

137
20



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD A pH
ALCALINO DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO
CARBOXILASA DE HOJA DE MAIZ"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
CARLOS MUJICA JIMENEZ



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



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.

INDICE.

Abreviaturas.-----	V
Resumen.-----	VI
I. INTRODUCCION.-----	1
II. ANTECEDENTES.-----	4
2.1 Ruta C_3 de asimilación de CO_2 atmosférico.-----	4
2.2 Ruta C_4 de asimilación de CO_2 atmosférico.-----	8
2.3 Regulación de la ruta C_4 .-----	12
2.3.1 Regulación por síntesis de novo de proteínas.-----	12
2.3.2 Regulación por el estado de activación de enzimas.-----	13
2.4 Características de fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas C_4 .-----	15
2.4.1 Reacción catalizada.-----	15
2.4.2 Propiedades físicas y químicas.-----	15
2.4.3 Propiedades cinéticas.-----	17
2.4.4 Regulación de su estado de actividad.-----	18
2.4.4.1 Regulación por metabolitos.-----	18
2.4.4.2 Regulación por pH.-----	28
2.4.4.3 Regulación por modificación covalente.-----	19
2.4.4.4 Regulación por luz.-----	21
III. OBJETIVOS.-----	27
IV. MATERIAL Y METODOS.-----	28
4.1 Materiales.-----	28
4.1.1 Equipo.-----	28
4.1.2 Reactivos.-----	39

4.1.3	Material biológico.-----	30
4.2	Métodos.-----	30
4.2.1	Crecimiento de plantas.-----	30
4.2.2	Eliminación del oxígeno en los medios de ensayo.-----	30
4.2.3	Extracción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa.-----	30
4.2.4	Ensayo de la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa.-----	31
4.2.5	Purificación parcial de PEPC por precipitación con sulfato de amonio.-----	32
4.2.6	Determinación de la concentración de proteína.-----	33
4.2.7	Purificación de PEPC por cromatografía en columna.-----	34
4.2.7.1	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.-----	35
4.2.8	Experimentos de preincubación de fosfoenolpiruvato carboxilasa.-----	36
4.2.8.1	Preincubación de la enzima parcialmente pura a pH 9 y 7.-----	36
4.2.8.2	Preincubación de la enzima pura a pH 8.5 -----	38
4.2.8.3	Preincubación a pH neutro de la enzima pura previamente inactivada por pH alcalino.-----	38

4.3	Análisis matemático	
	de los resultados experimentales.-----	39
4.3.1	Determinación de la velocidad inicial	
	de inactivación a pH 8.5 -----	39
4.3.2	Modelos matemáticos para una cinética	
	de descomposición de primero y de segundo	
	orden irreversibles.-----	43
4.3.3	Modelo matemático para una cinética	
	de descomposición de segundo	
	orden reversible.-----	45
V.	RESULTADOS.-----	47
5.1	Purificación de PEPC por cromatografía en columna.	47
5.2	Estabilidad de Fosfoenolpiruvato carboxilasa	
	Parcialmente pura a pH 7 y 9. Efecto de ligandos	
	y de glicerol.-----	52
5.3	Efecto de la concentración de la enzima pura	
	sobre el proceso de inactivación a pH alcalino.---	59
5.4	Efecto del polietilenglicol sobre el proceso de	
	inactivación en función de la concentración	
	de enzima.-----	61
5.5	Efecto del ditiotreitól (DTT) sobre	
	el proceso de inactivación.-----	63
5.6	Efecto combinado de DTT y polietilenglicol sobre	
	el proceso de inactivación.-----	63
5.7	Reversibilidad de la pérdida de actividad por	
	preincubación a pH neutro de PEPC previamente	
	inactivada a pH 8.5 -----	67

5.8	Determinación del orden de reacción del proceso de inactivación.	69
VI.	DISCUSION.	78
VII.	CONCLUSIONES.	91
VIII.	BIBLIOGRAFIA.	92

ABREVIATURAS.

PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa.
PEP	Fosfoenolpiruvato.
MDH	Málico deshidrogenasa.
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido.
PFDK	Piruvato ortofosfato dicinasa.
DTT	Ditiotreitol.
PEG	Polietilenglicol.
CAM	Metabolismo Acido Crasulaceo.
RuBPC	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa.
ATP	Adenosín Trifosfato.
OAA	Oxalacetato.
PK	Piruvato cinasa.
ADP	Adenosin difosfato.
G-6-P	Glucosa-6-fosfato.
TEA	Trietanolamina.
EDTA	Acido etilén diamino tetra acético.
TCA	Acido tricloroacético.
PCMB	Paracloromercuribenzoato.
Pi	Fosfato inorgánico.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

RESUMEN.

La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E:C.4.1.1.31) de hoja de maíz cataliza la β -carboxilación de PEP en presencia de Mg^{2+} y es una enzima clave en la ruta de asimilación fotosintética del CO_2 atmosférico en plantas C_4 , como el maíz.

Observaciones realizadas en varios laboratorios hacen suponer que la actividad de PEPC está fuertemente sometida a control durante el ciclo noche día, de manera que la enzima sea totalmente activa durante el día cuando la fotosíntesis está operando, y se inactiva durante la noche.

La evidencia experimental actual indica que son numerosos los efectores que actuando de forma coordinada pueden controlar la actividad de PEPC "in vivo". Entre los varios factores implicados pueden jugar un papel importante los incrementos en el pH citoplásmico que acompañan a los cambios de iluminación. A este respecto se ha observado que "in vitro" la enzima experimenta un proceso de inactivación cuando se incuba en medios con pH ligeramente alcalino.

Como medio de llegar a profundizar en el conocimiento de las características de PEPC, creímos de interés caracterizar el proceso de inactivación a pH ligeramente alcalino, ya que este efecto podría tener relevancia en la regulación de la actividad de esta enzima "in vivo".

Este trabajo se realizó a pH 9 y pH 7 con enzima parcialmente pura en presencia de ligandos de la proteína: los sustratos PEP y Mg^{2+} ; un inhibidor: Ca^{2+} y un agente estabilizador de enzimas: glicerol, para observar su efecto sobre el proceso de inactivación.

Además se hicieron preincubaciones a pH 8.5 en ausencia de oxígeno para impedir la oxidación de grupos ionizados y con enzima pura para evitar la participación de otras proteínas como proteasas.

En este caso los experimentos se hicieron a alta y baja concentración de enzima en presencia de : un agente reductor (DTT); y PEG; para observar la protección ejercida frente a la inactivación por pH alcalino.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

A pH 9 PEPC sufrió una rápida y considerable pérdida de actividad. En este caso la inclusión de glicerol proporcionó una protección casi total ante este fenómeno de inactivación, en tanto que el sustrato PEP proporcionó una protección parcial. Ca^{2+} y Mg^{2+} no tuvieron efecto protector y en el caso del primero éste resultó incluso inactivante.

A pH 7 no hubo pérdida de actividad y la inclusión de glicerol incrementó ligeramente la actividad de PEPC.

Estos resultados muestran claramente que en nuestras condiciones experimentales el pH es el factor directamente responsable de la inactivación de PEPC.

En las preincubaciones realizadas a pH 8.5 con enzima pura, se observó que el proceso de inactivación es dependiente de la concentración de proteína, ya que a baja concentración (1.20 $\mu\text{g/ml}$) la enzima se inactivó rápidamente, mientras que a alta concentración (12.0 $\mu\text{g/ml}$) y/o en presencia de PEG (agente estabilizador de enzimas) el proceso se hace lento.

La presencia de DTT también protegió parcialmente a la enzima

frente a la inactivación.

Cuando las preincubaciones se hicieron en presencia de PEG y DTT juntos se observó la máxima protección de PEPC frente a la inactivación.

El hecho de que en nuestras condiciones experimentales el pH sea el factor directamente responsable de la inactivación de PEPC, sugiere la participación de grupos ionizables de la proteína cuyo valor de pK esté entre 8 y 9. Los grupos que más probablemente están involucrados parecen ser grupos -SH de restos de cisteína que de alguna manera deben ser importantes en el mantenimiento de la estructura activa de la enzima y/o en la catálisis.

Debido a que el proceso es dependiente de la concentración de proteína y a que PEG ejerce un efecto protector frente a la inactivación parece más probable que una disociación de la enzima tetramérica activa a dímeros inactivos como resultado de un primer evento de ionización de grupos -SH importantes para mantener la estructura activa, sea la causa de la pérdida de actividad.

En virtud de que la enzima pudo reactivarse al ser transferida de un medio con pH 8.5 a otro con pH 7, tomando en cuenta además la suposición de que PEPC sufre una disociación cuando se preincuba en medios con pH alcalino, se propuso que la reacción de inactivación podría seguir una cinética de segundo orden reversible, ya que si la reacción fuera de primer orden la velocidad de inactivación sería directamente proporcional a la concentración de proteína ; si fuera de orden cero sería independiente de la concentración de proteína y solamente dependería del pH. Así, se dedujo un modelo matemático de descomposición de segundo orden reversible que se ajustó

favorablemente a los resultados experimentales de inactivación. Esto nos permitió observar que el proceso se lleva a cabo en dos fases claramente separadas porque sus velocidades son totalmente diferentes.

Este trabajo sugiere que la regulación de PEPC "in vivo" puede depender de un fino balance de grupos -SH y puentes disulfuro presentes en su estructura.

I. INTRODUCCION:

Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E.C. 4.1.1.31), es una enzima que parece existir en todas las células vegetales ya sean fotosintéticas o no (1). Esta amplia distribución se explica por las muchas diferentes funciones que la enzima realiza en los tejidos vegetales (2,3). Así, su actividad ha sido implicada en un mecanismo regulador del pH citoplásmico (3,4); en la apertura y cierre de estomas (5,6,7); en el crecimiento estimulado por auxinas (8) y en la fijación de nitrógeno en nódulos de leguminosas (3,8). Pero solamente en las células de mesófilo de hoja de plantas C₄ (1,2,10-14) y con metabolismo ácido crasuláceo (CAM) (15-19) posee una función asociada con la asimilación fotosintética de dióxido de carbono (CO₂). En estas plantas PEPC es la primera de las dos enzimas carboxilantes implicadas en la fijación del CO₂ atmosférico.

El interés por el estudio de esta enzima dentro del contexto del metabolismo C₄ y CAM es fácilmente comprensible si se toma en cuenta la posible trascendencia de este conocimiento a nivel agrícola y biotecnológico. Las plantas C₄ presentan una productividad superior que las plantas C₃ bajo condiciones de iluminación y temperatura elevadas y son capaces de sobrevivir en ambientes relativamente áridos. Por su parte, las plantas CAM pueden desarrollarse en climas desérticos, constituyendo así la única alternativa de productividad en este tipo de ambientes.

La asimilación fotosintética neta de CO₂ es superior en las plantas C₄ y CAM que en las plantas C₃ gracias a la existencia de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en el citoplasma de las células de mesófilo. Se ve pues claramente que el conocimiento de

estos metabolismos, y de sus enzimas clave como PEPC, pueden guiarnos hacia la obtención de variedades agrícolas más convenientes y útiles. Las plantas C_4 de interés agrícola tienen una producción media de dos a tres veces superior a las plantas C_3 . Sin embargo las plantas que poseen fotosíntesis C_3 constituyen el grupo mayoritario de las especies productoras de alimentos, mientras que de entre las especies C_4 , solo el maíz, caña de azúcar y sorgo son cultivos importantes.

La enzima PEPC presente en plantas C_3 , implicada en reacciones de relleno del ciclo de Krebs, posee una actividad muy inferior a la enzima de plantas C_4 . Pudiera ser que cualquier tipo de manipulación que conllevase un aumento de la actividad de PEPC en las plantas C_3 pudiese incrementar la productividad de estas plantas en las que la concentración de CO_2 es el factor limitante de la velocidad de la fotosíntesis. La idea central de este enfoque a largo plazo, consiste en emular por medio de técnicas de laboratorio lo que la naturaleza ha conseguido en las plantas C_4 : la supresión de la fotorrespiración y el aumento consiguiente de la productividad por un mecanismo concentrador de CO_2 en las células en donde se localiza el ciclo de Calvin, lo que implica una alta actividad de PEPC en tejidos fotosintéticos.

Es obvio que esto no se conseguiría sin un conocimiento lo más completo posible de las propiedades de esta enzima y de la reacción que cataliza, así como de los mecanismos involucrados en la regulación de su actividad, ya sea ésta realizada por medio de efectores o por el control de la expresión de los genes que codifiquen estos eventos.

Por otra parte, fosfoenolpiruvato carboxilasa cataliza una

reacción de β -carboxilación irreversible y tiene como sustrato a fosfoenolpiruvato el cual es, a la vez, un compuesto rico en energía y un importante intermediario en varias rutas metabólicas. Por todo ello es de creencia general que la actividad de esta enzima debe estar fuertemente sometida a control y existe un gran interés desde el punto de vista de ciencia básica en descubrir los mecanismos reguladores de su actividad.

Quizas el aspecto más importante de regulación es el efecto que las condiciones de iluminación a las que se somete la planta tiene a corto plazo sobre la actividad de la PEPC de hoja. Este problema de regulación está siendo en la actualidad intensamente estudiado en varios laboratorios, pero no ha sido aun totalmente resuelto. Los resultados obtenidos hasta el momento de iniciar este trabajo en relación a la regulación a corto plazo por luz del estado de activación de PEPC de hoja de maíz, indican que entre los varios factores implicados, los cambios en el pH citoplásmico que acompañan a los cambios de iluminación pueden jugar un papel muy importante. Ello despertó mucho interés de caracterizar el proceso de inactivación que experimenta esta enzima cuando se incuba en medios con pH ligeramente alcalino con el fin de llegar a profundizar en el conocimiento de las características de la enzima y sobre el mecanismo molecular responsable de esta regulación.

II. ANTECEDENTES.

Con el fin de facilitar la comprensión de la función metabólica de la isoenzima fotosintética de PEPC en plantas, describiremos brevemente las principales características de los procesos de asimilación del CO_2 atmosférico en las plantas C_3 y C_4 .

2.1 Ruta C_3 de asimilación de CO_2 atmosférico.

El dióxido de carbono del aire es incorporado en forma de compuestos orgánicos por los cloroplastos de las plantas mediante la ruta metabólica conocida como ciclo de reducción fotosintética del carbono descrita por Calvin y col. en 1948 (20,21) y que hoy es aceptada tal y como se muestra de manera esquemática en las figuras 1A y 1B.

La primera parte de este ciclo consiste en la carboxilación del azúcar ribulosa-1,5-bisfosfato en una reacción catalizada por la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RUBPC) con la producción de dos moléculas de ácido 3-P-glicérico. La segunda parte del ciclo es una fase reductiva en la que el fosfoglicérico producido se reduce a triosa fosfato en presencia de trifosfato de adenosina (ATP) y de nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido (NADPH), ambos generados por la cadena de transporte de electrones fotosintética en la membrana tilacoidal de los cloroplastos. Finalmente, en una fase regenerativa, que implica varias reacciones enzimáticas, cinco triosas fosfato se convierten en tres pentosas fosfato, regenerándose el aceptor de CO_2 : ribulosa-1,5-bisfosfato.

La eficiencia de este proceso de asimilación de CO_2 está limitada de manera importante por la naturaleza bifuncional de la enzima carboxilante, que es capaz de catalizar igualmente la

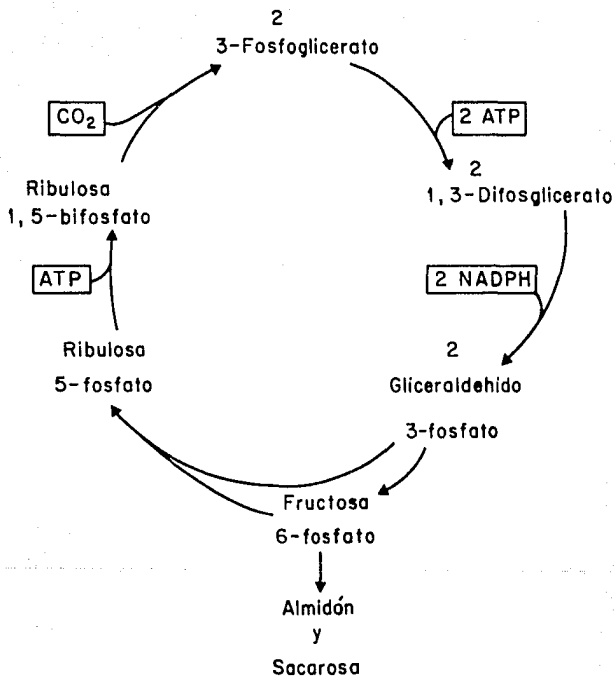


Fig. 1A. Esquema simplificado del ciclo de reducción del carbono o ciclo de Calvin.

5

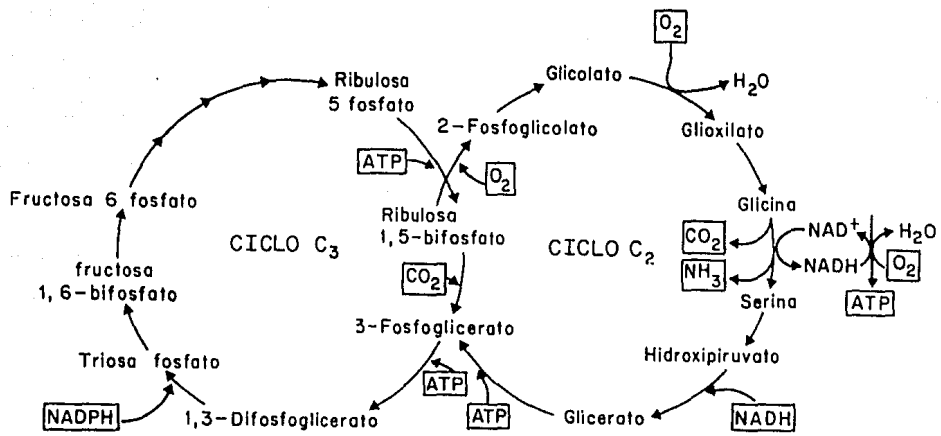


Figura 1B. Integración de los ciclos de reducción y oxidación del carbono (fotorrespiración)

oxigenación de su sustrato ribulosa-1,5-bifosfato, a partir del O_2 atmosférico (ciclo C_2 , Fig. 1 B.), produciendo los ácidos fosfoglicólico y 3-P-glicérico. Por ésto el nombre completo de la enzima es ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco). El fosfoglicolato producido se metaboliza hasta CO_2 y 3-P-glicerato mediante una compleja serie de reacciones que reciben en su conjunto el nombre de fotorrespiración (22) (Fig. 1B).

El metabolismo del carbono de las plantas es por tanto el resultado del balance integrado de estos dos procesos mutuamente opuestos. La operación simultánea de ambos conduce a un consumo de energía por molécula de CO_2 fijada muy superior a la que se consumiría si operase el ciclo de Calvin solo.

La existencia de este proceso, unido a la baja concentración de CO_2 en la atmósfera, hacen que uno de los factores que limitan el crecimiento de las plantas sea la insuficiente velocidad del proceso fotosintético de asimilación de CO_2 .

2.2 Ruta C₄ de asimilación de CO₂ atmosférico.

El maíz, al igual que las demás plantas C₄ presenta dos tipos de células diferenciadas (Fig. 2) participando en el metabolismo fotosintético de la hoja (11-13,23-28). La figura 3 muestra un esquema simplificado del metabolismo C₄. Las células llamadas de mesófilo se encuentran cerca de la superficie externa de la hoja y toman CO₂ atmosférico para asimilarlo en forma de oxalacetato a través de la carboxilación del fosfoenolpiruvato mediante la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). El oxalacetato (OAA) se transporta al interior del cloroplasto en donde se convierte en malato mediante la enzima málico deshidrogenasa dependiente de NADP (MDH-NADP), el malato, en intercambio con el oxalacetato que se está produciendo es transportado al citoplasma para, posteriormente, ser llevado a las células de vaina vascular, las cuales se localizan en la periferia de los haces vasculares (Fig. 2), en donde se encuentran bastante aisladas del intercambio directo de gases con la atmósfera. En las células de vaina vascular, el malato se descarboxila mediante la enzima málico deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP (enzima málica-NADP), el CO₂ producido se utiliza para la síntesis de carbohidratos a través del ciclo de Calvin que tiene lugar en estas células. El piruvato producto de la descarboxilación, regresa a las células de mesófilo y es transportado al interior del cloroplasto en donde se produce fosfoenolpiruvato (PEP), en una reacción catalizada por la enzima piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK), con el consumo de dos equivalentes de ATP. El PEP resultante se transporta al citoplasma en intercambio con fosfato para seguir alimentando esta ruta (12,24,27,28).

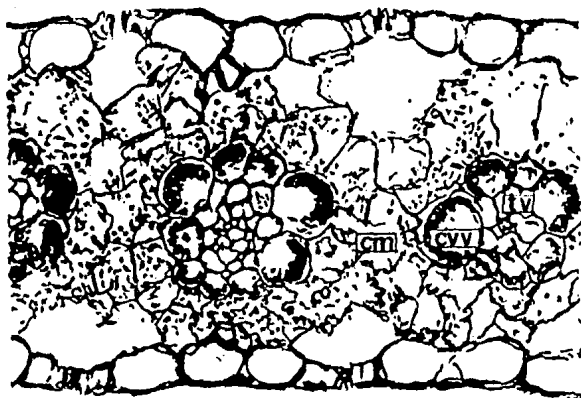


Figura 2. Corte transversal de una hoja de maíz: muestran la anatomía tipo Kranz, característica de las plantas **cm.** Célula de mesófilo; **CVV.** Célula de la Vaina Vasculuar; **tv.** Tejido vascular.

