscuridad.

Es obvio que una liberación continua de  $H^+$  al medio podría agotar la capacidad amortiguadora del citoplasma, lo que conllevaría un incremento del pH celular. Esto último se evitaría si funcionara un mecanismo compensatorio como el propuesto por Davies (9). En este sentido ha reportado que las propiedades de la enzima PEPC sa extraída de coleoptilo de avena son consistentes con la función de disminuir pHs intracelulares altos (16, 17). De igual manera, la adición de la fitotoxina fusicoccina, que también estimula la salida de  $H^+$  en tejidos etiolados de coleoptilos de avena y la captación de  $K^+$  (19), produce una síntesis rápida de malato en esos tejidos, probablemente a través de la actividad de PEPC acoplada con la actividad de malato deshidrogenasa (15). Puesto que no ha podido demostrarse un efecto directo de la fusicoccina in vitro sobre la enzima PEPC (64) se sugiere que es el -

aumento del pH celular lo que incrementa la actividad de esta enzima, de acuerdo con la hipótesis de Davies ya mencionada.

iii) Síntesis de malato para lograr un balance iónico. Como hemos venido discutiendo las células vegetales liberan  $H^+$  al medio cuando la captación de cationes excede la de aniones, y para ello sintetizan cantidades equivalentes de ácidos orgánicos. Ello cobra especial importancia en el tejido meristemático de raíz (punta de raíz). Existen evidencias que indican que el  $CO_2$  se fija vía PEPC para formar oxalacetato el que a su vez es reducido a malato por la malato deshidrogenasa soluble (22, 23). La señal que dispara la síntesis de los ácidos puede ser un aumento de pH citoplasmático, como postula Davies. Sin embargo, recientemente, Roberts et al. (65) no han podido detectar ningún cambio de pH en el citoplasma como cabría esperarse por la salida de protones ( $H^+$ ) que acompañan a la entrada de cationes. Parece por tanto, que los mecanismos de regulación del pH intracelular responden muy rápidamente y ello lleva a estos autores a postular que la síntesis de ácidos orgánicos se incrementa por un aumento en la concentración citoplasmática del  $HCO_3^-$  resultante de una entrada incrementada de  $CO_2$ , acoplada a la salida del  $H^+$ .

b) Función Anaplerótica: además de formar parte de un mecanismo regulador de pH, se ha propuesto que la PEPC tiene una función anaplerótica siguiendo la definición de Kornberg (20). Así en la biosíntesis de aminoácidos, la enzima PEPC desempeña un papel importantísimo, ya que su funcionamiento alimenta la poza de intermediarios del Ciclo de Krebs, que de otra manera serían agotados por su uso como esqueletos carbonados para la biosíntesis de aminoácidos. Esto es especialmente cierto en nódulos de plantas que exportan nitrógeno para eliminar el exceso de amonio incorporado en raíz por conversión de los aminoácidos aspártico y glutámico en sus respectivas amidas (24, 25). Igualmente estaría desempeñando una función anaplerótica típica en las etapas tempranas de la germinación, ya que el incremento de esta actividad enzimática estudiado en semillas de algodón y sorgo (28) sugiere que PEPC constituye el sistema proveedor de malato en los estadios tempranos de desarrollo de plántulas.

1.1.3.2. En tejidos fotosintéticos. La PEPC realiza una función fotosintética clara en las hojas de las especies con metabolismo  $C_4$  y ácido crasuláceo (CAM). Además, Ting y Osmond (52) han sugerido que la enzima PEPC encontrada en hojas de plantas  $C_3$  también posee una función fotosintética, puesto que interviene en la síntesis de malato a partir de fosfoenolpiruvato y el malato puede ser considerado como un producto fi

nal del ciclo de reducción fotosintética del carbono. Sin embargo, la actividad de la enzima extraída de hojas de plantas  $C_4$  y CAM es unas 20-30 veces mayor que la procedente de hojas de plantas  $C_3$ , lo que sugiere una mayor relevancia en el metabolismo fotosintético en aquellos casos y es por ello que nos limitaremos a discutir con detalle su papel en el metabolismo  $C_4$  y ácido crasuláceo.

a) Función en el metabolismo  $C_4$ . La fotosíntesis en plantas  $C_4$  es una de las principales variaciones del proceso fotosintético de asimilación del  $CO_2$ , conjuntamente con el metabolismo ácido crasuláceo (CAM), de la ruta  $C_3$  o Ciclo de reducción fotosintética del carbono. Fueron Hatch y Slack quienes propusieron por primera vez que en un gran número de plantas se verificaba una ruta cíclica basada en la reacción de beta-carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) catalizada por la enzima PEPC (88). Las especies  $C_4$  han desarrollado una compleja compartimentalización de enzimas y un igualmente complejo transporte de compuestos entre dos tipos de células: células de la vaina vascular, localizadas en el interior de la hoja rodeando el xilema y al floema, y células del mesófilo. Ambos tipos de células contienen cloroplastos, pero difieren en su contenido en ciertas enzimas. El  $CO_2$  atmosférico que penetra a través de los estomas se fija primariamente en el citoplasma de

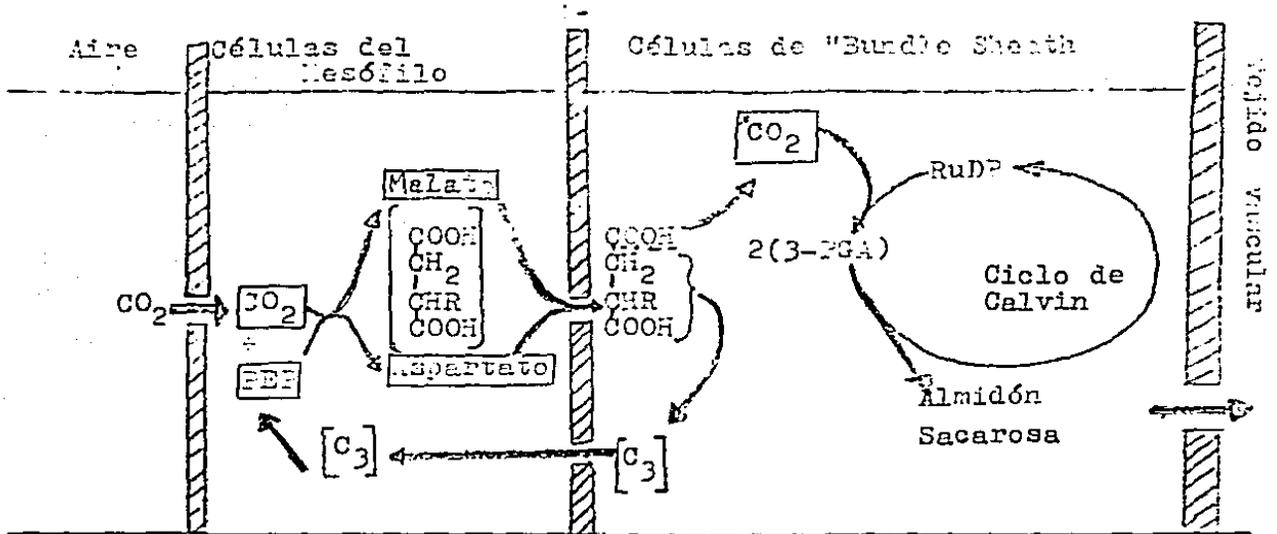


Fig. 1 Esquema simplificado para fotosíntesis de la ruta  $\text{C}_4$  mostrando las reacciones básicas y la localización intracelular (Información tomada de M. D. Hatch y C. B. Osmond 1976. Compartmentation and Transport in  $\text{C}_4$  Photosynthesis en :Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, C. P. Stocking, U. Heber Eds. 144-184, Berlin Sp ringer)

las células del mesófilo como un ácido de cuatro átomos de carbono (ácido oxaloacético) mediante la reacción de carboxilación catalizada por la enzima PEPC. El ácido de cuatro carbonos se transporta a las células de la vaina vascular donde se descarboxila liberando un ácido de tres átomos de carbono y  $\text{CO}_2$ . El  $\text{CO}_2$  así formado se asimila en el cloroplastos de estas células por el ciclo de Calvin, que es exactamente igual al que opera en cloroplastos de plantas  $\text{C}_3$ . El ácido de tres átomos de carbono se transporta a las células del mesófilo donde se regenera el sustrato de la reacción de carboxilación, cerrándose así un ciclo (Fig. 1)

En las plantas con metabolismo fotosintético  $\text{C}_4$  la PEPC proporciona una adecuada capacidad de carboxilación lo cual se traduce en una fijación rápida de  $\text{CO}_2$ . Debido a la función de la enzima PEPC, se alcanza buena eficiencia en el proceso fotosintético en células del mesófilo, aún cuando en estas células existen bajos niveles de  $\text{CO}_2$  durante el estado estacionario de la fotosíntesis. La carboxilación promovida por esta enzima también permite superar la alta resistencia que ofrece la superficie de la hoja a la difusión de  $\text{CO}_2$ . Por otra parte, las reacciones enzimáticas y los procesos de transporte que completan esta ruta metabólica sirven para concentrar  $\text{CO}_2$  en las células de la vaina vascular, permitiendo velocidades de fijación de  $\text{CO}_2$  mucho más altas

que las alcanzadas en plantas  $C_3$ , en las que exclusivamente opera el ciclo de Calvin. Resumiendo, la asimilación fotosintética neta del  $CO_2$  es superior en plantas  $C_4$  que en plantas  $C_3$  debido a: 1) la concentración de  $CO_2$  en las células donde se localiza el ciclo de Calvin, se incrementa a niveles considerablemente superiores a los que se alcanzarían por simple difusión del  $CO_2$  atmosférico; 2) la refijación del  $CO_2$  liberado en las células de la vaina, si bajo condiciones extremas ocurriese fotorrespiración. Ambos efectos son posibles gracias a la existencia, en el citoplasma de las células del mesófilo de la enzima PEPC cuya importancia en el proceso asimilador de  $CO_2$  en plantas  $C_4$  queda así de manifiesto. Estas características bioquímicas de las plantas  $C_4$  dan cuenta de las altas velocidades fotosintéticas de estas plantas y, además, del uso altamente eficiente del agua, entendido en términos de que transpiran menos agua por unidad de carbono fijado (31), lo que las hace ser plantas más productivas y que crecen bien en ambientes semiáridos.

b.) Función en el Metabolismo Acido Crasuláceo.

Este metabolismo es una adaptación fisiológica y bioquímica importante del metabolismo fotosintético del carbono a condiciones de escasez de agua en climas áridos.

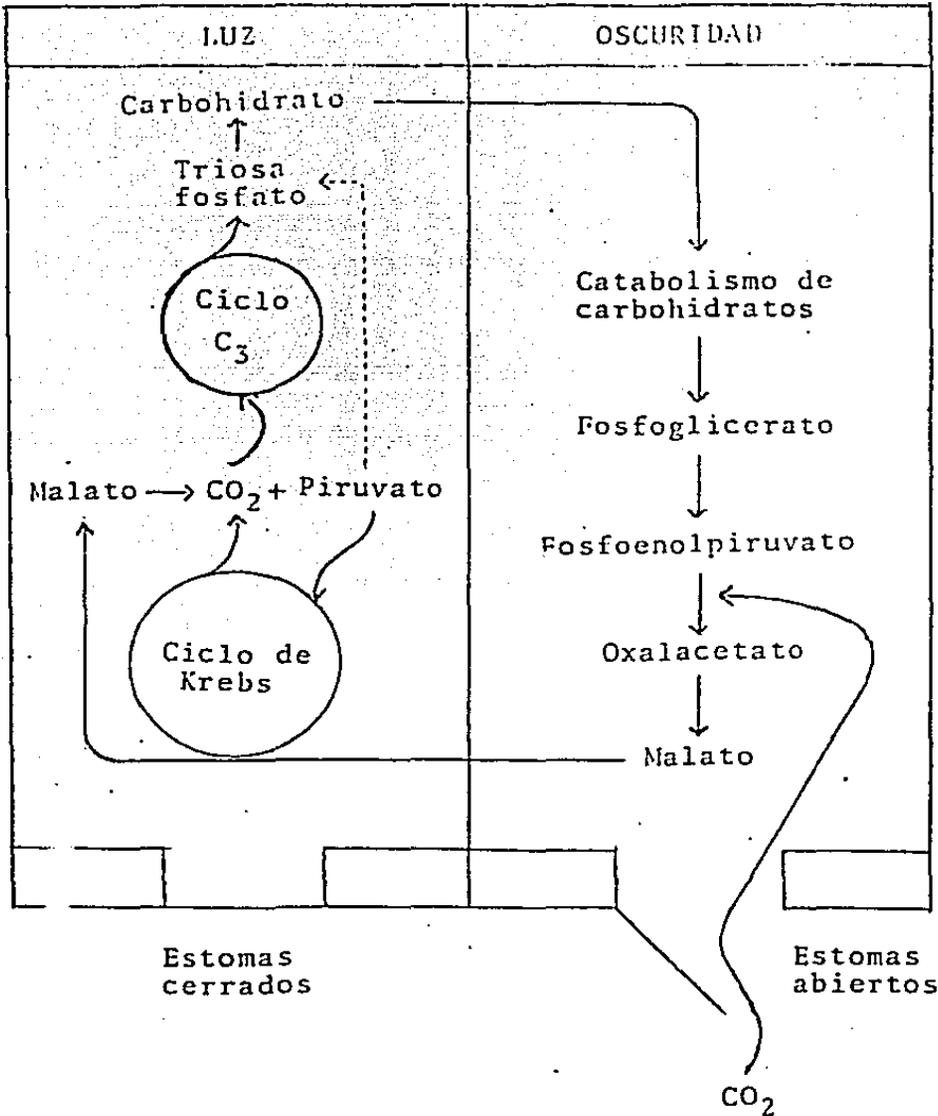


Fig.1.2 Esquema de la asimilación fotosintética de CO<sub>2</sub> atmosférico en plantas con metabolismo ácido carasuláceo (CAM), tomado de D. Walker "Energy, Plants and Man", 1979. Packerd Publishing.

En la fig.1,2 se esquematizan las rutas metabólicas implicadas en la asimilación fotosintética de  $\text{CO}_2$  en estas plantas. Durante la noche estas plantas tienen abiertos sus estomas permitiendo así la entrada de  $\text{CO}_2$  con pérdidas mínimas del agua intracelular. La fijación primaria de  $\text{CO}_2$  en un compuesto orgánico (el ácido oxalacético, un ácido de 4 carbonos) tiene lugar durante el período de oscuridad gracias a la actividad PEPC. La enzima malato deshidrogenasa convierte al oxalacético en ácido málico, el cual es almacenado en las vacuolas de la planta. Durante el día, los estomas están cerrados, de otra forma las pérdidas de agua impedirían la supervivencia. Pero el proceso fotosintético, que requiere luz y  $\text{CO}_2$ , puede tener lugar ya que se utiliza el  $\text{CO}_2$  resultante de la descarboxilación del malato acumulado (32, 33, 34, 36). La PEPC aparece en este metabolismo como una enzima clave, dado que cataliza la fijación primaria del  $\text{CO}_2$  atmosférico.

#### I.1.4 Características de la PEPC

a) 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 (52) han sugerido 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 hojas 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 (45, 52). 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 a las cuales se les han atribuido diferentes funciones metabólicas (53,54)

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  $C_4$  (52, 55, 56, 57, 63). En un principio se sugirió que la PEPC de hojas verdes procedía de las hojas etioladas por una modificación postraducciona1 originada por la luz (52, 55, 57). Posteriormente varios autores han demostrado que ocurre sin tesis de proteínas de novo en respuesta a la luz y que esta proteína sintetizada corresponde a la forma enzimática típica de hojas verdes (59, 102, 103, 104, 105).

Lo que no ha sido comprobado aún es el destino que sufre la forma típica de las hojas etioladas, puesto que ya no se ha detectado en hojas verdes. Esta fue la razón de que

los primeros estudios parecían sugerir 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 (52, 60, 61, 62) sugiriéndose que la modificación en la composición isoenzimática podría ser un primer paso en la respuesta al fotoperiodo a nivel metabólico (61, 62).

b. Propiedades inmunológicas. Aunque no muy numerosos, si son varios los trabajos publicados sobre la obtención y uso de anticuerpos frente a la enzima PEPC de diversos orígenes. De estos trabajos que en forma resumida se expondrán a continuación, parece deducirse que las formas de la enzima presentes en diferentes tejidos y plantas presentan un grado relativamente alto de homología estructural, lo que implicaría un origen evolutivo común de todas ellas.

Los anticuerpos conseguidos frente a la enzima obtenida de hoja verde de plantas  $C_4$  cruzan con las formas de PEPC de hojas verdes, etioladas, y de raíz de especies  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM y han permitido estudiar por técnicas inmunocitoquímicas la localización intracelular de esta enzima en hojas de

plantas superiores (49, 110). Hayakawa y colaboradores (59) obtuvieron anticuerpos frente a la enzima PEPC de hojas verdes de maíz y al adicionarlos a preparaciones enzimáticas de las formas aisladas de hoja verde y hoja etiolada encontraron que mientras producían aproximadamente un 100% de inhibición de la actividad en las primeras sólo inhibían un 45% en las segundas, demostrando así identidad estructural en un caso y cierto grado de homología en el otro.

Los resultados de Sims y Hague (103), también en maíz, confirman en cierto modo los mencionados de Hayakawa et al (59) ya que ellos encontraron que los anticuerpos obtenidos frente a la forma enzimática de hoja verde reconocían a la enzima presente en hoja etiolada. Su estudio, sin embargo, no permite concluir que ambas formas de la enzima sean inmunológicamente idénticas o que sólo exista una forma de PEPC en hojas etioladas o verdes, ya que estos autores se limitaron a comprobar por medio de la técnica de inmunoprecipitación, el incremento de la cantidad de una forma en hoja de la PEPC que acompaña al enverdecimiento de la planta. Queda pues, abierta la posibilidad de que en ambos tipos de hojas exista otra proteína con actividad de PEPC no reconocible por los anticuerpos que ellos obtuvieron y por lo tanto no precipitable.

En cuanto a la enzima PEPC de hojas de plantas con metabolismo ácido crasuláceo, existen en la literatura varios trabajos que reportan la obtención de anticuerpos frente a esta enzima y su reacción cruzada con una enzima que no está asociada a este metabolismo fotosintético (66,67,68,77,).

c) Propiedades Físicas: Peso Molecular y Composición de subunidades. Existen en la bibliografía significativas discrepancias en los datos referentes al peso molecular de la enzima PEPC nativa como puede observarse en la tabla 1.1 que resume lo publicado en este respecto.

Los diferentes pesos moleculares obtenidos 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 en 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 dissociable y presenta varios estados de agregación en función de su propia concentración (40, 43, 95, 131, 132) aún cuando la forma activa parece ser un homotetramero.

d) Estabilidad. La enzima de diversos orígenes, especialmente la asociada a fotosíntesis, ha demostrado ser altamente inestable en manos de muchos investigadores que

TABLA 1.1  
 PESOS MOLECULARES DE PEPC ENCONTRADOS EN  
 DIFERENTES TEJIDOS DE ESPECIES C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub> Y CAM

ESPECIE	TEJIDO	PESO MOLECULAR	REFERENCIA
Caña de Azúcar (C <sub>4</sub> )	Hoja verde	560,000	Goatly (113)
	Hoja etiolada	560,000	Goatly (113)
Sorgo (C <sub>4</sub> )	Hoja verde	400,000	Mares y Lebovlā (41)
	Hoja verde	275,000	Vidal y Gadal (114)
	Hoja etiolada	375,000	Vidal y Gadal (114)
Milo (C <sub>4</sub> )	Hoja verde	400,000	Mares y Lebovlā (41)
Maíz (C <sub>4</sub> )	Hoja verde	340,000	Kerr y Robertson (98)
	Hoja verde	400,000	Uedan y Sugiyama (40)
	Hoja verde	400,000	Mares y Lebovlā (41)
	Hoja verde (PEPC-2)	225,000	Mukerji (58)
	Hoja verde (PEPC-1)	270,000	Mukerji (58)
Espinaca (C <sub>3</sub> )	Hoja verde	560,000	Miziorki (45)
<u>Kalanchoe blossfeldiana</u> (CAM) No constitutiva*)	Hoja verde (día largo)	174,000	Brulfert et.al. (67)
	Hoja verde (día corto)	184,000	Brulfert et.al. (62)
<u>Sedum morganianum</u> (CAM)	Hoja verde	232,000	Brulfert et.al. (62)
<u>Bryophyllum pinnatum</u>	Hoja verde	300,000	Nott y Osmond (77)

reportan pérdidas importantes de actividad durante el proceso de purificación (46, 58, 84, 70). Esta inestabilidad se presenta principalmente cuando se incuba en soluciones con valores de pH alcalinos (por encima de 8.0) (46, 48, 70). La adición de glicerol o de agentes reductores (DTT o 2-mercaptoetanol) no evita las pérdidas de actividad de la enzima a estos valores de pH (46, 70). En cambio a pH 7.0, Kerr y Robertson (95) encontraron que la adición de glicerol a alta concentración (50%, v/v) no sólo estabiliza la enzima, sino que incrementa su actividad específica cuando se le está incubando a bajas temperaturas. Igual efecto del glicerol ha sido encontrado por Uedan y Sugiyama (40). Este efecto del glicerol a bajas temperaturas ha motivado el que varios investigadores hayan incluido glicerol en los amortiguadores usados durante el proceso de purificación de esta enzima (58, 63, 104, 1, 111, 47).

El hecho de que el glicerol estabilice la enzima a bajas temperaturas sugiere, como lo hace la discontinuidad de la curva de la Arrhenius a veces encontrada (40, 96), que la enzima sufre un proceso de disociación por exposición al frío, aunque esto no ha sido demostrado hasta la fecha.

e) Mecanismo de Reacción.- El átomo de carbono de la molécula de  $\text{HCO}_3^-$  normalmente es muy poco susceptible de ataque nucleofílico, y la manera en que la enzima PEPC cataliza la formación del enlace carbono-carbono no se comprende totalmente. Originalmente Maruyama y col. (44). propusieron un mecanismo de "reacción concertada" cíclico para la carboxilación de PEP debido a que no observaron reacciones parciales durante los ensayos cinéticos de la PEPC y a que encontraron que el  $^{18}\text{O}$  se transfería del  $\text{HCO}_3^-$  al Pi. Este mecanismo fue más tarde confirmado por estudios de resonancia paramagnética electrónica (10). Sin embargo, recientemente se han publicado evidencias que indican que la reacción transcurre por etapas involucrando un intermediario carboxifosfato unido a la enzima. O'Leary y col. sostienen que la formación de este intermediario es la etapa determinante de la velocidad de la reacción (2). Ambos grupos de investigadores han encontrado que al menos un grupo ionizable, con pK cercano a 7, está involucrado en la unión del magnesio y el PEP al sitio activo de la enzima y que la función del ión magnesio en la reacción parece ser la de servir como puente entre el sitio de unión de la carboxilasa y el PEP.

De acuerdo al mecanismo recientemente propuesto por O'Leary y colaboradores (92), el PEP actúa como un donador de fos-

fato para el bicarbonato formando un intermediario anhídrido carboxifosfato por un lado, y por otro, el piruvato en forma enólica, que se cree permanece unido a la enzima muy cercano al carboxifosfato. En una segunda etapa de la reacción, el piruvato enólico ataca el carbono del carboxifosfato liberando fosfato,  $P_i$ , y formando oxalacetato. Tal como se ha planteado este mecanismo, la energía del enlace fosfato enólico se podría usar para la formación del enlace carbono-carbono y al mismo tiempo suministra un medio para activar el átomo de carbono del bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) para un ataque nucleofílico.

f) Restos de Aminoácidos que participan en el centro activo. Posiblemente Cys, His, y Arg sean los aminoácidos más importantes; veamos como participan.

1. Cisteína: en un estudio detallado sobre PEPC de espinaca, Bandurski (5) encontró que era necesario incluir compuestos tiólicos (DTT,  $\beta$ -mercaptoetanol, etc.) en el medio de ensayo para obtener máximas actividades, lo que consideró como evidencia de la existencia de grupos sulfhidrí los esenciales para la actividad de la enzima. Posteriormente se ha encontrado que PEPC de diversos orígenes vegetales se inhibe por p-cloromercuribenzoato (44, 46, 47, 98) y que esta inhibición es revertida por DTT y evitada por PEP (46, 47). Recientemente varios autores (133-136) han

reinvestigado el papel de los grupos SH en la actividad de la enzima de maíz llegando a la conclusión de que esta enzima posee dos grupos SH vecinos que pueden formar puente disulfuro, lo que se acompaña de una disminución en la actividad enzimática. Sin embargo, Hatch y Oliver (70) no pudieron encontrar inhibición por p-cloromercuribenzoato, acetato de mercurio, cloruro de cadmio o DTT oxidado de la enzima de maíz. Por otra parte se ha reportado que la enzima de plantas CAM se inhibe por glutatión reducido. De estos resultados se deduce que aún cuando PEPC tiene grupos sulfhidrilo<sup>s</sup> cuyo mantenimiento en estado reducido es importante para una máxima actividad catalítica, podría ser que igualmente poseyera puente (s) disulfuros esenciales para la actividad y/o estabilidad.

2. Histidina. Iglesias y Andreo (118) han demostrado la esencialidad de dos restos de histidina por subunidad de la enzima nativa para la unión del sustrato, o para la catálisis realizada por PEPC, ya que la enzima se inactiva rápidamente por incubación en presencia de dietilpirocarbonato.

3. Arginina. Iglesias y col (141) han reportado la inactivación de la PEPC de hoja de maíz por fenilgloxal con una estequiometría 2: 1, lo que sugiere que dos restos de arginina por molécula de PEPC son los responsables de esta inactivación. Estos restos serían esenciales para la catálisis

y/o unión del sustrato a la enzima.

g) Propiedades cinéticas.- i) Valores de  $V_{max}$ . Ting y Osmond (52) hicieron un amplio estudio de las características cinéticas de las formas de la enzima PEPC en hojas de plantas  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM. En 10 especies, tipo  $C_4$ , examinados por estos autores encontraron que la enzima de hoja presenta  $V_{max}$  muy variable con valores comprendidos entre 9 y 53.5 moles/min/g de peso fresco; siendo el promedio de estos valores de  $22.5 \pm 14$  mol/min/g de peso fresco. En cambio en el estudio que realizaron con ocho plantas tipo  $C_3$ , encontraron que aunque la enzima extraída de hoja mostraba valores de  $V_{max}$  también muy variables (valores comprendidos entre 0.18-2.52 mol/min/g de peso fresco), el valor promedio era unas 15-20 veces inferior al obtenido para la enzima de hoja de plantas  $C_4$ . Estos mismos autores, Ting y Osmond, determinaron la velocidad máxima de la enzima extraída de hoja de 5 especies CAM, encontrando un valor promedio cercano al encontrado en plantas  $C_4$ . A este respecto resulta interesante el hallazgo de Brulfert y col. (114) de que en una especie CAM podían encontrarse diferencias en los valores de  $V_{max}$  de PEPC, dependiendo de si la planta había sido sometida a un fotoperíodo de día largo ( $V_{max} = 0.2$  mol/h/g de peso seco) o de día corto ( $V_{max} = 6.4$  mol/h/g de peso seco). Esta

es una de las razones por la que estos autores proponen que el cambio de fotoperíodo que induce al metabolismo ácido crasuláceo en esta especie, induce al mismo tiempo la aparición de una forma de PEPC con una mayor capacidad catalítica que la forma pre-existente cuya  $V_{max}$  corresponde a una forma típica de metabolismo  $C_3$ .

ii) Valor de  $K_m$ . Ting y Osmond en el estudio citado (52) encontraron para PEPC de hojas verdes de plantas  $C_4$  un valor promedio de  $K_m$  para PEP de  $0.59 \pm 0.35$  y para la PEPC de hojas verdes de plantas  $C_3$ ,  $0.14 \pm 0.07$ .