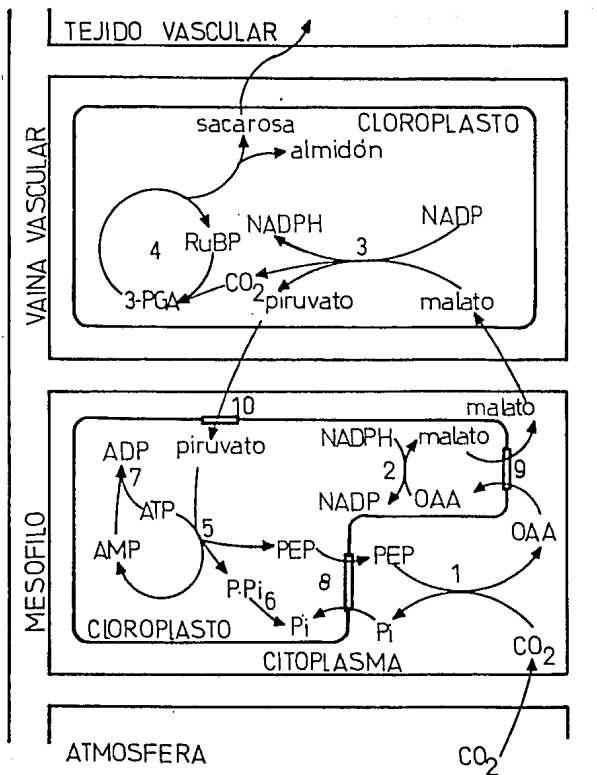


Figura 3. Esquema del metabolismo C₄ de maíz .
 Enzimas: 1. Fosfoenolpiruvato carboxilasa; 2. NADP-malato deshidrogenasa; 3. enzima málica-NADP; 4. Ciclo de Calvin; 5. Piruvato ortofosfato dicinasa; 6. Pirofosfatasa; 7. Adenilato cinasa; 8. Translocador de PEP- fosfato; 9. Traslocador de dicarboxilatos; 10. Transportador de piruvato.

Las plantas que poseen ruta C₄ usan parte de la energía solar captada para mantener esta ruta extra, pero a pesar de ello su eficiencia energética es superior a la de las plantas C₃. Es un sistema fotosintético que además puede operar con pérdidas de agua menores, gracias a que la afinidad por el CO₂ es muy superior en las plantas C₄, por lo que estos organismos pueden mantener altas velocidades de fijación de carbono con apertura estomática limitada, permitiendo una fotosíntesis activa en condiciones de relativa aridez y con bajas concentraciones de CO₂. Esta última condición es frecuente cuando las plantas se encuentran fotosintetizando activamente ya que consumen con rapidez el CO₂ de las capas cercanas de la atmósfera. Por otra parte, debido a que su asimilación de CO₂ es más eficiente, las plantas C₄ poseen la capacidad de aprovechar mayor cantidad de energía luminosa, en consecuencia son bastante productivas, por lo que representan magníficos candidatos para lograr incrementar la productividad en ambientes desfavorables como son los climas áridos (26-34).

2.3 Regulación de la ruta C₄

2.3.1 Regulación por síntesis de novo de proteínas.

Las plantas han desarrollado varios mecanismos de respuesta a variaciones del medio ambiente, de manera que su desarrollo se ha supeditado a la aparición de muchos de estos cambios. Lógicamente una de las señales más importantes para el desarrollo de una planta es la luz, que induce la síntesis de numerosas proteínas enzimáticas y estructurales necesarias para el establecimiento del organismo fotosintético adulto. Se han propuesto tres clases de fotoreceptores que median respuestas del desarrollo a la luz: fotoclorofilido, fitocromo y varios fotoreceptores de luz azul y luz ultravioleta no bien caracterizados (35-40). De los anteriormente mencionados sin duda el fotoreceptor mejor caracterizado y el único que ha sido aislado es el fitocromo (41,42). Se sabe que la estimulación de la planta por luz roja es capaz de inducir la capacidad autotrófica (entendida como la capacidad de asimilación del carbono) que se acompaña de un incremento en la actividad de varias enzimas participantes del ciclo de Calvin, como son: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (43-45), ribulosa-5-P-cinasa (43,44), fructosa-1,6-bisfosfatasa (43,44,46) y NADP-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; y también de varias enzimas participantes de la ruta C₄: piruvato ortofosfato dicinasa (42,43,45), NADP-málico deshidrogenasa (44,47), NADP-malato deshidrogenasa descarboxilante (41,44,47), adenilato cinasa (43,45), pirofosfatasa (48) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (12,48,45,50). Este incremento de actividad se acompaña de un incremento en los niveles de ARN mensajero específico

(41,46,51,52) y en la cantidad de proteína específica (52,53).

2.3.2 Regulación por el estado de activación de enzimas.

La necesidad de mecanismos de regulación de la actividad enzimática a corto plazo surge de la ausencia relativa de compartimentalización en el citoplasma y dentro del cloroplasto, que separe las enzimas degradativas de las enzimas fotosintéticas, las cuales, de funcionar simultáneamente darían lugar a la generación de ciclos inútiles, con el consecuente desperdicio de energía, esqueletos carbonados, nitrógeno, etc que ésto supone (55,57,59). Los mecanismos de regulación de la actividad enzimática mejor estudiados son: fosforilación-desfosforilación de proteínas dependiente de la fotofosforilación y oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo, el que a su vez depende del transporte de electrones. Ambos procesos están activos bajo condiciones de iluminación y son capaces de modular "in vitro" e "in vivo" la actividad de un número considerable de enzimas de cloroplasto involucradas en el ciclo de Calvin (56,57,60-62) y la ruta C₄ (57,58,63,64), así como enzimas cloroplásticas y citoplásmicas que participan en la glucólisis (62,63,65) y el ciclo de las pentosas fosfato (62,63,65). Dichos mecanismos producen una modificación relativamente estable de las enzimas, la cual va ligada a un cambio en la actividad, pero no deben confundirse con los efectos regulatorios mediados por cambios en la concentración de metabolitos, iones o cambios en el pH.

De las enzimas que participan en la ruta C₄ la piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK) es la única enzima para la cual está demostrado que se regula "in vivo" a través de un proceso de fosforilación-desfosforilación. Esta proteína puede encontrarse en

forma fosforilada inactiva durante la noche y en forma no fosforilada activa durante el día (63,66,67).

Por otro lado, la enzima málico deshidrogenasa dependiente de NADP (MDH-NADP) presente en el estroma de cloroplastos de las células de mesófilo se encuentra en estado inactivo (con ciertos grupos sulfhidrilo oxidados) durante la noche y en estado activo (con los grupos sulfhidrilo mencionados reducidos) durante el día (55,67,68). Más conocido y mejor estudiado, el mecanismo de oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo da lugar a la regulación de un número considerable de enzimas tanto cloroplásticas como citoplásmicas.

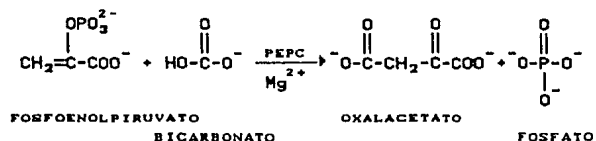
Otra de las enzimas que participan en un paso importante de la ruta C_4 es la malato deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP. Esta es una enzima del estroma de cloroplasto de las células de vaina vascular, responsable de la descarboxilación del malato que proviene de mesófilo (11,12). Hasta la fecha no hay reportes en la literatura de que la enzima de plantas C_4 sufra cambios en sus propiedades moleculares como consecuencia de la iluminación. La regulación de su actividad, más bien, podría ejercerse a través de los cambios en la concentración de sustrato, cofactor y/o cambios en el pH que ocurran en el estroma de cloroplasto al pasar la planta de luz a oscuridad o viceversa (47).

Con respecto a otra enzima clave de la ruta C_4 , PEPC, los aspectos de su regulación conocidos hasta la fecha serán discutidos con detalle en el apartado siguiente.

2.4 Características de fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas C₄.

2.4.1 Reacción catalizada.

La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (E.C. 4.1.1.31) cataliza la β -carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP), según la siguiente reacción :



Esta reacción tiene un cambio de energía libre muy negativo (es fuertemente exergónica) $\Delta G^\circ = -6$ a -8 kcal/mol, y es prácticamente irreversible (la reacción de regreso no ha sido observada) (14). Esta actividad fue descubierta en tejidos vegetales por Bandurski (89,70), quien además purificó parcialmente la proteína responsable de la actividad de PEPC, y demostró que para la actividad catalítica se requiere la presencia de Mg^{2+} .

PEPC es la única carboxilasa a la fecha reportada que utiliza bicarbonato como sustrato y no CO_2 , que no requiere biotina (71,72).

2.4.2 Propiedades físicas y químicas.

Fosfoenolpiruvato carboxilasa purificada de maíz y de otras plantas C₄ tiene un peso molecular de 400,000 daltons en su forma nativa (73-78). En electroforesis en gels de poliacrilamida en presencia de SDS se obtiene una sola banda de proteína de peso molecular de 100,000 daltons, indicando ésto que la enzima es un homotetrámero (74-78,80).

Recientes reportes indican que, factores tales como fuerza iónica, temperatura, concentración de protones y varios metabolitos, pueden alterar "in vitro" la estructura cuaternaria de PEPC, haciendo que la enzima se pueda encontrar en diferentes estados de agregación (77,78,81-84). Así, se ha reportado la existencia de dímeros y monómeros de esta enzima .

Para investigar la naturaleza de los restos de aminoácidos implicados en la unión de los sustratos y en la catálisis se han realizado numerosos estudios de modificación química de la proteína. De esta forma se ha detectado la presencia de grupos -SH en la molécula de PEPC (75,85,87). Cuando la enzima se incubaba en presencia de paracloromercuribenzoato (PCMB), compuesto que reacciona irreversiblemente con los grupos -SH de las proteínas, sufre una rápida inactivación. El sustrato PEP protege eficazmente contra la inactivación por PCMB (75). Glucosa-6-P y glicina (ambos activadores de esta enzima) también ejercen protección frente a la inactivación por PCMB, mientras que los iones Mg^{2+} no tienen efecto. El efecto protector de PEP sugiere la presencia de grupos -SH en el sitio activo pudiendo estar implicados en la unión del sustrato o en la catálisis. La inactivación es dependiente del pH, alcanzando un valor máximo a pH 9. Ditiotreitól (DTT) protege de inactivación por PCMB a pH 8.2 (86).

En otros estudios de modificación química con la enzima de maíz usando fenilgioxal (74), eosin isotiocianato (88) y piridoxal-S-fosfato (89) se ha mostrado que dos residuos de arginina y cuatro de lisina por cada tetrámero de enzima son esenciales para la actividad y que estos grupos son protegidos por PEP. De la modificación química con dietilpirocarbonato se ha

inferido la importancia de residuos de histidina para la unión de PEP y/o Mg^{2+} a la enzima de maíz (90).

2.4.3 Propiedades cinéticas.

Debido al papel clave de PEPC en la fijación del carbono en plantas C_4 , muchos investigadores se han interesado en las propiedades cinéticas de esta enzima. A continuación se describe lo que se conoce acerca de la cinética de PEPC.

La enzima tiene un requerimiento absoluto por un catión divalente. Probablemente Mg^{2+} llena este requerimiento "in vivo" (91-93). "In vitro", Mn^{2+} puede reemplazar al Mg^{2+} como cofactor. Con Mn^{2+} se observan menores valores de K_m , pero también menores valores de V_{max} . (94-96), mientras que Co^{2+} es menos efectivo (95,96). Otros cationes tales como Zn^{2+} , Hg^{2+} (96); Ca^{2+} (97); Cu^{2+} y Cd^{2+} (96) inhiben a la enzima.

El papel de Mg^{2+} en la catálisis aun no es claro, Maruyama et al. (98) y Miziorco et al. (94) han sugerido que se forma un puente enzima-metal-PEP en el sitio activo de la carboxilasa. Estudios de modificación química con la enzima de hoja de maíz indican que Mg^{2+} no es esencial para la unión de PEP a la carboxilasa, aunque su presencia incrementa la afinidad por este sustrato (74,96,99). Se propuso que el sustrato activo es la forma libre de PEP mas que el complejo metal-PEP (94,95,99). Sin embargo estudios cinéticos más recientes han demostrado que el sustrato preferencial es el complejo metal-PEP.

Se ha reportado la existencia de formas isoenzimáticas de PEPC en hoja etiolada de varias plantas C_3 y C_4 como son sorgo (74-76), caña de azúcar (77) y maíz (78-80). Se ha encontrado que las formas isoenzimáticas presentes en hoja etiolada difieren de

las presentes en hoja verde tanto en plantas C_3 como en plantas C_4 (49,102-104,106,107). En un principio se sugirió que la forma de hoja verde procede de la de hoja etiolada por una modificación postraducciona l originada por luz (49,103,108). Posteriormente varios autores han demostrado que ocurre síntesis de novo en respuesta a la luz, y que esta proteína sintetizada corresponde a la forma enzimática típica de hoja verde (44,46,54,56)

2.4.4 Regulación de su estado de actividad.

2.4.4.1 Regulación por metabolitos.

PEPC de plantas C_4 es activada por glucosa-6-P, un producto final de la fijación de CO_2 (109). Este compuesto produce un incremento en la V_{max} . y en la afinidad por la unión a PEP (110,111). Otro metabolito, L-malato, el cual es un producto inmediato de la reacción de carboxilación es un inhibidor de la carboxilasa (112). Este muestra un efecto cooperativo y parece interactuar con PEPC en diferentes sitios, produciendo inhibición no competitiva o competitiva dependiendo del pH y su concentración (110). Glucosa-6-fosfato produce una disminución en el efecto inhibitorio de malato (110,112). Aspartato, otro producto importante de la carboxilación en algunas plantas C_4 también inhibe a la enzima (80,112).

2.4.4.2 Regulación por pH.

Variaciones en el pH podrían también operar como un control fino de la actividad de la carboxilasa. La afinidad de la enzima por PEP y Mg^{2+} se incrementa ligeramente entre pH 7 y 8 (90,95). En otros trabajos se ha reportado que PEPC de maíz se inactiva rápidamente cuando se expone a elevados valores de fuerza iónica (tales como 200-400 mM de NaCl) (77), y por experimentos de

filtración en gel se ha observado que esta inactivación está asociada con cambios en el estado de agregación de la enzima, proceso que a su vez también es dependiente del valor de pH, observándose que la pérdida de actividad es casi total a pH 8. Es notable el hecho de que el sustrato PEP y el activador glucosa-6-fosfato eviten la pérdida de actividad consecuencia de la disociación por fuerza iónica. Un reporte (113) acerca de la estabilización de PEPC de plantas C_4 a altos valores de pH por cosolventes no iónicos también sugiere que la disociación puede ocurrir cuando la enzima se diluye a altos valores de pH.

Es posible que cambios en el pH del medio en que se encuentre la enzima produzcan cambios conformacionales en la proteína que pueden llevar incluso a la disociación de sus subunidades, como veremos en el estudio que aquí presentamos. A este respecto es importante mencionar que en estudios realizados con plantas CAM, se ha observado que la forma tetramérica activa de la enzima es convertida a la forma dimérica inactiva cuando se preincuba a pH 8.2 (73,82,84).

Los reportes mencionados indican que valores de pH superiores a 8 parecen desempeñar un papel importante en el estado de actividad de PEPC, y se ha propuesto que cambios en el estado de protonación de cisteínas y/o argininas presentes en la molécula de la enzima podrían estar involucrados en la transición oligomérica dependiente del pH (74,75,77,80).

2.4.4.3 Regulación por modificación covalente.

Recientemente se han obtenido datos experimentales que sugieren que la actividad de PEPC en plantas C_4 durante las transiciones luz oscuridad está mediada por un proceso de

fosforilación de restos seril de la enzima (114-118).

Se ha encontrado que la enzima obtenida de hojas de maíz iluminadas es menos sensible a inhibición por malato y está fosforilada en uno o más residuos de serina, mientras que la obtenida de hojas mantenidas en oscuridad es más sensible a inhibición por malato y está mucho menos fosforilada (115). Después de iluminación la enzima muestra inhibición sigmoideal por malato con un K_i aparente de 0.9 - 1.2 mM, y después de un periodo de oscuridad la enzima muestra inhibición hiperbólica por malato con un K_i aparente de 0.3 - 0.6 mM. La V_{max} de la forma de PEPC obtenida de hojas iluminadas es aproximadamente el doble de la de la enzima obtenida de hojas mantenidas en oscuridad

La incubación de PEPC de maíz con fosfatasa alcalina exógena conduce a un incremento en la sensibilidad a inhibición por malato de la enzima obtenida de hojas iluminadas, hasta niveles como los observados con la enzima obtenida de hojas mantenidas en oscuridad (116). Así mismo, la incubación de PEPC con una proteína cinasa soluble (ambas obtenidas de hoja verde de maíz) muestra que la proteína cinasa activa a PEPC de hojas mantenidas en oscuridad (118). Concomitante con estos cambios en la actividad de PEPC se tiene una marcada disminución en la sensibilidad a inhibición por malato. El análisis de aminoácidos fosforilados de la enzima marcada con ^{32}P mediante HPLC y electroforesis bidimensional en capa fina revela que la enzima está fosforilada exclusivamente en residuos de serina y que el grado de fosforilación es 50% mayor en la enzima obtenida de hojas iluminadas (116,118).

Estos resultados obtenidos "in vitro" junto con otros recientes estudios acerca de los cambios inducidos por luz en la

actividad catalítica y sensibilidad a malato de PEPC ,están relacionados al menos en parte al grado de fosforilación de residuos seril de la proteína "in vivo".

2.4.4.4 Regulación por luz.

Parecería que la acción de los mecanismos de regulación inducidos por luz antes mencionados sobre la actividad de las enzimas PPK y MDH-NADP, sería suficiente para explicar la regulación noche día de la sección de la ruta C_4 que se lleva a cabo en el citoplasma de las células de mesófilo. Por ello la regulación por luz de PEPC en plantas C_4 no se consideró importante por mucho tiempo. No obstante deben tenerse en cuenta los siguientes hechos :

i).- La reacción catalizada por PEPC es prácticamente irreversible bajo las condiciones imperantes en la célula,por tanto esta enzima actua virtualmente como una bomba capaz de canalizar su sustrato hacia la formación de malato,molécula que actua como transportador del CO_2 a las células de vaina vascular.Debido a que no existe reacción inversa, cuando el producto no es requerido en esta ruta metabólica (recuerdese que la fijación de CO_2 está detenida durante la noche en plantas C_4) (102,107,119) la bomba debe ser apagada para evitar una acumulación de intermediarios (OAA,malato).

ii).- PEP el sustrato de PEPC es un metabolito central en el metabolismo general de las plantas (120) (Fig.4), siendo glucólisis una de las rutas más importantes en que participa.En varias plantas C_4 se ha demostrado que las enzimas glucolíticas enolasa y piruvato cinasa, cuyo sustrato es PEP, se encuentran al igual que PEPC en el citoplasma (121,122).Por tanto durante la

noche, cuando la producción de PEP via PPK se detiene (PPK se encuentra inactiva en la oscuridad), PEPC podría competir por el mismo sustrato con las enzimas glucolíticas, que sí están activas durante la oscuridad.

Dada la gran cantidad de PEPC presente en mesófilo de plantas C_4 (se ha reportado que constituye hasta el 15 % de la proteína total soluble de la hoja en este tipo de plantas) (54), que se traduce en una elevada capacidad catalítica (su V_{max} en extractos crudos de maíz es aproximadamente diez veces superior a la isoforma no fotosintética presente en hoja de plantas C_3) (112,123), sería de esperar que en caso de que esta enzima tuviera acceso al PEP citoplásmico producido por glucólisis, interfiriera de manera notable con el funcionamiento de esta importante ruta metabólica, constituyendo así una ruta alterna de consumo de carbohidratos, que reporta menor ganancia de energía y que además produce acumulación de intermediarios del ciclo de Krebs (Fig.5).

Por estas razones es de esperar que la actividad de PEPC esté sometida a control durante el ciclo noche-día, de manera que la enzima sea totalmente activa durante el día cuando la fotosíntesis está operando y se inactive durante la noche. La existencia de una regulación por luz a corto plazo de esta enzima fué reportada por Karabourniotis y col. para varias plantas C_4 (124,125) y por Iglesias y Andreo para maíz (49). Sin embargo los primeros no fueron capaces de detectar ningún cambio en la enzima extraída de plantas de maíz mantenidas en luz o en oscuridad, generando así serias dudas sobre el reporte de Iglesias y Andreo, y sobre la necesidad de una regulación de la actividad de PEPC "in vivo".

Recientemente se ha confirmado que la actividad de PEPC de

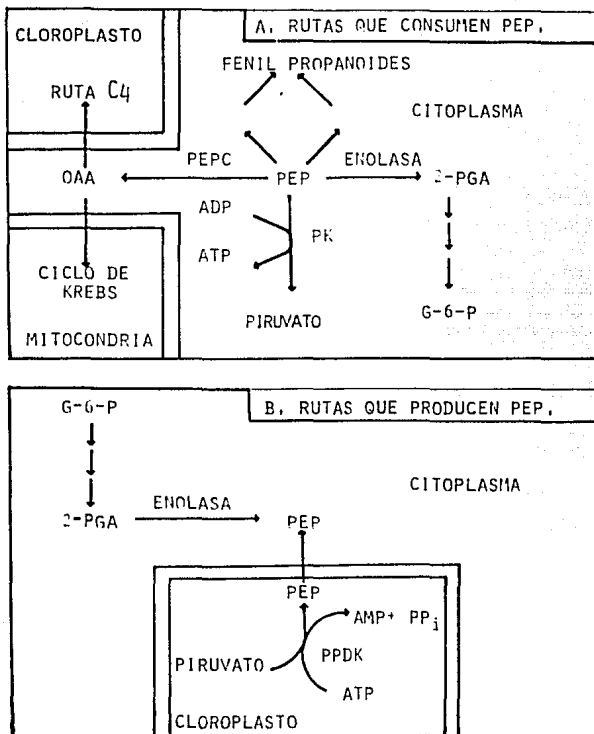


Figura 4. esquema de las rutas metabólicas que consumen (parte A) y que producen (parte B) fosfoenolpiruvato (PEP) en el metabolismo de las plantas C₄.

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

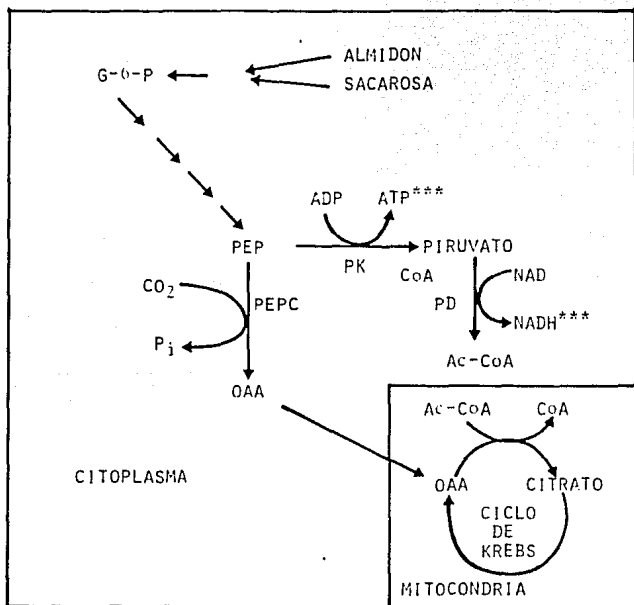


Figura 5. Esquema que ilustra la competencia que se presentaría si tanto glucólisis como PEPC estuvieran activas al mismo tiempo, con acceso a la misma poza metabólica de PEP.

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

hoja verde de maíz está sujeta a regulación noche día (49,115,125-130). La enzima extraída de plantas iluminadas muestra características cinéticas diferentes a la enzima extraída de plantas mantenidas en oscuridad por periodos cortos (2-3 horas). Así, la enzima de día presenta una mayor afinidad por el sustrato PEP y una menor sensibilidad a inhibición por malato que la enzima de noche, lo que presumiblemente se traduce en una mayor actividad de esta enzima durante el periodo de luz "in vivo".

El mecanismo molecular responsable de estos cambios en el comportamiento cinético de la enzima no parece ser la oxidación-reducción de grupos -SH como originalmente habían propuesto algunos autores (49,125), sino más bien un cambio en el estado de fosforilación de la enzima como se discutió en el apartado 2.4.4.3. La forma de día activa está más fosforilada que la forma de noche inactiva.

Esta modificación covalente de la proteína inducida por luz podría tener así mismo consecuencias en el estado de agregación de la enzima y por consiguiente sobre su actividad. Así, se ha reportado que la enzima de día es más sensible a dilución que la de noche (114,128), es decir, sería más fácilmente disociable en dímeros y/o monómeros.

Resumiendo, la evidencia experimental actual indica que son numerosos los efectores que actuando de forma coordinada pueden controlar la actividad de esta carboxilasa "in vivo". En virtud de ésto, puede pensarse que variaciones en la concentración de metabolitos, efectores y/o cambios en la concentración de protones pueden tener lugar en la vecindad de esta enzima al pasar la planta de condiciones de luz a condiciones de oscuridad, lo que

podría disparar el mecanismo molecular de conversión de la forma de día a la forma de noche, y viceversa, en forma semejante a lo reportado para la enzima de hoja de plantas CAM (58,59). Se ha demostrado de manera clara que PEPC de plantas CAM, en donde esta enzima también posee una función fotosintética, existe como una forma tetramérica activa durante la noche y como una forma dimérica inactiva durante el día (82-84,131).

III. OBJETIVOS.

En vista de los anteriores antecedentes nos planteamos los siguientes objetivos :

3.1 Objetivo general.

Investigar el efecto del pH ligeramente alcalino sobre la actividad de PEPC de hoja verde de maíz y su posible papel en los mecanismos de regulación de esta actividad enzimática.

3.2 Objetivos particulares.

a).- Determinar si la incubación de PEPC en medios con pH ligeramente alcalino produce inactivación de esta enzima.

b).- Caracterizar este proceso de inactivación de la enzima mediante el estudio del efecto que, sobre tal comportamiento, tengan diversos factores como son: concentración de enzima, presencia de agentes reductores y/o presencia de ligandos de la enzima.

c).- En base a los datos obtenidos, proponer el mecanismo a través del cual ocurre la inactivación de PEPC de hoja de maíz en nuestras condiciones experimentales.

IV. MATERIAL Y. METODOS.

4.1 Materiales.

4.1.1 Equipo.

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

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

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

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

Para centrifugar se utilizó la centrifuga Beckman modelo J2-21.

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

Las microjeringas empleadas fueron marca Hamilton de 10,50 y 100 μl .

Para el ensayo de actividad de PEPC se utilizaron celdas de cuarzo de 1 ml de capacidad.

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

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

Se utilizó nitrógeno gaseoso de INFRA para la eliminación de

oxígeno en los medios de ensayo

Las columnas de vidrio para cromatografía fueron de la casa Pharmacia Fine Chemicals.

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, se hizo en un equipo para electroforesis en placa vertical diseñado y elaborado en nuestro laboratorio.

4.1.2 Reactivos.

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

De Merck: Trietanolamina (TEA), fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, glicerol, sulfato de amonio, ácido clorhídrico, cloruro de potasio, etilendiamino tetraacético (EDTA), ácido tricloroacético (TCA), polietilenglicol 6000, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, Tris(-hidroximetilaminometano), glicina.

De Sigma Chemical Co. : β -mercaptoetanol, Nicotinaminadenin-dinucleótido reducido (NADH) en sal disódica, Fosfoenolpiruvato, (sal de monociclohexilamonio), málico deshidrogenasa de corazón de cerdo, ditiotreitol, azul brillante G, albúmina sérica de bovino, tritón X-100, polivinilpirrolidona, DEAE (celulosa) Sphacel, acrilamida, bisacrilamida, dodecil sulfato de sodio, TEMED, persulfato de amonio, marcadores de peso molecular (MW-SDS-200): ureasa, transferrina, mioglobina, albúmina bovina, albúmina de huevo, anhídrido carbónico.

De Técnica Química S.A. : bicarbonato de sodio, fosfato dibásico de sodio, ácido fosfórico, metanol.

De Pharmacia Fine Chemicals: Sphacryl S-300 superfino.

De American Can. Co. : Parafilm oil.

4.1.3 Material biológico.

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

4.2 Métodos.

4.2.1 Crecimiento de plantas.

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

4.2.2 Eliminación del oxígeno en los medios de ensayo.

Para eliminar el oxígeno en los medios de ensayo, cuando esto fue necesario, se llevó a cabo el siguiente procedimiento : La solución amortiguadora para la preparación de cada uno de los medios de preincubación de la enzima se sumergió en un baño maría a 30-35°C y se conectó a vacío durante 24 horas para hacer un desgasado exhaustivo y eliminar el oxígeno lo más posible. Finalmente se hizo fluir nitrógeno a la solución por espacio de una hora. El volumen de agua evaporada se repuso con agua destilada también libre de oxígeno.

4.2.3 Extracción de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa

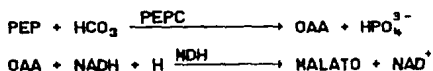
Las hojas de plantas de maíz de cuatro semanas de edad fueron desprovistas de nervadura central y fragmentadas en trozos pequeños, tras lo cual se adicionaron al amortiguador de extracción en una proporción de 4 ml de amortiguador por cada gramo de tejido. El amortiguador de extracción fue el siguiente:

Tris-PO₄ 100 mM pH 7.2, EDTA 1 mM.
 glicerol 20 % (v/v), MgCl₂ 5 mM.
 PVPP 10 % (p/v) -----
 β-mercaptoetanol 10 mM ----- } adicionados en el momento del
 uso del amortiguador.

Posteriormente el tejido se homogenizó utilizando un politrón a máxima velocidad durante cuarenta segundos. El homogenado obtenido se filtró a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó a 18000 rpm durante 30 minutos en la centrifuga Beckman modelo J2-21, utilizando el rotor JA-20, el precipitado se desechó y al sobrenadante se le determinó actividad de PEPC y concentración de proteínas. Todo este procedimiento se llevó a cabo a una temperatura de 0 a 4 °C manteniendo los extractos y soluciones en un baño de hielo.

4.2.4 Ensayo de la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa

Para determinar la actividad enzimática se empleó un sistema acoplado a la enzima málico deshidrogenasa (MDH) (E.C.1.1.1.37) dependiente de NADH, según el método descrito por Uedan (79). En este sistema el oxalacetato resultante de la carboxilación del fosfoenolpiruvato es reducido a malato gracias a la actividad de la enzima málico deshidrogenasa que paralelamente oxida NADH a NAD según el siguiente esquema de reacciones :



La cantidad de oxalacetato producido durante el transcurso de la reacción puede así medirse siguiendo el descenso de la densidad óptica a 340 nm debido a la conversión de NADH a NAD⁺. La pendiente obtenida (cambio de densidad óptica /minuto) se midió durante los primeros instantes de la reacción donde se obtenía una

adecuada linealidad de cambios de absorbancia frente a tiempo (velocidad inicial).

La composición del medio de ensayo estandar es la siguiente :

Reactivos.	Volumen (ml).	concentración final en el medio de ensayo
amortiguador	0.500	
NADH (20 mM)	0.010	0.2 mM
DTT (200 mM)	0.010	2.0 "
NaHCO ₃ (1 M)	0.010	10.0 "
PEP (200 mM)	0.005	1.0 "
MDH (300 unidades)	0.010	3 unidades.
H ₂ O	El volumen necesario para completar 1 ml.	
Volumen final	1 ml.	

La actividad enzimática se calculó con la siguiente expresión:

$$A = \frac{(\Delta DO) \cdot v}{E \cdot V \cdot d \cdot C}$$

en donde :

- ΔDO. = cambio de densidad óptica por minuto.
- v. = volumen final de la mezcla de reacción.
- V. = volumen de preparación enzimática utilizada.
- E. = coeficiente de extinción molar de NADH a 340 nm (6.22 cm²/μmol.)
- d. = distancia del paso de luz en la celda del espectrofotómetro.
- c. = concentración de proteína de la preparación enzimática utilizada en mg/ml.

La temperatura del ensayo fue de 25 °C.

Los blancos hechos en ausencia de PEP o en ausencia de enzima PEPC mostraron un descenso de absorbancia en función del tiempo que es despreciable frente a las velocidades de reacción medidas.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que carboxila un μmol de PEP por minuto en nuestras condiciones de ensayo.

4.2.5 Purificación parcial de fosfoenolpiruvato carboxilasa por precipitación con sulfato de amonio.

El extracto crudo obtenido de la homogeneización de hojas y su posterior centrifugación fue inicialmente precipitado agregando sulfato de amonio sólido, de manera lenta y con agitación

constante hasta alcanzar un 30 % de saturación. (El pH se controló adicionando Tris base en polvo cuando fue necesario). Después de agregarle toda la sal se mantuvo diez minutos con agitación lenta, tras lo cual se centrifugó a 18000 rpm durante 30 minutos en la centrifuga Beckman modelo J2-21 y utilizando el rotor JA-20 a 4°C. El precipitado se desechó y el sobrenadante se sometió a una segunda precipitación, esta vez al 60 % de saturación siguiendo un procedimiento idéntico.

Después de la segunda centrifugación el precipitado (30-60 %) contiene toda la actividad de PEPC.

4.2.6 Determinación de la concentración de proteína.

Basados en la modificación de Hartree (132) al método de Lowry, nosotros modificamos el método de azul de Coomassie de Bradford (87) para determinación de proteínas. Supusimos que los extractos crudos de maíz podrían contener glucoproteínas que producen una respuesta no lineal. Suponiendo que un tratamiento en medio alcalino en presencia de desoxicolato podría mejorar la respuesta, hicimos lo siguiente :

Como estándar se empleó albúmina de suero de bovino (BSA) tipo I, la cual fue tratada con carbón activado de acuerdo con Chen (133) y fue disuelta en agua a 2.5 mg/ml.

Se probaron diluciones de albúmina conteniendo : 0,5,25,50,75 y 100 µg de albúmina, y se llevaron a 100 µl con agua destilada.

Posteriormente se adicionaron 100 µl de medio A :

$\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, glicerol 10 % y DTT 2 mM.

Las muestras de extracto de maíz cuya concentración de proteína iba a determinarse fueron diluidas a 100 µl con medio A y completadas a 200 µl con agua destilada. (se hicieron diluciones

de: 10,20,30,40,50,60,70,80,90 y 100 μ l)

Después de esta preparación 100 μ l de desoxicolato de sodio 0.15 % y 100 μ l de NaOH 0.1 N fueron añadidos a cada tubo, los cuales se agitaron vigorosamente e inmediatamente después se incubaron a 60 °C durante 15 minutos, tras lo cual se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 5 ml de solución de azul de Coomassie preparada de acuerdo con Bradford (87).

Las lecturas de absorbancia a 595 nm se hicieron durante la siguiente hora.

La concentración de proteína de las muestras problema se interpoló de la curva patrón de albúmina .

En estas condiciones la cantidad de proteína de extractos de maíz añadidos al ensayo mostraron una respuesta lineal entre 10 y 90 μ g de proteína total con respecto al desarrollo de color.

4.2.7 Purificación de fosfoenolpiruvato carboxilasa por cromatografía en columna.

260 unidades totales de fosfoenolpiruvato carboxilasa precipitadas con sulfato de amonio (30-60 %) se resuspendieron en dos ml. del amortiguador Tris- PO_4 50 mM pH 7.2, EDTA 1 mM, MgCl_2 5 mM y glicerol 15 %. La enzima resuspendida se sometió a un proceso de purificación de cromatografía en columna basado principalmente en el método descrito por Uedan y Sugiyama (79).

Así nuestra preparación enzimática resuspendida se aplicó a una columna de filtración en gel de Sephacryl S-300 superfino de 1.6 X 60 cm. y se eluyó con el mismo amortiguador de resuspensión.

Se colectaron fracciones de 2 ml y se determinó actividad y

concentración de proteínas a cada fracción.

Las fracciones correspondientes al pico de actividad de PEPC se aplicaron a una columna de intercambio iónico de DEAE (celulosa) Sephacel de 5.4 X 11 cm. La columna se equilibró con el mismo amortiguador utilizado para la resuspensión, y se lavó con cinco volúmenes de dicho amortiguador hasta que ya no se registró absorbancia a 280 nm en el eluato. Posteriormente la enzima se eluyó con un gradiente lineal de KCl de 0 a 200 mM aplicado en el mismo amortiguador. Se colectaron las fracciones y se les determinó actividad de PEPC y concentración de proteínas.

Todo el procedimiento de purificación se llevó a cabo en un cuarto frío a una temperatura de 0 a 4 °C.

4.2.7.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

La preparación enzimática obtenida del proceso de purificación se sometió a electroforesis en condiciones desnaturalizantes con el fin de determinar el grado de pureza de la misma, para lo cual se llevó a cabo el procedimiento descrito por Laemli (134), y que se describe a continuación.

Una muestra de la enzima se mezcló con un amortiguador para muestra en una proporción de 1-1.

El amortiguador para muestra fue el siguiente : Tris-HCl 0.0625 M pH 6.8, SDS 2 %, , EDTA 1 mM , β -mercaptoetanol 5 % (v/v), azul de bromofenol 0.01 % (p/v). Una vez hecha la mezcla se calentó durante tres minutos a 100 °C.

Las características de los geles fueron las siguientes :

Un gel separador de 10 % T de 7 cm de longitud , preparado con el amortiguador Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1 % , EDTA 1 mM

Un gel concentrador de 4 % T colocado sobre el gel separador

y preparado con el amortiguador Tris-HCl 0.125 M, SDS 0.1 % , EDTA 1 mM, pH 6.8.

El amortiguador utilizado para los electrodos fue el siguiente : Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1 % , pH 8.3.

La electroforesis se corrió durante tres horas, tras lo cual los geles se tñeron con azul de Coomassie durante dos horas y, posteriormente desteñidos sumergiendolos en una solución de etanol-ác. acético-agua en una proporción de 5-1-5 respectivamente.

Para determinar el peso molecular se emplearon los siguientes marcadores :

β-galactosidasa de <u>E. coli.</u>	116 000 daltones.
Fosforilasa B de músculo de conejo.	94 000 "
Albumina de suero de bovino.	67 000 "
Albumina de huevo.	43 000 "
Anhidrasa carbónica.	30 000 "

4.2.8 Experimentos de preincubación de fosfoenolpiruvato carboxilasa.

4.2.8.1 Preincubación de la enzima parcialmente pura a pH 9 y a pH 7.

Fosfoenolpiruvato carboxilasa parcialmente purificada por precipitación con sulfato de amonio (como se describió en 4.2.5) se resuspendió y se preincubó a pH 9 y a pH 7 a 25 °C en el amortiguador de TEA-HCl 100 mM conteniendo además EDTA 1 mM . En ambos valores de pH se hicieron preincubaciones en ausencia o presencia de : PEP 5 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 mM y glicerol 20 % (v/v).

Con el fin de evitar excesiva dilución de la enzima, las preincubaciones se realizaron en el mismo medio en el que se iba a determinar la actividad enzimática una vez finalizados los

periodos de preincubación. Por ello en el medio de preincubación estaban presentes los reactivos necesarios para la determinación de la actividad de PEPC, descritos anteriormente en 4.2.4, con excepción de los sustratos PEP y/o Mg^{2+} que se añadieron una vez finalizados los correspondientes periodos de preincubación para iniciar la reacción enzimática y determinar así la actividad residual de la enzima tras el tratamiento. La Tabla 1 muestra la composición del medio de preincubación.

TABLA 1. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE PREINCUBACIÓN A pH 9 Y 7.

Reactivos	Volumen (ml)	Concentración final en el medio de preincubación.
Amortiguador *	0.500	
NADH (20 mM)	0.010	0.2 mM
NaHCO ₃ (1 M)	0.010	10 mM
MDH (300 unidades)	0.010	3 unidades.
Enzima (PEPC)	0.010	
Agua destilada	0.430	
Volumen final	0.970	

* Como amortiguador a ambos valores de pH se uso TEA-HCl 100 mM EDTA 1 mM, en donde se disolvieron las sales y el glicerol usados en los diferentes tratamientos.

El volumen del medio de preincubación fue 0.970 ml, completándose a 1 ml tras la adición de los sustratos para iniciar la reacción.

Los resultados se muestran como porcentajes de la actividad de la enzima al tiempo cero de preincubación a los diferentes valores de pH (tomando a éste como el momento en que se mezcla la preparación enzimática con el medio de preincubación) y representan la concentración de enzima activa en la mezcla de preincubación.

4.2.8.2 Preincubación de la enzima pura a pH 8.5

Fosfoenolpiruvato carboxilasa purificada (como se describió en 4.2.7) se preincubó a 25 °C y a pH 8.5 en presencia y ausencia de polietilenglicol 6000 15 % (v/v) y ditiotreitól (DTT) 5 mM. La composición del medio de preincubación fue la misma que la usada con la enzima parcialmente pura (descrita anteriormente en la tabla 1).

En este caso el medio de preincubación y los frascos en que fue preparado y guardado fueron hermeticamente sellados y desgasados (como se describió en 4.2.2 para eliminar en lo posible el oxígeno) con el fin de evitar la oxidación de grupos ionizados.

Las incubaciones y las medidas de actividad se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno. Para ello las celdas del espectrofotómetro donde se realizaron las incubaciones y las medidas de actividad fueron hermeticamente selladas con tapones especialmente diseñados para posteriormente eliminar el oxígeno por gaseo exhaustivo con nitrógeno.

Las manipulaciones necesarias de PEPC y de las soluciones de reactivos se hicieron cuidadosamente utilizando jeringas y microjeringas para evitar el contacto con la atmósfera.

4.2.8.3 Preincubación a pH neutro de la enzima pura previamente inactivada por pH alcalino (pH 8.5)

Tras inactivar la enzima a pH 8.5, se preincubó por diferentes periodos de tiempo a pH 7 con el fin de estudiar el proceso de reactivación. Para ello se llevó a cabo el siguiente procedimiento: el medio de preincubación a pH 8.5 conteniendo la enzima inactiva se diluyó 1 a 2 con un amortiguador de TEA-HCL 100 mM pH 5.5 previamente desgasado, resultando un pH final de 7, tras lo cual la recuperación de la actividad fue seguida con el tiempo.

4.3 Análisis matemático de los resultados experimentales.

4.3.1 Determinación de la velocidad inicial de inactivación a pH 8.5

Algunas veces se plantean problemas en ciencias cuya solución práctica solamente puede hacerse aproximando una función $f(x)$ que sea difícil de evaluar, a un tipo de función $g(x)$ más simple y manejable (135).

En algunos casos $f(x)$ es conocido analíticamente, pero difícil de calcular, en otros casos podemos saber a que clase general de funciones pertenece $f(x)$ sin conocer los valores de determinados parametros funcionales. Por el contrario, en general, solo es conocida la información funcional por medio de los puntos base y muy poco se sabe sobre $f(x)$. Este último es el caso de nuestros experimentos a pH 8.5, en donde la velocidad inicial de inactivación es el único parámetro real que podemos determinar a partir de los resultados crudos, ya que las curvas obtenidas experimentalmente no nos permiten calcular otro parámetro valioso.

La velocidad inicial de inactivación es un parámetro importante ya que su valor absoluto es un reflejo del efecto que sobre el proceso de inactivación de PEPC tienen los diferentes factores probados a pH 8.5

Nosotros determinamos la velocidad inicial de inactivación aproximando las curvas obtenidas en cada uno de los experimentos a pH 8.5, a un polinomio de interpolación, particularmente a un polinomio de interpolación de Lagrange. Posteriormente calculamos la derivada de las curvas (polinomio), en el tiempo $t=0$.

Los fundamentos teóricos del polinomio de interpolación son los siguientes :

Existe uno y solamente un polinomio de grado $n - 1$ inferior

que toma los valores $f(x_0), f(x_1), \dots, f(x_n)$, para los $n+1$ diferentes puntos base x_0, x_1, \dots, x_n ; llamado polinomio de interpolación. El polinomio de interpolación tiene aquellos coeficientes A_i que componen la solución del sistema de $n+1$ ecuaciones lineales:

$$A_0 + A_1 x_0 + A_2 x_0^2 + \dots + A_n x_0^n = f(x_0)$$

$$A_0 + A_1 x_1 + A_2 x_1^2 + \dots + A_n x_1^n = f(x_1)$$

⋮

$$A_0 + A_1 x_n + A_2 x_n^2 + \dots + A_n x_n^n = f(x_n)$$

El determinante de la matriz de los coeficientes del sistema anterior es el siguiente:

$$\begin{vmatrix} 1 & x_0 & x_0^2 & \dots & x_0^n \\ 1 & x_1 & x_1^2 & \dots & x_1^n \\ 1 & x_2 & x_2^2 & \dots & x_2^n \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & x_n & x_n^2 & \dots & x_n^n \end{vmatrix}$$

Se conoce como determinante de Vandermonde y es distinto de cero si $x_i \neq x_j$. Por tanto, existe una única solución para los valores A_i , o sea, existe un único polinomio $P_n(x)$ que reproduce exactamente a $f(x)$ para los puntos base.