Los valores de la  $K_m$  para Mg correspondientes a PEPC de hojas de plantas  $C_4$  dan como promedio  $0.5 \pm 0.3$  mM, mientras que el valor promedio de la enzima de hoja de plantas  $C_3$  es de  $0.097 \pm 0.057$ . Las diferencias entre las enzimas de hoja verde de ambos tipos de plantas, en cuanto a los valores de  $K_m$  tanto para PEP como para Mg, son significativos y permiten definir dos formas moleculares: una típica de hoja de planta  $C_4$  y otra típica de hoja de planta  $C_3$ , fácilmente diferenciables por este criterio cinético.

Por otra parte, Mares y Leblová (41) encontraron para maíz y sorgo una  $K_m$  de 1 mM para PEP en ambos casos y para Mg una  $K_m$  de 0.8 mM.

El comportamiento cinético a bajas temperaturas de la enzima PEPC ha sido estudiado por Phillips y col (96) en plantas  $C_4$  sensibles al frío, encontrando que aumenta significativamente su energía de activación por debajo de  $12^\circ\text{C}$ , mientras que la enzima de las plantas resistentes al frío no muestran ningún cambio en el rango de temperatura de  $2-15^\circ\text{C}$ . Estos autores, al tratar la enzima con Tritón X 100 (0.5%, p/v) consiguieron eliminar el quiebre de la curva de Arrhenius, lo que se acompañaba de un aumento en la energía de activación sobre ese rango de temperatura. En base a estos resultados, sugirieron que podía existir una interacción de la enzima de extracto crudos con las membranas. Sin embargo, Uedan y Sugiyama (40) que también encontraron una abrupta discontinuidad de la curva de Arrhenius obtenida con la enzima purificada de maíz y un incremento asociado de la energía de activación por debajo de  $10.8^\circ\text{C}$ , no pudieron comprobar este efecto de la adición de Tritón X 100. Por ello, estos últimos autores concluyeron que el comportamiento cinético de la enzima a baja temperatura es una propiedad inherente de la enzima PEPC de maíz. Igualmente, Vidal y Gadai (63) han encontrado que la enzima fotosintética de sorgo (planta  $C_4$ ) muestra una discontinuidad en la curva de Arrhenius a  $16^\circ\text{C}$ , pero no así la enzima proveniente de hoja etiolada de la misma planta que ellos sugieren es semejante a la enzima encontrada en hoja de plantas  $C_3$ . Por otra parte, Grahan y col (72) encontraron que la enzima extraída de especies  $C_3$  tropicales (sensibles a bajas temperaturas) presenta gráficas de Arrhenius no lineares por debajo de  $10^\circ\text{C}$ , mientras que la enzima de especies  $C_3$  ó

de climas templados (resistentes a bajas temperaturas presentan una gráfica lineal).

Los posibles mecanismos por los que las bajas temperaturas pueden ejercer efectos directos sobre la molécula proteica implican a los enlaces hidrofóbicos. Ruptura de estos enlaces, que pueden llevar a disociar a la proteína en sus subunidades, influenciarían los parámetros cinéticos de la enzima.

#### 1.1.5 Regulación

A pesar de que son numerosos los datos bibliográficos relacionados con los mecanismos de regulación de la enzima PEPC, no se ha establecido, por el momento, un modelo adecuado que dé cuenta de su regulación en las plantas en general, con la excepción quizás de la enzima operante el metabolismo ácido crasuláceo cuya regulación ha sido estudiada de forma más exhaustiva. De hecho, se han reportado variaciones significativas entre especies con respecto a ciertos mecanismos de control, lo que hace difícil generalizar y postular un mecanismo básico de regulación. La inhibición por malato y la activación por glucosa 6-fosfato han sido hasta ahora los mecanismos de regulación de la enzima por metabolitos más importantes de entre los descritos.

a) Inhibidores.- Existe un acuerdo casi general de que malato y aspartato son los principales inhibidores de la enzima de muy diversas especies (116, 117, 76, 42, 82). La inhibición por

ácidos C-4 probablemente esté ejerciendo un control fino para integrar la producción y utilización de estos metabolitos intermediarios. La inhibición por malato es dependiente de los valores de pH ("in vitro" e "in vivo"). Así, en hojas de plantas CAM se ha demostrado que malato a concentración de 4 mM inhibe el 100% de la actividad de la PEPC a pH 7.0 y sólo el 10% a pH 8.0 (89, 43). Por otro lado también en plantas CAM, la protección que ejerce la glucosa 6-fosfato sobre la enzima PEPC contra la inhibición por malato es mayor a pH ácido (77,78). En estas plantas con metabolismo ácido crasuláceo la interconexión entre los valores de pH, los niveles de malato, la actividad de PEPC y la luz son de especial importancia para el mantenimiento de un estado metabólico determinado. Existen evidencias de que la actividad de la enzima PEPC en las plantas con metabolismo ácido crasuláceo está fuertemente inhibida durante los períodos de luz coincidiendo con una concentración citoplasmática de malato alta (34). Las altas concentraciones de malato que existen durante el día pueden mantener inactiva a la enzima PEPC (33, 81, 83, 86). Como Winter ha demostrado (91, 93) la enzima PEPC de hojas de plantas CAM en extractos crudos rápidamente desalados, existe en un estado altamente sensible a malato cuando el extracto se obtiene durante el período de luz. En cambio, la enzima obtenida durante el período de oscuridad es inhibida en menor grado por malato. En el caso de la enzima extraída durante el período de luz, después de la extracción se produce un cambio rápido al estado menos sensible a malato, típico de la enzima extraída durante el período de oscuridad, pero si la enzima se extrae

en presencia de malato y a pH ácido se evita el cambio de la forma altamente sensible a inhibición por malato (forma de PEPC de la noche). En consecuencia, el malato no sólo es un inhibidor potente de la PEPC durante el día, sino que también mantiene un estado "altamente sensible" de la enzima durante el período de luz. Si a esto sumamos el hecho de que el pH celular desciende a la región ácida durante la iluminación (77, 89) y que a valores de pH ácidos se incrementa la inhibición por malato, se comprende que la actividad de PEPC en plantas con metabolismo ácido crasuláceo, esté completamente inhibida durante la mayor parte del período de luz. Estos hechos han sido corroborados recientemente por Wu y Wedding (131, 132), quienes además han demostrado que la forma de día "sensible" a malato, es tetramérica mientras que la forma de noche ("insensible" a malato) es dimerica.

Por lo que respecta a PEPC de otros orígenes, una relación similar entre el efecto inhibidor de malato y el pH ha sido demostrado en coleptilo de avena (16) y en enzima purificada de hoja de maíz (137). No sería de extrañar por ello, que en un futuro próximo se encontrara que las bases moleculares del control ejercido por malato sobre la actividad PEPC, operantes en plantas CAM, son las mismas para el caso de PEPC de plantas  $C_3$  y  $C_4$ .

b) Activadores. En cuanto a los metabolitos activadores de PEPC,

la glucosa 6-fosfato ha sido descrita como un activador de la enzima de hojas de plantas  $C_4$  (69, 56, 40) y de plantas CAM (42). En la enzima extraída de hoja de maíz este metabolito cambia la cinética de la forma sigmoideal a la forma michaeliana (40). Debido a la insensibilidad a este metabolito de la PEPC de hoja etiolada de caña de azúcar Goatly y col. (56) sostienen que el efecto activador de glucosa 6-fosfato podría ser específico para isoenzimas asociadas a la fotosíntesis  $C_4$ . Sin embargo, Hayakawa y col. (59) encontraron activación por glucosa 6-fosfato de la forma de la enzima típica de hoja etiolada de maíz. Se ha descrito que glucosa 6-P disminuye la  $K_m$  para PEP (59), aumenta la velocidad máxima (74) o modifica ambos parámetros (40). Por otra parte, se ha reportado (76) que en plantas  $C_4$  al igual que en plantas CAM, como mencionamos anteriormente, glucosa 6-fosfato revierte la inhibición de la enzima por malato y aspartato.

El significado fisiológico de la activación de PEPC por glucosa 6-P no está claro. En el caso de la enzima asociada a fotosíntesis  $C_4$ , es posible que el efecto de la glucosa 6-fosfato está relacionado con la coordinación que debe existir entre la carboxilación primaria y el ciclo de reducción del carbono fotosintético o Ciclo de Calvin, del cual la glucosa 6-fosfato es un producto. En estas plantas, la necesidad de que la enzima esté activamente catalizando la reacción de carboxilación depende de que el ciclo de Calvin a su vez esté funcionando, puesto que de lo contrario habría un consumo de PEP y una producción de ácidos dicarboxílicos innecesarios. Por eso se sugie-

re que niveles relativamente altos de glucosa 6-fosfato serían la señal que indicaría a PEPC que efectivamente está ocurriendo la asimilación de  $\text{CO}_2$  por el Ciclo de Calvin. Este posible significado fisiológico no es aplicable a plantas  $\text{C}_3$  o a tejidos no autótrofos (donde la enzima no está asociada al proceso fotosintético de asimilación de  $\text{CO}_2$ ) o a plantas CAM, en las que la fijación primaria de  $\text{CO}_2$  por la fosfoenolpiruvatocarboxilasa no ocurre simultáneamente con la operación del Ciclo de Calvin. Algunos autores han postulado que el incremento de concentración de glucosa 6-fosfato por hidrólisis del amidón contribuiría a la fijación neta de  $\text{CO}_2$  en la oscuridad. Pero como Osmond y Holtum (34) apuntaron, la compartimentalización de metabolitos y enzimas (glucosa 6-fosfato se forma en cloroplastos, mientras que la enzima PEPC es citoplasmática) puede invalidar estas especulaciones. Es difícil imaginar una acción directa "in vivo" de glucosa 6-fosfato sobre esta enzima ya que los compuestos fosforilados no atraviesan la membrana del cloroplasto.

Otro metabolito estudiado en relación con su poder activador "in vitro" de la actividad de PEPC ha sido la glicina. Se ha reportado (40, 59, 80) que la glicina activa a la enzima PEPC de hoja verde de especies  $\text{C}_4$  monocotiledóneas, pero no tiene efecto sobre la forma no fotosintética de hojas etioladas de maíz, sobre especies  $\text{C}_4$  dicotiledóneas ni sobre especies  $\text{C}_3$ , tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas.

Los activadores también muestran una dependencia del pH. Así ha sido descrito que Pi y fructosa 1,6 difosfato activan la enzima de hojas etioladas de maíz y que lo hacen más eficientemente a valores de pH bajos (84). La posible importancia fisiológica de este hecho reside en que a pH bajo la actividad de PEPC es menor y por lo tanto dichos efectores podrían contrarrestar, al menos en parte, este efecto de pH. Este sería el caso cuando la captación excesiva de aniones por la célula provoca una disminución de la concentración de ácidos orgánicos (18). Si este descenso alcanza un punto donde el funcionamiento del ciclo de Krebs se ve afectado, entonces las elevadas concentraciones de Pi podrían abolir el efecto pH bajo y estimular así la producción de Oxalacetato a través de la PEPC. Por otro lado, si los ácidos orgánicos son eliminados en respuesta a la toma excesiva de aniones, la producción incrementada de fructuosa 1,6 difosfato a través de la fosfofructocinasa activaría la PEPC contribuyendo a abastecer el ciclo de Krebs (84).

## 1.2 OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo es investigar las características fisicoquímicas y moleculares de la enzima PEPC extraída de diferentes tejidos de Zea mays con el fin de determinar si están presentes varias isoenzimas en maíz y de evaluar las conexiones estructurales y funcionales que pudieran existir entre esas isoformas enzimáticas.

### 1.3 HIPOTESIS

Si la actividad de de la PEPC de Zea mays en tallo, raíz, hoja etiolada y callo está realizando la misma función anaple-  
rótica en el metabolismo de estos tejidos, entonces estas pro-  
teínas deberán tener características muy similares entre sí y  
sustancialmente diferentes a las de la proteína con actividad  
de PEPC presente en hojas de plantas crecidas en presencia  
de luz , puesto que en este último caso la enzima está desem-  
peñando preponderantemente una función en el proceso foto-  
sintético de asimilación del  $\text{CO}_2$  atmosférico.

#### 1.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

El esquema experimental desarrollado para resolver el problema planteado consistió en la realización de los siguientes experimentos:

- a) Cuantificación de la actividad de PEPC extraída de los diferentes tejidos.
- b) Purificación parcial de los extractos por técnicas de precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna de intercambio iónico y de filtración en gel.
- c) Caracterización electroforética de las proteínas con actividad de PEPC mediante electroforesis nativa para detectar bandas con actividad enzimática y electroforesis en condiciones desnaturizantes para estimar los pesos moleculares de las sub-unidades de estas proteínas.
- d) Inmunización de dos conejos con la enzima PEPC purificada de hoja verde y obtención de los anticuerpos correspondientes para investigar las relaciones estructurales entre las proteínas con actividad PEPC encontradas en los diferentes tejidos de maíz.

## II. METODOS Y MATERIALES

## II.1 EQUIPOS

Para medir la actividad enzimática se empleó un espectrofotómetro Pye Unicam modelo SP 500 de doble haz con temperatura constante y registrador integrado.

Se empleó un espectrofotómetro Carl Zeiss modelo PMQ II para la determinación colorimétrica de proteínas en las fracciones cromatográficas y en los distintos extractos.

El colector de fracciones utilizado para cromatografía en columna fue LKB Ultrarac 7000 con unidad registradora integrada. Las columnas de vidrio fueron de Pharmacia Fine Chemicals.

Las centrífugas utilizadas en este trabajo fueron los modelos J2-21, L50 y L-75 de Bechman, todas ellas refrigeradas.

La balanza analítica utilizada para pesar los reactivos químicos fue Mettler.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en tubos de vidrio se realizó en un equipo ISCO con fuente de poder modelo 490. La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se hizo en placa horizontal en el equipo 217 MULTIPHOR.

La homogenización de pequeñas cantidades de tejido se hizo en Polyttron KINEMATIC GmbH.

-Para medir el pH se empleó un potenciómetro Corning Modelo 12.

## II.2 REACTIVOS Y MATERIALES

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

De Märk: Tris ( $\alpha$ -hidroximetilaminometano), fosfato de sodio monobásico y dibásico, fosfato de potasio monobásico y dibásico, glicerol, sulfato de amonio, borohidruro de sodio, ácido clorhídrico, persulfato de amonio, cloruro de sodio, agar-agar, metanol, cloruro de potasio.

De J.T. Baker: sulfato de sodio, EDTA, nitrato de plata, etanol, formaldehído.

De Sigma Chemical: 2-mercaptoetanol, polivinilpoli-pirrolidona -- (PVPPP), NAD, fosfoenolpiruvato, deshidrogenasa málica, DEAE-Celulosa, acrilamida (grado electroforético), bis-acrilamida, violeta rápido B, dodecil sulfato de sodio, miosina, fosforilasa, galactosidasa, albúmina, anhídrida carbónica, reactivo de Folin-Ciocalteu, ditioneitol, azul brillante R, azul brillante G.

De Pharmacia Chemicals: sephadex G-200, sephadex G-25.

De Schwarz/Mann: apoferritina, alfa-globulina, ovalbúmina, catalasa.

De DIFCO: Coadyuvante completo de Freund [Mannide monooleate 1.5 ml. paraffin oil, 8.5 ml y Mycobacterium 5 mg (muerta y secada)].

La trituración de los trocitos de geles que contenían las bandas de actividad de la enzima PEPC se hizo con un homogenizador manual de tejido Potter Elvehjem .

La centrifugación de pequeños volúmenes se hizo en una microfuga Beckman. La mezcla del antígeno con el coadyuvante de Freund se hizo en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar marca HITACHI. Las preparaciones químicas y soluciones en general que necesitaban temperatura baja se almacenaron en refrigerador marca Bendix (4°C) o en un congelador marca Kelvinator (-70°C).

Algunas preparaciones enzimáticas fueron concentradas empleando una celda de presión Amicón (10 ml de capacidad).

Las microgeringas empleadas fueron Hamilton.

Las bolsas de diálisis de celulosa utilizadas fueron de la marca Sargent-Welch, del tamaño C-65.

De Bio-Rad: Temed, hidroxipatito.

De Productos Químicos Monterrey, S.A.: ácido acético.

El nitrógeno líquido empleado fue obtenido en el Centro de Materiales de la UNAM.

## II.3 MATERIAL BIOLÓGICO

II.3.1 Semillas y plantas. Se usaron semillas de maíz (*Zea mays* L. var. Tuxpeño1) donadas por el Centro de Investigación de Mejoramiento de Maíz y Trigo. A partir de las semillas se obtuvieron plantas verdes y etioladas.

II.3.2. Conejos .- Los conejos utilizados para producir anticuerpos fueron machos de la raza Nueva Zelanda de aprox. 2 Kg. de peso y 7 semanas de edad al momento de la primera inoculación. Los conejos fueron proporcionados y se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Química de la UNAM durante todo el tiempo que duró el experimento.

## ii.4 METODOS Y TECNICAS

### ii.4.1 Crecimiento de Plantas e Inducción de Callos

i) Plantas verdes.- Las semillas fueron germinadas en tierra en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Como fuente luminosa se empleó luz fluorescente de tubo. Al término de una semana, las plantas se trasladaron a un invernadero donde se dejaron crecer con fotoperíodo natural y temperaturas entre 20 y 30°C hasta una edad de 15 a 20 días (de dos a tres lígulas expuestas), momento en que se realizaba la extracción de la PEPC de los diferentes tejidos.

ii) Plantas etioladas. Las plantas etioladas se germinaron en las mismas condiciones que las plantas verdes pero se mantuvieron todo el tiempo en oscuridad. En estos casos las plantulas fueron usadas a los 10-12 días después de la siembra.

iii) Inducción de Callos.- Los callos fueron inducidos a partir de embriones de semillas secas de maíz en el Laboratorio de la Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

La diferenciación hacia callos y el crecimiento de estos se llevó a cabo con el medio MS. (véer apéndice) sobre agar sólido suplementado con tiamina (0.9 mg/ml), MCPP (4mg/ml), AIA (50 mg/ml), caseína (100 mg/ml), pH 5.4.

#### II.4.2 Extracción de Fosfoenolpiruvato carboxilasas

a) Técnica de Extracción.- Se pesó la cantidad de tejido deseado y se molió en un mortero pre-enfriado con suficiente nitrógeno líquido para romper las células y obtener un polvo fino congelado que se suspendió en el volumen deseado del amortiguador de extracción con agitación constante hasta que todo el tejido se descongelara. La solución resultante se transfirió a una licuadora (Waring Blendor), previamente enfriada con nitrógeno líquido, y se homogenizó durante 20-30 segundos a velocidad máxima. El homogenizado obtenido se filtró inmediatamente a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó a 26,000 xg durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se desechó y el sobrenadante que contenía la actividad PEPC se filtró a través de papel Whatman No. 2.

b) Sistema Amortiguador para el Extracción. . El sistema amortiguador utilizado para la extracción de la PEPC en todos los casos, al que llamaremos A, tenía la siguiente composición:

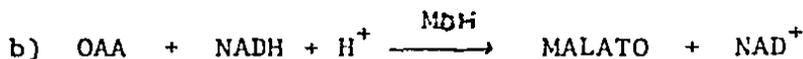
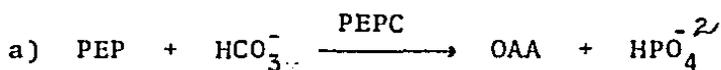
Tris	100 mM
Fosfato de potasio	100 mM
Sulfato de magnesio	5 mM
EDTA	1 mM
Acido ascórbico	1% (p/v)
Glicerol	20% (v/v)

Polivinilpolipirrolidona 20%(p/v)

2-mercaptoetanol 20 mM

Los dos últimos componentes se agregaban extemporáneamente. El pH resultante era 7.5. La relación de amortiguador a peso fresco del tejido a extraer usado fue variable dependiendo del tejido que se estuviera estudiando. Así, se hizo con cuatro volúmenes (4 ml/g de tejido fresco) cuando se trataba de hoja y con 2 volúmenes en el caso de los otros tejidos.

c) Ensayo de la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa. Se utilizó un sistema acoplado a la enzima málica deshidrogenasa (MAM, E.C. 1.1.1.37) dependiente de NADH según el método descrito por Uedan (40). En este sistema el oxalacetato resultante de la carboxilación del fosfoenolpiruvato es reducido a malato gracias a la actividad de la enzima malato deshidrogenasa, que paralelamente oxida NADH a NAD<sup>+</sup>, según el siguiente esquema de reacciones:



La cantidad de oxalacetato producido durante el transcurso de la reacción puede así medirse siguiendo el descenso de densidad óptica a 340 mm causado por la conversión del NADH a NAD<sup>+</sup>.

El amortiguador utilizado para determinar la actividad enzimática (amortiguador B) consistió en Tris-HCl 117.6 mM, cloruro de magnesio, 11.76 mM; el pH era 7.3. La enzima malato deshidrogenasa (preparación comercial como suspensión en sulfato de amonio) se dializaba frente a fosfato de potasio 10 mM y glicerol 50%(v/v) con anterioridad a cada medida para evitar la precipitación de fosfatos insolubles (fosfato de magnesio) que tendría lugar durante el transcurso de la reacción por la elevada concentración de sales.

La composición del medio de reacción era la siguiente:

Reactivos	Celda problema	Celda Blanco	Concentración final
	Volumen (ml)	Volumen (ml)	
Amortiguador B	0.85	0.85	100
NADH (20 mM)	0.01	0.01	0.2
DTT (200 mM)	0.01	0.01	2
Bicarbonato (1M)	0.01	0.01	10
PEP (250 mM)	0.01	-	2.5
MDH	0.01	0.01	4 unidades
Agua	El volumen necesario para completar 1 ml		
Volumen final	1.0	1.0	

Todas las celdas preparadas de esta manera se pre-incubaban durante 5 minutos para que alcanzaran la temperatura a la que se llevaba a cabo la reacción (40° C). La reacción se iniciaba añadiendo el volumen deseado de la preparación de PEPC (casi siempre 30  $\mu$ l). La pendiente obtenida (cambio de densidad óptica/minuto) se midió en los primeros 5 minutos de la reacción donde se obtenía una adecuada linealidad de cambios de absorbancia frente a tiempo.. La reacción enzimática es de orden de cero durante este tiempo en nuestras condiciones experimentales. Para verificar la especificidad de la reacción se realizaron controles que consistían en determinar cambios de absorbancia en ausencia de PEP o de la preparación enzimática.

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

$$A = \frac{(\text{DO/min}) \times v}{E \times V \times d}$$

DO/min = cambio de densidad óptica por minuto

v = volumen final de la mezcla de reacción

V = volumen de la preparación enzimática utilizado en esta determinación.

E = coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm  
(6.22  $\text{cm}^2/\text{micromol}$ )

d = distancia del paso de luz (en la celda de espectrofotómetro usada es de 1 cm).

La actividad se expresó como micromoles de PEP transformados en oxalacetato/minuto/ml de preparación enzimática. La actividad específica se obtuvo dividiendo este valor por los miligramos de proteína que contuviera 1 ml de la preparación utilizada. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de esta que carboxila 1 micromol de PEP/minuto bajo nuestras condiciones de ensayo (pH 8.3, 40°C).

### II.4.3 Determinación de proteína

a) Método de Peterson (75). Este procedimiento es una modificación al descrito por Lowry y Col. (119). Se basa en la formación de un precipitado coloreado entre el  $\text{Cu}^{+2}$  y los enlaces peptídicos de las proteínas. Por otra parte, los residuos aromáticos de aminoácidos de proteínas interaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu e intensifican el color azul.

#### Reactivos:

- 1) CTC (Cobre-Tartrato-Carbonato): carbonato de sodio 0.2% (p/v), sulfato cúprico 0.1% (p/v). Debe disolverse primero el sulfato cúprico y el tartrato de sodio y potasio y luego agregarlo a una solución de carbonato de sodio para evitar la precipitación del reactivo.
- 2) SDS (dodecil sulfato de sodio) 10% (p/v)
- 3) Hidróxido de sodio 0.8 N
- 4) Reactivo de Folin-Ciocalteu (preparación comercial)
- 5) TCA (ácido tricloroacético) 72% (p/v)
- 6) BSA (solución estándar de proteína) 1 mg/ml

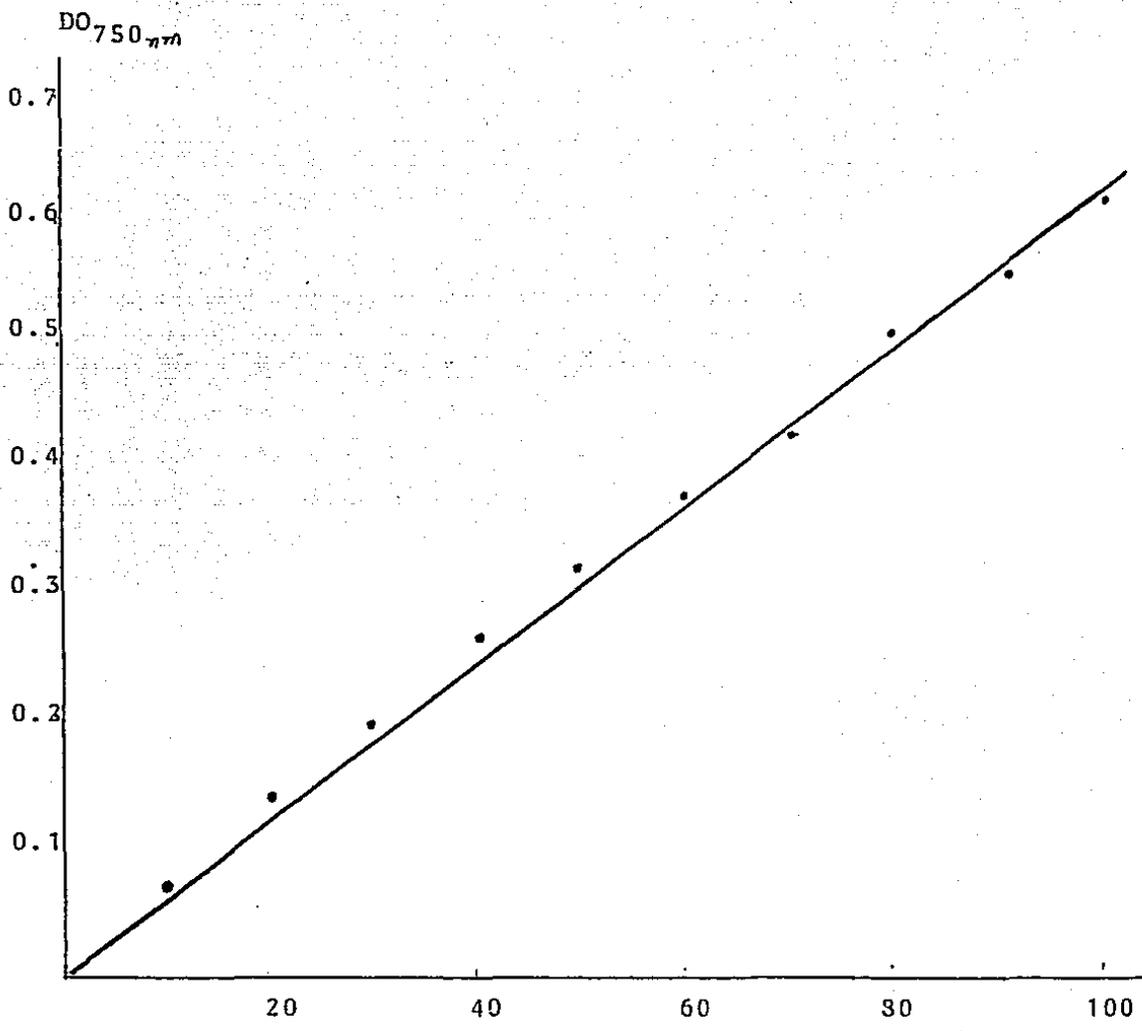


Fig. 2.1. Curva de calibración para la determinación de proteínas empleando la técnica de Peterson.