La forma de Lagrange para el polinomio de interpolación está dada por :

$$P_n(X) = \sum_{i=0}^n L_i(X) f(X_i)$$

En donde :

$$L_i(X) = \prod_{\substack{j=0 \\ j \neq i}}^n \frac{(X - X_j)}{(X_i - X_j)} \quad , \quad i = 0, 1, \dots, n$$

Cada valor funcional $f(X_i)$ incluido en el polinomio está multiplicado por $L_i(X)$, un polinomio de grado n en X , ya que existen n factores $(X - X_j)$.

La aproximación de las curvas a el polinomio de Lagrange y el calculo de las derivadas se llevó a cabo en una computadora utilizando un programa elaborado en nuestro laboratorio para este propósito en lenguaje Pascal version 3.0

El programa principal utilizado es el siguiente :

```

Function Derivada(Inicio,
                  Grado,
                  Apunt:Integer):Real;

```

Esta función permite el cálculo de la derivada del punto (Apunt) del arreglo dados (Grado+1) puntos consecutivos, ajustando dichos puntos a un polinomio de Lagrange de grado=Grado empezando con el punto (Inicio) del arreglo.

```

Var
  Numer,
  Denom,
  Factor,
  Deriv :Real;
  I1,
  J1,
  Fin,
  K1      : Integer
Begin
  Fin := Inicio + Grado
  Deriv := 0;
  For I1:= Inicio to fin do
  Begin
    Numer:= 0;
    Denom:= 1;
    For J1:= Inicio to fin do
    Begin
      if (J1<>I1) Then
      Begin
        if (Apunt=J1) OR (Apunt=I1) Then
        Begin
          Factor := 1;
          For K1:= Inicio to Fin do
          Begin
            If (K1<>J1) AND (K1<>I1) Then
            Factor:= Factor * (Punto,[Apunt"X"]- Punto[K1,"X"]);
          end;
          Numer:= Numer + Factor;
        end;
        Denom:= Denom * (Punto [I1,"X"]-Punto[J1,"X"]),
      end; (If J1)
    end; (For J1)
    Deriv:= Deriv+ Punto[I1,"Y"]* Numer/Denom;
  end; (For I1)
  Derivada := Deriv;
end; (Derivada)

```

4.3.2 Modelos matemáticos para una cinética de descomposición de primero y de segundo orden irreversibles.

Para una reacción de orden n la forma de la expresión de velocidad es :

$$- \frac{dc}{dt} = k c^n$$

En donde :

c = concentración del reactivo.

k = constante de velocidad.

n = Orden de reacción.

(La cual puede ser fácilmente integrada después de multiplicar por dt y dividiendo entre c^n para dar las variables separadas).

Los límites de integración son tomados como : $c=c_0$ a $t=0$, y $c=c$ a $t=t$ respectivamente:

$$- \frac{dc}{c^n} = k dt$$

$$- \int_{c_0}^c \frac{dc}{c^n} = k \int_0^t dt$$

Para $n=1$ (primer orden) el resultado es :

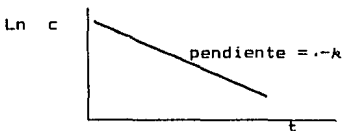
$$\ln \frac{c_0}{c} = kt$$

$$\ln c = -kt + \ln c_0$$

$$c = c_0 e^{-kt}$$

Para verificar si los datos experimentales corresponden a una reacción de primer orden, la forma logarítmica es preferible, ya que una gráfica de $\ln c$ contra t , debe dar una línea recta con una pendiente negativa ($-k$).

Así una gráfica para una cinética de primer orden es como la siguiente (136).

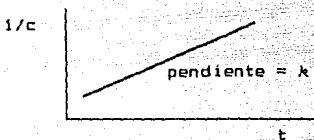


La pendiente de esta recta representa el valor de la constante de velocidad k (con signo negativo).

Para una reacción de segundo orden, la integración resulta en lo siguiente :

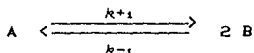
$$\frac{1}{c} = kt + \frac{1}{c_0}$$

De acuerdo a esto, una gráfica de $1/c$ contra t , es lineal y con una pendiente positiva igual a k , como la siguiente :



4.3.3 Modelo matemático para una cinética de descomposición de segundo orden reversible.

La deducción de la expresión matemática que describe el cambio de concentración en función del tiempo para una reacción de descomposición reversible de orden 2; es decir:



Sean:

a = Concentración de la especie A; b = Concentración de la especie B; A_0 = Concentración de la especie A al tiempo cero. Entonces:

$$\text{Ec.1:} \quad \text{velocidad} = -\frac{da}{dt} = k_{+1} a - k_{-1} b^2$$

La ecuación de balance de materia será:

$$\text{Ec.2:} \quad A_0 = a + 2b.$$

Y la constante de equilibrio de la reacción será:

$$\text{Ec.3:} \quad K_{eq} = \frac{b^2}{a\alpha} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{(A_0 - a\alpha)^2}{4 a\alpha}$$

En donde $a\alpha$ y $b\alpha$ son las concentraciones de las dos especies a tiempo infinito, es decir, al equilibrio.

Substituyendo las ecuaciones 2 y 3 en 1 tenemos:

$$-\frac{da}{dt} = k_{+1} a - \frac{1}{4} k_{-1} (A_0 - a\alpha)^2 = k_{+1} \left[a - \frac{4}{K_{eq}} (A_0 - a\alpha)^2 \right]$$

La cual al substituir el valor de K_{eq} de la Ec.3 queda:

$$\text{Ec.4:} \quad -\frac{1}{k_{+1}} \cdot \frac{da}{dt} = a - \left(\frac{A_0 - a\alpha}{A_0 - a\alpha} \right)^2 \cdot a\alpha$$

Sumando los términos de la derecha desarrollando el numerador y simplificando se obtiene la expresión siguiente:

$$-\frac{1}{k_{+1}} \cdot \frac{da}{dt} = \frac{A_0 a + a a\alpha - A_0 a\alpha - a^2 a\alpha}{(A_0 - a\alpha)^2}$$

La cual después de factorizar el numerador de la derecha y separar las variables se convierte en:

$$\text{Ec.5:} \quad \frac{(A_0 - a\alpha)^2 da}{(a - a\alpha)(A_0 - a\alpha)} = -k_{-1} dt$$

Esta ecuación puede integrarse por descomposición en fracciones parciales, la cual se facilita grandemente si se utiliza el factor: $(A_0 + a\alpha)/(A_0 - a\alpha)$. Multiplicando por esta constante ambos miembros y descomponiendo en fracciones parciales se obtiene:

$$\text{Ec.6: } \frac{da}{(a - a\alpha)} + \frac{a\alpha da}{(A_0^2 - a\alpha a)} = -k_{+1} \cdot \left(\frac{A_0 + a\alpha}{A_0 - a\alpha} \right) dt$$

Integrando ambos miembros desde A_0 a tiempo cero hasta a a tiempo t , usando las propiedades de los logaritmos y simplificando la expresión se obtiene lo siguiente:

$$\text{Ec.7: } \text{LN} \left[\frac{A_0(a - a\alpha)}{A_0^2 - a\alpha a} \right] = -k_{+1} \cdot \left(\frac{A_0 + a\alpha}{A_0 - a\alpha} \right) \cdot t$$

Si definimos ahora el parámetro $\lambda_t = (A_0 - a) / (A_0 + a)$ para $a = a$ a tiempo t y sus correspondientes valores λ_α a tiempo infinito y λ_0 a tiempo cero (que es igual a cero), la expresión anterior (Ec.7) puede escribirse como:

$$\text{LN} \left[\frac{\lambda_\alpha - \lambda_t}{\lambda_\alpha + \lambda_t} \right] = -\frac{k_{+1}}{\lambda_\alpha} \cdot t$$

Cuando se desea hacer ajuste de datos mediante regresión no lineal puede transformarse esta ecuación en su forma exponencial:

$$a = A_0 \left[\frac{a\alpha + A_0 \cdot \exp\left(-\frac{k_{+1}}{\lambda_\alpha} \cdot t\right)}{A_0 + a\alpha \cdot \exp\left(-\frac{k_{+1}}{\lambda_\alpha} \cdot t\right)} \right]$$

O en términos de la variable λ ya definida:

$$\lambda = \lambda_\alpha \left[\frac{1 - \exp\left(-\frac{k_{+1}}{\lambda_\alpha} \cdot t\right)}{1 + \exp\left(-\frac{k_{+1}}{\lambda_\alpha} \cdot t\right)} \right]$$

Esta ecuación tiene las propiedades esperadas ya que a tiempo cero a es igual a A_0 y a tiempo infinito, dado que $\exp(-t)$ tiende a cero conforme t crece, a es igual a $a\alpha$.

Los valores de K_{eq} y k_{-1} pueden calcularse fácilmente a partir de esta ecuación ya que:

$$K_{eq} = \frac{16 A_0 \lambda_\alpha^2}{1 - \lambda_\alpha^2} \quad \text{y} \quad k_{-1} = k_{+1}/K_{eq}$$

V. RESULTADOS.

5.1 Purificación de PEPC por cromatografía en columna.

En la figura 6 se muestra el perfil de elución de proteínas y de actividad de PEPC tras cromatografía de filtración en gel (en Sephacryl S-300 superfino). Puesto que la enzima es un tetrámero de peso molecular 400 000, eluye en las primeras fracciones de la columna. El pico de actividad corresponde a las fracciones 9 a la 15 y se recuperaron 241 unidades totales de actividad. Las unidades totales de PEPC en el extracto crudo fueron 370 , y por lo tanto el rendimiento de este paso de purificación fue 65 % .

Estas fracciones se sometieron a cromatografía de intercambio iónico (en DEAE Sephacel) bajo las condiciones descritas en métodos. El perfil de elución obtenido se muestra en la figura 7. Como puede observarse el pico de actividad de PEPC eluyó entre 75 y 100 mM del gradiente de KCl. Se reunieron las fracciones con la más alta actividad específica (de la 20 a la 33), en las que se recuperaron 207 unidades totales de actividad. Se calculó el rendimiento de este paso de purificación que fue de 56 % . Los resultados de la purificación se resumen a continuación :

PURIFICACIÓN DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE HOJA DE MAÍZ.

Paso.	Act. total. [Proteína] (unidades).	(mg).	Act. específica. (u/mg).	Rendimiento. (%).
Extracto crudo.	370	142.3	2.6	100
Precipitación con sulfato de amonio.	260	92.49	2.8	70.2
Sephacryl.	241	16.74	14.39	65
DEAE Sephacel.	207	11.384	18.18	56

La pureza de esta preparación enzimática se determinó por electroforesis bajo condiciones disociantes. En la figura 8 se muestra una fotografía de un gel de las electroforesis.

La banda de PEFC se identificó por el peso molecular del monómero reportado de 100 000 daltones (74,77,78,80).

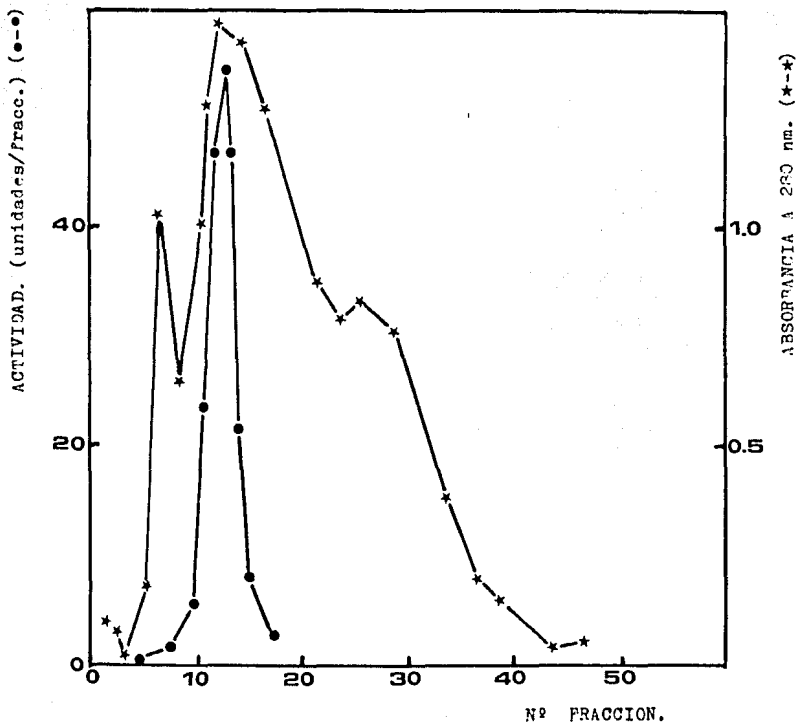


FIGURA 6. PERFIL DE ELUCION DE PROTEINAS Y DE ACTIVIDAD DE PEPc TRAS CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL.

ACTIVIDAD. (unidades/fracc.) (●-●)

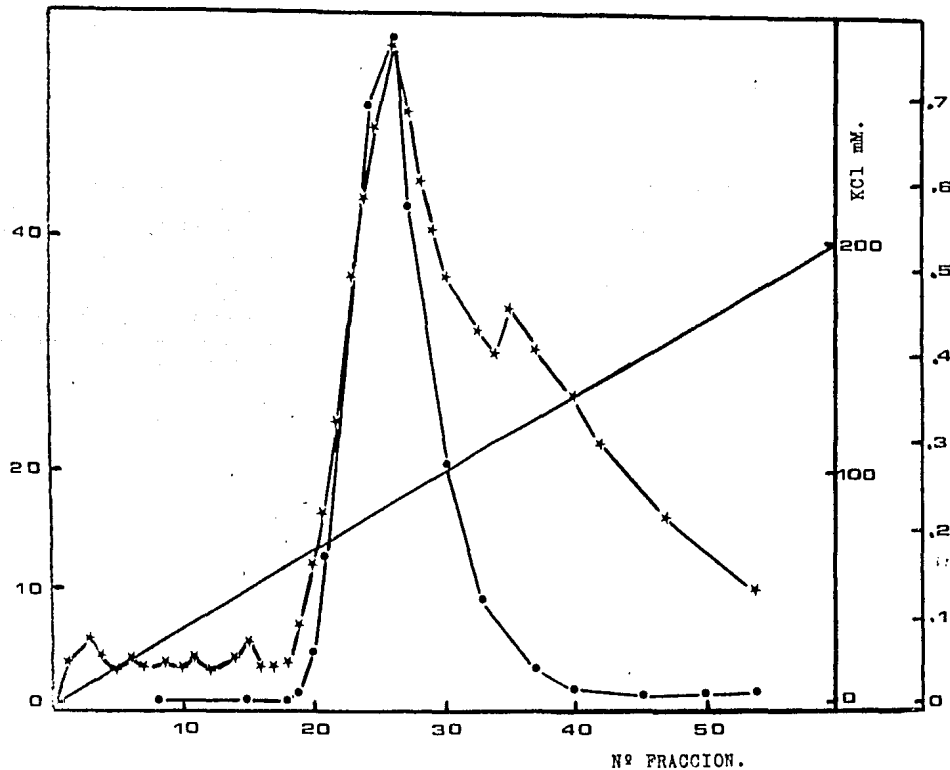


FIGURA 7. PERFIL DE ELUCION DE PROTEINAS Y DE ACTIVIDAD DE PEPC TRAS CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

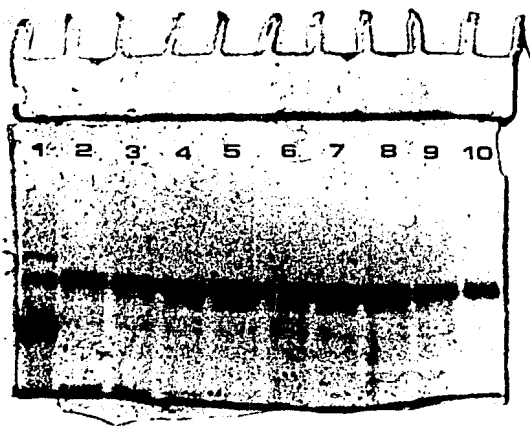


FIGURA 8. Análisis electroforético de Fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz purificada por cromatografía a través de Sephacryl (S-300) superfino y DEAE-Sephacel. Carril 1: marcadores de peso molecular, Carriles 2 al 10 : Fosfoenolpiruvato carboxilasa . Las concentraciones de enzima aplicadas fueron las siguientes: carriles 2 al 5 : 10 μg , carriles 5 al 9 : 20 μg . , carril 10 : 15 μg .

5.2 Estabilidad de fosfoenolpiruvato carboxilasa parcialmente pura, a pH 7 y a pH 9. Efecto de ligandos y de glicerol.

Cuando PEPC se preincuba a pH 9 y a 25 °C bajo las condiciones descritas en métodos, sufre una rápida pérdida de actividad. Así, tras los primeros diez minutos de preincubación se pierde el 80 % de la actividad inicial, por el contrario cuando se preincuba a pH 7 solamente hay una pérdida del 3 % de la actividad inicial en el mismo periodo de tiempo. Después de este tiempo la actividad se conserva practicamente invariable a ambos valores de pH. Estos resultados se muestran en la figura 9. Por tanto se puede considerar que la enzima es razonablemente estable a pH 7 y que la dilución de ésta, que conlleva la preincubación, no es responsable de la pérdida de actividad observada a pH 9, sino que éste es un efecto del pH alcalino. Este efecto se ejerce mediante ionización de grupos específicos necesarios para la estabilidad de la enzima.

Con el fin de conocer un poco más acerca del proceso de inactivación, se investigó la posible protección ofrecida por los sustratos : PEP y Mg^{2+} ; un inhibidor Ca^{2+} y el conocido agente estabilizador de enzimas : glicerol. En las figuras 10 y 11 se muestra el efecto de dichos agentes sobre la estabilidad de PEPC a ambos valores de pH.

Cuando la enzima se preincuba a pH 7 (Fig.10), la presencia de Mg^{2+} y Ca^{2+} no tienen efecto sustancial sobre su estabilidad, ya que después de 150 minutos de preincubación se pierde el 8 % de la actividad inicial, prácticamente igual que cuando se preincuba en ausencia de dichos agentes. Sin embargo, la inclusión de glicerol en el medio de preincubación a pH 7 incrementa ligeramente la estabilidad de la enzima, observándose que después de un periodo de 150 minutos la inactivación medida es solo del 3 % (Fig. 10).

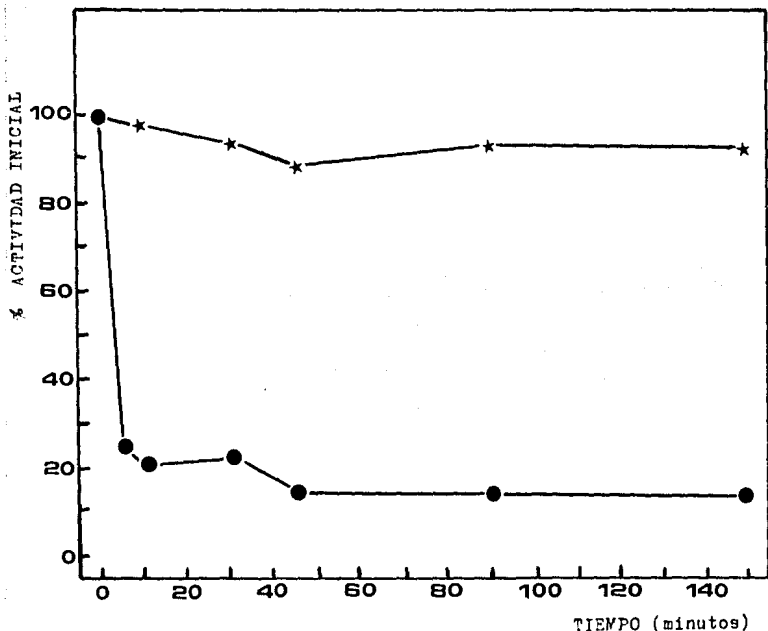


FIGURA 9. EFECTO DEL pH DEL MEDIO DE PREINCUBACION SOBRE LA ACTIVIDAD DE α -KETOGLICOLATO CARBOXYLASA PARCIALMENTE PURA EXTRAIDA DE HOJA DE MAIZ. Las preincubaciones se hicieron en el amortiguador Trisacetato-HCl 100 mM, conteniendo además EDTA 1 mM a 25 °C y pH 7 (*-*) ; pH 9 (●-●). Las concentraciones de enzima preincubadas fueron 5 μ g/ml.

Estos resultados eran de esperarse dada la ligera pérdida de actividad que la enzima sufre a este valor de pH. Sin embargo son de gran interés puesto que nos sirven de control para los experimentos realizados a pH 9.

El hecho de que glicerol disminuya aún más esta pérdida, sugiere que la dilución que la enzima sufre en el medio de preincubación, aunque en grado mínimo, también induce pérdida de actividad.

Por otro lado cuando la enzima se preincuba a pH 9 (Fig.11), la presencia de calcio no tiene efecto protector alguno frente al proceso de inactivación, por el contrario el efecto inactivante es ligeramente mayor que cuando la enzima se preincuba en ausencia de dicho catión, ya que en los primeros diez minutos de preincubación se pierde el 90 % de la actividad inicial.

La inclusión de PEP 5 mM y $MgCl_2$ 10 mM en el medio de preincubación ejerce un efecto protector parcial frente a la inactivación a pH 9 (Fig.11). En presencia de $MgCl_2$ se pierde el 57 % de la actividad inicial en los primeros diez minutos de preincubación, mientras que en presencia del sustrato PEP se pierde solamente el 37 % de la actividad en el mismo tiempo. Además tanto con $MgCl_2$ como con PEP se observa una pérdida gradual de la actividad después de la rápida inactivación observada en los primeros diez minutos, llegándose a alcanzar un 92 % de inactivación después de 150 minutos de preincubación en presencia del primero y un 70 % de inactivación en presencia del segundo después del mismo tiempo.