Soluciones de trabajo:

Reactivo A: Mezclar CTC, hidróxido de sodio, SDS y agua en proporción 1:1:1:1

Reactivo B: Mezclar un volumen del reactivo 4 con cinco volúmenes de agua.

Procedimiento: A 1 ml de la solución de proteína problema o estándar se le añadieron 0.1 ml del reactivo 5 (previamente enfriado a 4°C) y se dejó en reposo durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos y se descartó el sobrenadante cuidando de que el precipitado no quedara contaminado con líquido. Al precipitado obtenido en cada tubo se le añadió 1 ml del reactivo A y 1 ml de agua, se agitó y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se le agregó 0.5 ml del reactivo B y después de 30 minutos a temperatura ambiente, se leyó la densidad óptica a 750 nm o 500 nm frente a un blanco tratado de la misma manera pero que contenía 1 ml de amortiguador empleado para disolver la proteína estándar en lugar de la solución de proteína problema. La gráfica patrón se construyó usando cantidades de albúmina comprendidas entre 10 y 100 microgramos. Se hicieron las diluciones adecuadas a las muestras cuya concentración de proteínas iba a determinarse con el fin de que los valores de D.O. que se obtuvieran cayeran dentro del rango de proporcionalidad de la curva patrón. La determinación de la concentración de proteína (estándar o problema) se hizo por triplicado.

b) Método de Bradford(120).- Este procedimiento se basa en la formación de un complejo azul entre el reactivo azul de Coomassie (azul brillante G) y los enlaces peptídicos de proteínas.

**Reactivos y Soluciones:**

**Azul de Coomassie:** se disuelven 50 mg del colorante en 25 ml de etanol 95% (v/v) y se le agregan 50 ml de ácido fosfórico 85% (p/v) lentamente. Se afora a 500 ml con agua desionizada o amortiguador y finalmente se filtra en papel para eliminar residuos no disueltos.

**Procedimiento:** A 0.1 ml de la solución estándar de proteína o de la solución problema se le agregaron 5 ml del reactivo azul de Coomassie, tras 30 minutos a temperatura ambiente se lee la absorbancia a 595 nm frente a un blanco que ha sido tratado de la misma manera y que contiene 0.1 ml de la solución empleada para disolver la proteína. La gráfica patrón se construyó con cantidades de albúmina comprendidas entre 5 o 50 microgramos, rango en el cual hay una adecuada proporcionalidad. El contenido de proteína de las muestras ensayadas se ajustó de manera que quedara en el rango de proporcionalidad de la gráfica. La determinación de la concentración de proteína (estándar o problema) se hizo por triplicado.

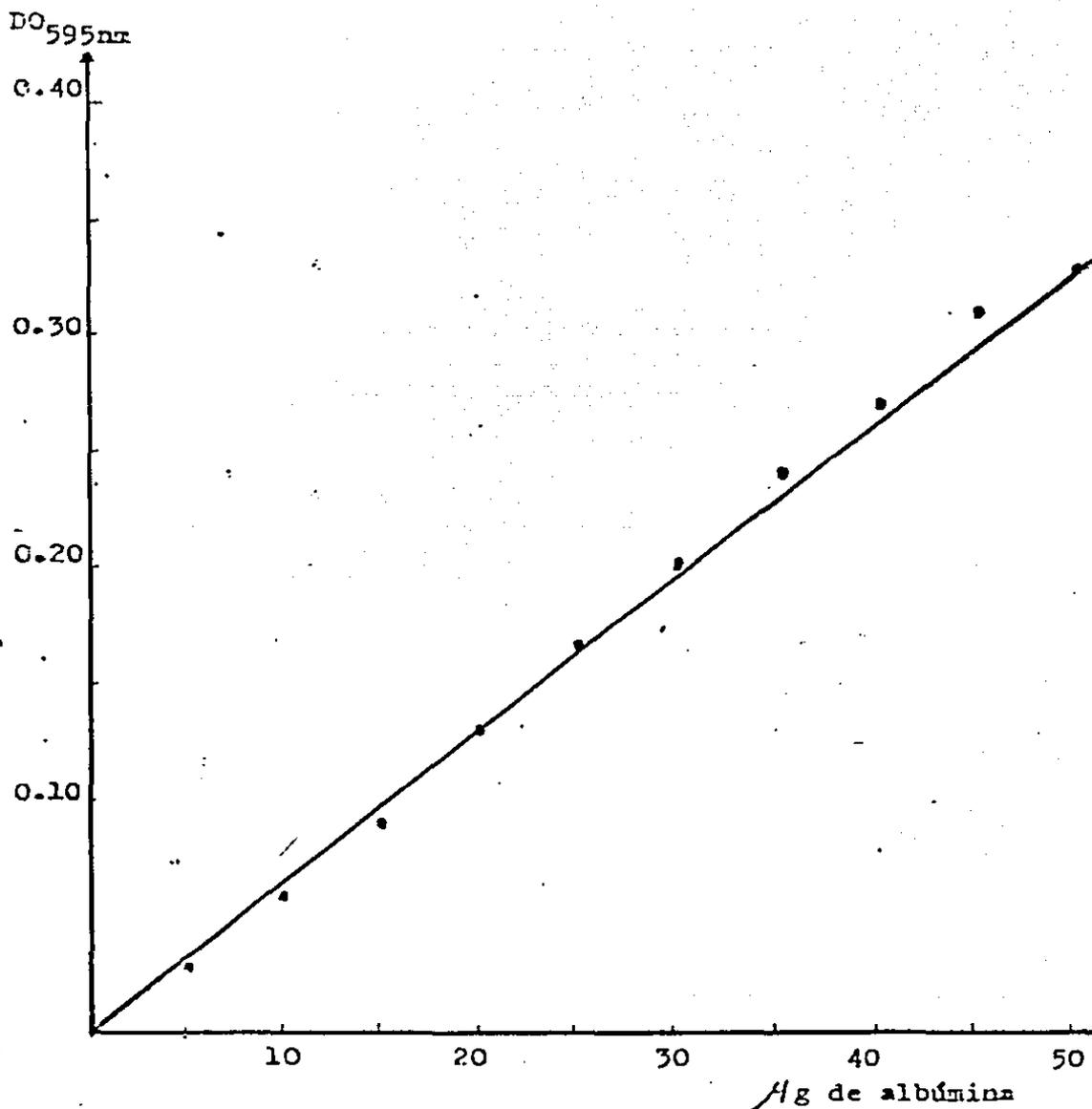


Fig. 2.6 CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS  
EMPLEANDO LA TECNICA DE AZUL DE COOMASSIE

#### II.4.4 Purificación de la PEPC

a) Precipitación con Sulfato de Amonio.- El procedimiento de purificación consistió en los siguientes pasos: La precipitación inicial del extracto crudo se hizo agregando a este sulfato de amonio sólido de manera lenta y con agitación constante hasta alcanzar un 30% de saturación (0.176 g/ml). Después de agregarle toda la sal se dejó 10 minutos con agitación lenta y finalmente se centrifugó a 26,000 g durante 30 minutos. El precipitado obtenido se descartó y el sobrenadante fue sometido a una segunda precipitación, esta vez al 60% (0.198 g/ml) siguiendo el mismo procedimiento. Después de la centrifugación a 26,000 g durante 30 minutos, el precipitado obtenido (precipitado 30-60) contiene toda la actividad de PEPC. Todo el proceso de precipitación se hizo a 4°C. El precipitado fue utilizado inmediatamente o guardado a -20°C hasta su posterior uso, sin que sufriera pérdidas de actividad significativas durante el período de almacenamiento.

b) Resuspensión y Desalamiento. El precipitado 30-60 de sulfato de amonio se resuspendió en un amortiguador de fosfato de sodio 50 mM, pH7.2. que contenía sulfato de magnesio 5mM, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 20 mM (amortiguador C). El volumen de resuspensión utilizado fue del 3-5% del volumen del extracto crudo antes de precipitarlo. En ocasiones fue preciso centrifugar esta resuspensión a 15,000 g durante 15 minutos, con el objeto de lim

piaría del material no disuelto, antes de someterla al siguiente paso de desalamiento en una columna de Sephadex G-25. El volumen de la proteína aplicado a la columna de Sephadex G-25 estuvo siempre comprendido entre el 5-10% del volumen de cama de esta columna para así conseguir un desalamiento completo. La columna de Sephadex G-25 (52 x 1.4 cm) se equilibró y eluyó con el amortiguador C con un flujo aproximado de 100 ml/h. Se recogieron fracciones de 6 ml y aquellas con actividad de PEPC se reunieron para ser aplicadas a una columna de intercambio iónico.

c) Cromatografía de intercambio iónico.- i) Preparación de la columna cromatográfica: para la preparación de la resina se incubaron 30 gramos de DEAE-CELULOSA (0.91 meq/g malla media) en un exceso de agua por varias horas. Después de eliminarle ésta por filtración, se mezclaron con 450 ml de HCl 0.5 N durante 45 minutos agitando ocasionalmente. Se lavó con agua sobre un embudo Buchner hasta lograr que el pH de los lavados alcanzar un valor cercano a 4. La resina húmeda se resuspendió entonces en 450 ml de hidróxido de sodio 0.5 N siguiendo el mismo procedimiento, es decir, se mantuvo 45 minutos con agitación y a continuación se lavó con agua hasta alcanzar ahora un pH aproximado de 9.0. Finalmente, la resina sin agua, pero húmeda, se resuspendió en una solución 0.2 M del componente ácido del amortiguador C y tras 30 minutos de equilibración se eliminó este componente y se resuspendió en el amortiguador C lavando repetidas veces hasta que el pH de la resuspensión

de resina alcanzó el valor de 7.2. En ocasiones, en vez de seguir este procedimiento, la resuspensión se tituló con el componente ácido del amortiguador hasta que alcanzara un pH de 7.1 y entonces se equilibró con el amortiguador C. Finalmente, la resina equilibrada, se montó en una columna de vidrio (26 x 1.5 cm) con ayuda del amortiguador C y se siguió lavando con unos 200 ml del mismo amortiguador.

ii) Corrida de la cromatografía. A la columna de DEAE-CELULOSA se aplicó el extracto desalado en Sephadex G-25, con un flujo de 80 ml/h. Después de que todo el extracto había entrado a la columna, ésta se comenzó a lavar con el amortiguador C y se mantuvo este lavado hasta que las fracciones recogidas presentaron valores de absorbancia a 280 mm inferiores a 0.04. En este momento, se conectó la columna a un gradiente de KCl de 0 a 200 mM disuelto en un volumen de 200 ml de solución del amortiguador C. El lavado de la columna y su elución con el gradiente se llevó a cabo con un flujo de alrededor de 80ml/h. Después de consumirse el gradiente, la columna fue lavada con 200 mM de KCl disuelto igualmente en el amortiguador C. Durante la elución se recogieron fracciones de 4 ml a las que se les midió el contenido de proteína por absorbancia a 280 mm y la actividad de PEPC con el método descrito anteriormente. Las fracciones que constituían el pico de actividad de esta enzima se reunieron y se precipitaron con sulfato de amonio al 70%. Tras centrifugar a 10,000 g durante 30 minutos a 4°C siguiendo el pro-

cedimiento usual, el sobrenadante obtenido se descartó y el precipitado se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. El grado de pureza de estas fracciones se determinó electroforéticamente.

d) Cromatografía de Filtración en GEL

Una cantidad adecuada de Sephadex G-200 fue suspendida en exceso de agua durante una noche a temperatura ambiente tras lo cual se montó en una columna de vidrio (2.6 x 85 cm). Se equilibró con el amortiguador C que contenía, además, glicerol al 5% (v/v) (amortiguador E). Las fracciones de DEAE-CELULOSA con actividad de PEPC precipitadas con sulfato de amonio se resuspendieron en el amortiguador C y se centrifugaron nuevamente con el objeto de tener una preparación suficientemente limpia para ser aplicada a la columna de Sephadex G-200. Una vez aplicada la preparación a G-200, se eluyó la columna con el mismo amortiguador C con un flujo de 12 ml/h y se recogieron fracciones de 6 ml a las cuales se les determinó el contenido de proteína para su absorbancia a 280 nm. Aquellas fracciones que presentaron actividad de la enzima PEPC se reunieron y precipitaron con sulfato de amonio al 70% siguiendo el procedimiento habitual. Todo el procedimiento se realizó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

e) Cromatografía sobre hidroxipatita. Las fracciones anteriores después de ser precipitadas y resuspendidas en el amortiguador C, se dializaron y diluyeron con el mismo amortiguador

en proporción de 1/5 y se mezclaron con un volumen adecuado de hidroxapatita que había sido lavado previamente varias veces con el amortiguador C. La mezcla de resina-preparación enzimática se mantuvo a 4°C con agitación ocasional durante 30 minutos, tras lo cual se montó en una columna de vidrio (15 x 1.5 cm) con ayuda del amortiguador C. Se siguió lavando la columna con ese mismo amortiguador y al mismo tiempo se fue verificando el contenido de proteínas de las fracciones recogidas midiendo absorbancia a 280 nm. Cuando la absorbancia de esas fracciones disminuía a 0.04 unidades de D.O., se inició la elución por pasos con el amortiguador C incrementando la concentración de éste a 50 mM y 100 mM de fosfatos; la actividad de PEPC fue seguida en las distintas fracciones tal como se explicó anteriormente en los otros procedimientos cromatográficos. Igualmente, se estudió el grado de pureza del pico de actividad mediante electroforesis.

#### II.4.5 Determinación del peso molecular de la proteína nativa por cromatografía en Sephadex G-200.

Para estos estudios se utilizó la PEPC obtenida en cromatografía de DEAE-CELULOSA. Las muestras se dializaron frente al amortiguador F antes de ser aplicadas a la columna de G-200. Las condiciones bajo las cuales se cromatografiaron estas muestras y se calibró la columna fueron las ya descritas en el apartado II.3.4.4. de métodos.

Se utilizaron las siguientes proteínas estándares para la calibración de la columna.

Tabla 2.1 Pesos moleculares de proteínas estándares empleadas en cromatografía de filtración en gel.

Proteína	Peso Molecular (Daltones)	Cantidad (mg)
Apoferritina	480,000	1.5
Catalasa	232,000	5.0
Gamma-globulina	160,000	6.0
Ovalbúmina	45,000	7.0

Todas ellas fueron disueltas conjuntamente en un volumen final de 6 ml de amortiguador E. Para la determinación del volumen vacío ( $V_0$ ) de la columna se utilizó una solución de azul de dextrano en el amortiguador E (2 mg/ml). Los 6 ml conteniendo las proteínas estándares se aplicaron a la columna de G-200 con flujo de 24 ml/h y se recogieron fraccio

nes de 2.6 ml cuyas absorbancias a 280nm se determinaron para detectar los picos de proteína. El volumen total ( $V_t$ ) de gel suspendido que se empacó en la columna fue de 450 ml. El volumen de elución ( $V_e$ ) de cada proteína fue determinado tomando en cuenta aquella fracción de cada pico de proteína que presentara la mayor absorbancia a 280nm o la mayor actividad enzimática. Se calculó el coeficiente de distribución ( $K_{av}$ ) con los valores de  $V_o$ ,  $V_t$  y  $V_e$  hallados experimentalmente como se acaba de exponer.

$$V_o = 162.2 \text{ ml}$$

$$V_t = 450 \text{ ml}$$

$$V_e = \text{Volumen de elución de cada proteína estándar}$$

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} = \frac{V_e - 161}{288}$$

La curva de calibración se hizo graficando el  $K_{av}$  de las proteínas patrones frente al logaritmo de sus respectivos pesos moleculares. El peso molecular nativo de las isoformas de la enzima PEPC se obtuvo de esa curva al interpolar el  $K_{av}$  obtenido experimentalmente (Fig. 3.7)

#### II.4.6 Técnicas electroforéticas

a) Electróforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturalizantes (PAGE). Esta electroforesis se llevó a cabo en tubos (0.3 cm de diámetro interno y 9 cm de largo) de acuerdo con el procedimiento que describimos a continuación. Se empleó un sistema continuo de gel en el amortiguador de fosfatos pH 7.2 tal y como se detalla a continuación.

##### Preparación de los Geles:

Los geles se prepararon mezclando las soluciones que se describen a continuación (en ml) indicadas en la siguiente tabla para diferente %T (porcentaje total monómeros: acrilamida + bisacrilamida) y un volumen final de 30 ml.

Tabla 2.2 Preparación de geles para electroforesis (PAGE)

<u>%T</u>	<u>Solución A</u>	<u>Solución B</u>	<u>Solución C</u>	<u>TEMED</u>	<u>Agua</u>
3	15	4.05	0.05	0.05	10.85
4	15	5.4	0.05	0.05	9.5
5	15	6.75	0.05	0.05	8.15
7	15	9.45	0.05	0.05	5.45

Solución A: amortiguador de fosfato 0.2M pH 7.2

Solución B: acrilamida 22.2% (p/v)-bisacrilamida 0.6% (p/v).

Solución C: persulfato de amonio 0.2 g/ml (preparado inmediatamente antes de usarse)

TEMED : preparación comercial.

Para hacer los geles, todos los componentes se mezclan (excepto el persulfato de amonio) y se desgasifica la mezcla durante 10 minutos. Finalmente se añade el persulfato de amonio y se procede a llenar los tubos.

ii)Preparación de la muestra:

Las muestras antes de ser sometidas a electroforesis se dializaron durante 3-5 horas frente al amortiguador de fosfatos diluido 1:10, con el objeto de igualar su fuerza iónica. A 0.25 ml de este dializado se le agregaron 0.01 ml de azul de bromofenol (0.25%,p/v) y 0.01 ml de glicerol 50% (v/v). De esta preparación se tomaron los volúmenes deseados para realizar la electroforesis.

iii)Amortiguador usado en los electrodos : amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.2 (diluir 1:1 la solución A).

iv)Condiciones de corrida: Se hizo una preelectroforesis de 30 minutos de duración, a 4 mA/tubo y 4°C con el fin de eliminar del gel los iones y radicales libres que no reaccionaron durante el proceso de

polimerización. Acabada ésta, se aplicaron las muestras en un volumen inferior a 0.02 ml para evitar en lo posible el ensanchamiento de las bandas de proteína durante la corrida electroforética, la cual se hizo a 4°C y a 8mA/tubo. Generalmente su duración fue de 3-4 horas. La electroforesis se daba por terminada cuando el indicador del frente electroforético (azul de bromofenol) llegaba a 1 cm del extremo inferior del tubo.

v )Revelado de los geles:

La banda de proteína que mostró actividad de PEPC, se detectó siguiendo una modificación al método de Vidal y Carvalie (55). El procedimiento seguido fue el siguiente. Los geles se incubaron inmediatamente después de las electroforesis en tubos conteniendo 1.5 ml de una solución que llevaba el medio completo de reacción de la PEPC (Tris-HCl 100 mM, bicarbonato de sodio 40 mM, sulfato de magnesio 30 mM, PEP 18.7 mM, pH8.0) más un colorante específico para el oxalacetato, violeta rápido B (3-5 mg/ml). Este reactivo debe mezclarse con los demás componentes momentos antes de la incubación del gel para evitar que se precipite. Una banda color rojo ladrillo aparece tras incubar los geles por períodos de tiempos variables que dependían de la actividad de PEPC en las bandas (el tiempo de incubación nunca fue superior a 30 minutos). El color desarrollado se debe a la formación del complejo oxalacetato-violeta rápido B. Esta banda teñida sobre el gel es estable por varias semanas. Hay que señalar que esta técnica de detección de PEPC es muy sensible, pudiéndose detectar actividades tan pe-

queñas como 0.03 unidades/tubo. En aquellos geles que fueron incubados en ausencia del sustrato de la reacción (PEP) no apareció ninguna banda teñida. Cuando se aplicaron actividades superiores a 0.1 unidad/tubo fue preciso incubar los geles durante un tiempo inferior a 5 minutos, para así obtener una banda coloreada bien definida. Si el gel se dejaba por más tiempo en la solución reveladora, se obtenía una banda muy difusa y ancha que no permitía medir con precisión la movilidad relativa ( $R_f$ ). El proceso de revelado se llevó a cabo a temperatura ambiente. Los  $R_f$  de las bandas se midieron inmediatamente después de la aparición. La movilidad relativa ( $R_f$ ) de cada banda revelada se calculó empleando la fórmula siguiente:

$$R_f = \frac{D_b}{D_c}$$

donde  $D_b$  es la distancia recorrida por la proteína que mostró actividad de PEPC y  $D_c$  es la distancia recorrida por el azul de bromofenol, utilizado como frente electroforético.

b) Electroforesis en geles de Poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS). La electroforesis bajo condiciones desnaturizantes en presencia de SDS se hizo en placa horizontal de acuerdo a la técnica descrita en el boletín LKB 306 (121), que se describe a continuación;

i)Preparación de los geles:

Las soluciones empleadas fueron las mismas que para la electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes, con la única diferencia de que la solución A contenía en este caso SDS 0.2%(p/v).

Para el equipo (LKB Multiphor) utilizado la placa de gel se hizo con 66 ml de solución de gel constituída por:

Agua	14.82 ml
Solución A	33.00 ml
Solución B	18.00 ml
Solución C	0.1 ml
TEMED	0.078ml

El persulfato de amonio (solución C) se agregaba después de que la mezcla de las otras soluciones se había desgasificado durante unos 10 minutos. El gel resultante es del 6% (%T), La placa de gel no fue utilizada hasta después de 8 horas de haberse preparado para permitir su total polimerización.

ii)Preparación de la muestra:

Las muestras se dializaron previamente a la electroforesis en la solución A diluída 1:10. A 250  $\mu$ l del dializado se le añadieron 10  $\mu$ l de 2-mercaptoetanol. La mezcla se calentó durante 2 minutos a 100°C, tras lo cual se aplicaron 10  $\mu$ l por carril de la placa-gel. En ocasiones, la muestra aplicada en este tipo de electroforesis provenía

de las proteínas eluidas de las bandas detectadas por actividad de PEPC en PAGE. El procedimiento seguido para esta elución fue el siguiente: Las banditas teñidas con violeta rápido B se cortaron; se reunieron aquellas que provenían de un mismo material de partida y se tritularon en un homogenizador en presencia de un volumen adecuado de un amortiguador de fosfato 20 mM, pH 7.0 conteniendo SDS 1% (p/v). Las suspensiones resultantes se distribuyeron en bolsas de diálisis y se dejaron dializando frente al mismo amortiguador durante toda la noche a temperatura ambiente. Después se centrifugaron en microfuga a velocidad máxima durante un minuto, para eliminar los restos de gel, y los sobrenadantes se colocaron nuevamente en bolsitas de diálisis. A éstas se les aplicó una corriente de aire (un ventilador a temperatura ambiente) para concentrarlos hasta el volumen deseado. Estas preparaciones concentradas fueron dializadas nuevamente frente al mismo amortiguador tras lo cual se les agregó 10% de mercaptoetanol por cada 250  $\mu$ l de dializado y se calentaron a 100°C durante 2 minutos. Finalmente, después de enfriar, se les agregó 10% de azul de bromofenol (0.25% p/v) y se aplicaron volúmenes adecuados de esta preparación a la electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

Los patrones de proteínas incluidos en la PAGE-SDS para determinar los pesos moleculares de las especies ensayadas se prepararon de la misma manera que las muestras problemas (pero atendiendo a las especificaciones de la casa comercial en cuanto a su concentración a usar). Las

proteínas usadas como patrones fueron las siguientes:

<u>Proteína</u>	Peso molecular (Sub-unidades)
Anhidrasa Carbónica (eritrocitos).....	29,000
Albúmina (huevo).....	45,000
Albúmina (bovino).....	66,000
Fosforilasa B (músculo) .....	97,000
Beta-galactosidasa (E. Coli.).....	116,000
Miosina (músculo).....	250,000

Todas las proteínas usadas como patrón vienen mezcladas en la preparación comercial. De esta mezcla se aplicaron 0.135 mg por carril, disueltas en 10 ml del amortiguador de la muestra.

iii) Amortiguador usado en los reservorios de los electrodos:

Amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.2 conteniendo SDS 0.1% (p/v).

iv) Condiciones de corrida:

La electroforesis se realizó a 9.8 mA/carril (amperaje constante) y a temperatura ambiente.

v) Revelado de los geles:

Las bandas de proteínas presentes en los geles fueron fijadas y te-

ñidas por dos procedimientos, usando azul de Coomassie y/o usando un reactivo de plata ( $\text{AgNO}_3$ ).

La fijación y tinción con azul de Coomassie se llevó a cabo de la manera siguiente. Los geles se incubaron durante 2-5 horas (a veces durante la noche) en una solución que contenía 1.25 g de azul de Coomassie R-250 en 454 ml de metanol al 50% (v/v) y 46 ml de ácido acético glacial (esta solución siempre fue filtrada en papel previamente a su uso para eliminarle los residuos no disueltos). El desteñido se llevó a cabo lavando los geles sucesivas veces con una solución de metanol:agua:ácido acético glacial en proporción 5:5:1 o con etanol:agua:ácido acético glacial en proporción 3:6:1. Este procedimiento se empleó tanto para geles de placa como para geles de tubo.