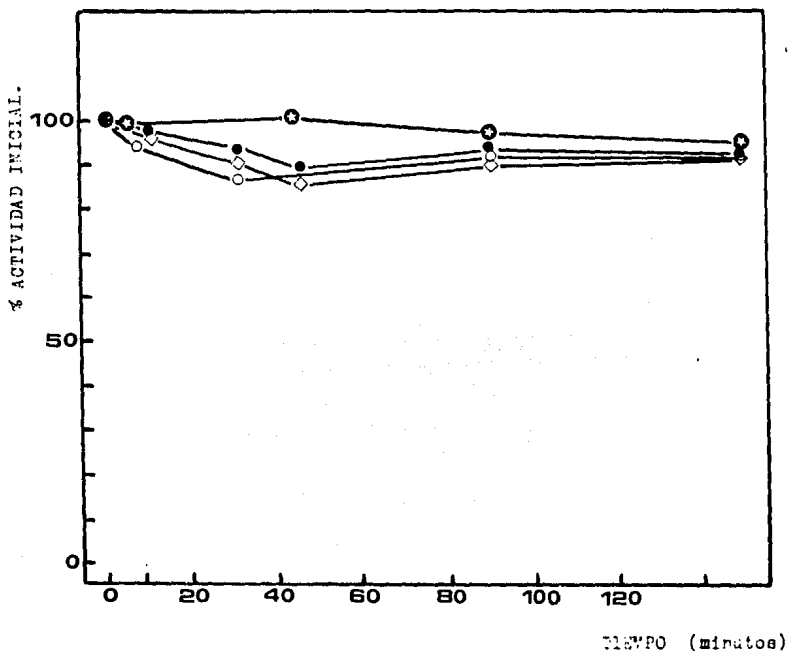


FIGURA 10. EFECTO DE DIVERSOS AGENTES SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA ENZIMA FOSFOENOPIRUVATO CARBOXILASA DE HOJA DE MAIZ PARCIALMENTE PURA. Las preincubaciones se hicieron a pH 7 y a 25 °C en el amortiguador Trisacetato-HCl 100 mM, EDTA 1 mM. Control (sin adición) (●-●), CaCl₂ 10 mM (○-○), MgCl₂ 10 mM (◇-◇) glicerol (■-■). Las concentraciones de enzima preincubadas fueron 5 µg./ml.

El glicerol si muestra un importante efecto de protección contra la inactivación de la enzima a pH 9, ya que como puede observarse en la figura 11, en los primeros diez minutos de preincubación se pierde solamente el 20 % de la actividad inicial y después de este tiempo la actividad permanece prácticamente constante, conservándose el 78 % de la actividad inicial después de un periodo de preincubación de 150 minutos.

En resumen, se observa claramente que cuando la enzima PEPC de hoja verde de maíz se preincuba a pH alcalino (pH 9), sufre una rápida y considerable pérdida de actividad, y que la inclusión de glicerol proporciona una protección casi total ante este fenómeno de inactivación por pH, en tanto que el sustrato PEP proporciona una protección parcial. Ca^{2+} y Mg^{2+} no tienen efecto protector, y en el caso del primero éste resulta incluso inactivante. (Los resultados se resumen en la tabla 2).

Es bien conocido el papel de glicerol como estabilizador de la estructura cuaternaria de las proteínas, protegiendo frente a frío y dilución, que generalmente conllevan pérdida de esta estructura y por consiguiente de la actividad biológica de las proteínas. Por ello dada la notable protección que glicerol ofrece frente a la inactivación por pH alcalino, es de suponer que está implicado un proceso de disociación de la enzima tetramérica activa en sus subunidades (dímeros o monómeros) inactivas.

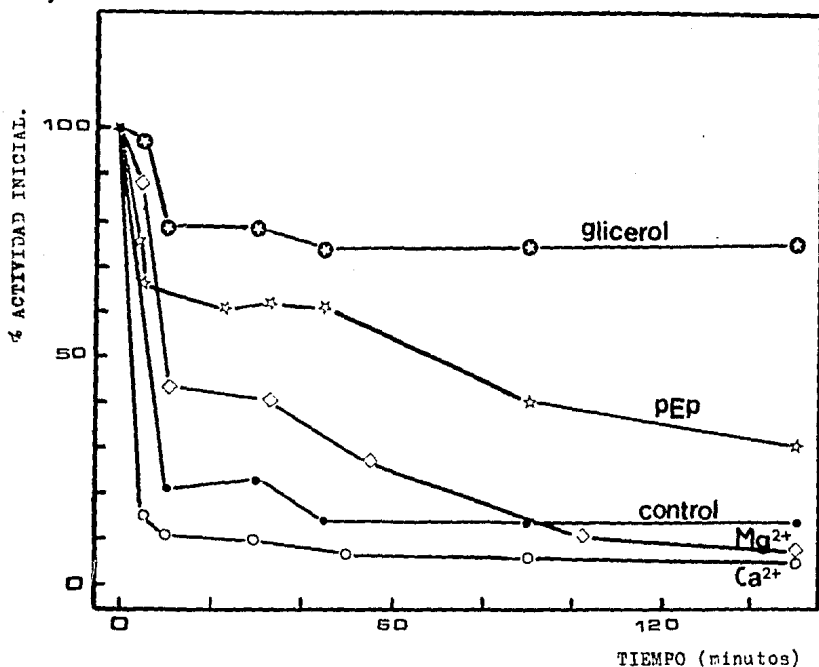


FIGURA 11. EFECTO DE DIVERSOS AGENTES SOBRE LA INACTIVACION DE FOSFOENOPIRUVATO CARBOXILASA EXTRAIDA Y PARCIALMENTE PURIFICADA DE HOJA DE MAIZ. Las preincubaciones se hicieron a pH 9 y a 25 °C en el amortiguador trietanolamina-HCl 100 mM, EDTA 1 mM. Control (sin adición) (●-●); CaCl₂ 10 mM (○-○); MgCl₂ 10 mM (◇-◇), PEP 5 mM (★-★); glicerol 20 % (⊙-⊙). Las concentraciones de enzima preincubadas fueron 5 ug/ml.

TABLA 2. EFECTO DE DIVERSOS AGENTES SOBRE LA ACTIVIDAD DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE HOJA DE MAIZ DURANTE SU PREINCUBACION A pH 9 y 7.

Adiciones	Preincubación en TEA-HCl 100 mM, EDTA 1 mM.			
	% Inactivación			
	pH 9		pH 7	
	10 min.	150 min.	10 min.	150 min.
ninguna	80	85	3	7
CoCl ₂ (10 mM)	90	95	6	8
MgCl ₂ (10 mM)	57	92	4	8
PEP (5 mM)	35	70		
glicerol (20 %)	20	22	0	3

Estos resultados muestran claramente que el valor alcalino de pH es el factor directamente responsable de la inactivación de PEPC.

A fin de caracterizar la pérdida de actividad dependiente del pH observada, y con la intención de determinar el mecanismo molecular mediante el cual ocurre la inactivación, decidimos realizar estudios de inactivación usando enzima purificada, lo que nos permitiría por un lado eliminar la participación de otras proteínas contaminantes, como proteasas cuya actividad pudiera incrementarse a valores alcalinos de pH y de esta manera dar lugar a artefactos, y por otro lado intentar reactivar la enzima regresándola a un medio de pH neutro después de inactivada por pH alcalino. En extractos parcialmente purificados las subunidades disociadas con regiones altamente hidrofóbicas expuestas pueden unirse a otras proteínas hidrofóbicas de la preparación y de este modo hacer muy difícil, si no imposible su correcta reasociación y recuperación de la actividad.

Se eliminó el oxígeno en los medios de preincubación (como se describió en 4.2.2) para evitar fenómenos de oxidación de grupos ionizados.

5.3 Efecto de la concentración de la enzima pura sobre el proceso de inactivación a pH alcalino.

Cuando fosfoenolpiruvato carboxilasa pura se preincuba a concentración baja de proteína a pH 8.5 y a 25°C en el amortiguador Trietanolamina-HCl 50 mM, conteniendo además EDTA 0.1 mM se observa una rápida pérdida de actividad, mientras que cuando se utiliza una concentración diez veces mayor de enzima hay una disminución en la velocidad de inactivación, (Fig. 12 y Tabla 3). Como puede apreciarse, cuando la concentración de enzima preincubada es 1.20 µg/ml la velocidad inicial de la reacción de inactivación es $-2.70 \Delta a \cdot \text{min}^{-1}$, mientras que cuando la concentración es 12.0 µg/ml la velocidad inicial de inactivación se reduce a la mitad ($-1.36 \Delta a \cdot \text{min}^{-1}$).

La velocidad inicial de la reacción de inactivación se determinó calculando la derivada de la actividad con respecto al tiempo (da/dt) cuando $t=0$ a partir de los datos obtenidos experimentalmente, mediante un método numérico convencional (como se describió 4.3.1).

La velocidad de inactivación la consideramos como cambio o pérdida de actividad por unidad de tiempo ($\Delta a \cdot \text{min}^{-1}$).

En la figura 12 puede observarse que el proceso de inactivación ocurre aparentemente en dos fases, siendo la primera muy rápida cuya velocidad es afectada por la concentración de enzima y durante la cual se alcanza el mayor porcentaje de inactivación, y una segunda fase de lenta inactivación en donde la velocidad aparentemente no es afectada por la concentración de enzima, ya que en la gráfica las pendientes son aparentemente iguales.

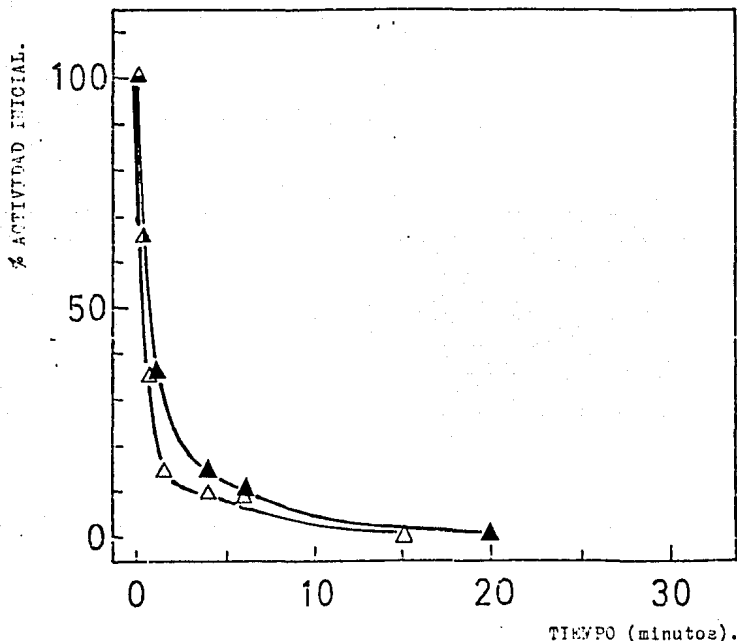


FIGURA 12. INACTIVACION DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA PREINCUBADA A pH 8.5 EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA: 1.20 µg/ml (Δ - Δ), 12.0 µg/ml (\blacktriangle - \blacktriangle). Las preincubaciones se hicieron a 25 °C en un amortiguador de Tris tanolamina-HCl 50 mM, EDTA 0.1 mM.

5.4 Efecto del polietilenglicol sobre el proceso de inactivación en función de la concentración de enzima

En estos experimentos usamos polietilenglicol porque este compuesto es conocido por su efecto protector sobre la estructura cuaternaria de las proteínas (136). Su efectividad, evitando disociación de las proteínas en sus subunidades, es aun superior a la del glicerol en algunos casos.

Cuando FEPC se preincuba a pH 8.5 y a 25°C en el amortiguador de Trietanolamina-HCl 50 mM, EDTA 0.1 mM ; conteniendo además polietilenglicol (PEG de peso molecular promedio 6000) al 15 % (v/v), se observa claramente que la velocidad inicial durante la primera fase de inactivación y el porcentaje de inactivación alcanzado después de un periodo de preincubación de 60 minutos disminuyen considerablemente. (Fig.13 y Tabla 3). Como puede observarse cuando 1.20 µg/ml de enzima se preincuban en presencia de PEG la velocidad inicial (-0.65 Δa.min⁻¹) es cuatro veces menor que cuando se preincuba en ausencia de dicho compuesto (-2.70 Δa.min⁻¹). De la misma manera cuando la concentración de enzima preincubada es diez veces mayor (12.0 µg/ml) la velocidad inicial de inactivación en presencia de PEG (-0.099 Δa.min⁻¹) es ahora siete veces más pequeña que cuando se preincuba en ausencia de PEG (-1.36 Δa.min⁻¹). Es claro que el polietilenglicol ejerce protección frente a la inactivación por pH alcalino, disminuyendo la velocidad con la que se lleva a cabo el proceso y el porcentaje de inactivación alcanzado después de un periodo de preincubación de 60 minutos. Los resultados se resumen en la tabla 3.

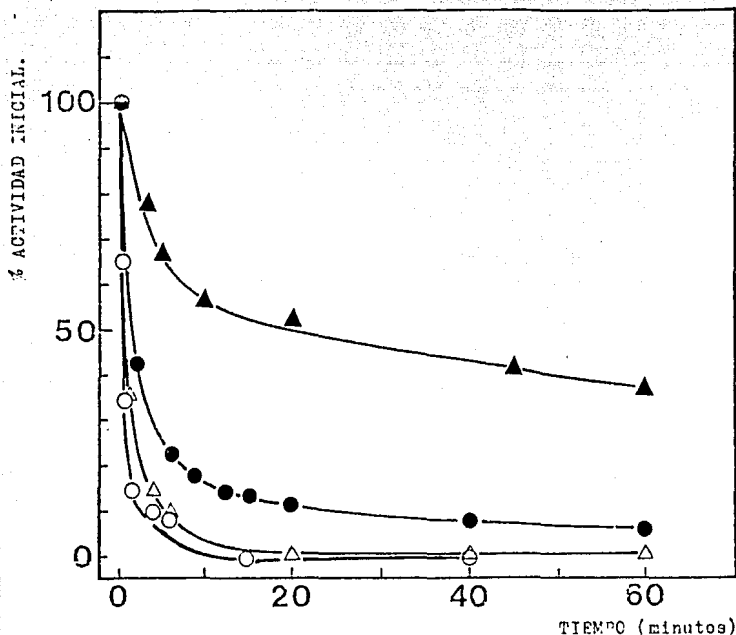


FIGURA 13. INACTIVACION DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA PREINCUBADA A pH 9.5 EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA Y EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE POLISTILENGLICOL 6000 AL 15 % (v/v). La concentración de enzima en el medio de preincubación fué de: 1.20 µg/ml (○-○), 1.20 µg/ml + PEG (●-●), 12.0 µg/ml (△-△), 12.0 µg/ml + PEG (▲-▲). Las preincubaciones se hicieron en un amortiguador de Trietanolamina-HCl 50 mM, EDTA 0.1 mM.

TABLA 3. EFECTO DEL POLIETILENGLICOL (PEG 6000) SOBRE LA INACTIVACION DE PEPC DE HOJA DE MAIZ.

concentración de enzima preincubada.	adiciones	(V ₀) *	% de inactivación después de 60 minutos de preincubación.
1.20 µg/ml	-----	-2.70	98
	PEG (15 %)	-0.65	90
12.0 µg/ml	-----	-1.36	97
	PEG (15 %)	-0.099	60

* Velocidad inicial de la reacción de inactivación ($\Delta a \cdot \text{min}^{-1}$). Las preincubaciones se hicieron en el amortiguador TEA-HCl 50 mM pH 8.5, EDTA 0.1 mM a 25°C (vease métodos).

5.5 Efecto del ditioneitol (DTT) sobre el proceso de inactivación.

Cuando fosfoenolpiruvato carboxilasa se preincuba a pH 8.5 y a 25°C en el amortiguador TEA-HCl 50 mM, EDTA 0.1 mM conteniendo además DTT 5 mM (con la finalidad de mantener reducidos los posibles grupos sulfhidrilo que sufren ionización a este valor de pH) se observa claramente que la pérdida de actividad es más lenta que cuando se preincuba en ausencia de dicho agente reductor (Fig.14 y Tabla 4). Lo anterior puede verse comparando las velocidades iniciales de inactivación en donde se aprecia que DTT produce una disminución de tres veces en la tasa de pérdida de actividad. Además, la presencia de DTT reduce el porcentaje de inactivación alcanzado al final del periodo de preincubación (Tabla 4).

5.6 Efecto combinado de DTT y Polietilenoglicol sobre el proceso de inactivación.

La inclusión conjunta de PEG 15 % y DTT 5 mM en el medio de preincubación de la enzima a pH 8.5 y a 25° C en el mismo amortiguador utilizado en los experimentos anteriores, también

disminuye notablemente el valor de la velocidad inicial de inactivación de PEPC, y además hay una disminución bastante clara en el porcentaje de inactivación alcanzado después del periodo de preincubación (Fig.15 y Tabla 4). Como puede observarse en presencia de PEG+DTT el valor de la velocidad inicial es tres veces menor que el observado en ausencia de ambos agentes, y dicho valor de velocidad es similar al observado con solamente DTT. La actividad residual después del periodo de preincubación es superior en presencia de PEG+DTT que en su ausencia, indicando ésto que la protección frente a la inactivación es más eficaz en presencia de ambos agentes que en presencia de cada uno aisladamente, lo cual señala que, como es de esperar actúan a diferentes niveles.

TABLA 4. EFECTO DEL POLIETILENGLICOL Y DEL DTT SOBRE EL PROCESO DE INACTIVACION DE PEPC DE HOJA DE MAIZ.

	ADICIONES			
	-----	PEG 15%	DTT 5 mM	PEG 15 % + DTT 5 mM
V ₀ *	-1.36	-0.099	-0.40	-0.37
% de inactivación después del periodo de preincubación.	97	60	65	48

* Velocidad inicial de la reacción de inactivación ($\Delta a \cdot \text{min}^{-1}$). Las preincubaciones se hicieron en el amortiguador TEA-HCl 50 mM, a pH 8.5, conteniendo además EDTA 0.1 mM. La concentración de enzima preincubada fue siempre 12.0 $\mu\text{g/ml}$.

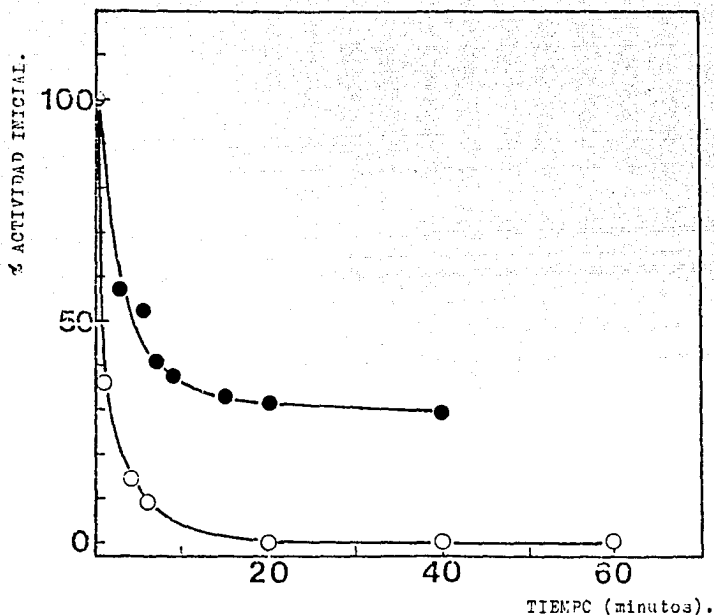


FIGURA 14. INACTIVACION DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA PREINCUBADA A pH 6.5, EN AUSENCIA (O-O), Y PRESENCIA (●-●) DE DTI (DITIOUREITOL) 5 mM. La concentración de la enzima en el medio de preincubación fué de 12.0 µg/ml. Las preincubaciones se hicieron en un amortiguador de Trietanolamina-HCl 50 mM, EDTA 0.1 mM.

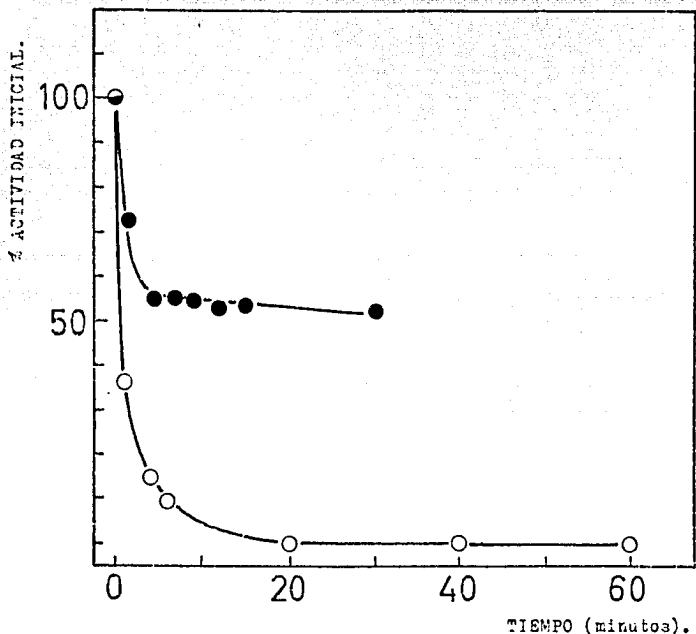


FIGURA 15. INACTIVACION DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA PREINCUBADA A pH 9.5, EN AUSENCIA (○-○), Y PRESENCIA (●-●) DE POLIETILENGLICOL 15 % (v/v) Y DITIOTREITOL 5 mM. La concentración de enzima en el medio de preincubación fué de 12.0 µg/ml. Las incubaciones se hicieron en el amortiguador de Trietanolamina-HCl 50 mM, EDTA 0.1 mM.