Por otra parte para la tinción de los geles de placa con el reactivo  $\text{Ag}^+$  el procedimiento seguido fue el de Wray y col. (125)

Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

- Solución A-1: etanol 50%-ácido acético 10%
- Solución A-2: etanol 25%-ácido acético 10%
- Solución A-3: etanol 10%-ácido acético 0.5%
- (las concentraciones porcentuales son v/v)
- Solución A-4: nitrato de plata, 1.9 g/L
- Solución A-5: carbonato de sodio 7.5 g/L

Mezcla reductora:

Hidróxido de sodio (60g/L)	200 ml
Borohidruro de sodio (7 mg/L)	5 ml
Formaldehído (37%, prep. comerc.)	3 ml
Volumen total	<u>400 ml</u>

Las bandas de proteínas se fijaron incubando al gel (placa) 2 horas (con un cambio de solución cada hora) en cinco volúmenes de la solución A-1, luego en 5 volúmenes de la solución A-2 y finalmente en 5 volúmenes de gel de la solución A-3 (un volumen del gel fue siempre 66 ml). En total se requieren 6 horas de incubación, pudiéndose dejar el gel en la solución A-3 hasta el día siguiente. Para teñir las proteínas, el gel se sumerge durante dos horas en 3 volúmenes de la solución A-4 lavando después tres veces con agua bidestilada durante 30 minutos y sumergiéndolo inmediatamente en la solución reductora. Esta solución debe utilizarse en los 5 minutos siguientes a su preparación. Cuando aparecen las bandas, lo cual ocurre entre los 10 y 15 minutos de incubación, se lava el gel con agua y se sumerge en la solución A-5 que permite incrementar la intensidad de las bandas. Finalmente se procede a medir los  $R_f$  de las bandas sobre el gel. En ciertos casos el gel se fijó y teñió con azul de Coomassie y por el procedimiento descrito anteriormente. En estos casos el gel perfectamente desteñido se colocó en la solución A-3 durante toda la noche y al día siguiente se siguió el protocolo de tinción con el reactivo

de plata a partir de este punto tal y como acabamos de describir.

Se obtuvo una gráfica del  $\text{Log}_{10}$  del peso molecular de las proteínas de peso molecular conocido, usadas como marcadores, frente a su movilidad electroforética relativa. El peso molecular de las subunidades de PEPC se estimó interpolando en la gráfica de calibración la movilidad relativa ( $R_f$ ) de las diferentes isoformas obtenidas en esta electroforesis.

#### II.4.7 Técnicas inmunológicas

a) Preparación del Antígeno.- Como antígeno se empleó la fracción eluida de la columna de DEAE-CELULOSA que presentó mayor actividad específica y que demostró tener un grado aceptable de pureza, puesto que en electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se obtuvo solamente la banda de proteína correspondiente a PEPC cuando se tiñó con azul de Coomassie. Esta fracción se concentró en Amicón con membrana de 100,000 daltones hasta conseguir que la preparación tuviera una concentración de proteína de alrededor de 1.2 mg/ml. El proceso de concentración se llevó a cabo a 4°C con una presión de nitrógeno de 4-5 kg/cm<sup>2</sup> y un flujo aproximado de 10 ml/h. Posteriormente se filtró en una membrana de millipore de 0.65 micrómetros y se dializó durante 5 horas frente a un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.5 conteniendo NaCl al 0.85% (p/v). Todo el material utilizado en la preparación final de la suspensión que iba a ser inyectada al conejo (pipetas, viales, solución de cloruro de sodio, jeringa, agujas, etc.) se esterilizó durante 45 minutos en autoclave. En condiciones de esterilidad se mezclaron 3.8 ml de la preparación de enzima pura dializada y 3.8 ml de adyuvante completo de Freund. Con el objeto de convertir esta mezcla en una verdadera emulsión, se la hizo pasar repetidas veces por agujas de diámetro interno decreciente (18, 20, 21, 22) hasta que se formó una emulsión blanca espesa. La estabilidad de la emulsión se comprobó añadiendo una gotita sobre agua helada y veri-

ficando que no se dispersaba sino que se mantenía estable por varios minutos.

b) Programa de Inoculación.- A cada uno de los conejos se les aplicó por vía intramuscular 1 ml de la emulsión (0.6 mg de proteína) distribuido proporcionalmente en los cojinetes plantares. Los detalles y el calendario de inmunización llevado a cabo fue el siguiente:

DIA	TRATAMIENTO	SITIO DE INOCULACION	CANTIDAD
0	1ra. Inoculación	Intramuscular (cojinetes plantares)	1 ml
15	2da. Inoculación	Sub-cutánea (cuello)	0.5 ml
21	3ra. Inoculación	Sub-cutánea (cuello)	0.5 ml
28	Sangrado (prueba)	Vena (oreja)	3 ml
33	4ta. Inoculación	Sub-cutánea (cuello)	0.5 ml
43	Sangrado (prueba)	Vena (oreja)	3 ml
45	Sangrado final	Punción cardiaca	40 ml

Cuando se hizo preciso obtener nuevamente anticuerpos se utilizaron a los mismos conejos y se empleó como antígeno a la proteína contenida en los geles de poliacrilamida.

En este caso la preparación pura de PEPC se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes en

tubo; las banditas de protefna reveladas por actividad para PEPC se cortaron y se homogenizaron con la solución salina y se pasó la mezcla repetidas veces a través de varias jeringas de diámetro interno diferente 18, 21, 22. Todo este procedimiento al igual que en la primera preparación se hizo en condiciones de esterilidad. La suspensión obtenida, muy fluida, se aplicó a los conejos por vía sub-cutánea. Una semana después, estos se volvieron a inocular con otros 50 microgramos de protefna (esta vez la protefna no fue obtenida a través de electroforesis) mezclada con solución salina. El sangrado de prueba se hizo a los 6 días y el sangrado final (punción cardiaca) de 60 ml $\times$  a las dos semanas de la primera inoculación. El suero fue sometido al mismo tratamiento de purificación parcial llevado a cabo en el primer programa de inmunización. Los anticuerpos contenidos en el suero fueron purificados parcialmente antes de ser usados en los estudios inmunológicos siguiendo el procedimiento descrito.

c)Obtención del Suero Inmune.- La sangre obtenida de los conejos fue procesada con el objeto de obtener el suero e investigar en éste la presencia de los anticuerpos. Para esos propósitos, la sangre se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del coágulo y luego se incubó a 4°C durante 24 horas, tras lo cual se procedió a despegar el coágulo de la pared del tubo (de centrifuga) o se sometió a centrifugación durante 30 minutos a 5,000 x g a 4°C. El sobrenadante (suero) era de-

cantado y utilizado para hacer las pruebas de inmunoprecipitación en capilares o de Ouchterlony. Finalmente, se utilizó para obtener los anticuerpos parcialmente purificados. La sangre de conejo no inmunizado también fue sometida a este tratamiento.

d) Precipitación en Capilares.- Esta prueba se usó para la detección inicial de los anticuerpos en el suero. Tubos de 0.025 ml de capacidad se llenaron a la mitad de su volumen con el antisuero y la otra mitad con diferentes diluciones del antígeno (PEPC de hojas verdes). En los tubos donde existían anticuerpos frente a este antígeno y la proporción de ambos era adecuada, se formó un precipitado perfectamente visible después de 24 horas de incubación a 4°C.

e) Titulación del suero inmune. El título del suero se midió cualitativamente, observando el tamaño de los inmunoprecipitados formados en los capilares con las diferentes diluciones del antígeno. Cuando aún se formaba inmunoprecipitado con diluciones del antígeno de 1/64 se consideraba alto el título y entonces se procedía a sangrar el conejo no sin antes comprobar este resultado con la prueba de Ouchterlony en placa de agar. El sangrado se hizo por punción cardiaca.

1) Purificación parcial de los anticuerpos.- El suero obtenido después de la centrifugación se precipitó con una solución saturada de sulfato de amonio amortiguada con Tris-HCl 0.02M, pH 8.0 que llevaba además EDTA 1 mM. Para ello a 20 ml de suero se agregaron 12 ml de solución saturada, gota a gota con bureta y con permanente agitación en frío (4°C). Después de agitar durante unos 30 minutos adicionales se centrifugó a 8,000 rpm a 4°C durante 45 minutos. El precipitado obtenido, rojizo y abundante, se suspendió en 8 ml de Tris-HCl 0.02mM y nuevamente se le agregó gota a gota 4.8 ml de la solución saturada de sulfato de amonio. Después de 30 minutos de agitación se centrifugó de la misma manera que antes. Este procedimiento se repitió hasta conseguir un precipitado perfectamente blanco el cual se resuspendió en un amortiguador de fosfato de sodio 5 mM pH 8.0 y se dializó contra ese mismo amortiguador durante la noche a 4°C.

g) Prueba de doble difusión de Ochterlony (124). Para llevar a cabo esta prueba, se fundió agar al 1% (p/v) en el amortiguador de fosfato de sodio 50mM pH 7.2 conteniendo azida al 0.02% (p/v) cuando la temperatura del agar era de 50-60 °C se cubrieron los portaobjetos formando una capa de agar de unos 2-3 mm de espesor. Después de que gelificaron se guardaron las placas a 4°C en cámara húmeda hasta su utilización. Sobre cada placa se hicieron 7 pocitos con

una capacidad aproximada de 0.03 ml, que se llenaron con las preparaciones enzimáticas y de anticuerpos. Las placas de agar se mantuvieron a 4°C en cámara húmeda durante 3 días para permitir la difusión de anticuerpos y antígenos a través del agar y la formación de la banda de precipitación inmunológica. Una vez estas bandas fueron visibles, se eliminaron las proteínas que no reaccionaron por sucesivos lavados con una solución de cloruro de sodio al 0.085% (p/v) amortiguada con fosfato de sodio 10 mM pH 7.0. Finalmente, se lavaron con agua desionizada y se cubrieron con una tira de papel filtro que al humedecerse quedaba adherida a la superficie del gel. En esta se secaba la placa completamente situándola frente a una corriente de aire producida por un ventilador. Una vez secas las placas, las bandas de inmunoprecipitación se tiñeron durante unos 10-15 minutos en una solución de negro de amido al 0.1% (p/v) disuelto en ácido de acético glacial al 10% (v/v) o con azul de Coomassie (el mismo reactivo empleado para teñir geles de electroforesis). El desteñido se llevó a cabo lavando la placa con una solución de ácido acético glacial al 10% (v/v) en el primer caso o con el sistema de desteñir geles de electroforesis ya descrito en el segundo caso.

b) Inmunoprecipitación de la actividad de PEPC. Para permitir una comparación entre las dos formas de la enzima encontradas en tejidos de maíz se incubaron separadamente cantidades constantes de actividad de PEPC (0.5 u/ml) tanto de hojas verdes

como de raíz obtenidas ambas tras la cromatografía en DEAE-CELULOSA. La incubación se llevó a cabo con diferentes cantidades del mismo - antisuero completando hasta un volumen de 0.250 ml con una solución salina (fosfato de sodio 50 mM pH 7.2 y cloruro de sodio 0.85% (p/v). En el experimento control se empleó un suero de conejo no inmunizado. La incubación fue realizada a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para medir actividad residual de PEPC que se expresó como % de la actividad enzimática existente en la fracción del control que no contenía antisuero inmunizado.

### III. RESULTADOS

### III.1 ACTIVIDAD ESPECIFICA DE PEPC EN LOS DIFERENTES TEJIDOS DE MAIZ

El estudio de la actividad de PEPC en diferentes tejidos de maiz nos permitió entre otras cosas, establecer los niveles de actividad específica de los extractos crudos de estos tejidos. Para la obtención de estos datos, después de la centrifugación del homogenado, el sobrenadante obtenido en cada caso (extracto crudo) se utilizó inmediatamente para medir la actividad y determinar el contenido de proteína, tal como se explica en métodos

Con el objeto de extraer y preservar el máximo de la actividad de PEPC, fue preciso ensayar diversos procedimientos de extracción y estabilización. En la literatura se reporta el uso de diversos medios para ruptura de los tejidos y el empleo de diversos amortiguadores para la obtención de la actividad de PEPC (52, 53, 56). En este trabajo se seleccionó cuidadosamente aquel que garantizó el mayor rendimiento y estabilidad de la actividad enzimática de PEPC. Por ejemplo varios autores han usado Tris-HCl como amortiguador en el procedimiento de extracción de PEPC: 0.1M-pH 7.5 (40); 0.05M-pH 7.7 (41); 0.2M-pH 8.0 (67); 0.1M-pH 8.3 (82). Sin embargo, con estos sistemas obtuvimos rendimientos muy bajos en comparación con los obtenidos con el sistema Tris-Fosfato que desarrollamos. La poca actividad que extrajimos en Tris-HCl pudiera deberse a la baja capacidad amortiguadora de este tampón a pH cercano a 7,4 a 4°C, que permite que

el pH del extracto descienda a valores inferiores a 6.0 y/o a un efecto estabilizador de los iones fósforo que ha sido descrito para otras enzimas (138)

Por otra parte, se ha verificado lo que en otro reporte se ha publicado (56) en el sentido de que la presencia de polifenoles en hoja es un serio obstáculo para obtener buenos rendimientos de enzima y que la adición del ascorbato y PVPP en el amortiguador mejoran sustancialmente esos rendimientos.

Es interesante señalar que no se consiguen los mismos resultados en la medida de la actividad de PEPC cuando la reacción se inicia con PEP que cuando se inicia con la preparación enzimática. Cuando se inicia con PEP después de una pre-incubación de la enzima durante unos 5 minutos en presencia de los demás reactivos y a pH 8.3 se registra una significativa y rápida pérdida de actividad enzimática, lo que no ocurre si la reacción se inicia con el extracto enzimático. Por esta razón, este último procedimiento fue utilizado para medir la actividad de PEP. Esta observación fue publicada por Gavalas y col. (47 b y c) después de que este trabajo experimental ya había sido concluido.

En la tabla 3.1 se muestra la actividad específica de PEPC en extractos crudos de los diferentes tejidos. Se observa que la actividad específica en hoja verdes, es al menos, un orden de magnitud mayor que

en los demás tejidos, excepto en callos de embriones. Hay que resaltar el hecho de que según varios autores, la PEPC representa del 9 al 15% de la proteína soluble en hojas de maíz -- (103, 59, 40).

Por otra parte hemos detectado que los callos de embriones de maíz contienen actividad de PEPC aunque dado de que se trata de un tejido no fotosintético no es de esperar que esta actividad esté asociada con la operación de un ciclo  $C_4$  y corresponda más bien a la enzima anaplerótica que se encuentra en la mayoría de los tejidos de las plantas. La actividad específica de PEPC va incrementándose durante la resiembra del callo, alcanzando un máximo a los 14 días, después del cual comienza de nuevo a decrecer hasta estabilizarse en un valor de 0.45 u/mg de proteína a los 20-25 días (Fig. 3.1). Es de notar que la resiembra de estos tipos de callos se hace cada 18 días.

Tabla 3.1 Actividad Específica de la enzima PEPC en extractos crudos de los Diferentes Tejidos de Maíz Estudiados.

	Contenido de proteína (mg/ml)	Actividad específica unidades/mg proteína
Hoja verde	1.4	2.98
Hoja etiolada	1.6	0.41
Tallo	0.62	0.14
Raíz	0.65	0.21
Callo de embrión	0.196*	1.39*

\* Actividad específica máxima encontrada 14 días después de la siembra.

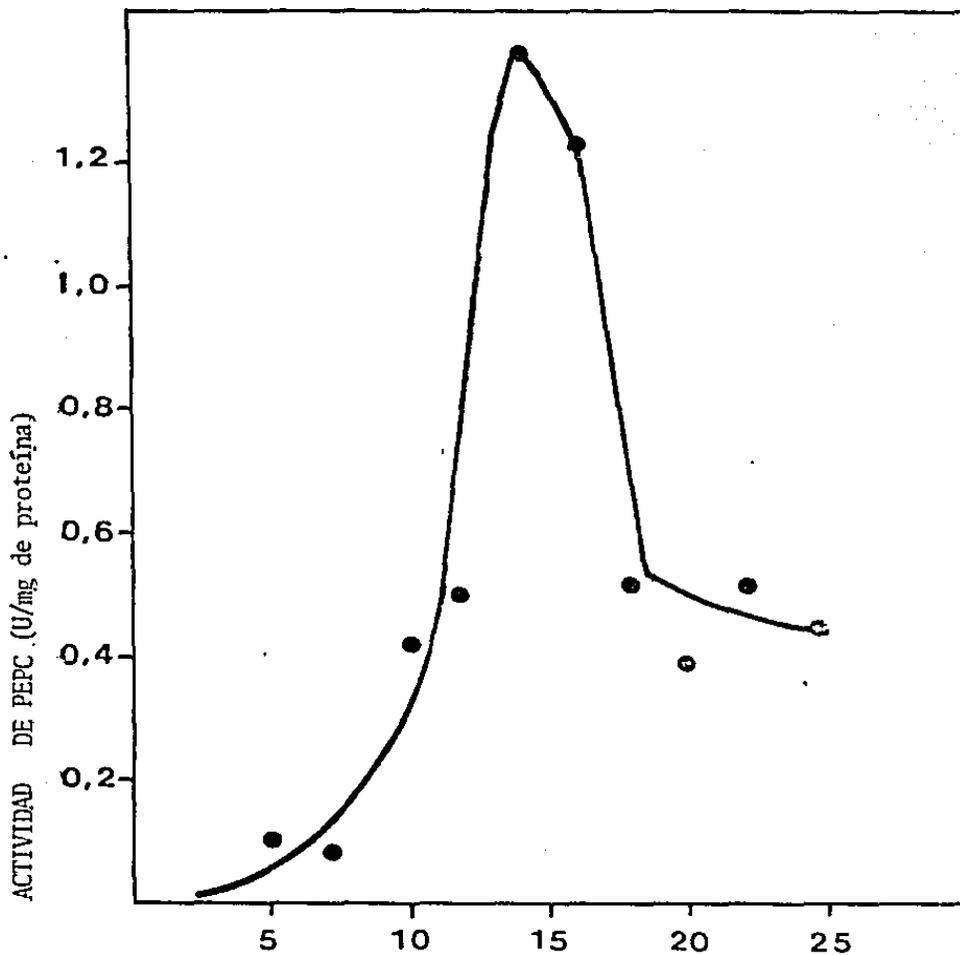


Fig 3.1 CAMBIO EN LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA ENZIMA PEPC A LO LARGO DEL PERIODO DE CRECIMIENTO DE CALLOS DE EMBRIONES.

Muestras de callos (tomadas cada 2-3 días) a partir de la siembra) fueron homogenizadas a 4°C en el amortiguador A en un politrón. Después de centrifugar, el sobrenadante fue utilizado para medir la actividad de PEPC y el contenido de proteína.

### III.2 PURIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PEPC EXTRAIDA DE HOJA DE MAIZ

Como se ha mencionado anteriormente, el objetivo principal de este trabajo fue hacer un estudio comparativo de la actividad de la enzima PEPC existente en los diferentes tejidos de maíz, tanto a nivel físico-químico como estructural, para lo cual requeríamos disponer de anticuerpos monoespecíficos frente a alguna de las formas enzimáticas de los diferentes tejidos estudiados. Decidimos conseguir estos anticuerpos frente a la forma asociada a la fotosíntesis  $C_4$  presente en hoja verde ya que por ser esta la más abundante de las actividades encontradas supusimos que su purificación sería relativamente más fácil. En consecuencia, se inició la purificación con el único fin de conseguir una cantidad apropiada de la enzima pura para la obtención de anticuerpos específicos de esta forma.

Los valores de rendimiento y grado de purificación de la actividad de PEPC a partir de hojas de maíz reportados por diferentes autores son muy discrepantes. Se han citado como causa de esta variabilidad la actividad oxidante de la polifenoloxidasas presente en los pasos iniciales de la preparación de la enzima y en general, las características intrínsecas de inestabilidad de la actividad de PEPC ante factores no siempre esclarecidos.

En este trabajo se precipitó la actividad de PEPC de extractos crudos con sulfato de amonio entre el 30% y el 60% obteniendo buenos resultados.

Por otra parte, se hicieron ensayos preliminares para la posible inclusión en el proceso de una cromatografía hidrofóbica usando Phenyl Sepharosa CL-4B (Sigma) ya que considerabamos que las características hidrofóbicas de PEPC, indicada por su gran facilidad de formación de agregados de alto peso molecular, eran adecuadas para obtener una buena retención selectiva de la actividad sobre la resina. Para tal fin, la enzima se pegó a la matriz hidrofóbica a una concentración de 0.5M en sulfato de amonio en un amortiguador de fosfatos 0.05M que llevaba además EDTA (1mM),  $Mg^{+2}$  (5 mM) y glicerol (25%, v/v). La elución se hizo usando sucesivamente: a) solución que llevaba 0.25M en sulfato de amonio-10% en Glicerol (v/v); b) solución de sulfato de amonio (0.1M)-Glicerol (10%, v/v); c) y solución diluída de glicerol (10%).

Todas las soluciones disueltas en el mismo amortiguador de fosfatos con el que se hizo el pegado. Pero, los resultados no fueron alentadores ya que la pureza de las fracciones con actividad de PEPC y la actividad específica de ésta no aumentaron significativamente tras esa cromatografía, por lo que no se incluyó este paso en el esquema final de purificación.

Un mejor fraccionamiento de las proteínas del precipitado 30-60%

de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se consiguió mediante una cromatografía de intercambio iónico en columna empleando DEAE-CELULOSA y las condiciones experimentales descritas en Métodos. Tanto el rango de concentración de la sal como el volumen total del gradiente usado en la elución se determinaron experimentalmente teniendo presente el conseguir la actividad de PEPC en un pico bien definido y con una contaminación mínima con otras proteínas. En este sentido, aunque el grado de purificación conseguido en este paso considerando la totalidad de las fracciones obtenidas no fue extraordinariamente alto, la recuperación obtenida de 57% fue considerada buena, (véase tabla 3.2),

El siguiente paso consistió en aplicar la preparación enzimática obtenida anteriormente a una columna de filtración en gel de Sephadex G-200. Este paso no rindió buenos resultados. Solamente se recuperó el 10% de la actividad total aplicada (equivalente al 6% de las unidades del extracto crudo). Electroforéticamente se comprobó que esta cromatografía permitía recuperar fracciones de PEPC en un grado de pureza más alto que las fracciones obtenidas tras DEAE-CELULOSA y tras Phenil Sepharosa CL-4B. Sin embargo, aún quedan contaminantes muy fuertes principalmente una fracción que electroforéticamente coincidió con la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa. Además otro inconveniente fue la fuerte pérdida de actividad de la enzima tal como lo demuestra la baja recuperación de un 6% y el descenso de la actividad específica de 10.3 U/mg de proteína obtenida después de DEAE-CELULOSA, a 4.1 U/mg de

proteína después de esta cromatografía de filtración en gel.

Finalmente, las fracciones obtenidas en Sephadex G-200, se aplicaron a una columna de intercambio iónico en hidroxiepatita con el fin de aumentar el grado de purificación. Este soporte cromatográfico posee grupos funcionales diferentes a los del intercambiador DEAE-CELULOSA, y por otra parte, algunos autores (40,45) lo han empleado con relativo éxito en la purificación de PEPC.

Debe hacerse notar que aunque electroforéticamente pudo determinarse que la banda de proteína correspondiente a la enzima PEPC estaba considerablemente más enriquecida (prácticamente pura) el descenso en la actividad específica demuestra que parte de esta proteína se encontraba inactiva.

Los resultados finales de este proceso (Tabla 3.2) nos indican que siguiendo este protocolo experimental la purificación se podría mejorar bastante si se logra estabilizar la actividad de PEPC durante las etapas cromatográficas, fundamentalmente en el paso de Sephadex G-200. Una recomendación podría ser modificar la composición de los amortiguadores usados a lo largo del proceso de purificación incluyendo en ellos algunas sustancias de las conocidas como activadores o protectores de la actividad enzimática (glicerol por ejemplo).

Es interesante notar que las 2 ó 3 fracciones con actividad de PEPC máxima tras la cromatografía en DEAE-CELULOSA poseían una actividad

específica constante de 22.5 U/mg de proteína, actividad que coincide con la que según los datos existentes en la bibliografía posee la enzima purificada (1). Este hecho, conjuntamente con el de la pureza de estas fracciones estimadas por electroforesis - (PAGE-SDS), nos motivó a usar la enzima contenida en estas fracciones (conseguida en un experimento posterior) como el antígeno que habría de inocularse a conejos para la obtención de anticuerpos monoespecíficos.

TABLA 3.2 Purificación de la actividad de PEPC de hojas verdes de maíz

Etapa	Proteína mg	Actividad Total Unidades	Actividad Específica Unidades mg proteína	Rendimiento %	Purificación
Extracto Crudo	72	201	2.79	100	-
Precipitación con Sulfato de Amonio	51	180	3.52	89	1.26
Cromatografía en DAE-CELULOSA	12.1	125	10.3	57	3.70
Cromatografía en SEPHADEX G-200	2.92	12	4.1	6	1.47
Cromatografía HIDROXIPATITA	2.42	8	3.3	4	1.18

87

### III.3 COMPORTAMIENTO EN CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LA ACTIVIDAD DE PEPC EXTRAIDA DE LOS DIFERENTES TEJIDOS DE MAIZ.

Las diferentes isoformas de PEPC que existen en las plantas han sido estudiadas empleando, entre otras técnicas, la cromatografía de intercambio iónico. Esta técnica le permitió a Vidal et al .(63) encontrar las dos formas de PEPC en hojas verdes y etioladas. De la misma manera Ting y Osmond (42,52) caracterizaron las holoenzimas e isoenzimas de hojas de plantas  $C_3$  y  $C_4$ . Otros muchos estudios sobre esta actividad enzimática (57,40) han sido llevado a cabo con el auxilio de la cromatografía de intercambio iónico principalmente sobre la DEAE-CELULOSA de donde las proteínas previamente aplicadas son eluidas tras aplicar un gradiente lineal de una fuerza iónica que normalmente oscila entre 0-300 mM de KCl.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se llevaron a cabo experimentos con la DEAE-CELULOSA para examinar las similitudes o diferencias que existen a este nivel entre las enzimas con actividad de PEPC presentes en los tejidos de maíz estudiados (hoja verde, hoja etiolada, tallo, raíz y callos inducidos de embriones.

Las diferentes preparaciones enzimáticas fueron aplicadas y cromatografiadas por separado en una columna de DEAE-CELULOSA bajo condiciones experimentales (amortiguador usado, tamaño de columna, cantidad de muestra aplicada, volumen de elución) iguales en todos los casos y descritos en métodos.

En la tabla 3.3 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en estos experimentos. Las actividades específicas, y otros valores que aparecen en la tabla se obtuvieron después de reunir todas las fracciones pertenecientes al pico de actividad de las respectivas cromatografías en DEAE-CELULOSA.

TABLA 3.3 Resultados de la Cromatografía de Intercambio Iónico Aplicada a Extractos Crudos de PEPC

TEJIDO	UNIDADES TOTALES APLICADAS	REC (%)	ACTIVIDAD ESPECIFICADA	PURIFICACION	KCl (mM)
Hoja verde (1)	10.00	55	12.5	4.2	104*
Hoja Etiolada (2)	1.90	64	( I ) 3.25**	7.3	107
			( II ) 1.2	2.9	170
Tallo	5.40	36	0.82	5.6	157
Raíz	5.44	48	1.60	7.6	150
Callo	11.32	53	6.70	4.8	160

\*Otro pico no muy bien definido eluyó a 168 mM (ver cromatograma)

\*\*Esta actividad específica corresponde a la fracción mayoritaria

(1) La actividad específica corresponde a la fracción más pura

(2) El pico que eluyó a 107 mM representa el 97% de la actividad de PEPC recuperada; el que eluye a 170 mM representa solamente el 3% de la actividad de PEPC recuperada tras la cromatografía.

La actividad de PEPC de los diferentes tejidos fue purificada alrededor de 6 veces tras la cromatografía en DEAE-CELULOSA y los rendimientos obtenidos oscilan entre el 30-50%.

La actividad de PEPC de hoja verde presente en la resuspensión desalada del precipitado 30-60% de sulfato de amonio tras ser aplicada y cromatografiada en DEAE-CELULOSA (Fig. 3.2) apareció como un pico bien definido en la sección del gradiente correspondiente a 104 mM de KCl. Es interesante señalar la aparición de un segundo pico de actividad, no muy bien definido, pero encontrado en tres experimentos diferentes a aproximadamente 168 mM de KCl. Desafortunadamente las bajas actividades enzimáticas asociadas con este pico no nos permitió una posterior caracterización de la forma enzimática que contenía.

La cromatografía de intercambio iónico de la preparación de sulfato de amonio de hoja etiolada resolvió la actividad de PEPC en dos picos (Fig. 3.3). El primero al que hemos llamado PEPC-I resultó contener la mayor actividad (97% de la actividad total recuperada tras esta cromatografía) y eluyó a una concentración de KCl de 107 mM, es decir a una concentración muy similar a la que eluyó el pico principal de actividad de hoja verde. El otro pico obtenido de hoja etiolada, al que estamos llamando PEPC-II representó sólo el 3% de la actividad total recuperada y eluyó a una concentración en KCl alrededor de 170 mM.

En cambio, el pico de la actividad de PEPC obtenido después de cromatografiar en DEAE-CELULOSA las preparaciones de sulfato de amonio de raíz, tallo y callo apareció a una concentración de KCl entre 150-160 mM (Fig. 3.4, 3.5, 3.6).

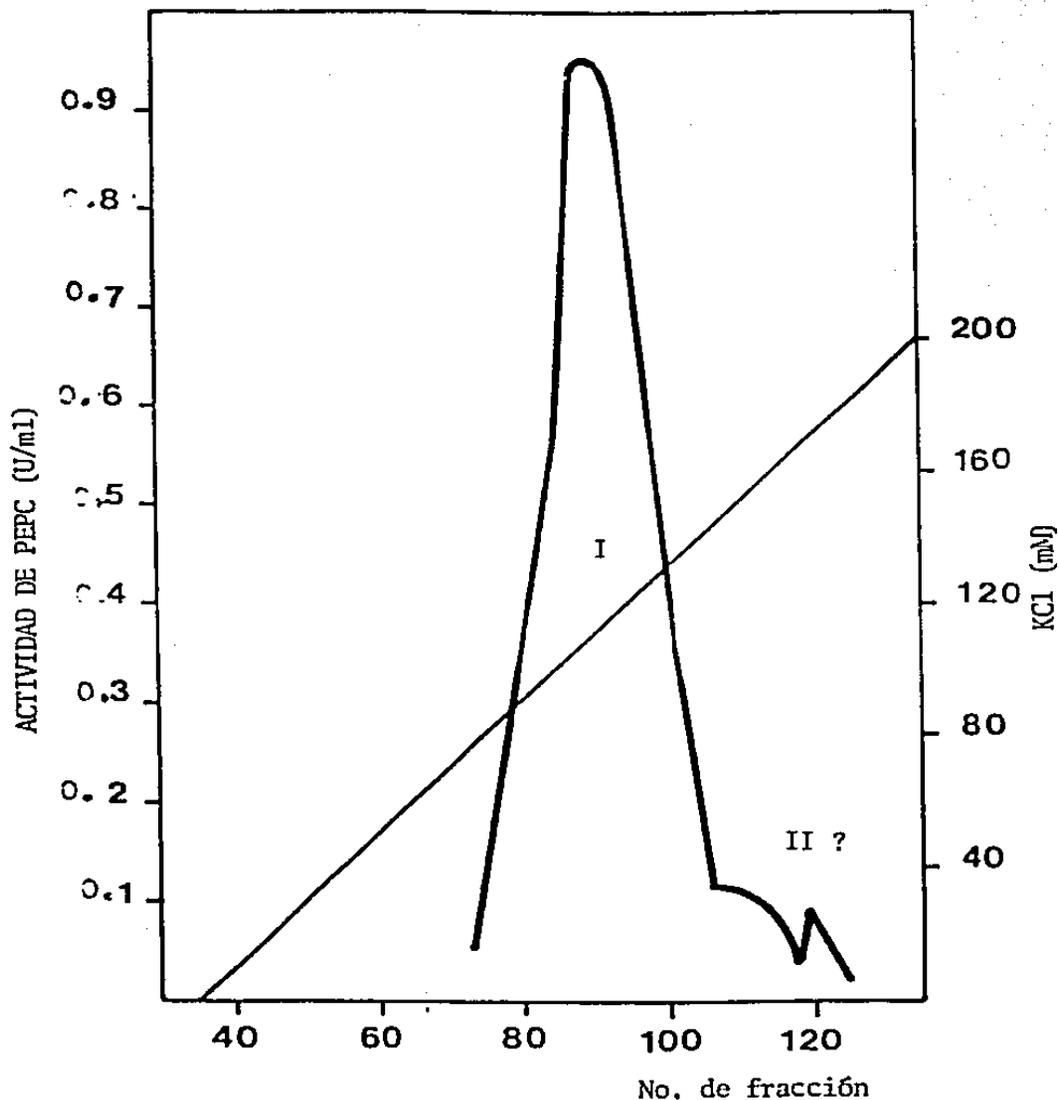


Fig.3.2 PATRON DE ELUCION EN DEAE-CELULOSA DE LA ACTIVIDAD DE PEPC DE HOJA VERDE.

Los extractos de hoja verde precipitados con sulfato de amonio (30-60%) y desalados, se aplicaron a una columna de DEAE CELULOSA equilibrada con el amortiguador C. La elución se hizo con un gradiente de KCl 0-200 mM en el mismo amortiguador C y se recogieron fracciones de 4 ml.

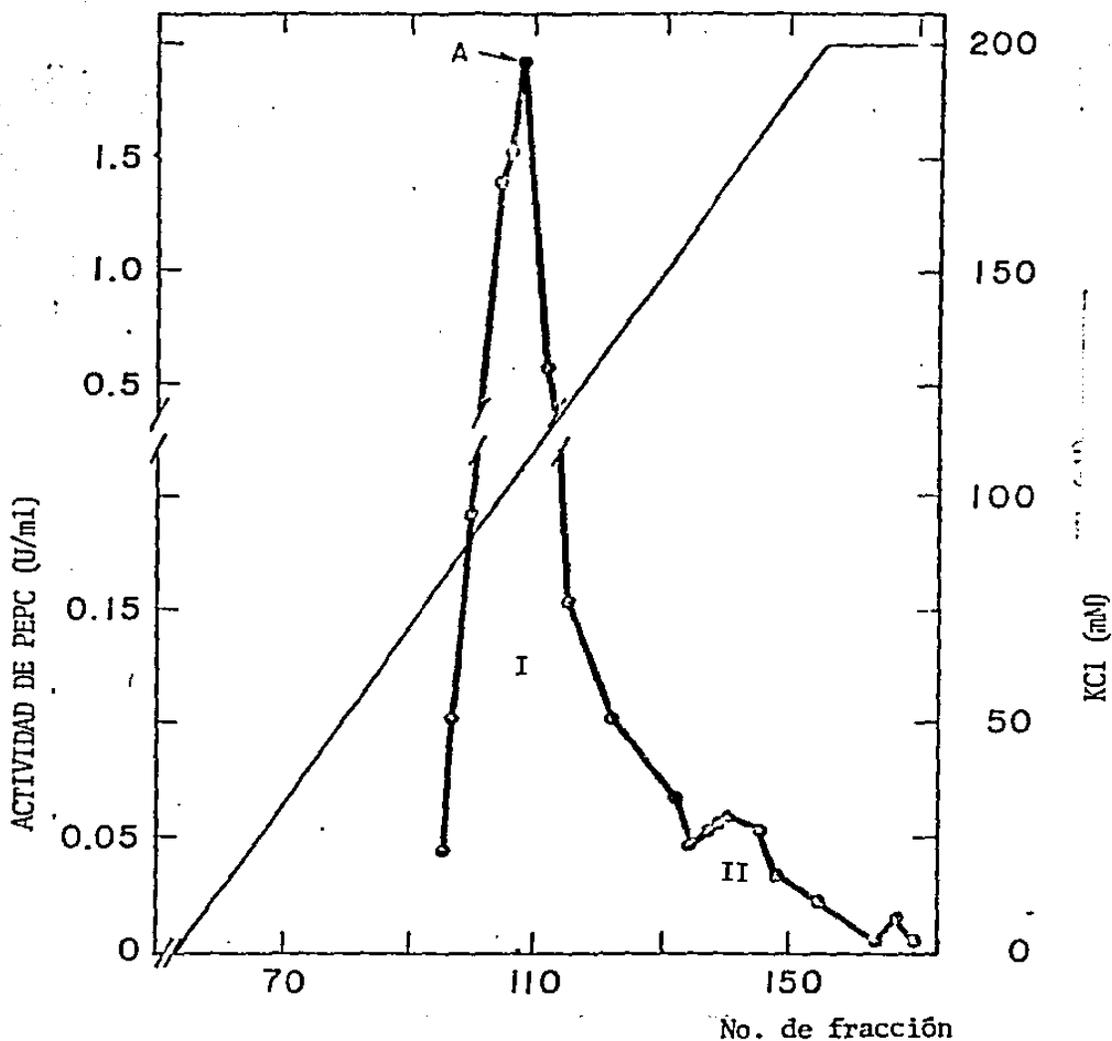


Fig. 3.3 PATRON DE ELUCION DE DEAE-CELULOSA DE LA ACTIVIDAD DE PEPC EN HOJA ETIOLADA.

Los extractos de hoja etiolada precipitados con sulfato de amonio (30-60%) y desalados, se aplicaron a una columna de DEAE-CELULOSA equilibrada con el amortiguador C. La elución se hizo con un gradiente de KCl 0-200 mM en el mismo amortiguador C y se recogieron fracciones de 4 ml.

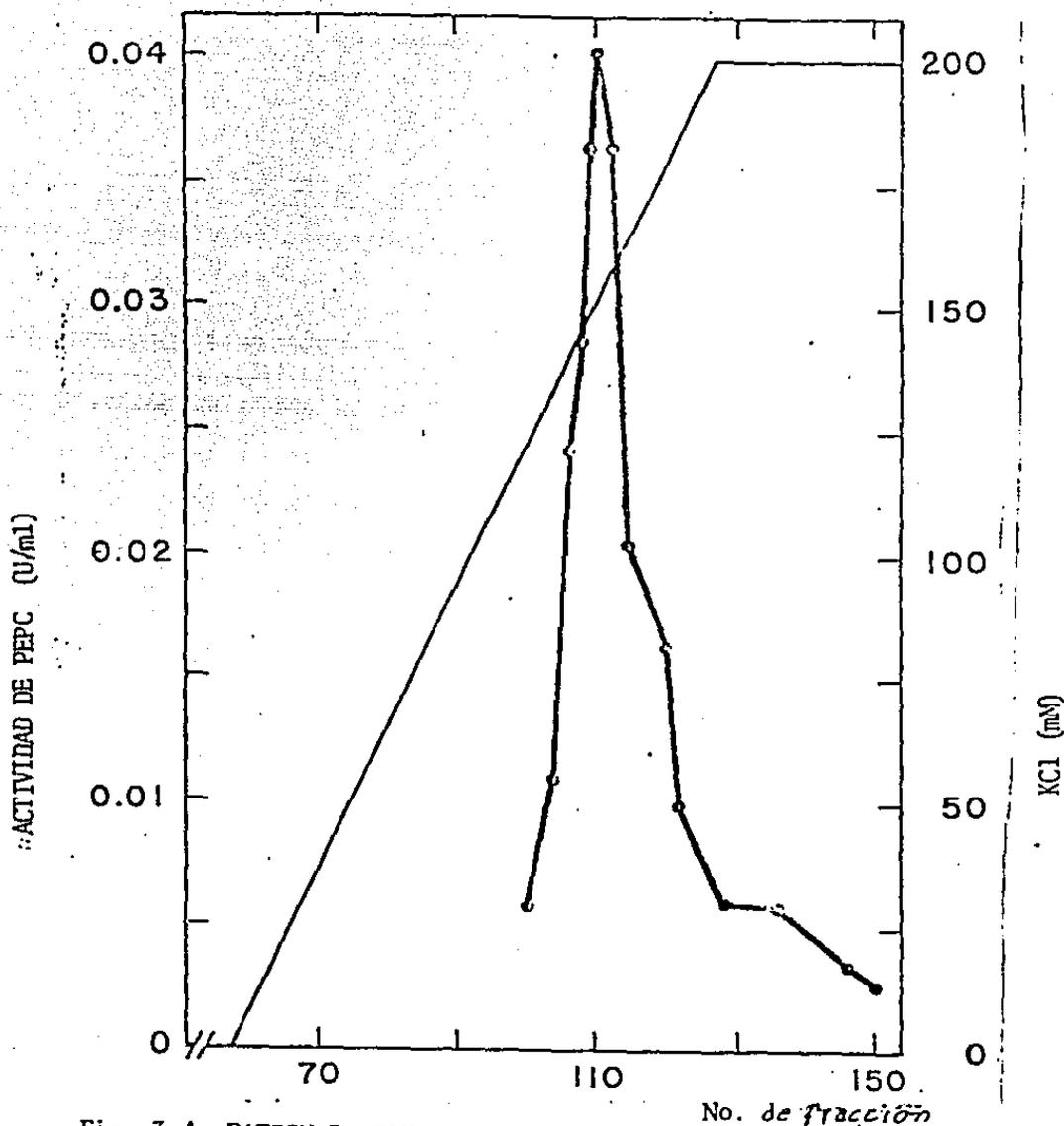


Fig. 3.4 PATRON DE ELUCION EN DEAE-CELULOSA DE LA ACTIVIDAD DE PEPC DE LA RAIZ

Los extractos de raíz precipitados con sulfato de amonio (930-60%) y desalados, se aplicaron a una columna de DEAE-CELULOSA equilibrada con el amortiguador C. La elución se hizo con un gradiente de KCl 0-200 mM en mismo amortiguador C y se recogieron fracciones de 4 ml.

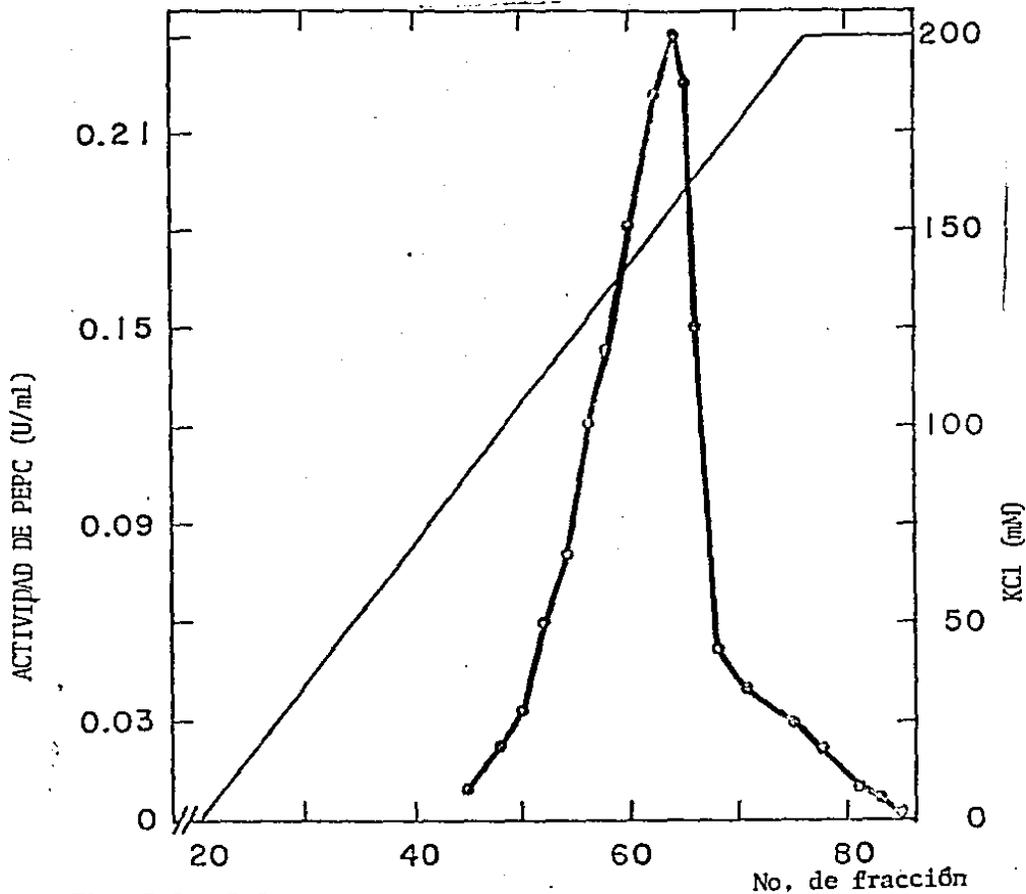


Fig. 3.5 PATRON DE ELUCION EN DEAE-CELULOSA DE LA ACTIVIDAD DE PEPC DE TALLO.

Los extractos de tallo precipitados con sulfato de amonio (30-60%) y desalados, se aplicaron a una columna de DEAE - CELULOSA equilibrada con el amortiguador C. La elución se hizo con un gradiente de KCl 0-200 mM en el mismo amortiguador C y se recogieron fracciones de 4 ml.

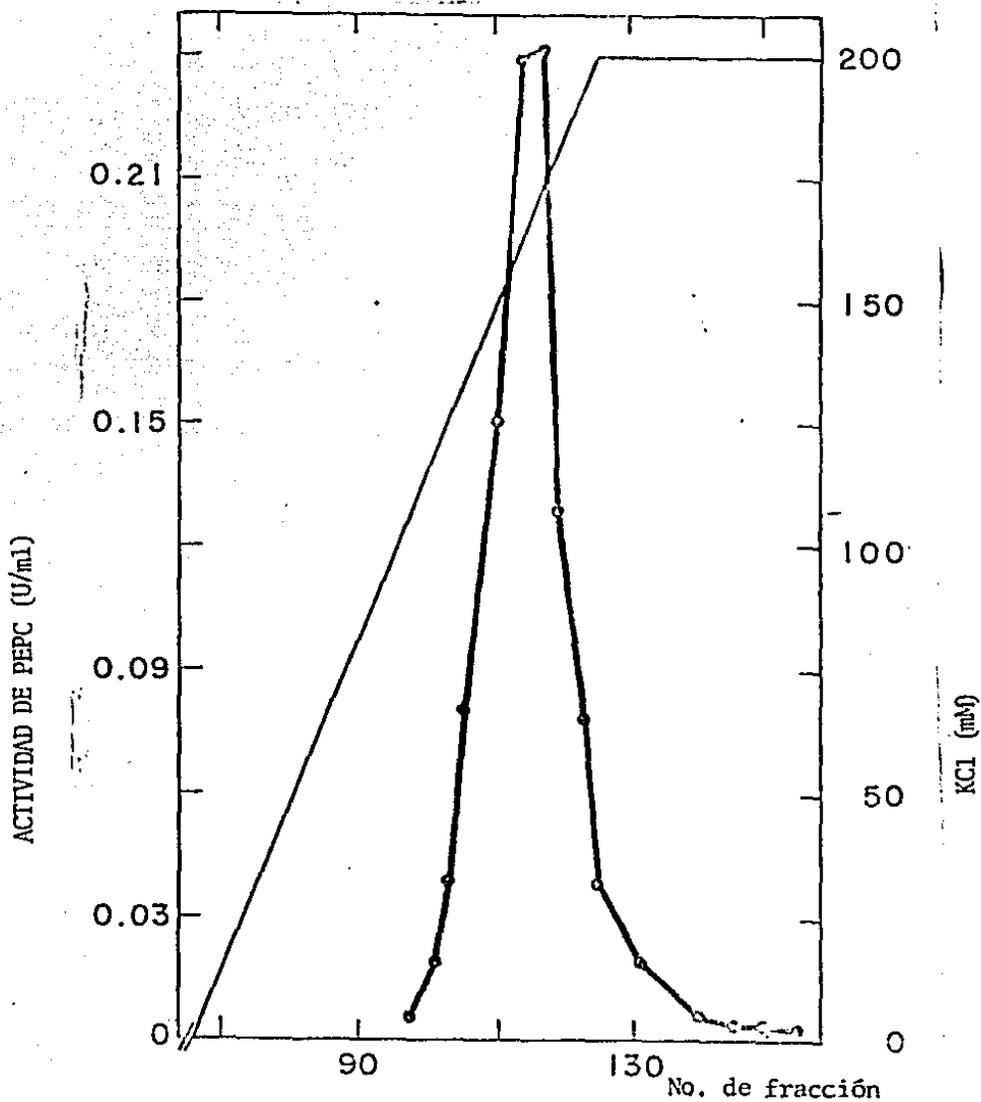


Fig. 3.6 PATRON DE ELUCION DE DEAE-CELULOSA DE LA ACTIVIDAD DE PEPC DE CALLOS DE EMBRION.

Los extractos de callos de embrión precipitados con sulfato de amonio (30-60%) y desalados, se aplicaron a una columna de DEAE-CELULOSA equilibrada con el amortiguador C. La elución se hizo con un gradiente de KCl 0-200 mM en el mismo amortiguador C y se recogieron fracciones de 4 ml.

El resultado más interesante de esta cromatografía fue el que el segundo pico de actividad de hoja verde coincide en cuanto a la concentración de KCl a la que se eluyen los picos de actividad de PEPC de raíz, tallo, callo y PEPC-II de hoja etiolada. Al mismo tiempo, uno de los picos de actividad de hoja etiolada (PEPC-II) y el pequeño no caracterizado de hoja verde también coinciden en el valor de concentración de KCl a la que eluyen (170 mM y 168 mM respectivamente). Es por ello que podemos decir que los datos obtenidos en nuestras condiciones experimentales concernientes al comportamiento en cromatografía en DEAE-CELULOSA de la actividad de PEPC apuntan hacia la existencia de dos poblaciones o dos formas isoenzimáticas, entendiendo por formas isoenzimáticas "moléculas con la misma actividad enzimática que pueden separarse en tipos distinguibles por cualquier método", tal como define Market (62) de PEPC en tejidos de maíz; una población eluyendo a una concentración promedio de KCl de 105.5 mM y la otra a 171 mM.

Los experimentos que a continuación describimos fueron emprendidos con el objeto de confirmar este hecho y de caracterizar a las dos isoenzimas.

### III.4 DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LAS ISOFORMAS DE LA ENZIMA PEPC POR CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL

Después de haber identificado y caracterizado las isoformas de la enzima PEPC en cromatografía de intercambio iónico resultaba interesante comprobar si las formas encontradas diferían en peso molecular. Por ello, procedimos a determinar su peso molecular en cromatografía de filtración empleando Sephadex G-200.

Las preparaciones de PEPC concentradas tras cromatografía en DEAE-CELULOSA se aplicaron por separado a una columna de Sephadex G-200 previamente equilibrada como se describió en métodos; la tabla 3.4 muestra los resultados de este experimento.

TABLA 3.4 PESO MOLECULAR DE LAS ISOFORMAS DE PEPC ESTIMADO POR CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL.

PROTEINA	$K_{av}$ EXPERIMENTAL	$K_{av}$ CALCULADO	PESO MOLECULAR (Daltones)
Ferritina	0.029	0.061	480,000
Catalasa	0.240	0.327	232,000
Globulina	0.430	0.398	160,000
Ovalbúmina	0.743	0.784	45,000
PEPC-Callo	0.102	--	418,193
PEPC-Tallo	0.111	--	406,028
PEPC-Hoja verde	0.121	--	392,000

El ajuste lineal de la curva de  $K_{av}=f(\text{Log PM})$  dió la siguiente ecuación con coeficiente de correlación lineal de 0.96

$$K_{av} = 0.70 \text{ Log PM} + 4.048$$

Los pesos moleculares fueron calculados a partir de esta expresión matemática.

Tal como se observa en la tabla 3.4 los pesos moleculares de las proteínas nativas con actividad de PEPC presentes en los tejidos de hoja verde, tallo o callo de embriones no son significativamente diferentes. El peso molecular promedio es de 400,000 daltones, lo cual está de acuerdo con el peso molecular reportado por varios autores (40, 139) para la enzima presente en hoja de maíz. No hay datos en la bibliografía sobre el peso molecular de esta enzima en otros tejidos de maíz.