5.7 Reversibilidad de la pérdida de actividad por preincubación a pH neutro de PEPC previamente inactivada a pH 8.5

Cuando el medio de preincubación a pH 8.5 conteniendo a la enzima inactiva se diluyó 1:2 en el amortiguador TEA-HCl 100 mM a pH 5.5, resultando un pH de 7 en la mezcla final, tuvo lugar una lenta reactivación de la enzima (Fig.16). Como puede observarse cuando la concentración de la enzima en la preincubación inicial a pH 8.5 es de 1.20 $\mu\text{g/ml}$ y en ausencia de PEG, no ocurre reactivación al pasar a pH 7 ; lo mismo ocurre cuando la concentración de enzima inicialmente preincubada es diez veces mayor (12.0 $\mu\text{g/ml}$) también en ausencia de PEG. En contraste, cuando en la preincubación inicial a pH 8.5 se utiliza la concentración de enzima más alta (12.0 $\mu\text{g/ml}$) y además se incluye PEG 15 %, ocurre una lenta reactivación de PEPC al pasar a pH 7, recuperándose el 100 % de la actividad inicialmente ensayada (Tabla 5). Tampoco se observó reactivación cuando la enzima se inactivó por preincubación a pH 8.5 en presencia de PEG 15 % y DTT 5 mM.

TABLA 5. REACTIVACION DE PEPC DE HOJA DE MAIZ, POR PREINCUBACION A pH NEUTRO DE LA ENZIMA INACTIVADA A pH ALCALINO.

Preincubaciones a pH 8.5	% de reactivación después de pasar a pH 7.	
Adiciones.	% Inactivación.	
-----	97	0
PEG 15 %	60	100
DTT 5 mM	65	0
PEG 15 % + DTT 5 mM	48	0

Después de la preincubación a pH 8.5, el medio conteniendo la enzima parcialmente inactiva se diluyó en un medio a pH 5.5 en una proporción de 1:2, resultando una mezcla final con un pH de 7. La concentración de enzima preincubada inicialmente a pH 8.5 fue 12.0 $\mu\text{g/ml}$.

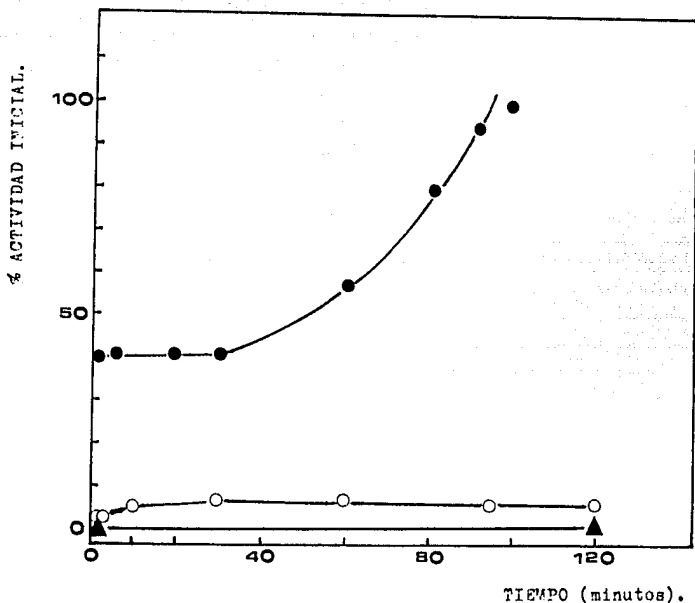


FIGURA 16. REACTIVACION DE POSMENOPAUSAL PIRUVATO CARBOXILASA. El medio de preincubación conteniendo la enzima inactiva se diluyó 1:2 en un amortiguador de Trietanolamina-HCl 100 mM a pH 5.5, resultando un pH final de 7. Las concentraciones de enzima inicialmente preincubadas fueron: 1.20 µg/ml (▲-▲), 12.0 µg/ml (○-○), 12.0 µg/ml + PEG 15% (●-●).

5.8 Determinación del orden de reacción del proceso de inactivación.

El proceso de inactivación de la enzima pura cuando se preincuba a pH 8.5 en las diferentes condiciones experimentales probadas (concentración de enzima, PEG 6000, DTT y PEG+DTT) (Figs.12,13,14,15) siempre ocurre aparentemente en dos fases: una primera fase de inactivación muy rápida y una segunda muy lenta. El análisis realizado de los resultados de estos experimentos, aunque nos permite suponer los posibles cambios moleculares que sufre PEPC durante su preincubación a pH alcalino, no nos proporciona los suficientes elementos de juicio que nos permitan proponer un mecanismo para el proceso de inactivación debido a que hace falta definir con mayor claridad los parámetros cinéticos involucrados. En virtud de esto y con el fin de determinar el mecanismo molecular mediante el cual ocurre la inactivación, creímos necesario encontrar un modelo matemático que se ajustara a los datos obtenidos, y que nos permitiera observar con mayor claridad el efecto que sobre los parámetros cinéticos del proceso tienen los diferentes factores probados en nuestros experimentos.

Como se muestra en las Figs.17 y 18, cuando se intenta ajustar los datos a una cinética de primero o de segundo orden con un modelo irreversible (ver métodos 4.3.2) se observa claramente que los puntos experimentales no se ajustan ni lejanamente a una línea recta. Por tanto, se descartó que el proceso de inactivación que bajo nuestras condiciones experimentales estamos observando sea de primero o segundo orden irreversible.

Por otra parte debido a que: i).- La velocidad con la que ocurre el fenómeno es dependiente de la concentración de proteína (aspecto que se mostró anteriormente, Figs.12,13 y tabla 3).

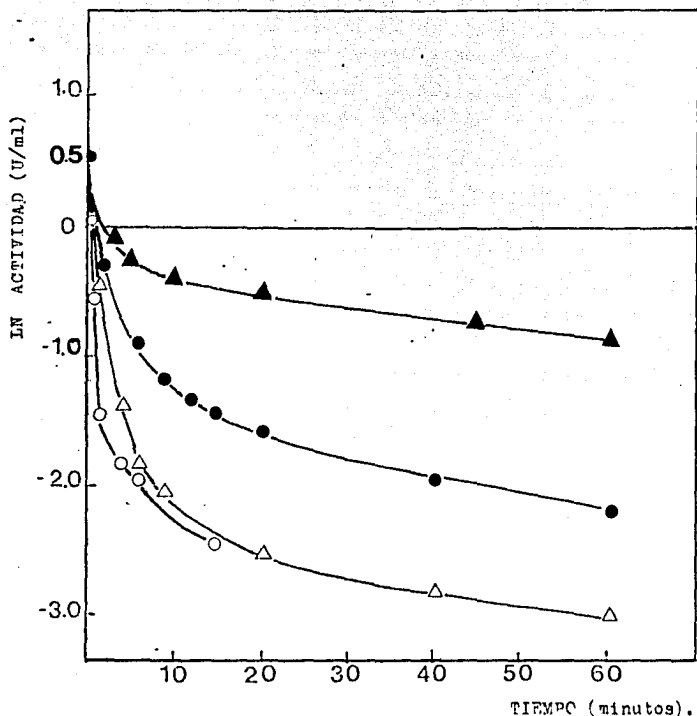


FIGURA 17. CINÉTICA DE PRIMER ORDEN IRREVERSIBLE DE LA INACTIVACIÓN DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXYLASA DE MAÍZ. Las preincubaciones se hicieron a pH 8.5, en función de la concentración de enzima y en ausencia y presencia de PEG 6000 15%. La concentración de enzima en el medio de preincubación fue la siguiente: 1.20 µg/ml (O-O), 1.20 µg/ml + PEG (●-●), 12.0 µg/ml (Δ-Δ), 12.0 µg/ml + PEG (▲-▲).

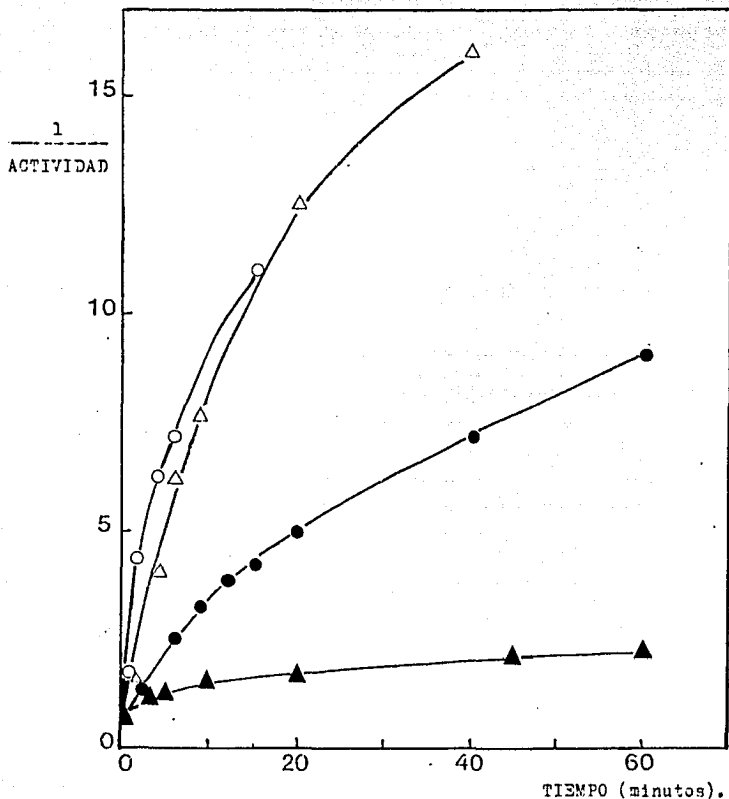


FIGURA 18. CINÉTICA DE SEGUNDO ORDEN IRREVERSIBLE DE LA INACTIVACION DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE MAIZ. Las preincubaciones se hicieron a pH 8.5, en función de la concentración de enzima y en ausencia y presencia de PEG 6000 15 % (v/v). La concentración de enzima en el medio de preincubación fue la siguiente: 1.20 $\mu\text{g/ml}$. (O-O), 1.20 $\mu\text{g/ml}$ + PEG (●-●), 12.0 $\mu\text{g/ml}$ (Δ - Δ), 12.0 $\mu\text{g/ml}$ + PEG (\blacktriangle - \blacktriangle).

ii).- La forma activa de la enzima es un tetrámero y iii).- Otros autores han reportado la presencia de dímeros y monómeros parcial o totalmente inactivos en las preparaciones de PEPC (77,78,81), supusimos que a nivel molecular la inactivación observada pudiera ser la consecuencia de una disociación reversible de los tetrámeros activos en dos dímeros y cada uno de estos a su vez en dos monómeros. Esta disociación estaría promovida por la aparición y/o desaparición de cargas en restos de aminoácidos importantes para el mantenimiento de la estructura cuaternaria, al hacer ligeramente alcalino el pH del medio en que se encuentra la enzima.

Por ello examinamos el ajuste de nuestros datos experimentales a un modelo de cinética de descomposición de segundo orden reversible. Es importante hacer notar que el proceso de inactivación no llega a 100 % sino que aparentemente se estabiliza en un nivel, que además varía según las condiciones de preincubación. En este nivel la pérdida de actividad se hace tan lenta que ya no es atribuible a una misma fase inicial. Esto hace pensar que cualquiera que sea el mecanismo de pérdida de actividad, éste involucra un fenómeno de equilibrio, y es por ello que el mecanismo propuesto implica también una reacción de regreso, es decir, es de carácter reversible.

Esto se manifiesta también por el hecho de que la enzima puede reactivarse una vez inactivada, siempre que las condiciones sean favorables (Fig.16). La elaboración del modelo cinético utilizado tomando en cuenta los aspectos anteriores, se describe con detalle en Métodos (sección 4.3.3).

Cuando los datos obtenidos en cada uno de los experimentos de inactivación a pH 8.5 se ajustan mediante la ecuación correspondiente al modelo anterior, se observa una linearización de los puntos en dos fases, claramente separadas en las gráficas debido a que sus velocidades son suficientemente diferentes (Figs.19,20,21,22). Ello confirma que el proceso de inactivación sigue en efecto una cinética de segundo orden reversible.

(Los datos ajustados con el modelo de descomposición de segundo orden reversible se trataron por el método de mínimos cuadrados para obtener el valor de la pendiente de cada una de las fases). En la tabla 6 se muestran los valores encontrados en las diferentes condiciones experimentales.

TABLA 6. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LA ENZIMA, DEL POLIETILENGLICOL Y DEL DTT SOBRE LA CINETICA DE INACTIVACION A pH 8.5, DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE HOJA DE MAIZ.

Concentración de enzima preincubada.	Adición.	$(-k_{+1}/\lambda\alpha)^*$		Actividad residual. \times
		1ª fase	2ª fase	
1.20 $\mu\text{g/ml}$.	-----	14×10^{-1}	17.3×10^{-2}	2
	PEG 15 %	2×10^{-1}	4.1×10^{-2}	10
12.0 $\mu\text{g/ml}$.	-----	3.3×10^{-1}	4.1×10^{-2}	3
	PEG 15 %	1.4×10^{-1}	2.8×10^{-2}	40
	DTT 5 mM	2.8×10^{-1}	3.6×10^{-2}	35
	+ PEG 15 % + DTT 5 mM	2×10^{-1}	5.1×10^{-4}	52

Las preincubaciones se hicieron en el amortiguador Trietanolamina-HCl 50 mM, EDTA 0.1 mM a 25°C y en ausencia de oxígeno.

La pendiente $(-k_{+1}/\lambda\alpha)$ en cada una de las fases se determinó tratando con el método de mínimos cuadrados los datos de inactivación ajustados con el modelo reversible de descomposición de segundo orden.

* Valores aparentes.

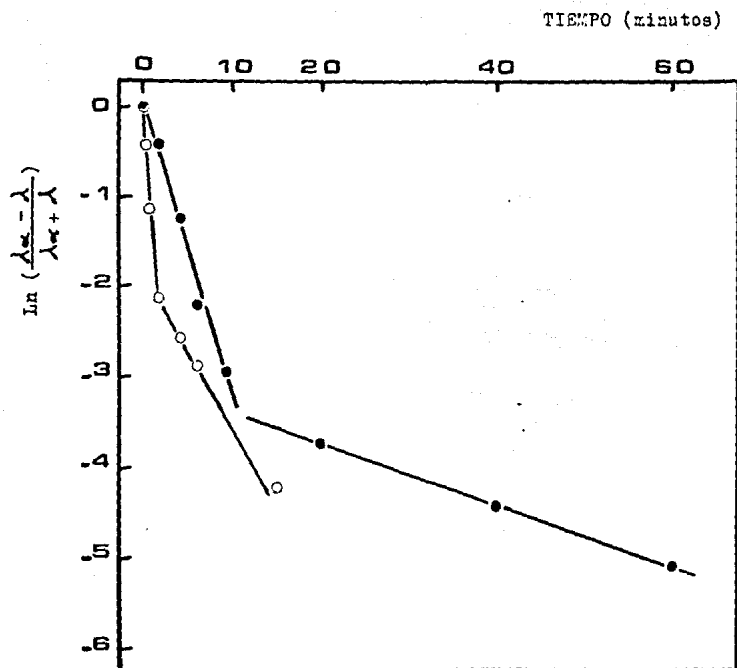


FIGURA 19. AJUSTE DE LA CINETICA DE INACTIVACION DE FOSFOENOL-PIRUVATO CARBOXILASA A UNA DESCOMPOSICION DE SEGUNDO ORDEN REVERSIBLE. Las preincubaciones se hicieron a pH 8.5 y a 25 °C en función de la concentración de la enzima: 1.20 µg/ml (○-○), 12.0 µg/ml (●-●).

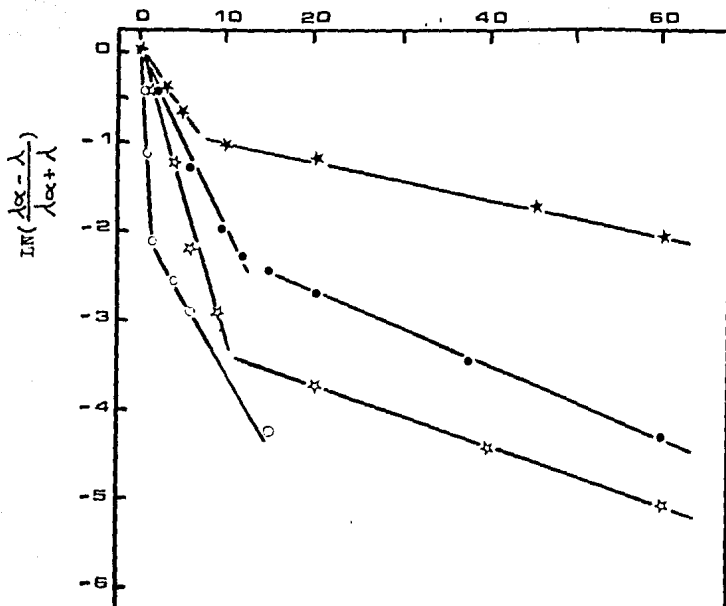


FIGURA 20. AJUSTE DE LA CINÉTICA DE INACTIVACION DE FOSFOENOL-PIRUVATO CARBOXILASA A UNA CINÉTICA DE DESCOMPOSICION DE SEGUNDO ORDEN REVERSIBLE. Las preincubaciones se hicieron a pH 8.5 y a 25 °C , en función de la concentración de la enzima y en ausencia y presencia de PEG 6000 15 % (v/v). La concentración de la enzima en el medio de preincubación fue la siguiente : 1.20 µg/ml (O-O), 1.20 µg/ml + PEG (●-●), 12.0 µg/ml(*-*) 12.0 µg/ml + PEG (*-*).

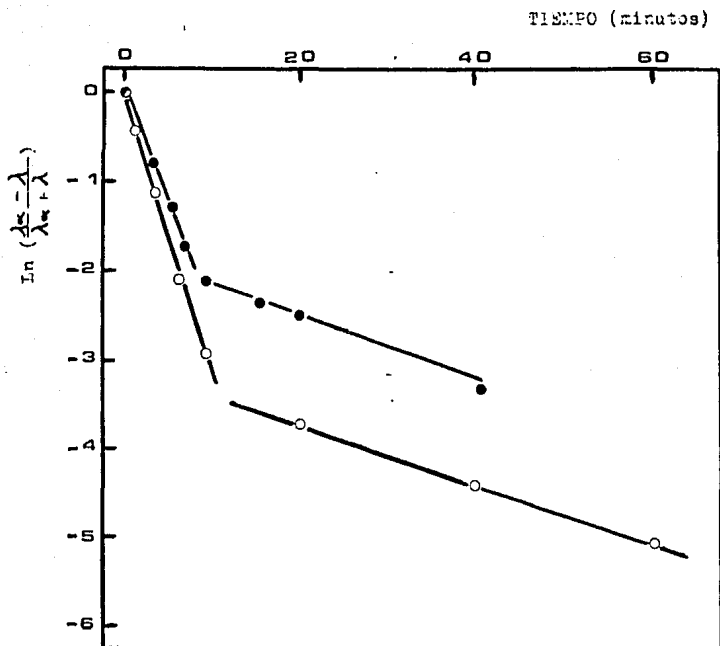


FIGURA 21. AJUSTE DE LA CINÉTICA DE INACTIVACION DE FOSFOENOL-PIRUVATO CARBOXILASA A UNA DESCOMPOSICION DE SEGUNDO ORDEN REVERSIBLE. Las preincubaciones se hicieron a pH 8.5 y a 25 °C en ausencia (O-O) y presencia (●-●) de DTT 5 mM. La concentración de la enzima en el medio de preincubación fue 12.0 µg/ml.

TIEMPO (minutos).

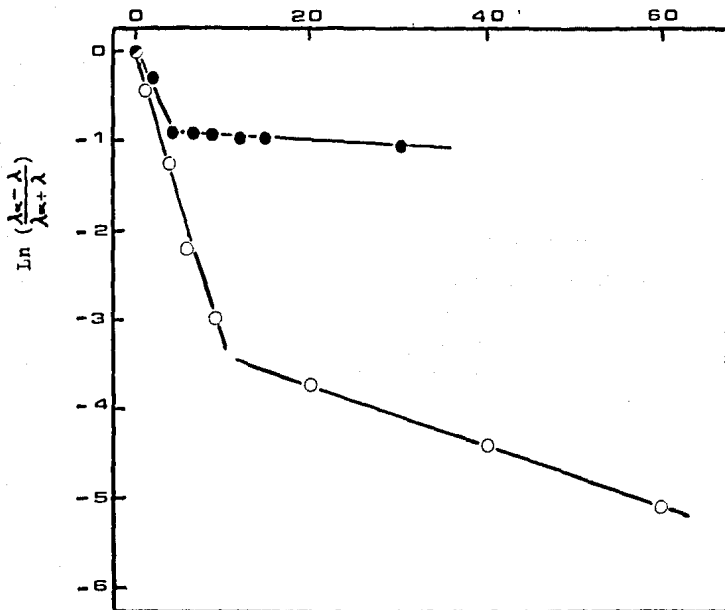


FIGURA 22. AJUSTE DE LA CINETICA DE INACTIVACION DE FOSFOENOL-PIRUVATO CARBOXILASA A UNA DESCOMPOSICION DE SEGUNDO ORDEN REVERSIBLE. Las preincubaciones se hicieron a pH 8.5 y a 25 °C, en ausencia (O-O) y presencia (●-●) de polietilenglicol 15 % (v/v) y DTT 5 mM. La concentración de enzima en el medio de preincubación fué 12.0 µg/ml.

VI. DISCUSION.

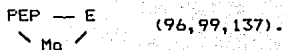
Cuando observamos la inactivación de FEPC en las condiciones en que se encuentra en el medio de preincubación, surge la pregunta de si el pH es realmente responsable de este fenómeno. Sin embargo, pensamos que la inactivación de la enzima parcialmente purificada durante su preincubación a pH 9 (Fig.9) no podía deberse a otro factor diferente al pH del medio, ya que:

i).- Una rápida degradación de la molécula de enzima por proteasas coextraídas no es la causa de la pérdida de actividad, ya que cuando se hicieron los experimentos con la enzima purificada, que obviamente no contenía proteasas, también se observó pérdida de actividad.

ii).- La temperatura tampoco es el factor responsable, ya que la pérdida de actividad ocurre tanto a 15°C como a 37°C (73).