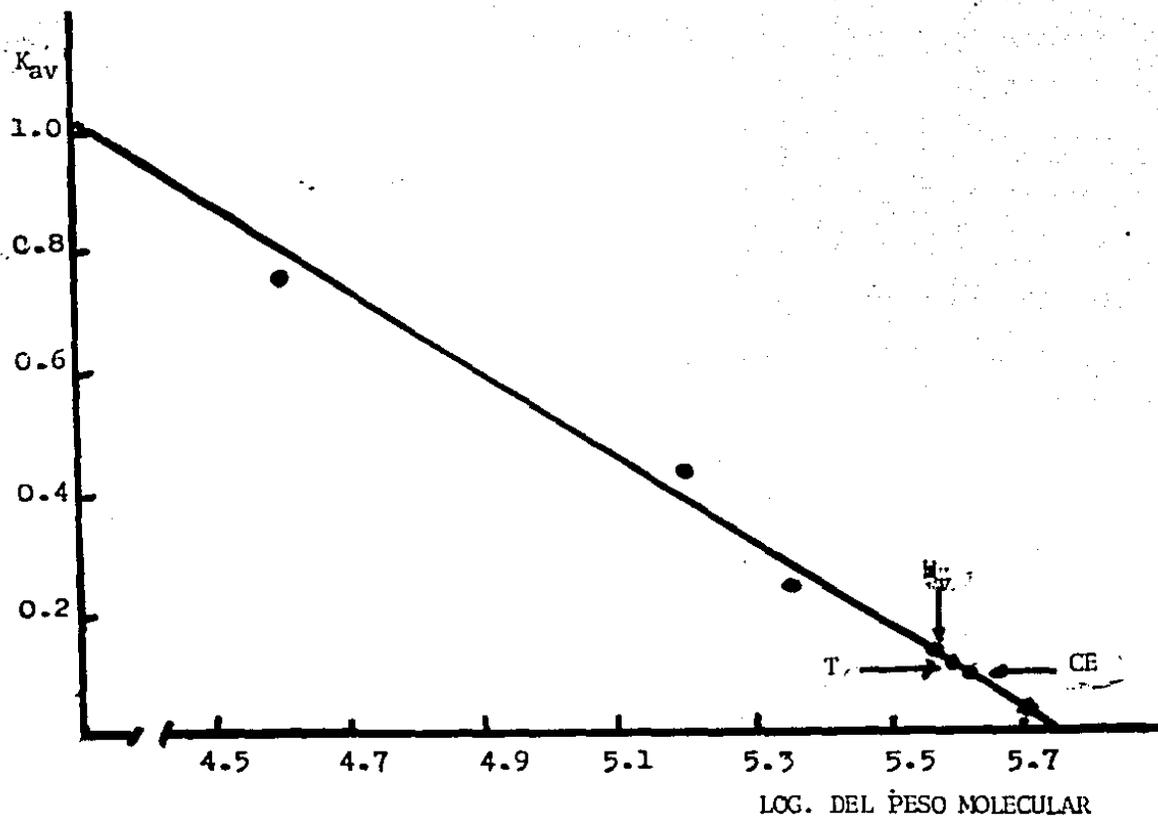


Fig. 3.7 DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200 DE LA PEPC DE HOJA VERDE ( $H_v$ ), TALLO (T) Y CALLO DE EMBRION (CE).

Las fracciones con actividad de PEPC obtenidas en DEAE-CELULOSA de callo de embriones (CE), tallo (T) y hojas verdes ( $H_v$ ) tras ser precipitadas con sulfato de amonio y posteriormente dializada se aplicaron a una columna de Sephadex G-200, equilibrada con el mismo amortiguador C que contenía adicionalmente glicerol (5%). El volumen vacío fue determinado utilizando azul de dextrano y la calibración de la columna se realizó empleando ferritina (480,000), catalasa (232,000), globulina (160,000) y ovalbúmina (45,000). Se recogieron fracciones de 6 ml y se le midió proteína por absorbancia a 280 nm.

### III.5 COMPORTAMIENTO ELECTROFORETICO DE LA ACTIVIDAD DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA EXTRAIDA DE LOS DIFERENTES TEJIDOS DE MAIZ

Los datos cromatográficos obtenidos nos indicaban la existencia de dos posibles isoenzimas que presentaban diferencias en cuanto a su carga neta (diferente retención en la columna de intercambio iónico y no en cuanto a su tamaño, ligeras diferencias en el valor de  $K_{av}$  en cromatografía de filtración molecular). Sométimos estas formas a electroforesis para tratar de corroborar estas observaciones.

#### III.5.1 Caracterización Electroforética de las isoformas de PEPC de tejidos de maíz

Uno de los métodos más frecuentemente usados para determinar la heterogeneidad enzimática es la detección en zimogramas, consistente en acoplar la electroforesis en gel con procedimientos de tinción histoquímicos para identificar enzimas diferentes; esta técnica es directa, simple, fácil de usar, puede aplicarse a enzimas en homogenizados crudos y posee un gran poder de resolución para la identificación de las enzimas. El éxito en la detección de una enzima en particular presente en una mezcla de proteínas aplicadas a electroforesis en geles de poliacrilamida depende, entre otras cosas, de la especificidad del reactivo presente en la mezcla de reacción enzimática donde se lleva a cabo la incubación de los geles. En ese sentido, entre las técnicas reportadas para la detección de la actividad de la enzima PEPC (55, 125, 126, 127) nosotros hemos seleccionado la

que utiliza el colorante violeta rápido B (55) ya que cumple con esos requisitos, es decir, tiene una absoluta especificidad frente al oxalacetato, que es uno de los productos de la reacción catalizada por PEPC.

Los extractos de los diferentes tejidos de maíz fueron precipitados con 30-60% de sulfato de amonio, dializados y finalmente sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% de T. Las bandas de proteína con actividad de PEPC se revelaron específicamente como se describe en Métodos, utilizando el colorante violeta rápido B.

Se eligió el 4% de acrilamida+bisacrilamida ya que el elevado peso molecular de la proteína nativa dificulta su movimiento a través de poros relativamente pequeños. Usamos por ello el porcentaje de T - (% T) mínimo que nos permitía un manejo apropiado de los geles y una máxima separación entre las dos isoenzimas.

La técnica utilizada (véase Métodos) fue una modificación a la original descrita por Vidal y col. (55), ya que si usábamos el amortiguador Tris-HCl al pH descrito tanto para los electrodos como para hacer los geles, la actividad de la enzima PEPC se perdía sustancialmente; en cambio cuando se sustituyó el Tris-HCl por un amortiguador de fosfatos se pudieron detectar actividades tan bajas como 0.03 unidades totales tubo.

En la fig. 3.8 se presentan los resultados de este estudio electroforético y como se puede observar el zimograma obtenido confirma las conclusiones derivadas del perfil cromatográfico obtenido en DEAE-CELULOSA; es decir, las proteínas con actividad de PEPC que eluyeron a fuerza iónica baja en DEAE-CELULOSA (tipo PEPC-I) presentaron una movilidad relativa electroforética menor que las que eluyeron a fuerza iónica alta. Además, la enzima de hoja verde y el pico PEPC-I de hojas etioladas mostraron el mismo comportamiento electroforético. Del mismo modo, la enzima de tallo, raíz, callo y el pico PEPC-II de hoja etiolada se movieron idénticamente, mostrando así nuevamente, una total coincidencia en las características de ambos grupos de isoformas de PEPC.

Cuando se sometieron a electroforesis los extractos crudos de hojas etioladas no se detectó más que una banda de actividad, a pesar de que la cromatografía de intercambio iónico había revelado la presencia de dos formas. Este resultado es lógico si se tiene en cuenta la gran diferencia en cuanto a actividad que presentan los dos picos eluidos de DEAE-CELULOSA y que el proceso de revelado no se puede continuar por períodos prolongados para evitar el excesivo ensanchamiento de la banda teñida por difusión del oxalacetato. Por ello el tiempo de revelado óptimo para la forma mayoritaria era a todas luces insuficiente para detectar la pequeña proporción de la forma minoritaria.

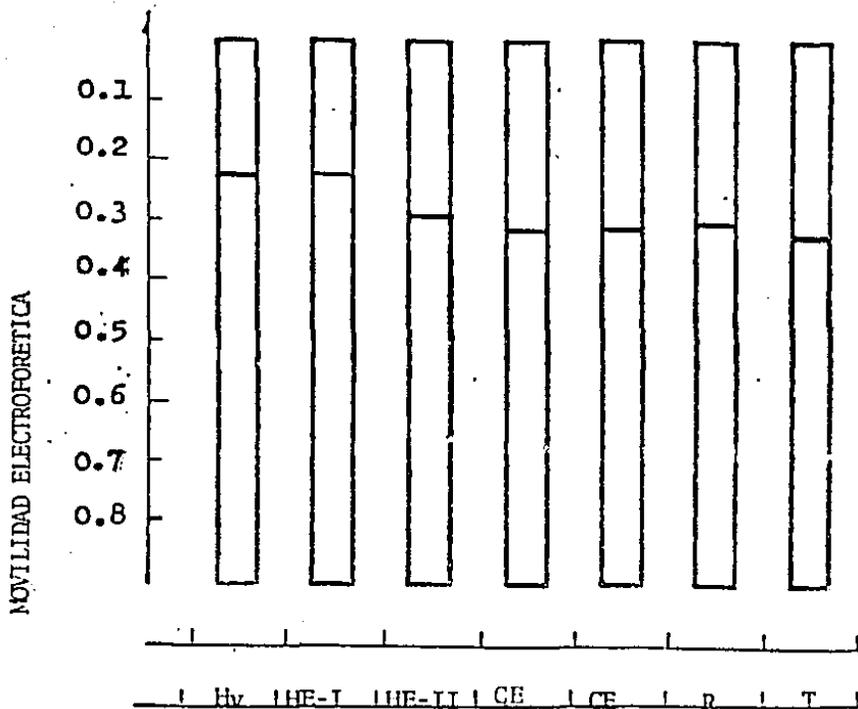


Fig. 3.8 PATRON ELECTROFORETICO DE LA ENZIMA PEPC DE HOJA VERDE (Hv),HOJA ETIOJADA (HE-I y HE-II),CALLO DE EMBRIONES, RAIZ(R), Y TALLO (T).

Las muestras aplicadas en todos los casos, correspondieron al precipitado 930-60%) de sulfato de amonio, resuspendido y dializado. La electroforesis en condiciones nativas se hizo en geles de poliacrilamida en tubo al 4% de T. Las proteínas con actividad de PEPC fueron detectadas por incubación de los geles en presencia de los sustratos y del colorante específico del producto de la reacción, violeta rápido B a pH 8.0.

Por otra parte, es importante señalar la identificación de las características de la actividad de PEPC extraída de callos con las características de la PEPC extraída de otros tejidos. Esto se hace más interesante (como discutiremos más adelante) si se tiene en cuenta que aún no se había estudiado esta actividad enzimática en callos de embriones de maíz.

### III.5.2 Gráfica de Ferguson de las Actividades Enzimáticas de hoja verde y callo de embriones.

Los resultados anteriores si bien confirmaron los resultados obtenidos en la cromatografía de intercambio iónico, no aportaron ninguna indicación acerca de una semejanza o diferencia en cuanto a peso molecular entre las dos isoenzimas. Para tratar de elucidar si presentaban diferencias en cuanto a su tamaño obtuvimos una gráfica de Ferguson de las formas de hoja verde y de callo de embriones (tomadas como representantes de las dos formas hasta este momento encontradas) mediante electrofóresis en condiciones no desnaturizantes y revelado específico por actividad de preparación de enzima parcialmente purificadas (Fig. 3.9).

La gráfica de Ferguson (90) que relaciona la movilidad relativa ( $R_f$ ) de proteínas con el tamaño del poro del gel (determinado por el % de T, el cual es definido como la suma total de acrilamida más bisacrilamida/100) es una gráfica de gran utilidad cuando se quiere caracterizar isoenzimas. La relación matemática del  $\text{Log}_{10}$  de  $R_f$  frente al % T

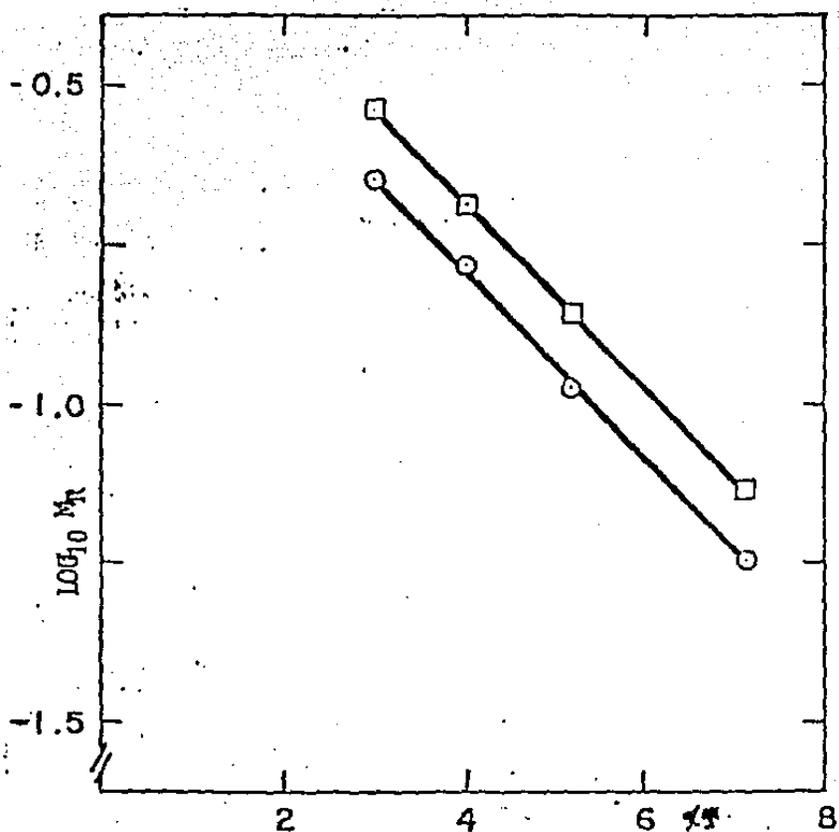


Fig. 3.9 GRAFICA DE FERGUSON PARA LA PEPC DE HOJA VERDE (□)  
Y CALLO DE EMBRIONES (○)

Los extractos precipitados con sulfato de amonio (30-60%) de hojas verdes y callo de coleoptilo después de ser resuspendido y dializados se sometieron a electroforesis en tubo bajo condiciones nativas usando geles de diferentes %T. Las bandas de proteínas con actividad de PEPC fueron detectadas mediante tinción específica empleando el colorante violeta rápido B :

es lineal. Puesto que esta gráfica refleja la movilidad durante la electroforesis cuando sólo el poro del gel se está variando, la pendiente de la recta obtenida es una medida de la resistencia que el gel impone al movimiento de la proteína y por tanto está relacionada con el tamaño molecular de esta. La intersección con el eje de las ordenadas ( $Y_0$ ) de la gráfica de Ferguson (cuando  $\% T = 0$ ) es una medida de la movilidad de la proteína en solución libre. Al graficar  $-\log_{10} R_f$  frente al  $\% T$  se obtuvieron un par de líneas paralelas, lo que es una fuerte indicación de que las dos proteínas tienen el mismo tamaño, pero diferentes movilidades libres en solución, es decir, diferente carga. Esto está de acuerdo con el hecho de que los pesos moleculares de las distintas PEPC, determinadas por cromatografía de filtración en gel difieren sólo ligeramente.

### III.5.3. Determinación del Peso Molecular de las Subunidades de las isoformas de PEPC de tejidos de maíz.

Utilizamos la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS con el objeto de determinar cuantas subunidades componían las isoformas de PEPC de los diferentes tejidos, así como su peso molecular.

Las proteínas desnaturalizadas (PEPC) aplicadas a electroforesis (PAGE-SDS) se obtuvieron tras su elución de los geles de poliacrilamida donde se había detectado su actividad empleando el colorante

específico Violeta Rápido B. Una vez eluídas de los geles y preparadas adecuadamente, las proteínas fueron sometidas a electroforesis tal como se explicó (en II.3.6.2)

Es interesante destacar el hecho de que la alternativa de obtener la muestra de PEPC de los diferentes tejidos a través de la elución de geles revelados por actividad permitió disponer de cantidades pequeñas de proteínas con un grado bajo de contaminación sin tener que seguir todas las etapas tradicionales de purificación de proteína. La cantidad de proteína eluída de estas bandas, fue muy pequeña, por lo que tras la electroforesis en presencia de SDS las bandas de proteína de los geles no pudieron ser detectadas empleando la tinción con Azul de Coomassie. Fue necesario implementar la técnica de tinción con el reactivo de plata, el cual es capaz de detectar hasta nanogramos de proteína. La sensibilidad de esta técnica de tinción es tal que las preparaciones comerciales de las proteínas usadas como patrones, supuestamente puras, al ser sometidas a electroforesis mostraban numerosas bandas teñidas, lo que hacía difícil la identificación de aquellas correspondientes a los patrones usados. Para solucionar este problema tuvimos que teñir los geles en primer lugar con Azul de Coomassie, y una vez identificados los patrones, (con esta técnica de tinción aparecen sólo las bandas mayoritarias correspondientes a los patrones aplicados) se hizo la tinción con el reactivo de plata para detectar las bandas de proteínas de las subunidades de PEPC. En los carriles en los que se aplicó PEPC de raíz tallo y callo también aparecieron va-

rias bandas de proteínas teñidas. Nosotros atribuimos la banda teñida más intensamente, y que al mismo tiempo estaba presente en todos los carriles, a la de las subunidades de la PEPC

Sin embargo, no pudimos tener certeza absoluta que así sea, puesto que este método de revelado no es cuantitativo y aparecieron otras bandas de peso molecular superior e inferior.

La fig. 3.10 es un diagrama de las principales bandas observadas al final de la electroforesis. En el primer carril, se observan bandas de proteínas correspondientes a los patrones de peso molecular conocido. En los demás carriles, se han dibujado las bandas de las subunidades de PEPC de los diferentes tejidos de acuerdo con su movilidad electroforética. Este patrón electroforético muestra una total identificación entre las subunidades de la enzima PEPC de hoja verde y la forma de "baja fuerza iónica" (PEPC-I) de hoja etiolada. De igual forma, las subunidades de la enzima de raíz, tallo, callo y PEPC-II de hoja etiolada presentaron el mismo  $R_f$ .

El valor del peso molecular estimado para las subunidades de la enzima de hoja verde y la de la forma PEPC-I de hoja etiolada es de 111, 511 daltones, mientras que el de las subunidades de PEPC de tallo, callos de embrión, raíz y PEPC-II de hoja etiolada es de 93, 061 daltones. (Fig 3.11)

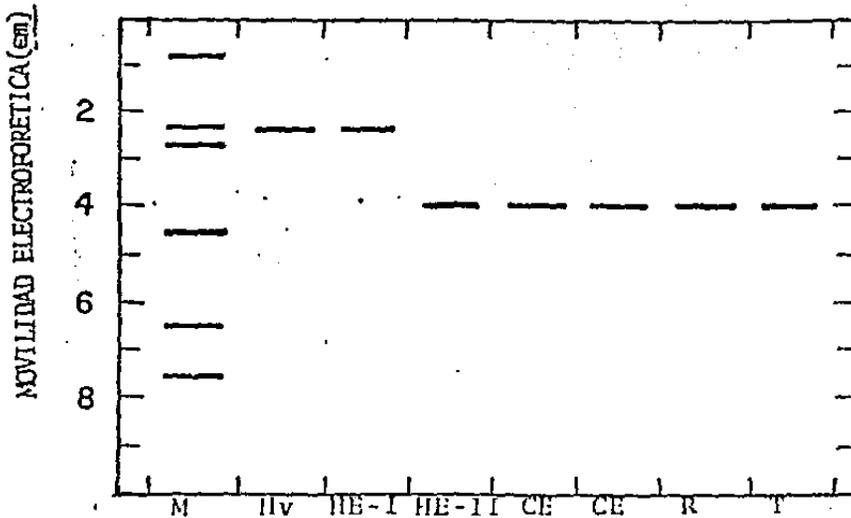


Fig. 3.10 PATRON ELECTROFORÉTICO DE LAS SUBUNIDADES DE LA PEPC DE HOJA VERDE (Hv), HOJA ETIOLADA (HE-I y HE-II), CALLO DE EMBRIONES (CE), RAIZ (R), TALLO (T) y MARCADORES (M).

Las bandas de proteínas que mostraron actividad de PEPC en electroforesis en condiciones nativas, fueron cortadas, homogenizadas y dializadas en presencia de SDS para lograr la elución de las proteínas. Después de centrifugar y desechar los restos de poliacrilamida, se sometió el sobrenadante, que contenía las proteínas eluidas, a PAGE-SDS en geles de 6% de T. Los pesos moleculares de las proteínas macadoras utilizadas fueron: Ovalbúmina (66,000), anhidrasa carbónica (29,000), fosforilasa (97,000), galactosidasa (116,000) y miosina (250,000).

Puesto que el valor de peso molecular de la proteína nativa de la forma de hoja verde encontrado en cromatografía en Sephadex G-200 fue de 400,000 daltones y el valor de la subunidad según electroforesis en presencia de SDS es de 111,000 daltones, podemos deducir que la proteína nativa es un tetrámero compuesto por cuatro subunidades idénticas como ha sido reportado por otros autores (40, 41, 42). Esto sería aplicable a la forma PEPC-I encontrada en hoja etiolada que posee características en todo semejantes a la de hoja verde, aún cuando en este caso no determinamos el peso molecular de la proteína nativa por filtración en gel. En lo que respecta a la otra isoenzima encontrada y caracterizada en raíz, tallo, hoja etiolada y callo, considerando el peso molecular estimado de las subunidades y de la proteína nativa (tomando como representantes a las formas de raíz y callo) podríamos concluir que está formada igualmente por cuatro subunidades.

Estos datos, unidos a los resultados anteriores (gráfica de Ferguson, electroforesis en condiciones nativas, cromatografía en DEAE-CELULOS y de filtración en gel) refuerzan la conclusión de que en los tejidos de maíz hay al menos dos isoenzimas de PEPC. Una de ellas está presente en todos los tejidos estudiados, con la posible excepción quizás, de hoja verde, aún cuando como ya mencionamos, también pudiera estar presente en este tejido puesto que el pequeño pico de actividad encontrado regularmente en cromatografía en DEAE-CELULOSA presentó un comportamiento muy similar al de los demás tejidos. La otra es una forma localizada exclusivamente en hoja, independientemente de que es-

ta sea fotosintética o no. Esta isoenzima es, sin embargo, inducible por luz puesto que la cantidad de ella presente en hojas verdes (medida como unidades de actividad enzimática/mg de proteína) es muy superior a la presente en hojas etioladas.

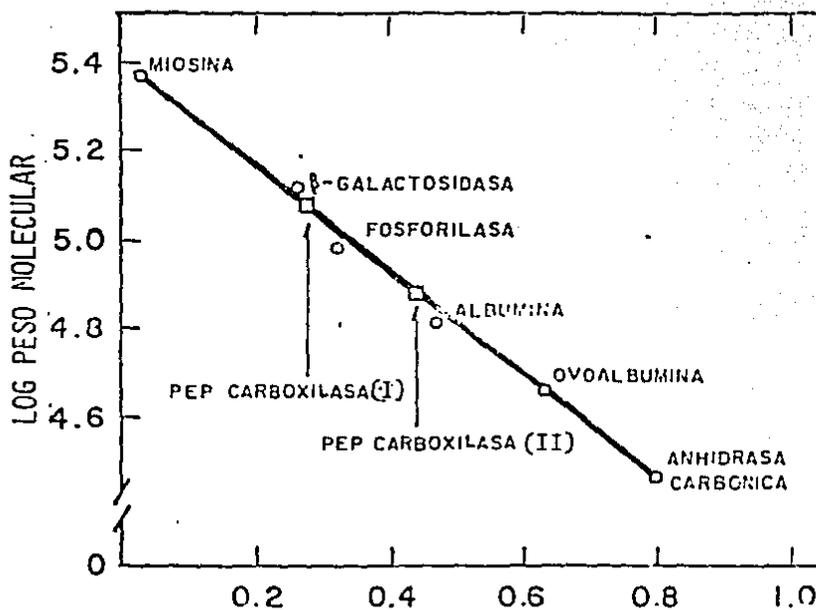


Fig. 3.11 DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LAS SUBUNIDADES DE LA PEPC DE HOJA VERDE (I), HOJA ETIOLADA (HE-I) (I), HOJA ETIOLADA (HE-II) (II), TALLO (II), CALLO DE EMBRION (II).

Esta gráfica fue obtenida con los datos hallados en los experimentos del mostrado en la fig. 3.10.

### III.6 ESTUDIOS INMUNOLOGICOS

#### III.6.1 Obtención de Anticuerpos Frente a la forma Enzimática encontrada en hoja verde

La presencia de anticuerpos específicos en el suero inmune fue comprobada en ensayos de inmunoprecipitación en capilares empleando como antígeno preparaciones crudas de PEPC de hoja verde.

Los anticuerpos parcialmente purificados demostraron ser monoespecíficos mediante la prueba de Ouchterlony de doble inmunodifusión en geles de agar, puesto que apareció una única banda de inmunoprecipitación al cruzar el anticuerpo con extractos crudos de hojas verdes.

Igualmente se hicieron placas en la que en el pocito central se aplicó una cantidad determinada de antígeno y en los circundantes cantidades decrecientes del antisuero y viceversa; De esta forma, se investigó la relación óptima antígeno-anticuerpo para obtener una línea de inmunoprecipitación definida y perfectamente visible tras la tinción. En la Fig. 3.12 se muestra una placa de agar con el resultado de un requerimiento de este tipo.

El suero de un animal no inmunizado fue incapaz de producir banda alguna de inmunoprecipitación cuando se sometió a la prueba de Ouchterlony conjuntamente con el antígeno (Ag) (extracto crudo de hoja verde).

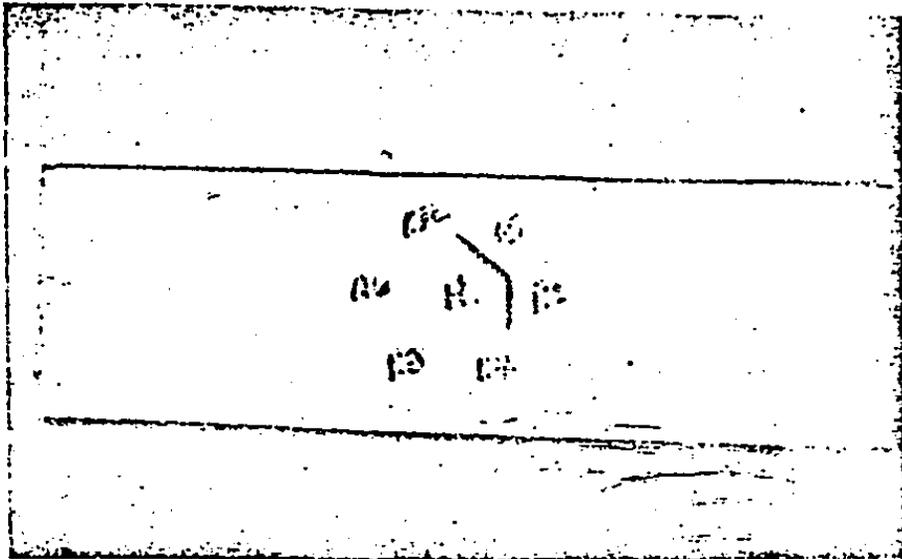


Fig. 3.12

Inmunoprecipitación en agar de PEPC de hoja verde con I<sub>g</sub>A obtenidos frente a una preparación pura de esta enzima. El pocillo central contenía los I<sub>g</sub>A y los circundantes cantidades variables del A<sub>g</sub> -- (PEPC en extracto crudo de hojas verdes).

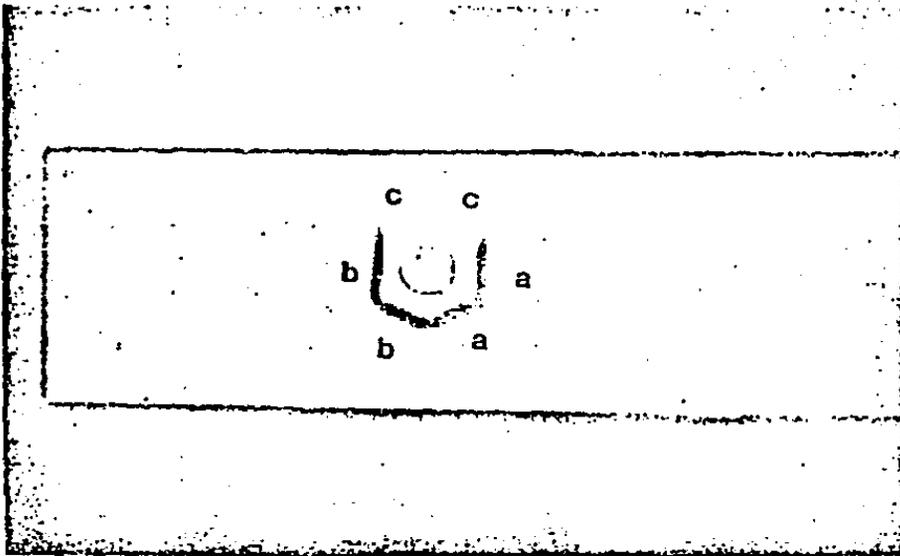


Fig. 3.13

Comparación inmunológica de las isoenzimas de PEPC de hoja y raíz de maíz. Los I<sup>g</sup>A fueron obtenidos frente a PEPC de hoja verde (pocillo central), a: PEPC de hoja verde b: PEPC-I de hoja etiolada; c: PEPC de raíz. Se usaron las preparaciones enzimáticas obtenidas tras DEAE-CELULOSA en las pocillos b y c.

### III.6.2 Determinación del grado de homología inmunológica existente entre las isoenzimas de PEPC de tejidos de maíz.

Las técnicas inmunoquímicas pueden en forma simple y económica medir el grado aproximado de semejanza de la secuencia de aminoácidos de las proteínas (es decir, su semejanza estructural), por lo que constituye una práctica alternativa a las técnicas mucho más difíciles y caras de secuenciación y comparación directa de la estructura primaria de las proteínas.

Por esta razón, nosotros hemos utilizado la prueba de doble difusión en agar de Ouchterlony y la de inmunotitulación de preparaciones con actividad PEPC con el fin de comprobar si las diferencias electroforéticas y cromatográficas encontradas se acompañan de diferencias inmunológicas.

#### III.6.2.1 Prueba de doble difusión en gel de Ouchterlony

Cuando se realizó la reacción de precipitación en gel de los anticuerpos del suero inmune parcialmente purificados (obtenidos frente a la enzima PEPC de hojas verdes) con extractos de PEPC del mismo tejido (precipitación del 30-60% con sulfato de amonio), se observó solamente una banda de precipitación definida y continua (Fig 3.13). Ello demuestra (como ya comentamos) que los anticuerpos obtenidos son monoespecíficos para la isoenzima de PEPC presente en hoja verde.

Para determinar si la PEPC-I de hoja etiolada que presenta características cromatográficas y electroforéticas similares de hoja verde posee también similares características inmunológicas, se compararon ambas isoenzimas mediante esta prueba. Los resultados (Fig. 3.13.) muestran que las líneas de precipitación que dan lugar a ambas preparaciones enzimáticas se funden completamente indicando una total identidad inmunológica y sugiriendo identidad molecular, en términos del antisuero usado. Por el contrario, no se observaron líneas de precipitación cuando se difunde el suero frente a las formas enzimáticas de callos, raíz, o tallo o a la forma minoritaria (PEPC-II) obtenida tras cromatografía en DEAE-CELULOSA de extractos de hoja etiolada.

En todos los casos se aplicaron en los pocitos las mismas unidades de actividad enzimática, como una forma de aplicar aproximadamente la misma cantidad de enzima ya que numerosos datos de la bibliografía indican que PEPC purificadas de muy diferentes orígenes poseen una actividad específica en estado puro muy similar y cercana a 25 unidades/mg de proteína (40, 43, 44).

Por ello podemos concluir que la ausencia de precipitados no se debió a escasez de antígeno, sino a que no existen determinantes antigénicos en común entre las dos isoenzimas encontradas en maíz.

### III.6.2.2 Inmunoprecipitación de la PEPC con Anti-PEPC de Hojas verdes.

Con el fin de corroborar la ausencia de reactividad entre las dos isoenzimas, hemos examinado la precipitación de la actividad PEPC de preparación parcialmente purificadas de hoja verde y de raíz (tomadas ambas como representantes de las dos isoenzimas encontradas) por el suero anti-PEPC de hoja verde, siguiendo el procedimiento descrito en Métodos. Como puede observarse (Fig. 3.14) la actividad enzimática de hojas verdes es completamente precipitada por el anticuerpo (10 microlitros bastan para precipitar 0.125 unidades de actividad enzimática), mientras que el mismo anticuerpo no tiene efecto sobre la actividad de la enzima de raíz incluso a concentraciones mucho más altas que las que producen total precipitación de la de hoja. Todas las incubaciones se hicieron en ambos casos por duplicado y con las mismas unidades iniciales de actividad enzimática. El suero control (obtenido de animal no inmunizado) no modificó la actividad soluble de ninguna de las dos carboxilasas durante el período de incubación. Este resultado proporciona un nuevo apoyo a la conclusión deducida de la prueba de Ouchterlony de la existencia de considerables diferencias estructurales entre estas isoenzimas.

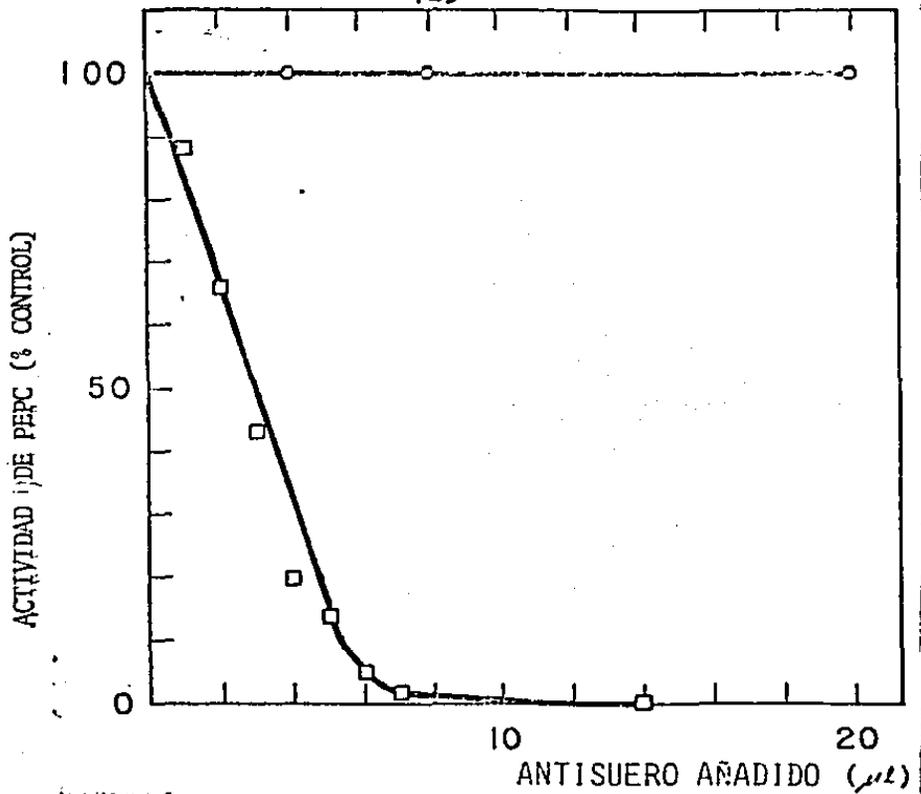


Fig. 3.14 INMUNOPRECIPITACION DE PEPC DE HOJA VERDE (□) Y DE RAÍZ (○)

Cantidades constantes de actividad de PEPC se incubaron con diferentes volúmenes de antisuero. Al mismo tiempo se empleó suero no inmune como control. La incubación se llevó a cabo a 4<sup>o</sup>C durante 18 horas en un amortiguador salino a pH 7.2 tras lo cual se centrifugó, y los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para medir actividad residual de PEPC.

**TABLA 3.5 RESUMEN CARACTERISTICAS DE LA ENZIMA PEP-CARBOXILASA DE DIFERENTES TEJIDOS DE MAIZ OBTENIDAS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO**

	Elución en DEAE- CELULOSA ( [ KCl ] mM)	R <sub>f</sub> en PAGE	R <sub>f</sub> en PAGE_SDS	Peso molecular estimado de las subunidades (daltons)
PEPC hoja verde	104*	0.216	0.266	120,266
PEPC-I hoja etiolada	107**	0.215	0.266	120,266
PEPC-II hoja etiolada	170***	0.291	0.435	75,845
PEPC Tallo	157	0.305	0.435	75,845
PEPC Raíz	150	0.310	0.435	75,845
PEPC Callo embrión	160	0.308	0.435	75,845

\* Un segundo pico no muy definido, eluyó a 168 mM

\*\* Representa el 97% de la actividad total eluida de PEPC

\*\*\* Representa el otro 3% de la actividad total eluida de PEPC

#### IV. DISCUSSION

#### IV. DISCUSION

Los estudios de Ting y Osmond (42, 52) demostraron de manera clara la existencia de diferencias significativas a nivel cinético y molecular entre las formas enzimáticas con actividad PEPC extraídas de diferentes orígenes (hojas de plantas  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM o tejidos no fotosintéticos), iniciando y mostrando así un importante camino a seguir para abordar el estudio de la regulación de los metabolismos intermediario y fotosintético en la que esta actividad enzimática interviene, así como para el estudio de la historia evolutiva de estas formas enzimáticas. Estos autores concluyeron a partir de sus resultados que las diferencias observadas entre especies moleculares con actividad PEPC se debían a la función que realizan en diferentes tejidos y justificaban su particular función en una ruta metabólica o en otra, conclusión que hoy es considerada correcta.

Resulta lógico pensar que si queremos llegar a entender los aspectos regulatorios de las rutas metabólicas en las que participa la enzima PEPC, lo primero que hay que hacer es caracterizar de la manera más completa posible sus isoenzimas, puesto que sobre sus distintas características moleculares ha de basarse la regulación diferencial de estas rutas. Al mismo tiempo como apuntábamos anteriormente, estos estudios comparativos a nivel molecular posiblemente nos indicarán la proximidad o lejanía evolutiva existente entre las formas actuales de la enzima PEPC.

A este respecto, los resultados descritos en esta tesis que discutiremos a continuación a la vista de los estudios ya publicados por otros autores, si bien son limitados, tienen el valor de confirmar algunos hechos ya publicados y de aportar nuevos datos e interrogantes que servirían de base para investigaciones futuras.

La primera caracterización de las isoenzimas de PEPC llevada a cabo por Ting y Osmond (42, 52) se basó exclusivamente en criterios cinéticos (valores de  $V_{max}$  y  $K_m$ ) de una muestra amplia de especies y en criterios cromatográficos (comportamiento en una columna de intercambio iónico de las preparaciones enzimáticas crudas). Por lo que respecta a esta tesis merecen comentarse los resultados que ellos obtuvieron con hojas verdes y etioladas y con raíz de maíz. De acuerdo con Ting y Osmond, el pico de actividad de la forma enzimática presente en hoja de plantas etioladas eluye de una columna de DEAE-CELULOSA a una fuerza iónica inferior a la que eluye el pico de actividad de la forma enzimática presente en hoja verde. Basándose en que no encontraron ninguna actividad PEPC en los extractos de hoja etiolada que eluya en la región en la que la hace la actividad PEPC de extractos de hoja verde, y viceversa, y en que en experimentos realizados con extractos de hojas expuestas por períodos crecientes de tiempo se observó un aumento progresivo del valor de fuerza iónica al que eluye el pico de actividad hasta alcanzar el valor típico de hoja verde, postularon que el enverdecimiento lleva consigo una conversión, por modificación, de la forma existente en

la hoja etiolada a la forma existente en hoja verde. Por otra parte, encontraron que la enzima de raíz queda más fuertemente retenida en la columna, eluyendo a valores de fuerza iónica bastante superiores a las que eluyen las enzimas de hoja etiolada o verde. Nuestros resultados usando estos tejidos difieren notablemente de la de estos autores, puesto que nosotros encontramos que la actividad de extractos crudos de hoja etiolada eluye en dos picos tras cromatografía en DEAE-CELULOSA (PEPC I,II) mientras que sólo pudimos encontrar un pico de actividad al cromatografiar los extractos crudos de hoja verde, eluyendo este a un valor de fuerza iónica que razonablemente coincide con el primer pico de hojas etioladas (PEPC-I). Debemos hacer notar, sin embargo, que en repetidos experimentos cromatográficos encontramos de forma consistente en extractos de hojas verdes un "hombro" o pequeño pico a valores de fuerza iónica mayores a las del pico mayoritario que bien pudiera corresponder a la forma PEPC II de extractos de hojas etioladas, pero cuya caracterización siguiendo otros criterios no se llevó a cabo, por lo que no podemos concluir inequívocamente que se trate de la misma forma enzimática.

Por último, como volveremos a discutir más adelante, el pico de actividad PEPC de raíz concide con el PEPC-II de hoja etiolada, Es de hacer notar que nuestros experimentos cromatográficos fueron realizados controlando y estandarizando, en la medida de lo posible, todas las condiciones experimentales que pueden, de ser modificadas, conducir a la producción de artefactos. Así, las columnas usadas fueron en todos los casos del mismo tamaño y se aplicaron cantidades iguales

de proteína y de actividad PEPC en los diferentes experimentos. Por tanto, las discrepancias entre nuestros resultados y los de Ting y Osmond, podrían deberse, al menos en parte, a que estas variables no fueron controladas en su estudio y por ello no son confiables los datos que obtuvieron respecto a la posición del pico eluído de las formas de PEPC.

Por el contrario, nuestros resultados coinciden con los de Hayakawa y col. (59) quienes años más tarde, estudiaron el cambio cualitativo y cuantitativo que la enzima PEPC sufre cuando la planta pasa de la oscuridad a la luz, y a diferencia de Ting y Osmond, concluyeron que la luz induce síntesis de nueva enzima. Hayakawa et al encontraron dos isoformas (PEPC-I, PEPC-II) tras cromatografía en DEAE-CELULOSA de extractos de hojas etioladas y un sólo pico de actividad en hojas verdes, cuya elución relativa a otra enzima usada como marcador interno, la hacía corresponder con PEPC-I. Al igual que bajo nuestras condiciones experimentales, la actividad de PEPC-I era la mayoritaria en el extracto de hoja etiolada. El que no se encontrase el pico de actividad, correspondiente a PEPC-II en hoja verde puede deberse a que esta actividad aún cuando esté presente es menor que PEPC-I (Fig. 3.2 de este estudio) y es muy pequeña para ser detectada (téngase en cuenta que el enverdecimiento supone un notable incremento de la cantidad de proteínas con actividad PEPC-I). Alternativamente existe la posibilidad de que la luz o el proceso natural de desarrollo de la planta, de alguna manera altere la velocidad de recambio de ambas for

mas enzimáticas conduciendo a un descenso de la actividad PEPC-II hasta valores no detectables y, al mismo tiempo a un gradual incremento de la actividad PEPC-I, como ya ha sido descrito para el cambio que en los valores relativos de su actividad sufren otras isoenzimas (94).

De cualquier forma, el poder asegurar que la forma enzimática PEPC-II está o no presente en hoja verde tiene que esperar a los resultados de investigaciones futuras. La disponibilidad de anticuerpos específicos frente a esta forma permitiría posiblemente detectarla, si está presente en en hojas verdes.

Resultados similares en cuanto al patrón de elución relativo en cromatografía de intercambio iónico de las formas enzimáticas características de hoja verde y hoja etiolada, son los publicados por Goatly y Smith (56) en caña de azúcar y muy recientemente (después de que el trabajo experimental que se describe en esta memoria ya había sido concluído), por Vidal y Gadal en Sorgo (63) y en maíz (139) todas ellas especies  $C_4$ . En estos estudios se encontró que la forma típica de hoja verde eluye de una columna de intercambio iónico a fuerza iónica menor que lo que lo hace la forma enzimática característica de hoja etiolada. Ello parece indicar que este comportamiento cromatográfico es una característica propia de la enzima asociada a fotosíntesis en hojas de plantas  $C_4$  y que la diferencia claramente de la forma anaplética existente en hoja etiolada. De acuerdo con nuestros resultados que en este punto coinciden con los de Hayakawa y col. pero difieren

de los de Vidal y Gadal y de los de Goatly y Smith, esta forma fotosintética se está expresando en hoja aún cuando la planta haya sido crecida en la oscuridad, si bien la iluminación se traduce en un incremento de varias veces de la cantidad presente de esta isoenzima como ha sido demostrado inequívocamente por Kobayashi y col. (102), Hayakawa y col. (59) y Hague y Sims (103, 105). Queda sin respuesta la pregunta de en qué momento del desarrollo de la plántula aparece esta forma enzimática que obviamente está implicada en el metabolismo autótrofo. Es de esperar que durante el período heterótrofo de la vida de la planta sea la forma anaplerótica la predominante, si no la única presente. Cabría la posibilidad de que la síntesis de la forma "fotosintética" sea inducida no sólo por luz, sino por el estado nutricional o de desarrollo de la planta. Ello justificaría su presencia en plantas etioladas (téngase en cuenta que el estudio en este caso se realizó con plantas que ya contaban con 12-15 días de edad). Lógicamente, se necesitan estudios adicionales para confirmar o rechazar esta hipótesis.

Además de confirmar algunos de los datos de Hayakawa y col., en el trabajo que aquí presentamos, nosotros extendimos estas observaciones con estudios electroforéticos, los que permiten distinguir claramente entre ambas formas enzimáticas, ya que presentan en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes una movilidad relativa distinta, concordante con la densidad de carga que habían demostrado en la cromatografía de intercambio iónico. Además determinamos el

peso molecular de sus subunidades, lo que, según nuestro conocimiento, no se había hecho hasta la fecha con la enzima característica de hoja etiolada (PEPC-II). Los valores de peso molecular hallados para las subunidades de la enzima presente en hoja verde (PEPC-I), están de acuerdo con los publicados por Uedan y Sugiyama (40) para enzima de hoja verde de maíz.

Por lo que respecta a los resultados que obtuvimos al estudiar otros tejidos de maíz, resulta a nuestro juicio muy interesante el hallazgo de que la única forma de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa que estos tejidos parecen poseer presentan características en todo similares a la forma típica de hoja etiolada en cuanto a los parámetros estudiados (peso molecular, comportamiento cromatográfico, electroforético e inmunológico). De estos resultados, se puede concluir que en maíz, existen únicamente dos isoenzimas de PEPC, una anaplérica presente en cualquier tejido, con la posible excepción, ya discutida, de hoja verde, y otra fotosintética, presente en hoja.

Cabe destacar que aunque son varios los trabajos existentes a la bibliografía sobre la enzima PEPC de raíz de maíz (137, 140), ninguno de ellos ha consistido en un estudio electroforético, ni inmunológico. Por tanto, los datos relativos a su movilidad en electroforesis no desnaturizante en geles de poliacrilamida, al peso molecular de la proteína nativa y de sus subunidades y a su falta de reactividad con los anticuerpos anti-PEPC de hoja verde son totalmente originales

de este trabajo. Lo mismo podemos decir de los estudios realizados sobre la enzima de tallo y de callo sobre los que, por lo que nosotros sabemos, no se había realizado ningún tipo de estudio hasta la fecha.

La presencia de varias formas de una enzima plantea preguntas acerca de la naturaleza de este polimorfismo, lo que es de gran importancia para comprender la regulación de esa actividad y el origen y desarrollo evolutivo de estas formas, las proteínas variantes pueden presentar solo pequeñas diferencias en estructura terciaria que serían suficientes para afectar su movilidad electroforética o su comportamiento en cromatografía de intercambio iónico pero que no afectaría suficientemente la funcionalidad de la enzima. Por lo que respecta a la actividad enzimática objeto de este estudio, la enzima PEPC las conocidas e importantes diferencias que existen entre las isoformas a nivel funcional puestas de manifiesto por otros autores (52, 59, 63) parecen sugerir que deben existir entre estas isoformas diferencias estructurales mayores.

En principio, nuestro hallazgo de que el peso molecular de las isoformas en su estado nativo era prácticamente coincidente, parecía hablar en forma de pequeñas diferencias estructurales, pero un estudio más profundo reveló diferencias importantes en cuanto a sus propiedades inumológicas. El grado de semejanza estructural entre las isoenzimas, puede determinarse por análisis inmunológicos, entre otros métodos. La ausencia de la acción cruzada de los anticuer

pos anti-PEPC de hoja verde con las otras PEPC debe interpretarse en el sentido de que hay un grado considerable de diferencia estructural entre estas dos formas enzimáticas, puesto que se considera que dos proteínas que difieran en su secuencia de aminoácidos en más de un 40% generalmente no exhiben reactividad cruzada (106).

Debemos puntualizar que, a este respecto, nuestros resultados difieren de los de Hayakawa y Col. (59) que sí encuentran un cierto grado de reconocimiento entre la forma PEPC-II de hoja verde también de maíz y de los dos de Vidal y Gadal (104) que en sorgo encontraron igualmente reacción cruzada entre las formas enzimáticas de hoja etiolada y los anticuerpos anti-PEPC de hoja verde. Por otra parte, Perrot-Rechnmann y Col. (110) reportan la existencia de características inmunológicas comunes entre las PEPC extraídas de orígenes tan diversos como hoja y raíz de especies  $C_4$ ,  $C_3$ , y CAM, puesto que según estos autores, al suero obtenido frente a la isoenzima de hoja de una especie  $C_4$  reconoce a todas las carboxilasas citadas.

Hemos de señalar que en los estudios inmunológicos descritos en esta memoria utilizamos como antígeno la forma fotosintética PEPC-I de hoja verde, purificada cuidadosamente, no sólo para eliminar proteínas contaminantes, sino también la forma PEPC-II, aunque como discutimos anteriormente su presencia en extractos de hoja verde está aún por demostrar.

Basándonos en nuestros resultados, concluimos que las dos isoen-

zimas encontradas en maíz son realmente entidades moleculares totalmente distintas, y es tentador pensar, que la forma fotosintética específica de hoja apareció como un carácter  $C_4$  al mismo tiempo que este metabolismo, sin que exista una relación evolutiva con la forma anaplerótica.

De haber existido una relación evolutiva entre las dos formas de -- PEPC de maíz, los determinantes antigénicos deben haberse perdido, cambiado o enmascarado, de manera que no son ya reconocibles en las isoenzimas actuales. Si este fuera el caso, estas isoenzimas deberían haber estado sometidas a una fuerte presión de mutación o selección. Por otra parte hasta que no se consigan anticuerpos frente a la isoenzima PEPC-II, no se puede descartar la posibilidad de que algunos determinantes reconocidos por el suero anti-PEPC-II puedan dar reacción cruzada con PEPC-I.

## V. CONCLUSIONES

## V. CONCLUSIONES

1. Se ha podido detectar de manera clara una sola especie molecular de la enzima PEPC (PEPC-I) en hoja verde de maíz.
2. En hoja etiolada de maíz se han encontrado dos formas moleculares de esta enzima (PEPC-I y PEPC-II), siendo una de ellas en todo semejante a la encontrada en hoja verde, aún cuando en tejido etiolado presenta una actividad considerablemente menor.
3. En extractos de raíz, tallo y callo (procedentes de embriones de maíz) está presente una forma enzimática que en cuanto a peso molecular de la proteína nativa y de sus subunidades y en cuanto a criterios cromatográficos, electroforéticos e inmunológicos son indistinguibles entre sí y con la forma presente en hoja etiolada (PEPC-II).
4. Ambas formas enzimáticas encontradas en los diferentes tejidos estudiados (PEPC-I y PEPC-II) presentan fuertes diferencias estructurales, como se pone de manifiesto por la ausencia de reacción cruzada con los anticuerpos anti-PEPC-I.

## CONCLUSION. GENERAL

Se demuestra que en maíz existen al menos dos isoenzimas de PEPC, que por su distribución deben estar asociadas a funciones metabólicas tan diferentes como la asimilación fotosintética del  $\text{CO}_2$  atmosférico (típicamente autótrofo) y la participación en el metabolismo anaplerótico (heterótrofo). Por otra parte, se ha puesto de manifiesto que las diferencias estructurales entre ambas isoenzimas son tales que parecen indicar un origen evolutivo no común.

## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

1. O'Leary, M. H., 1982  
Phosphoenolpyruvate Carboxylase: An Enzymologists View.  
Ann Rev Plant. Physiol. 33:297-315.
2. Jennesland, B., Tchen, T., Loewus, F., 1954  
Mechanism of enzymatic carbon dioxide fixation into  
oxalacetate, J. Am. Soc. 76:3358-3359.
3. Bandurski, R. S. y Greiner, C.M. 1953.  
The enzymatic aynthesis of oxalacetate from phosphonolpyruvate  
and carbon dioxide. J. Biol. Chem. 204:781-786.
4. Bandurski, R.S., Greiner, C.M. y Bonner, J., 1973.  
Enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate to oxalacetate  
Fed. Proc. 12:173.
5. Bandurski, R.S., 1955.  
Further studies on the enzymatic synthesis of oxalacetate  
from phosphoenolpyruvate and carbon dioxide, J. Biol. Chem.  
217:137-150.
6. Utter, M. F. y Kolenbrander, H. M., 1972.  
Formation of oxalacetate by CO<sub>2</sub> fixation on phosphoenolpyruvate.  
In: The Enzymes, ed. P.D. Boyer, 6:117-136; 3rd. ed.
7. Cooper, T. G. y Wood, H.G., 1971.  
The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate. The active  
species of "CO<sub>2</sub>" utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate  
carboxylase. J. Biol. Chem. 246:5488-5490.
8. Ting, I. F., 1968.  
CO<sub>2</sub> metabolism in corn roots. III. Inhibition of phosphoenolpyru  
vate carboxylase by L-malate. Plant Physiol. 43:1919-1924.
9. Davies, D. D., 1973.  
Control of and by pH Symp. Soc. Exp. Biol. 27:513-529.