Debido entonces a que el proceso es dependiente de pH, es de suponer la participación de algún o algunos grupos ionizables de la proteína cuyo valor de pK esté entre 8 y 9. Los grupos más probables son restos de cisteína que de alguna manera deben ser importantes en el mantenimiento de la estructura activa de la enzima, o grupos con un pK ligeramente mayor a 9, siendo más probables en este caso restos de arginina. Ambos grupos parecen en principio igualmente probables, ya que cuando se emplean reactivos químicos contra éstos, la enzima se inactiva totalmente (74,75,85,86). Sin embargo los grupos sulfhidrilo de la cisteína son más lábiles a la oxidación, por lo que son mejores candidatos. Con base en ésto puede pensarse razonablemente que durante la preincubación a pH 7 no ocurre inactivación de FEPC debido a que no ocurre ionización de los grupos mencionados (Fig.10).

Un dato adicional es el efecto que tienen PEP y Mg^{2+} sobre la inactivación. Aunque el sustrato PEP puede unirse a la enzima en ausencia de Mg^{2+} , esta unión es más fuerte cuando está presente el catión, indicando que el proceso catalítico implica la formación de un puente triple:



Por otro lado, Manetas y Gavalas (85), Stiborova y Leblova (75) han reportado que PEP protege de inactivación cuando PEPC se preincuba en presencia de paracloromercuribenzoato (PCMB, agente que reacciona específicamente con los grupos -SH de las proteínas), lo que sugiere que grupos -SH están presentes en el sitio al cual se une el sustrato PEP en la molécula de enzima. En contraste, la presencia de iones Mg^{2+} no influye sobre la inactivación de PEPC por PCMB al mismo pH.

De igual manera Iglesias y Andreo (74), demostraron la protección que ofrecen PEP y Mg^{2+} frente a la inactivación de PEPC por fenilgloxal (agente que reacciona con los grupos imidazol de los residuos de arginina), lo que igualmente indica la presencia de residuos de arginina en el centro activo de la enzima.

En nuestros experimentos a pH 9 con enzima parcialmente pura, el efecto protector parcial ejercido por el sustrato PEP frente a la inactivación (Fig.11), puede ser explicado con base en lo discutido anteriormente, sugiriendo que cuando PEP está presente en el medio de preincubación puede unirse a los grupos -SH de los restos de cisteína o a los imidazol de las argininas presentes en el centro activo impidiendo en algún grado el cambio en su estado

iónico inducido por el incremento de pH. Esto no es de extrañar dado que la entrada de una molécula de PEP (trianión a este valor de pH) al sitio activo debe alterar los pK's de los grupos en su proximidad aun cuando no esten participando directamente en la unión de este sustrato. Otra posibilidad es que la unión de PEP a la enzima conlleve un cambio conformacional que igualmente se traduzca en un incremento del pK del grupo o grupos implicados en la inactivación. Sea cual sea el caso, el resultado será una protección parcial frente a la inactivación por pH.

Con respecto a los iones Mg^{2+} , se ha sugerido su función como cofactor y efector alostérico de PEPC (75,76), además se ha reportado que la presencia de iones Mg^{2+} a pH 6.8 es importante para la agregación de formas diméricas de PEPC con poca actividad (de Crassula argentea, una planta CAM) para dar lugar a formas tetraméricas de la enzima con mayor actividad (84). Así mismo, en nuestro laboratorio hemos encontrado que Mg^{2+} promueve la reasociación de dímeros total o parcialmente inactivos en tetrámeros activos en extractos crudos de hoja verde de maíz. Todo ello sugiere que los iones Mg^{2+} son importantes para mantener una estructura activa de la enzima mediante su unión a la molécula. El hecho de que en nuestros experimentos Mg^{2+} enlentezca la inactivación, sugiere que los grupos susceptibles de sufrir modificación por pH (presentes en el sitio activo o importantes para mantener una estructura activa de la enzima) también pueden interactuar con Mg^{2+} , quedando parcialmente protegidos de la modificación por pH.

En cuanto al efecto de Ca^{2+} , se ha reportado que es un fuerte inhibidor de PEPC de plantas C_4 , a concentraciones bajas (0.5-1mM)

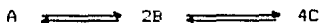
y a pH 7.7 (73,138,97), y que tal inhibición es competitiva con respecto a Mg^{2+} . En nuestros experimentos, el hecho de que en presencia de Ca^{2+} solamente ocurra inactivación de PEPC cuando se preincuba a pH 9 (Fig.11), mientras que a pH 7 prácticamente no tiene efecto (Fig.10) indica claramente que los iones calcio no son el factor directamente responsable de la inactivación de PEPC a pH 9. Sin embargo, el ligero incremento en el efecto inactivante a pH 9 en presencia de Ca^{2+} , puede deberse a que probablemente el tamaño iónico juega un papel importante en la determinación de la fuerza de interacción enzima metal (96).

La protección ejercida por el glicerol, frente a la inactivación de PEPC por pH (Fig.11), y el ligero incremento en la estabilidad de la enzima cuando la preincubación se hace a pH 7, nos indicó que el proceso de inactivación que estábamos estudiando era dependiente de la concentración de enzima, ya que el glicerol a la concentración usada tiene el efecto de reducir la actividad de agua, es decir, de incrementar la concentración efectiva de enzima, aumentando así la posibilidad de que las moléculas mantengan su estructura oligomérica en un medio diluido, de manera similar al efecto ejercido por un incremento en la concentración de proteína o por la adición de agentes tales como polietilenglicol.

Este resultado claramente nos está indicando que una disociación de la enzima en sus subunidades es el proceso responsable de la inactivación, ya que los procesos de asociación-disociación son los únicos afectados por la concentración de la molécula implicada.

Los resultados obtenidos con la enzima pura y la protección frente a la inactivación por pH alcalino que ejercen incrementos en la concentración de enzima y la presencia de PEG, confirman la sugerencia anterior de que la inactivación se produce por disociación del oligómero activo. El perfecto ajuste de nuestros datos experimentales a líneas rectas cuando se aplica el modelo cinético de segundo orden reversible, es una prueba más de ello.

En virtud de lo anterior, propusimos un mecanismo para la inactivación, como el que se describe a continuación:



en dónde :

A= tetramero activo.

B= dímero parcial o totalmente inactivo.

C= monómero inactivo.

Durante la preincubación a pH 8.5 PEPC de maíz sufre un proceso de inactivación, en el que pasa de una forma tetramérica activa a formas dimericas y monomericas parcial o totalmente inactivas .

No obstante que este mecanismo puede expresarse en términos matemáticos, el cálculo de las constantes de velocidad de cada paso implica la medición de intermediarios, lo cual hace que el modelo se complique excesivamente y se tengan que emplear métodos numéricos más complejos para su ajuste.

Dado que nuestro propósito es determinar las características de la inactivación, y no cuantificarla en términos absolutos lo anterior se consideró innecesario, y se propuso un mecanismo más simple que respondiera, o bien a la primera etapa del proceso de

disociación en donde la forma tetramérica pasa a dos dímeros, o a la segunda en donde la forma dimérica pasa a dos monómeros, si se llevaran a cabo independientemente.

Así, el mecanismo más simple propuesto es el siguiente:



en donde

A= tetramero.

B= dímero.

C= monómero.

La disociación de A en 2B debe estar promovida por la pérdida de uno o varios H^+ por grupo(s) de la enzima, es decir, previo al paso de disociación debe existir este paso de ionización. Sin embargo, dado que estos pasos son muy rápidos (su velocidad está únicamente limitada por la velocidad de difusión de los protones en el medio acuoso) puede considerarse que aplican las condiciones de equilibrio rápido y que cinéticamente no es observable. El paso de disociación, mucho más lento, sería el determinante de la velocidad del proceso de inactivación y por tanto el que podemos determinar.

De este mecanismo se dedujo la ecuación que se describe en la sección 4.3.3, y cuya aplicación a los datos se muestra en las figuras 19,20,21 y 22.

Como puede verse en la ecuación:

$$\ln\left(\frac{\lambda\alpha - \lambda}{\lambda\alpha + \lambda}\right) = -\frac{k_{+1}}{\lambda\alpha} t$$

la pendiente en cada una de las rectas ajustadas con este

modelo (Figs.19,20,21 y 22) representa el valor de $-k_{+1}/\lambda\alpha$, en donde λ es la variable de concentración transformada y $\lambda\alpha$ es la variable de concentración transformada a tiempo infinito, como se explicó en métodos.

El valor absoluto de la pendiente es proporcional al valor de la constante de velocidad (k_{+1}), y por lo tanto es un reflejo cuantitativo de la rapidez del proceso.

Con el ajuste de los datos mediante este modelo se pudo comparar en forma más cuantitativa y por tanto con mayor precisión los efectos que sobre el proceso de inactivación tienen las diferentes condiciones experimentales probadas.

Aún más, podemos notar (Fig.19) que el valor de la pendiente en la segunda fase permite establecer comparaciones también para esta segunda parte de la inactivación, lo cual debido a la naturaleza de las curvas, era difícil de hacer en las curvas no ajustadas (Fig.12)

Como puede observarse en la Fig.19, tanto en la primera fase de rápida inactivación como en la segunda de lenta, el valor de la pendiente y por tanto de la constante de velocidad aparente (k_{+1}) sufren una disminución importante cuando la concentración de enzima se incrementa de 1.20 a 12.0 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 6). Además es claro que la segunda fase de inactivación también es afectada por la concentración de enzima, ya que el valor de la pendiente es cinco veces más pequeño cuando la concentración de enzima se incrementa de 1.20 a 12.0 $\mu\text{g/ml}$, dato que no podía ser claramente observado en las curvas no ajustadas con el modelo, pero que coincide con lo que predice dicho modelo, en el cual la lenta velocidad de inactivación de la segunda fase debe ser también

dependiente de la concentración de proteína, puesto que se trata de un fenómeno de asociación-disociación de subunidades.

La naturaleza de la dependencia de la concentración de proteína de ambas fases está de acuerdo con que el proceso sea de carácter reversible, ésto es, si se tratara de un fenómeno irreversible observaríamos que la velocidad sería: o bien dependiente de la concentración de proteína en forma de proporcionalidad directa, o bien insensible a este factor (en cuyo caso sería de orden cero), pero al ser inversamente proporcional a la concentración de enzima implica que la estabilidad de los tetrámeros se incrementa al aumentar la posibilidad de que los dímeros presentes en la solución choquen entre sí para formar tetrámeros activos. Dado que los dímeros se incrementan dos veces más rápido que los tetrámeros, el efecto neto de aumentar la concentración de proteína total es un aumento neto de la velocidad de reacción de regreso, haciendo más pequeño el valor de la constante de velocidad aparente (k_{-1}). Si el proceso fuese irreversible, el aumento en la concentración de dímeros no afectaría a la velocidad de disociación, al contrario observaríamos un aumento en la velocidad de inactivación, ya que al aumentar nosotros la concentración de proteína estamos incrementandola concentración de reactivo (tetrámeros) presente en la solución.

Cuando los datos obtenidos en las preincubaciones realizadas en presencia de polietilenglicol son ajustadas con el modelo (Fig.20), podemos observar que el valor de la pendiente durante la primera fase de inactivación, con las dos concentraciones de enzima utilizadas (1.20 y 12.0 $\mu\text{g/ml}$) es menor que cuando las

preincubaciones se hacen en ausencia de dicho compuesto (Tabla 6). Cuando la concentración de enzima es baja (1.20 $\mu\text{g/ml}$) el valor de la pendiente durante la segunda fase también disminuye considerablemente en presencia de polietilenglicol, mientras que cuando la concentración de enzima es diez veces mayor (12.0 $\mu\text{g/ml}$) el valor de la pendiente durante esta segunda fase sufre poca variación en presencia de polietilenglicol. Los efectos observados en este caso no son sorprendentes, ya que el polietilenglicol ejerce el mismo efecto que una elevación en la concentración efectiva de proteína. Se ha reportado que el polietilenglicol no induce cambios estructurales en las proteínas (136), su efecto sería el de favorecer la agregación de dímeros y/o monómeros para formar tetrámeros, dando como resultado una disminución en el valor de la constante de velocidad aparente (k_{+1}) y por lo tanto en la velocidad de inactivación. Así, aunque a menor velocidad, la inactivación por disociación inducida por el valor alcalino de pH se sigue llevando a cabo, pero la presencia de polietilenglicol permite que después del periodo de preincubación un porcentaje importante de tetrámeros esté aún presente, lo cual se refleja en el valor de actividad residual observado después del periodo de preincubación (Fig.20, Tabla 6).

Como mencionabamos anteriormente, la disociación de la enzima debe ir precedida por un proceso de pérdida de un protón por uno o varios restos de aminoácidos, y la aparición o desaparición de carga que esto supone inestabiliza la estructura cuaternaria. El efecto de protección ejercido por el DTT (Fig.21 y Tabla 6) apoya la idea de que grupos $-\text{SH}$ de cisteínas deben ser importantes para la actividad y/o estabilidad de la enzima PEFC. Como ya se ha

mencionado, estos grupos son más lábiles que los imidazol de las argininas, y más susceptibles de sufrir oxidación cuando están ionizados. La oxidación de los grupos sulfhidrilo mencionados puede dar lugar a la formación de puentes disulfuro intramoleculares diferentes de los que se ha reportado están presentes en la molécula de PEPC en su conformación nativa, lo que puede ser una causa adicional de inactivación.

Resulta interesante que la ausencia de oxígeno durante la preincubación a pH alcalino sea necesaria para que se produzca reactivación de la enzima, ya que como se ha observado en previos estudios en nuestro laboratorio, cuando la inactivación se realiza en medios no desgasados exhaustivamente la reactivación no ocurre, probablemente porque ocurren oxidaciones irreversibles de los grupos ionizados. En cambio, en ambientes anaerobios el único cambio que sufren estos grupos al incrementarse el pH es la pérdida del protón, lo que es fácilmente reversible al disminuir el pH por debajo de su pK. Así pues, el efecto protector de DTT puede explicarse en función de su capacidad para mantener reducidos estos grupos -SH, enlenteciendo de esta manera la inactivación y/o facilitando la reacción de regreso, lo cual favorece la disminución del valor de la constante de velocidad (k_{+1}).

De cualquier modo el hecho de que el efecto protector de DTT sea menos acentuado que el de polietilenglicol, apoya la idea de que la ionización de ciertos grupos inducida por el pH, conlleva a una disociación que a su vez se acompaña de la exposición de grupos susceptibles de oxidación, en este caso grupos -SH de residuos de cisteína. De este modo, en un momento dado debe ser

más importante para mantener la actividad de PEPC impedir la disociación, ya que de este modo se impide la exposición de grupos susceptibles de oxidación, que en caso de ocurrir evitaría la reagregación de los dímeros y/o monómeros para formar tetrámeros activos.

Es pues interesante analizar el efecto combinado del polietilenglicol y DTT sobre la inactivación (Fig.22, Tabla 6). Podemos observar que la velocidad aparente de inactivación de ambas fases se ve sensiblemente disminuida por la adición de ambos agentes con respecto a lo observado cuando está presente uno de ellos solamente. Dicho resultado concuerda con el hecho de que ambos compuestos actúan a distintos niveles y su efecto protector puede ser aditivo.

Resulta muy notable que durante la segunda fase la velocidad de inactivación sea casi cero, indicando que en estas condiciones la conversión a monómeros es prácticamente nula. Este resultado es de cierta importancia desde el punto de vista fisiológico, ya que en el caso de PEPC de plantas CAM la conversión de tetrámeros a dímeros parece ser parte del mecanismo de regulación de la actividad de esta enzima en el ciclo noche día. (82-84,99). La enzima de hoja de maíz, que es la que se utilizó para este trabajo, también está sujeta a regulación noche día (49,126,127), y esta regulación podría llevarse a cabo mediante una interconversión dímeros-tetrámeros.

Lo anteriormente discutido señala que este equilibrio puede tener lugar a concentraciones elevadas de proteína y en condiciones reductoras, condiciones ambas que ciertamente prevalecen en el medio celular.

El haber encontrado condiciones en las cuales el equilibrio dímero-tetrámero se establece fácilmente, permite decir que el mecanismo de regulación de la actividad de PEPC basado en asociación disociación es en principio factible.

Es evidente además que el pH puede jugar algún papel en este mecanismo de regulación "in vivo", ya que este factor puede desplazar el equilibrio tetrámero-dímero "in vitro" como sugieren los resultados de este trabajo. Con respecto a ésto, es importante mencionar que en otro trabajo de tesis posterior a éste, realizado en nuestro laboratorio, y que aún está en proceso, se hicieron estudios en HPLC de las especies moleculares de PEPC presentes a pH 8.5 y a pH 7. En dichos estudios se encontró la presencia de dímeros a pH 8.5 y de tetrámeros a pH 7.

Un importante resultado de este trabajo es la reactivación de PEPC (Fig.16) observada cuando el medio de preincubación a pH 8.5 conteniendo a la enzima inactiva fue llevado a pH 7 (ver métodos 4.2.8.3). Por una parte esto es una prueba clara de que el valor alcalino de pH es el factor responsable de la inactivación que nosotros observamos. Sin embargo, solo ocurrió reactivación a pH 7 cuando se preincubó una alta concentración de enzima (12.0 μ g/ml) y además en presencia de polietilenglicol. Ello puede explicarse en base al hecho (antes mencionado) de que una alta concentración de enzima y la presencia de polietilenglicol disminuyen o impiden la disociación de tetrámeros activos de PEPC a dímeros inactivos, favoreciendo el desplazamiento del equilibrio en el sentido opuesto, y por lo tanto favoreciendo el predominio de la forma tetramérica activa. Hay que tener en cuenta que la enzima sufre una nueva dilución durante el proceso de reactivación cuando el

medio de preincubación a pH 8.5 es llevado a pH 7. Por ello, la presencia de PEG resulta crítica para contrarrestar los efectos de esta nueva dilución.

La ausencia de reactivación a pH 7 en presencia de PEG+DTT, o solamente DTT, puede deberse a que a pH 7 se expongan algunos puentes disulfuro importantes para el mantenimiento de la conformación activa de la enzima y, a que el efecto del DTT es deletéreo a pH 7 al reducir dichos puentes disulfuro (126), en tanto que como ya se describió es protector a pH alcalino. Esto sugiere que "in vivo" el control del estado redox de la proteína podría estar finamente regulado por factores adicionales que mantuviesen la configuración correcta de la delicada estructura de esta proteína por demás lábil. Un fenómeno estrechamente relacionado a este aspecto del estado redox de la enzima, es el hecho de que cuando la enzima se inactiva con PCMB (agente inactivante de grupos -SH), un 80 % de reactivación puede lograrse con reductores débiles como B-mercaptoetanol, pero no con reductores fuertes como DTT(39), esta observación apoya el hecho de que PEPC tiene una estructura que depende de un fino balance de grupos -SH lábiles y puentes disulfuro.

VII. CONCLUSIONES.

1.- La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja verde de maíz sufre un proceso de inactivación cuando se encuentra a valores de pH ligeramente alcalinos.

2.- Esta inactivación ocurre en dos fases claramente separadas que siguen una cinética reversible de orden dos, y es consecuencia de un proceso de disociación en sus subunidades que hacen que la enzima tetramérica activa se transforme en dímeros y monómeros parcial o totalmente inactivos.

3.- La disociación es inducida por cambios en el estado de ionización de grupos -SH que son necesarios en forma protonada para el mantenimiento de la estabilidad de la enzima.

4.- El proceso de inactivación es reversible a pH 7, siempre que la concentración de proteína sea lo suficientemente elevada y la inactivación y reactivación se lleven a cabo bajo condiciones no oxidantes (ausencia de O_2).

5.- Ya que la enzima PEPC es inestable a valores de pH superiores a 8, pero es activa cuando se preincuba a pH inferior, variaciones en el pH citoplásmico de las células de mesófilo pueden ser un factor que contribuya a la regulación de su estado de activación "in vivo".

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Kluge, M. (1983). The role of phosphoenolpyruvate carboxylase in C_4 -photosynthesis and Crassulacean Acid Metabolism. *Physiol. Veg.* 21(5):817-825.
- 2.- Brulfert, J., Kluge, M. and Queiroz, O. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase a key-enzyme in plants. *Physiol. Veg.* 21(5):803-804.
- 3.- Latzco, E. y Kelly, G.J. 1983. The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C_3 plants. *Physiol. Veg.* 21(5):805-815.
- 4.- Guern, J., Mathiew, Y. y Kurdjian, A. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and regulation of intracellular pH in plants cells. *Physiol. Veg.* 21(5):855-866.
- 5.- Willmer, C.M. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and stomatal operation. *Physiol. Veg.* 21(5):943-953.
- 6.- Schnabl, H. (1983). The key role of phosphoenolpyruvate carboxylase during the volume change of guard cell protoplasts. *Physiol. Veg.* 21(5):955-962.
- 7.- Thorpe, N. (1983). The role of phosphoenolpyruvate carboxylase in the guard cell of Commelina cyanea. *Plant. Science. Lett.* 30:331-338.
- 8.- Haschke, H.P. y Lutge, J..(1975). Stoichiometric correlation of malate acumulation with auxin-dependent K^+ - H^+ exchange and growth in avena coleoptile segments. *Plant. Physiol.* 56:696-698.
- 9.- Popp, M., Osmond, C.B. y Simmons, R.E. (1982). Pathway of malic acid synthesis in response to ion uptake in wheat and lupin roots: evidence from fixation of ^{14}C and ^{13}C . *Plant. Physiol.*

69:1289-1292.

10.- Coombs, J. (1979). Enzymes of C_4 metabolism. En: Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series. ed. M. Gibbs y E. Latzco. 6:251-262. Springer. New York.

11.- Hatch, M.D. y Osmond, C.B. (1976). Compartmentation and transport in C_4 photosynthesis. En: Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series. ed. M. Gibbs y E. Latzco. 3:144-184.

12.- Hatch, M.D. (1978). Regulation of enzymes of C_4 metabolism. En: Current Topics in cellular regulation. 14:1-27.

13.- Ray, T.B. y Black, C.C. (1979). The C_4 pathway and its regulation. En: Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series. ed. M. Gibbs. y E. Latzco. 6:77-79. Springer. New York.

14.- O'Leary, M.H. (1982) Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist view. Ann. Rev. Plant Physiol. 33:297-315.