- 9a. Bonugli, K.D., y Davies, D.D., 1977.  
The regulation of potato phosphoenolpyruvate carboxylase in relation to metabolic pH-Stat. *Planta* 133:281-287.
- 9b. Davies, D.D., 1979,  
The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30:131-158.
10. Rasckke, K. y Humble, C.D., 1973.  
No uptake of anions required by opening stomate of Vicia faba; guard cells release hydrogen ions. *Planta* 116:47-57
11. Allaway, W.C., 1973.  
Accumulation of malate in guard cells of Vicia faba during stomatal opening. *Planta* 110:63-70.
12. Cleland, R. 1976.  
Fusicoccin-induced growth and hydrogen ion excretion of avena coleoptiles: relation to auxin response. *Planta* 128: 201-206.
13. Stout, R.C., Johnson, D.A., y Rayle, D.L., 1978.  
Rapid auxin and fusicoccin-enhanced Rb<sup>+</sup> uptake and malate synthesis in avena coleoptile sections. *Planta* 139:34-41.
14. Haschke, H.P., y Luttge, J., 1975.  
Stoichiometric correlation of malate accumulation with auxin dependent K-H exchange and growth in avena coleoptile segments. *Plant, Physiol.* 56:696-698.
15. Johnson, K.D., y Rayle, D.L., 1976.  
Enhancement of CO<sub>2</sub> fixation in avena coleoptile by fusicoccin. *Plant Physiol.* 57:806-811.
16. Hill, B.C., y Bown, A.W., 1977,  
Phosphoenolpyruvate carboxylase activity from avena coleoptile tissue. Regulation by H<sup>+</sup> and malate, *Can. J. Bot.* 56:404-407.

17. Smith, C.E., y Bown, A.W., 1981.  
The regulation of oat coleoptile phosphoenolpyruvate carboxylase. Kinetic evidence for and against a metabolic pH-stat. *Can. J. Bot.* 59:1397-1404.
18. Jacoby, C., y Laties, C.G., 1971.  
Bicarbonate fixation and malate compartmentation in relation to salt-induced stoichiometric synthesis of organic acid. *Plant Physiol.* 47:525-531.
19. Marre, E., Lado, P., Rosi Cadongo, F. y Colombo R., 1973.  
Correlation between cell enlargement in internode segments and decrease in the pH of medium of incubation. I. Effects of fusicoccin, natural and synthetic auxins and mannitol. *Planta Sci. Lett.* 1:179-184.
20. Kornberg, H.K. 1966. Anaplerotic Sequences and their role in Metabolism. *Essays in Biochemistry*, Vol. 2 Campbell, P.N. y Greville, G.D., eds. Academic. Press. London; 1-31.
21. Willner, C., Kanai, R., Pallas, S.E. y Black, C.C. Jr. 1973.  
Detection of high levels of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaf epidermal tissue and its significance in stomatal movements. *Life Sci.* 12:151-155.
22. Jabobson, L. 1955.  
Carbon dioxide fixation and ion absorption in barley roots. *Plant Physiol.* 30:264-269.
23. Jackson, W.A. y Coleman, H.T. 1959. Fixation of carbon dioxide by plants roots through phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant. Sci.* 11:1-16.
24. Chisteller, J.T., Laima, W.A. y Sutton, W.D. 1977.  
Carbon Dioxide fixation by lupin root nodules. Characterization, association with phosphoenolpyruvate carboxylase, and correlation with nitrogen fixation during nodule development. *Plant Physiol.* 60:47-50.

25. McClure, P.R. Cooker, G.T.I. y Schubert, K.R. 1983.  
Carbon dioxide fixation in roots and nodules of Alnus glutinosa I. Role of phosphoenolpyruvate carboxylase and carbonyl phosphate synthetase in dark CO<sub>2</sub> fixation, citrulline synthesis and N<sub>2</sub> fixation, Plant Physiol. 71:652-657.
26. Outlaw, W.H.Jr. y Lowry, O.H., 1977.  
Organic acid and potassium accumulation in guard cells during stomatal opening. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:4434-4438.
27. Outlaw, W.H. Jr., Manchester, J. y Dicamelli, C.A., 1979.  
Histochemical approach to properties of Vicia faba guard cell phosphoenolpyruvate carboxylase. Plant Physiol. 64:269-272.
28. Perl, M., 1978.  
Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in cotton and sorghum seeds and its relation to seedling development. Planta 139: 239-243.
29. Smith, C.E., Doo, A., y Bown, A. W. 1978.  
The influence of pH on kinetic parameters of coleoptile PEP Carboxylase. Relationship to auxin-stimulated dark fixation. Can. J. Bot. 57:543-547.
30. Hatch, M. D., 1976.  
The C<sub>4</sub> pathway of photosynthesis: mechanism and function, In: CO<sub>2</sub> metabolism and plant productivity, R.H. Burris and C.C. Black eds. pp.59-81 Univ. Park Press, Baltimore, Maryland.
31. Good, M.E. y Bell, D.H., 1980.  
Photosynthesis, Planta Productivity and Crop Yield, in The Biology of Crop Productivity (P. S. Carson ed.) pp 3-51 Academic Press, New York.
32. Kluge, M. y Ting. P.,  
Crassulacean acid metabolism pp. 73-79 Springer- Verlag, Heidelberg New York.

33. Osmond, C.B., 1978  
Crassulacean Acid Metabolism:  
A curiosity in Context, Ann. Rev. Plant Physiol,  
29:379-444.
34. Osmond, C.B. y Holtum, J.A.M. 1981  
Crassulacean Acid Metabolism, in: Biochemistry of  
Plants ed. P.K. Stumps, E. E. Conn. 8:283-328. Ney York  
Academic Press.
35. Hatch, M.D., 1978  
Regulation of enzymes in C<sub>4</sub> Photosynthesis,  
Curr, Top. Cell. Regul. 14:1-27.
36. Walker, B.A., 1957  
Physiological Studies on Acid Metabolism. Phosphoenolpyruvate  
Carboxylase activity in extracts of Crassulacean plant.  
Biochem J. 67:73-79.
37. Danner J. y Ting. J.P., 1967  
CO<sub>2</sub> Metabolism in Corn Roots. II. Intracelular distribution  
of enzymes. Plant Physiol. 42:719-724.
38. Perchorowitz, J. T. y Gibbs, M., 1980  
Carbon dioxide fixation and related properties in sections  
of the developing green maize leaf. Plant Physiol;  
63:802-809.
40. Uedan, K. y Sugiyama, T., 1976  
Purification and characterization of phosphoenolpyruvate  
carboxylase from maize leaves. Plant Physiol. 57:906-910.
41. Mares, J. y Leblova, S., 1980  
Phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of maize, sor-  
ghum and millet. Photosynthetica 14:25-31.
42. Ting., I.G. y Osmond, C.B., 1973  
Photosynthetic Phosphoenolpyruvate Carboxylases. Charac-  
teristics of alloenzymes from leaves of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants.  
Plant Physiol. 51:439-447.

43. Jones, R., Wilkims, M.B., Coggins, J.R., Fewson, C.A. y Malcon, A.D.B., 1978  
Phosphoenolpyruvate Carboxylase from the Crassulacean Plant Bryophyllum fedtschenkoi Hamet et Perrier, Purification, molecular and kinetic properties  
Biochem. J. 175:391-466.
44. Maruyama, H., Easterday, R.C., Chama, H.C. y Lane, M.D., 1966  
The enzymatic Carboxylation of Phosphoenolpyruvate. Purification and Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxylase.  
J. Biol. Chem. 241:2405-2412
45. Miziorko, H.M., Mowak, T. y Mildam., A.S., 1974  
Spinach leaf Phosphoenolpyruvate Carboxylase: Purification, Properties and Kinetic Studies. Arch. Biochem. Biophys. 163:378-379.
46. Smith., C.E., 1968  
Partial Purification and Characteristics of Potato Phosphoenolpyruvate Carboxylase. Arch Biochem. Biophys. 125:178-188.
47. Manetas, Y. y Gavalas, N.A., 1982  
Evidence for Essential Sulfhydryl Group (s) in Photosynthetic Phosphoenolpyruvate Carboxylase: Protection by Substrate, Metal-substrate and Glucose 6-Phosphate against p-Chloromercuribenzoate Inhibition. Photosynthetica 16:59-66.
- 47b. Gavalas, N.A., Caravatas S. y Manetas Y., 1981  
Sigmoid rate curves of photosynthetic (C<sub>4</sub>) PEPC carboxylase as an artifact of the assay: factores affecting inactivation- reactivation of the enzyme. Photosynthesis IV, A. Akoyunogloge (Ed) Balaban International Science Services, Philadelphia. p. 81.
- 47c. Gavalas N.A., Caravatas S. y Manetas, Y., 1982  
Factors affecting a fast and reversible inactivation of photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase. Photosynthetica 16 (1) 49-58.
48. Manetas, Y., y Gavalas, N.A., 1983  
Reduced Glutathione as an Effector of Phosphoenolpyruvate Carboxylase of the Crassulacean Acid Metabolism Plant Sedum praealtum D.C., Plant Physiol. 71:187-189.

49. Perrot, C. Vidal, J., Burlet, A., y Gadai, P., 1981  
On the Cellular Localization of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Sorghum Leaves. *Planta* 151:226-231.
50. Francis, K., 1979  
Photosynthesis by Isolated Chloroplasts of Sorghum vulgare  
*Experientia* 35:1324-1326.
51. Schnarrenberger, C. Grob., B., Burckhard, C.H., y Herbert M. 1980  
Cell Organelles from Crassulacean Acid Metabolism (CAM) Plants. Compartmentation of Enzymes of the Crassulacean Acid Metabolism. *Planta* 147:477-484.
52. Ting, I.P. y Osmond, C.B., 1973  
Multiple Forms of Plant Phosphoenolpyruvate Carboxylase Associate with Different Metabolic Pathways. *Plant Physiology*. 51:448-453.
53. Mukerji, S.K. y Ting, J.P., 1971  
Phosphoenolpyruvate Carboxylase Isoenzymes: Separation and Properties of Three Forms Cotton Leaf Tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* 143:297-317.
54. Vidal, J., Cavalie, G. y Gadai, P., 1974  
Mise en evidence de formes isofonctionnelles de la PEP Carboxylase chez Phaseolus vulgaris L. *Physiol. Veg.* 12:175-188.
55. Vidal, J. y Cavalie, G., 1976  
Etude de la Phosphoenolpyruvate Carboxylase Du Haricot et du Sorgho. Electrophorese sur gel de polyacrylamide, *Plant Sci. Letter.* 7:265-270.
56. Goatly, M.B. y Smith, H., 1974  
Differential Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxylase from Etiolated and Green Sugar Cane. *Planta* 117:67-73.
57. Goatly, M.B., Coombs, J. y Smith, H. 1975  
Development of C<sub>4</sub> Photosynthesis in Sugar Cane: Change in Properties of PEP Carboxylase during Greening. *Planta* 125: 15-24.

58. Mukerji, S.K., 1977  
Corn Leaf Phosphoenolpyruvate Carboxylase: Purification and Properties of two Isoenzymes. Arch. Biochem. Biophys. 182: 243-351.
59. Hayakawa, S., Matsunaga, K. y Sugiyama, T., 1981  
Light Induction of Phosphoenolpyruvate in Etiolated Maize Leaf Tissue. Plant Physiol. 67:133-138.
60. Wilkinson, M.J. y Smith. H., 1976  
Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxylase from Bryophyllum fedtschenkoi Leaves and Fluctuations in Carboxylase Activity During the Endogenous Rhythm of Carbon Dioxide Output. Plant Sci. Lett. 6:319-324.
61. 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.
62. Market, C.L., 1975  
Biology of Isozymes, in: Isozymes. I. Molecular Structure. C.L. Market, Ed. Academic Press pp 1-10.
63. Vidal, J. y Gadal, P., 1983  
Influence of Light on Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Sorghum Leaves. I. Identification and Properties of Two Isoforms. Physiol. Plant. (Copenhagen) 57:119-123.
64. Stout, R.G. y Cleland, 1978  
Effects of Fusicocin on the Activity of A Key pH-Stat Enzyme, PEP-Carboxylase, Planta 139:43-45.
65. Robert, J.K.M. Ray, P.M. Wade-Jardezky, M. y Jardetzky, O. 1981  
Extent of Intracellular pH Changes During H<sup>+</sup> Extrusión by Maize Root-Tip Cells. Planta 152:74-78.
66. Muller, P., Kluge, M. y Groschel-Stewar, U., 1980  
Immunological Studies of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Sedum Species With Crassulacean Acid Metabolism or Photosynthesis C<sub>3</sub>. Plant Cell Environ. 3:249-254.

67. Brulfert, J. 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.
68. Muller, D., Kluger, M. y Groschel-Stewart, U., 1982  
Comparative Studies in Immunological and Molecular Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Species of *Sedum* and *Kalanchoe* Performing CAM. *Plant Cell Environ.* 5 225-230.
69. Mukerji, S.K., 1977  
Corn Leaf Phosphoenolpyruvate Carboxylase. Inhibition of  $^{14}\text{C}$  Fixation by  $\text{SO}_3^{2-}$  and Activation by Glucose 6-Phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 182:360-365.
70. Hatch, M.D. y Oliver, I. R., 1978  
Activation and inactivation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Leaf Extracts from  $\text{C}_4$  Species. *Aust. J. Planta Physiol.* 5:571-580.
71. Coombs. J., 1979  
Enzyme of  $\text{C}_4$  Metabolism in: *Encyclopedie of Plant Physiology. New Series* 6:251-262.
72. Graham. D., Hochley, D.G. y Patterson, B.D., 1979  
Temperature Effects on Phosphoenolpyruvate Carboxylase From Chilling-Sensitive and Chilling Resistent Plants in: *Low Temperature Stress in Crop Plants. The Role of The Membrane*, J.M. Lyons, D. Graham and J.K. Raison Eds. Academic Press (London) pp 453-461.
73. Coombs, J., Maw, S.L. y Baldry, C.W. 1975  
Metabolic Regulation in  $\text{C}_4$  photosynthesis. The inorganic carbon substrate for PEP Carboxylase.. *Plant Sci. Lett.* 4:97-102.
74. Coombs, J., Baldry, C.W., y Buche, C. 1973.  
The  $\text{C}_4$  Pathway in *Pennisetum purpureum*. The allosteric nature of PEP Carboxylase. *Planta* 110:95-107.

75. Peterson. K.L., 1977  
A simplification of the Protein Assay Method of Lowry et. al.  
Wich is More Generally Applicable. An. Biochem. 83:346-356.
76. Huber, S.C. y Edwards, G., 1975  
Inhibition of Phosphoenolpyruvate Carboxylase of C<sub>4</sub> Plants  
by Malate and Aspartate. Can. J. Bot. 53:1925-1923.
77. Nott. G.L. y Osmond, C.B., 1982  
Purification and Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxy-  
lase from Plants with Crassulacean Acid Metabolism.  
Aust. J. Plant Physiol. 9:409-422.
78. Buchanan-Bollig, I.C. y Kluge, M. 1981  
Crassulacean Acid Metabolism (CAM) in Kalanchoe diagramontiana:  
Temperature Response of Phosphoenolpyruvate Carboxylase  
in Relation to Allosteric Effectors. Planta 152:181-188.
79. Pays. A.G., Jones, R., Wilkins, M.B., Feuson, C.A. y Malcon,  
A.D., 1980  
Kinetics Analysis of Effectors of Phosphoenolpyruvate Car-  
boxylase from Bryophyllum fedtschenkoi. Biochem. Biophys.  
Acta 614:152-162.
80. Nishikido, T. y Takanashi, H. 1973  
Glycine Activation of PEP Carboxylase From Monocotyledoneus  
C<sub>4</sub> Plants. Biochem Biophys. Res. Commun 53:126-133.
81. Kluge, M. 1976  
In: CO<sub>2</sub> Metabolism and Plant Productivity (R.H. Burrins and  
C.C. Blacks Eds.) pp 205-216. University Panw Press Balti-  
more, Maryland.
82. Lowe, J. y Slack, R., 1971  
Inhibition of Maize Leaf Phosphoenolpyruvate Carboxylase by  
Oxalacetate. Biochem. Biophys. Acta. 235:207-209.
83. Kluge, M. y Ting. I.P. 1978  
Ecol. Stud 30:209.

84. Wong, K.K. y Davis D. 1973  
Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase of Zea mays  
by Metabolites. Biochem, J. 131:451-458.
85. Hiat, A.G., 1967  
Reaction in vitro of Enzymes involved CO<sub>2</sub> Fixation Accompanyng  
Salt Uptake by Barley Roots. Z. Pflanzenphysiol. 56:233-245.
86. Von Willert, D.J. y Von Willert, K., 1979  
Light Modulation of the Activity of The Phosphoenolpyruvate  
Carboxylase in CAM Plants in the Mesembryanthaceae. Z.  
Pflanzenphysiol. 95:43-49.
87. Huber, S.C., 1975  
Regulation of Oxalacetate, Aspartate and Malate Formation  
in Mesophyll Protoplast Extracts of three Types C<sub>4</sub> Plants  
Plant Physiol 56:324-331.
88. Hatch, M.D. y Slack, D.R., 1966  
Photosynthesis by Sugar-Cane Leaves: a New Carboxylation  
Reaction and the Pathway of Sugar Formation. Biochem J.  
101:103-111.
89. Pays, A.G., Jones, R., Wilkins, M. Fewson, C.A. y Malcon,  
A.D., 1980  
Kinetics Analysis of Effectors of Phosphoenolpyruvate Car-  
boxylase from Bryophyllum fedtschenkoi. Biochem, Biophys.  
Acta 614:152-162.
90. Ferguson, K.A. 1964  
Metabolism. 13:21.
91. Winter, K., 1981  
Changes in Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxylase  
from the Crassulacean Acid Metabolism Plant Mesembryanthemum  
cristallinum after Isolation. Aust. J. Plant Physiol. 8:115-  
119.
92. O'Leary, M.H. Rife, J. E. y Slater, J.D., 1981  
Kinetic and Isotope Effect Studies of Maize Phosphoenolpyruvate  
Carboxylase, Biochem. 20:-7208-7314.

93. Winter, K., 1982  
Properties of PEP Carboxylase in Rapidly Prepared Desalted Leaf Extracts of the Crassulacean Acid Metabolism Plant Mesembryanthemum crystallinum L. *Planta* 154:298-308.
94. Quail, P.H., y Scandalios, J.G., 1971  
Turnover of Genetically Defined Catalase Isozymes in Maize *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68:1402-1406.
95. Ker, M.R. y Robertson, A., 1971  
Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Isolated from Maize Leaves. *Biochem J.* 125:34.
96. Phillips, P.J. y Mc Willian, J.R., 1971  
Thermal Response of the Primary Carboxylation Enzymes from C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> Plants Adapted to contrasting temperature environments, <sup>3</sup>en Photosynthesis and Photorespiration. (M.D. Hatch C.B., Osmond y R.O. Slayter, Eds). Willey Interscience New, York, pp. 97-104.
97. Hansen, D.E. y Knowles, J.R., 1982  
The Stereochemical Course of the Reaction Catalized by Phosphoenolpyruvate Carboxylase. *J. Biol. Chem.* 257: 14795-14890.
98. Tchen, T.T., y Vennesland, B., 1955  
Enzymatic Carbon Dioxide Fixation into Oxalacetate in Wheat Germ. *J. Biol. Chem.* 213:533-546.
99. Hatch, M.D., Salck, C.R. y Bull, T.R., 1969  
Phosynthetic CO<sub>2</sub> Fixation Pathways. *Ann Rev. Plant Physiol.* 21:141-162.
100. Grahan, D., Hatch, M.D., Slack, C.R., y Smillie, R.M., 1970  
Light Induced Formation of Enzymes of the C<sub>4</sub> Dicarboxylic Acid Pathways of Photosynthesis in Detached Leaves *Phytochemistry* 9:521-532.

101. Hatch, M.D. y Osmond, C.B., 1976  
Compartmentation and Transport in C<sub>4</sub> Photosynthesis. In:  
Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Ed. C.R.  
Stoching, U. Heber, 3:144-84.
102. Kobayashi, H., Asamis, S. y Akazawa, T., 1980  
Development of Enzymes Involved in Photosynthetic Carbon  
Assimilation in Greening Sedling of Maize (Zea mays)  
Plant Physiol. 65:198-203.
103. Hague, D. y Sims, T., 1980  
Evidence for Light-Stimulated Synthesis of Phosphoenolpyru-  
vate Carboxylase in Leaves of Maize. Plant Physiol. 66:  
505-509.
104. Vidal, J, y Gadai, P., 1983  
Influence of Light en Phosphoenolpyruvate Carboxylase  
in Sorghum Leaves. II. Inmunochemical Study, Physiol.  
Plant. (Copenhagen) 57:124-128.
105. 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.
106. Cocks, C.T., y Wilson, A.C., 1972  
Enzyme Evolution in the Enterobacteriaceae. J. Bacteriol.  
110:793-802.
108. Mukerji, S., 1974  
Corn Phosphoenolpyruvate Carboxylase: Activation by Magne-  
sium Ions. Plant Sci. Lett. 2:243-248.
109. Miller, R.S., Mildvan, A.S., Chang, H.C. Easterday, R.L.  
Maruyama, H. y Lane, M.D., 1968  
The enzymatic carboxylation of Phosphoenolpyruvate. IV. the  
Binding of Manganese and Substrates by Phosphoenolpyruvate  
Carboxykinase and Phosphoenolpyruvate Carboxylase  
J. Biol. Chem. 243:6030-6040'

110. Perrot-Rechenmann. C., Vidal, J., Brulfert, J., Burlet, A. y Gadal, P., 1982  
A Comparative Immunocytochemical Localization Study of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Leaves of Higher Plants *Planta* 155:24-30.
111. Karabourniotis A., Manetas Y. Gavalas N.A. 1983  
Photoregulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Salsola soda L. and Other Plants. *Plant Physiol.* 73:735-739.
- 111b. Karabouniotis A. Manetas Y. y Gavalas N.A. 1985  
Detecting Photoactivation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in C<sub>4</sub> Plants. An effect of pH. *Plant. Physiol.* 77:300-302.
113. Goatly, M.B. 1974  
Differential Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxylase from Etiolated and Green Sugar Cane. *Planta* 117:67-73.
114. Brulfert, J. Guerrier, D., y Queiroz, O., 1975  
Photoperiodism and Enzyme Rhythms: Kinetic Characteristics of the Photoperiodic Induction Crassulacean Acid Metabolism *Planta* 125:33-44.
115. Hendrick, J. y Smith, A., 1968  
Size and Charge Isomer Separation and Stimulation of Molecular Weights of Proteins by Disc Gel Electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.* 126:155-164.
116. Raghavendra, A.S. y Das, V.S.R., 1975  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66:160-165.
117. Raghavendra, A.S., Das, V.S.R., 1976  
*Z. Pflanzenphysiol.* 78:434-437.
118. Iglesias, A.A., Andreo, C.S., 1983  
The presence of Essential Histidine Residues in Phosphoenolpyruvate Carboxylase from Maize Leaves. *Biochem. Biophys. Acta* 749:9-17.

119. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Randall, R.J. 1951  
Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent.  
J. Biol. Chem. 193:265-275.
120. Bradford, M.M., 1976  
A Rapid and Sensible Method for the Quantation of Micro-  
gram quantities of Protein utilizing the Principle of  
Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
123. Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P. y Hancock, R., 1981  
Silver Staining of Protein in Polyacrylamide Gels.  
Anal. Biochem. 118:197-203.
124. Ouchterlony, O.  
Antigen-Antibody Reactions in Gels.  
Acta Path Microbiol. Scand. 26:507-515.
125. Francis, K. y Gnanam, A., 1979  
Phosphoenolpyruvate Carboxylase assay on Polyacrylamide  
Gels. Experientia 35:23-24.
126. Karn, R.C., Rivic, P.A. y Hudock, G.A. 1973  
A procedure for the electrophoretic Analysis of Phosphoenol-  
pyruvate Carboxylase. Biochim. Biophys.  
Acta 293:567-69.
127. Scrutton, M.C., Fatebene, F. 1975  
An Assay System for Localization of Pyruvate and Phos-  
phoenolpyruvate Carboxylase Activity on Polyacrylamide Gel and  
its Application to Detection of These Enzymes in Tissue  
and Cell Extracts. Anal. Biochem. 69:247-60.
128. Cleland, R.E., 1975  
Auxin-induced hydrogen ion excretion. correlation with growth  
and control by external pH and water stress. Planta 127:233-242.  
233-242.

129. RAYLE, D.L.: 1973  
Auxin-induced hydrogen ion Secretion in Avena coleoptiles and its implications. Plant 114:68-73'
- 130: Jurd, R.D., 1981  
Immuno-electrophoresis, in Gel Electrophoresis of proteins: a practical approach, B.D., Hames, R.D. Rickwood eds. IRL Press Ltd. pp. 229-248.
- 49a: Rey, L., Thalovarn, P., Vidal J., y Renaudin, S. 1985  
Localisation ultrastructurale de la phosphoenolpyruvate carboxylase dans la feuille de maïs par immunocytochimie. Can. J. Bot. 63:1696-1699:
131. Wu. M.X., y Wedding, R.T. 1985 "Diurnal Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase from Crassula. Plant. .... Physiol. 77, 667-675.
132. Wu. M.X., y Wedding, R.T., 1985  
Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase from Crassula by interconversion of oligomeric Forms. Arch. Biochem. Biophys. 240:655-622.
133. Iglesias, A.A., y Andeo, C.S., 1984  
On the Molecular Mechanism of Maize Phosphoenolpyruvate Carboxylase Activation buy Thiol compounds. Plant Physiol. 75:983-987.
134. Iglesias, A.A., y Andreo C.S., 1984  
Inhibition of Zea mays Phosphoenolpyruvate Carboxylase by Copper and Cademium Ions. Photosynthetica. 18:134-138.
135. Iglesias, A.A., y Andreo C.S., 1984  
Involvement of thiol groups in the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. Photosynth Res. 5:215-26.
136. Stiborava M. y Leblova, S., 1983  
The role of cystein SH groups in the phosphoenolpyruvate carboxylase molecule of maize. Physiol, Veg. 21:935-942:

137. Gonzalez, D.H., Iglesias, A.A., y Andreo C.S., 1984  
On the Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase  
Activity from maize leaves by L. malate. Effect of pH.  
J. Plant. Physiol. 116:425-434.
138. Rippa, M., Signorini, M., y Bellini, T., 1981  
The effect of inorganic phosphate on the stability  
of some enzymes. Biochem, J. 197:747-749.
139. Stibarova, M., y Leblova, S., 1983  
Isolation and Partial Characterisation of Two  
Phosphoenolpyruvate Carboxylases from maize  
(Zea mays L.) Photosynthetica. 17:379-385.
140. Ting, I.P., y Dugger, Jr. W.M., 1967  
CO<sub>2</sub> metabolism in Corn Roots. I. Kinetics of Carboxylation  
and Decarboxylation. Plant. Physiol. 42:712-718.
141. Iglesias, A.A., Gonzalez, D.H. y Andreo, C.S., 1984  
Inactivation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase from  
Maize Leaves by Modification with phenylglyoxal.  
Biochem. Biophys. Acta. 788:41-47.