15.- Brulfert, J. y Gluclu, S. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase: a control point for photoperiodism in Crassulacean Acid Metabolism. Physiol Veg. 21(5):987-995.

16.- Kluge, M. (1983). The role of phosphoenolpyruvate carboxylase in C_4 photosynthesis and Crassulacean Acid Metabolism. Physiol Veg. 21(5):817-825.

17.- Osmond, C.B. (1978). Crassulacean Acid Metabolism: a curiosity in context. Ann. Rev. Plant. Physiol. 29:379-414.

18.- Osmond, C.B. y Haltum, J.A. M. (1981). Crassulacean Acid Metabolism. En: The Biochemistry of Plants. ed. P.F. Stumps y E.E. Conn. 8:283-328.

19.- Ting, I.P. (1985). Crassulacean Acid Metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 36:595-622.

20.- Robinson, S.F. y Walker, D.A. (1981). Photosynthetic

carbon reduction cycle. En: The Biochemistry of Plants. Q:194-234.

21.- Zelitch, I. (1979). Photosynthesis and plant productivity. En: Chemical and Engineering News. 57:28-48.

22.- Lorimer, G.G. y Andrews, T.J. (1981). The C_2 chemo and photorespiratory carbon oxidation cycle. En: The Biochemistry of Plants. Q:330-370.

23.- Welkie, G.W. y Coldwell, M. (1970). Leaf anatomy of species in some dicotyledonian families as related to the C_3 or C_4 pathways of carbon fixation. Can. J. Bot. 48:2135-2146.

24.- Rathman, C.K.M. (1978). C_4 -Photosynthesis: The pathway of carbon in bundle sheat cells. Sci. Prog. Oxf. 65:409-435.

25.- Oshugi, R. y Murata, T. (1980). Leaf anatomy postillumination CO_2 burst and NADP-malic enzyme activity of Panicum dichotomiflorum. Plant. Cell. Physiol. 21(7):1329-1333.

26.- Good, M.E. y Bell, D.H. (1980). Photosynthesis, plant productivity and crop yield. En: The biology of crop productivity. ed. P.S. Carlson. pp. 3-51. Academic Press, New York.

27.- Day, D.A. y Hatch, M.D. (1981). Transport of 3-phosphoglyceric acid, phosphoenolpyruvate and inorganic phosphate in mesophyll chloroplasts, and the effect of 3-phosphoglyceric acid on malate and phosphoenolpyruvate production. Arch. Biochem. Biophys. 21(2):743-749.

28.- Edwards, G.E. y Huber, S.C. (1981). The C_4 pathway. En: The Biochemistry of plants. ed. M.D. Hatch y N.K. Boardman. Q:237-281. Academic. Press. New York.

29.- Laetsch, W.M. (1974). The C_4 Syndrome: A structural analisis. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25:27-52.

30.- Huber, S.C. y Edwards, G.E. (1975). Light-dependent CO_2 fixation by mesophyll cells, protoplasts and protoplasts extracts

of Digitaria sanguinalis. Plant Physiol. 55:835-844.

31.- Day, D.A. y Hatch, M.D. (1981). Dicarboxylate transport in maize mesophyll chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 211(2):738-742.

32.- Huber, S.C. y Edwards, G.E. (1977). Transport in C_4 mesophyll chloroplasts: evidence for an exchange of inorganic phosphate and phosphoenolpyruvate. Biochem. Biophys. Acta. 462:603-612.

33.- Rumpho, M.E. y Edwards, G.E. (1984). Inhibition of 3-phosphoglycerate-dependent O_2 evolution by phosphoenolpyruvate in C_4 mesophyll chloroplasts of Digitaria sanguinalis (L) scop. Plant. Physiol. 76:711-718.

34.- Flugge, U.F., Stilt, M.S. y Heldt, H.W. (1985). Light driven uptake of pyruvate into mesophyll chloroplasts from maize. FEBS Lett. 183(2):335-339.

35.- Gressel, J. (1980). Blue light and transcription. En: The blue light syndrome .pp.133-153. ed. H. Senger. Springer, Berlin/Heidelberg/New York.

36.- Hase, E. (1980). Effects of blue light on greening in microalgae. En: The blue light syndrome. pp. 512-540. ed. H. Senger. Springer/Berlin/Heidelberg/New York.

37.- Hamiya, A.D., y Shigetou, M. (1975). Blue light induced formation of phosphoenolpyruvate carboxylase in colorless Chlorella mutant cells. Plant. Cell. Physiol. 16:729-736.

38.- Senger, H., Klein, O., Durnemann, D. y Porra, R.J. (1980). The activation of blue light on 5-aminolevulinic acid formation. En: The blue light syndrome. pp. 541-551. ed. H. Senger. Springer/Berlin/Heidelberg/New York.

39.- Gaba, V. y Black, M. (1979). Two separate photoreceptors control hypocotyl growth in green seedlings. *Nature*. 278:51-54.

40.- Lichenthaler, H.K., Busmann, C. y Ramsdorf, V. (1980). The importance of blue light for the development of sun-type chloroplasts En: The blue light syndrome. pp. 485-494. ed. H. Senger. Springer, Berlin/Heidelberg/New York.

41.-Collins, P.D. y Hague, D.R. (1983). Light-stimulated synthesis of NADP-malic enzyme in leaves of maize. *J. Biol. Chem.* 258(6):4012-18.

42.- Checa, A., Lazaro, J.S. y George, J.L. (1984). Light-induced nuclear synthesis of spinach chloroplasts fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant. Physiol.* 75:539-541.

43.- Graham, D., Hatch, M.D., Slack, C.R. y Smile, R.M. (1970). Light-induced formation of enzymes of the C_4 -dicarboxylic acid pathway of photosynthesis in detached leaves. *Phytochem.* 9:521-532.

44.- Kobasyashi, H., Asami, S. y Akasawa, T. (1980). Development of enzymes involved in photosynthetic carbon assimilation in greening seedling of maize (Zea mays). *Plant. Physiol.* 65:198-203.

45.- Welkie, G.W. y Coldwell, M. (1970). Leaf anatomy of species in some dicotyledonian families as related to the C_3 or C_4 pathways of carbon fixation. *Can. J. Bot.* 48:2135-2146. 46.- 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.

47.- Johnson, H.S. y Hatch, M.D. (1970). Properties and regulation of leaf NAD phosphate-malate dehydrogenase and malic

enzyme in plants with the C_4 dicarboxylic acid pathway. *Biochem. J.* 119:273-280.

48.- Deleens, E. y Brulfert, J. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase capacity and establishment of autotrophy in maize seedlings. *Physiol Veg.* 21(5):827-834.

49.- Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. (1984). On the molecular mechanism of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activation by thiol compounds. *Plant. Physiol.* 75:983-987.

50.- Vidal, J., Cretin, C. y Gadal, P. (1983). The mechanism of photocontrol of phosphoenolpyruvate carboxylase in sorghum leaves. *Physiol. Veg.* 21(5):977-986.

51.- Qual, P.H. (1984). Phytochrome: a regulatory photoreceptor that controls the expression of its own gene. *Trends. Biochem. Sci.* 9(10):450-453.

52.- Hague, D.R. y Sims, T.L. (1980). Evidence for light stimulated synthesis of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of maize. *Plant. Physiol.* 66:505-509.

53.- Coruzzi, G., Broglie, R., Edwards, C. y Chua, N.H. (1984). Tissue specific and light regulates expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase. *EMBO J.* 3(8):1671-1679.

54.- Hague, D.R. y Sims, T.L. (1980). Evidence for light stimulated synthesis of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of maize. *Plant. Physiol.* 66:505-509.

55.- Schopfer, P. (1977). Phytochrome control of enzymes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 28:223-252.

56.- Vidal, J., Godbillon, G. y Gadal, P. (1983). Influence of light on phosphoenolpyruvate carboxylase in sorghum leaves. II.

Immunochemical study. *Plant Physiol.* 57:124-128.

57.- Buchanann, B.B. (1980). Role of light on the regulation of chloroplasts enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:341-373.

58.- Anderson, L.E. (1979). Interacction between photochemistry and activity of enzymes. *En: Photosynthesis IV. Photosynthetic carbon metabolism and related processes. Encyclopaedia of Plant Physiology.* ed. M. Gibbs. 6:271-281. Springer, New York.

59.- Kowallick, W. (1982). Blue lights effects on respiration. *Ann. Rev. Plant Physiology.* 33:51-72.

60.- Leegood, R.C. y Walker, P.A. (1982). Regulation of fructose-1,6-biphosphatase activity in leaves. *Planta.* 156:449-456.

61.- Nishizawa, A.N. (1981). Enzyme regulation in C_4 photosynthesis. Purification and properties of bioredoxin-linked fructose biphosphatase and sedoheptulose biphosphatase from corn leaves. *J. Biol. Chem.* 256(12):6119-6126.

62.- Wolosiuk, R.A. y Buchanann, B.B. (1978). Activation of chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the ferredoxin-thyirredoxin system. *Plant Physiol.* 61:669-671.

63.- Ashton, A.R., Burnell, J.R. y Hatch, M.D. (1984). Regulation of C_4 photosynthesis: inactivation of pyruvate, Pi, dikinase by ADP-dependent phosphorylation and activation by phosphorilisis. *Arch. Biochem. Biophys.* 230(2):492-505.

64.- Wolosiuk, R.A., Acanann, B.B. y Crowford, N.A. (1977). Regulation of NADP-malate dehydrogenase by the light activated ferredoxin-thiorredoxin system of chloroplast. *FEBS. Lett.* 81(2):253-258.

65.- Krachru, R.B. y Anderson, L.E. (1975). Inactivation of pea leaf phosphofructokinase by light and DTT. *Plant. Physiol.* 55:199-202.

66.- Ashton, R.D. y Hatch, M.D. (1983). Regulation of C_4 photosynthesis: regulation of pyruvate, Pi, dikinase by ADP-dependent phosphorylation and desphosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 115(1):53-60.

67.- Edwards, G.E., Nakamoto, H., Burnell, J.N. y Hatch, M.D. (1985). Pyruvate, Pi, dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C_4 photosynthesis: properties and mechanism of light dark regulation. *Ann. Rev. Plant. physiol.* 36:255-286.

68.-Kagawa, T. y Hatch, M.D. (1977). Regulation of C_4 photosynthesis: Characterization of a protein factor mediating the activation and inactivation of NADP-malate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 184:290-297.

69.- Bandurski, R.S., Greiner, C.M. y Bonner, J. (1953). The enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphoenolpyruvate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 204:781-786.

70.- Bandurski, R.S. y Greiner, C.M. (1953). Enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate to oxalacetate. *Fed. Proc.* 12:17-23.

71.- Cooper, T.G. y Wood, H.G. (1971). The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate. The active species " CO_2 " utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 246:5488-5490.

72.- Mukerji, S.K. (1977). Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Purification and properties of two isoenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 182:343-351.

- 73.- Gavallas, N.A., Caravatas, S. y Manetas, Y. (1982). Factors affecting a fast and reversible inactivation of photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase. *Photosynthetica*. 16(1):49-58.
- 74.- Iglesias, A.A., Gonzales, D.H. y Andreo, C.S. (1984). Inactivation of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by modification with fenylglyoxal. *Biochem. Biophys. Acta*. 788:41-47.
- 75.-Stiborova, M. y Leblova, S. (1983). The role of cystein SH groups in the phosphoenolpyruvate carboxylase molecule of maize. *Physiol. Veg*, 21:935-942.
- 76.- Stiborova, M. y Leblova, S. (1983). Isolation and partial characterization of two phosphoenolpyruvate carboxylase from maize (Zea mays L.). *Photosynthetica*. 17:379-385.
- 77.- Wagner, R., Gonzales, D.H., Podesta, F.E. y Andreo, C.S. (1987). Changes in the cuaternary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase induced by ionic strenght affect its catalytic activity. *Eur. J. Biochem*. 164:661-666.
- 78.- Walker, G.H. y Edwards, G.E. (1986). Purification of phosphoenolpyruvate carboxylase and characterization of changes in oligomerization using HPLC. *J. Liquid Cromatography*. 9(4):861-874.
- 79.- Uedan, K. y Sugiyama, T. (1976). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant. Physiol*. 57:906-910.
- 80.- Iglesias, A.A., Gonzales, D.H. y Andreo, C.S. (1986). Purification and molecular kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from Amaranthus viridis L. leaves. *Planta*. 168:239-244.

- 81.- Selinioti, E., Manetas, Y. y Gavalas, N.A. (1986). Cooperative effects of light and temperature on the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase from Amaranthus paniculatus. L. Plant. Physiol. 82:518-522.
- 82.- Min-Xian, W. y Wedding, R.T. (1987). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from Crassula argentea. Plant. Physiol. 84:1080-1083.
- 83.- Wedding, R.T. y Black, M.K. (1987). Oligomerization and the sensitivity of phosphoenolpyruvate carboxylase to inactivation by proteinases. Plant. Physiol. 84:979-981.
- 84.- Min-Xian, W. y Wedding, R.T. (1985). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from Crassula by interconversion of oligomeric forms. Arch. Biochem. Biophys. 240(2):662-665.
- 85.- Manetas, Y. y Gavalas, N.A. (1982). Evidence for essential sulphhydryl group(s) in photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase: protection by substrate and glucose-6-phosphate against p-chloromercuribenzoate inhibition. Photosynthetica. 16:59-66.
- 86.- Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. (1984). Involvement of thiol groups in the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. Photosynthetic Research. 5:215-226.
- 87.- Bradford, M.M. (1976). A rapide and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72:248-254.
- 88.- Podesta, F.E., Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. (1986). Arch. Biochem. Biophys. 246:546-553.
- 89.- Andreo, C.S., Iglesias, A.A., Podesta, F.E. y Wagner, R.

(1986). *Biochim. Biophys. Acta.* 870:292-301.

90.- Iglesias, A.A y Andreo, C.S. (1983). *Biochim Biophys. Acta.* 749:9-17.

91.- Bandurski, R.S. (1955). Further studies on the enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphoenolpyruvate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 217:137-150.

92.- Maruyama, H. y Lane, M.D. (1962). Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from the germinating peanut cotyledon. *Biochem. Biophys. Acta.* 65:207-218.

93.- Tchen, T.T. y Vennesland, B. (1955). Enzymatic carbon dioxide fixation into oxalacetate in wheat germ. *J. Biol. Chem.* 213:533-546.

94.- Miziorco, H.W., Nowak, T. y Mildvan, A.S. (1974). Spinach leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Purification, Properties, and Kinetic studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 163:378-389.

95.- O'Leary, M.H. (1981). Kinetic and isotope affect studies of maize phosphoenolpiruvate carboxylase. *Biochemistry.* 20:7308-7314.

96.- Nguyen, T.T., Ngam, E.K., Jenkins, J. y Grover, S.D. (1988). Metal ion interactions with phosphoenolpyruvate carboxylase from Crassula argentea and Zea mayz. *Plant. Physiol.* 86:104-107.

97.- Gavalas, N.A. y Manetas, Y. (1980). Calcium inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase: Possible physiologilal consequences for C₄ Photosynthesis. *Z. Pflanzenphysiol.* 100:179-184.

98.- Maruyama, H., Easterday, R.L., Chang, H.C. y Lane, M.D. (1966). *J. Biol. Chem.* 241:2405-2412.

99.- Wedding, R.T. y Black, M.K. (1988). Role of magnesium in the binding of substrate and effectors to phosphoenolpyruvate carboxylase from a CAM plant. *Plant. Physiol.* 87:443-446.

100.- 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.

101.- Vidal, J., Cavalie, G. y Gadal, P. (1974). Mise en évidence de formes isofonctionnelles de la PEP carboxylase chez Phaseolus vulgaris L. *Physiol. Veg.* 12:175-188.

102.- Samejima, M. y Miyachi, S. (1978). Photosynthetic and light enhanced fixation of carbon-14 dioxide from the ambient atmosphere and ^{14}C bicarbonate infiltrates through vascular bundles in maize leaves. *Plant. Cell. Physiol.* 19:907-916.

103.- Manetas, Y. y Gavalas, N.A. (1983). Post-translational regulation of C_4 and CAM phosphoenolpyruvate carboxylase. *Physiol. Veg.* 21(5):911-917.

104.- Levi, C., Perchowics, J.T. y Gibbs, M. (1978). Malate synthesis by dark carbon dioxide fixation in leaves. *Plant. Physiol.* 61:477-480.

105.- Leegood, R.C. y Furbank, R.T. (1984). Carbon metabolism and gas exchange in leaves of Zea mays L. Changes in CO_2 fixation, Chlorophylla fluorescence and metabolite levels during photosynthetic induction. *Planta.* 162:450-456.

106.- Furbank, R.T. y Walker, D.A. (1985). Photosynthetic induction in C_4 leaves. An investigation using infra-red gas analysis and chlorophyll fluorescence. *Planta.* 163: 75-83.

107.- Usuda, H. y Edwards, G.D. (1984). Is photosynthesis during induction period in maize limited by the availability of

intracellular carbon dioxide ?. *Plant. Sci. Lett.* 37: 41-45.

108.- Ting, I.P. y Osmond, C.B. (1973). Multiple forms of plant phosphoenolpyruvate carboxylase associate with different metabolic pathways. *Plant. Physiol.* 51:448-453.

109.- Coombs, J., Baldry, C.W. and Bucke, C. (1973). *Planta.* 110:95-107.

110.- Gonzales, P.H., Iglesias, A.A. y Andreo, S.C. (1984). On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity from maize leaf by L-malate. Effect of pH. *J. Plant. Physiol.* 116:425-434.

111.- Min-Xian, W. y Wedding, R.T. (1985). *Plant. Physiol.* 77:667-675.

112.- Huber, H. y Edwards, G.E. (1975). Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase of C_4 plants by malate and aspartate. *Can. J. Bot.* 53:1923-1925.

113.- Budde, R.J. y Chollet, R. (1986). *Abstr. VII. Int. Congr. Photosynth.* 104-A.

114.- Budde, R.J.A. y Chollet, R. (1986). In vitro phosphorylation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 82:1107-1114.

115.- Nimmo, G.A., McNaughton, G.A.L., Fewson, C.A., Wilkins, M.B. y Nimmo, H.G. (1987). Changes in the kinetic properties and phosphorylation state of phosphoenolpyruvate carboxylase in Zea mays leaves in response to light and dark. *FEBS. Lett.* 213:18-22.

116.- Jiao, J.A. y Chollet, R. (1988). Light/dark regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by in vivo phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 261:409-417.

117.- Echeverria, C., Vidal, J., LeMarechal, F., Brulfert, J., Ranjeva, R. y Gadal, F. (1988). The phosphorylation of sorghum

leaf phosphoenolpyruvate carboxylase is a Ca^{++} -dependent process. Biochem. Biophys. Res. Commun. 155:835-840.

118.- Jiao, J.A. y Chollet, R. (1989). Regulatory seryl-phosphorylation of C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase by a soluble protein kinase from maize leaves. Arch. Biochem. Biophys. 269:526-535.

119.- Leegood, R.C. y Furbank, R.T. (1984). Carbon metabolism and gas exchanged in leaves of Zea mays L. Changes in CO_2 fixation, chlorophyll a fluorescence and metabolite levels during photosynthetic induction. Planta. 162:450-456.

120.- Davies, D.D. (1979). The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism. Ann. Rev. Plant. Physiol. 162:131.158.

121.- Dennis, D.T. y Miernyk, J.A. (1982). Compartamentation on non photosynthetic carbohydrate metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 33:27-50.

122.- Murphy, D.V. y Leech, R.M. (1977). Lipid biosynthesis from (14-C)-bicarbonate, 2-(14-C)-acetate during photosynthesis by isolated chloroplasts. FEBS. Lett. 77:164-168.

123.- Von Willert, D.J., Treichel, S., Kirst, G.O. y Curdets, E. (1976). Phytochem. 15:1433-1436.

124.- Karabourniotis, G., Manetas, Y. y Gavaias, N.A. (1985). Detecting photoactivation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C_4 plants. An effect of pH. Plant Physiol. 77:300-302.

125.- Karabourniotis, G., Manetas, Y. y Gavaias, N.A. (1983). Photoregulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in Salsola soda L. and other C_4 plants. Plant Physiol. 73:735-739.

126.- Rodriguez-Sotres, R. y Muñoz-Clares, R. (1987). Short

term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by light. *J. Plant Physiol.* 128:361-369.

127.- Rodriguez-Sotres, R., Lopes-Pozos, R. y Muñoz-Clares, R. (1987). Further studies of the short term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by light. *J. Plant Physiol.* 129:191-199.

128.- Huber, S.C. y Sugiyama, T. (1986). Changes in sensitivity to effectors of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase during light/dark transitions. *Plant Physiol.* 81:674-677.

129.- Huber, S.C., Sugiyama, T. y Akazawa, T. (1986). Light modulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 82:550-554.

130.- Doncaster, H.D. y Leegood, R.C. (1987). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity in maize leaves. *Plant Physiol.* 84:82-87.

131.- Min-Xian, W. y Wedding, R.t. (1985). Diurnal regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from Crassula. *Plant Physiol.* 77:667-675.

132.- Hartree, E.F. (1972). *Analytical Biochemistry.* 48:422-527.

133.- Chen, R.F. (1967). *Journal Biochemistry.* 242:173-181.

134.- Laemmli, U.K. (1970). *Nature.* 227: 680 .

135.- Carnahan, B., Luther, H.A. y Wilkes, J.O. (1979). *Interpolaciones y aproximaciones. En: Calculo numérico (métodos y aplicaciones).* John Wiley & Sons. 29-36.

136.- Moore, J.W., Pearson, R.G. (1981). *Empirical treatment of reaction rates. En: Kinetic and mechanism.* John Wiley & Sons. 16-36.

137.- Lee, J.C. y Lee, L.L. (1981). Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols. J. Biol. Chem. 256 (2):625-631.

138.- Miller, S.R., Mildvan, S.A., Chang, H.C. y Maruyama, H. (1968). The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. J. Biol. Chem. 243(22):6030-6040.

139.- Mukerji, S.K. (1977). Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylases. The effect of divalent cations on activity. Arch. Biochem. Biophys. 182:352-359.