

00562

4
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

INSENSIBILIZACIÓN DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO
CARBOXILASA AL ACTIVADOR GLUCOSA-6-FOSFATO POR
MODIFICACIÓN QUÍMICA CON PIRIDOXAL-5'-FOSFATO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS
(BIOQUÍMICA)

P R E S E N T A:

BIÓL. ALEJANDRO TOVAR MÉNDEZ



MEXICO, D.F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Armando Gómez Puyou
Primer Vocal: Dra. Marieta Tuena Sangri
Secretario: Dr. Jorge Vázquez Ramos
Primer Suplente: Dra. Marina Gavilanes Ruiz
Segundo Suplente: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Trabajo realizado en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, DEPg, Facultad de Química, UNAM y financiado por DGAPA, UNAM proyecto IN211694. El sustentante fue becario de CONACYT.

Asesor:

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares Rosario Muñoz Clares

Sustentante:

Biól. Alejandro Tovar Méndez Alejandro Tovar Méndez

CON LA FUERZA DE SU ETERNO RECUERDO

Y

EL GRAN SENTIMIENTO QUE POR

ELLA SIENTO

EN MEMORIA A MI MADRE

JOSEFINA MÉNDEZ UGALDE

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Rosario Muñoz, por permitirme viajar en el mundo de las enzimas.

A CONACYT por haberme otorgado la beca para la realización de mis estudios de Maestría y a DGAPA por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A mi esposa Helen por el cariño que me da y por confiar en nuestro futuro.

A mi madre Josefina (hija) y a mis hermanos (Ricardo, Minerva, Carlos, Carmen, Irene y Mónica) por respetar mi libertad de Ser.

A Carlos Mújica por ser mi camarada incondicional y por lo que de él he aprendido.

A la banda (la que queda y la que se ha ido), por su amistad y su apoyo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE PLANTAS	
2.2. REGULACIÓN DE LA PEPC DE PLANTAS	5
2.3. EL SITIO ALOSTÉRICO DE Glc6P	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
4. OBJETIVOS	16
5. MATERIAL Y MÉTODOS	17
5.1. Reactivos	
5.2. PEPC	
5.3. Cuantificación de proteína	
5.4. Determinación de la actividad de PEPC	
5.5. Determinación de la sensibilidad a Glc6P	18
5.6. Reacción de la PEPC con PLP	
5.7. Determinación de la estequiometría de la reacción de insensibilización por PLP	19
5.8. Análisis de datos	
6. RESULTADOS	21
6.1. Ensayo de actividad de la enzima modificada con PLP	
6.2. Cinética de la reacción de la PEPC con PLP	
6.3. Evidencia de que el grupo modificado por PLP es una lisina	23
6.4. Determinación del número de moléculas de PLP unidas por subunidad de PEPC	24
6.5. Efecto de Glc6P sobre los parámetros cinéticos de la PEPC nativa y de la PEPC modificada con PLP	
6.6. Protección por ligandos de PEPC frente a inactivación e insensibilización a Glc6P por PLP	
6.7. Tablas y Figuras de los Resultados	26
7. DISCUSIÓN	36
8. CONCLUSIONES	38
9. PERSPECTIVAS	39
10. BIBLIOGRAFÍA	40

ABREVIATURAS

C ₃	plantas que fijan CO ₂ exclusivamente vía ciclo de Calvin.
C ₄	plantas que poseen el ciclo de los ácidos dicarboxílicos C ₄ además del ciclo de Calvin.
CAM	metabolismo ácido de las crasuláceas.
DEPC	dietilpirocarbonato
DTT	ditiotreitól.
EDTA	ácido etilendiaminotetracético.
Gluc-6-P	glucosa-6-fosfato.
HPLC	crromatografía líquida de alta presión.
kDa	kilodalton.
MeCH ₂ PEP	2-dihidroxi fosfomilmetil-2-propenoato.
Mg ²⁺	ión divalente del metal magnesio
Mg-PEP	complejo de fosfoenolpiruvato con magnesio.
NaBH ₃ CN	cianoborohidruro de sodio.
NAD ⁺	dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado.
NADH	NAD ⁺ reducido.
NADPH	dinucleotido de nicotinamida y adenina-3-fosfato reducido.
OAA	oxaloacetato.
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida.
PCMB	p-cloromercurio benzoato
PEG	polietilenglicol.
PEP	fosfoenolpiruvato
PEPC	fosfoenolpiruvato carboxilasa.
PLP	piridoxal-5'-fosfato.
RUBISCO	ribulosa-1,5-bifosfato carboxilas/oxigenasa.
SDS	dodecilsulfato de sodio.
TNBS	sulfonato de trinitrobenzeno.

ABSTRACT

Incubation of the nonphosphorylated form of maize-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase (orthophosphate: oxaloacetate carboxy-lyase (phosphorylating), PEP-C, EC 4.1.1.31) with the reagent pyridoxal 5'phosphate (PLP) resulted in time-dependent, reversible inactivation and desensitization to the activator glucose-6-phosphate (Glc6P) and other related phosphorylated compounds. Both processes are not connected, since (i) when the PLP-modification was carried out in the presence of saturating ligands of the active site, which prevents inactivation, the desensitization to Glc6P is still observed, and (ii) under some experimental conditions the desensitization reaction is 4-times faster than the inactivation. Desensitization to Glc6P is first order with respect to PLP and has a second-order forward rate constant of $4.7 \pm 0.3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ and a first-order reverse rate constant of $0.0046 \pm 0.0002 \text{ s}^{-1}$. Correlation studies between the remaining Glc6P sensitivity and mol of PLP residues incorporated per mol of enzyme subunit indicate that one lysyl group per enzyme monomer is involved in the sensitivity of the enzyme to Glc6P. The reactivity of this group is increased by polyethylene glycol and glycerol, while the reactivity of the lysyl group of the active site is not affected by these cosolutes. In the presence, but not in the absence, of these cosolutes Glc6P by itself offers significant protection against desensitization, protection that is greatly increased when Mg^{2+} and PEP are also included in the modification medium. In the presence of Glc6P the extent of inactivation of the enzyme by PLP is increased. Free PEP, free Mg^{2+} and Mg-PEP cause similar increases in the extent of desensitization to Glc6P by PLP. Taken together these results are consistent with PLP-modification of a highly reactive lysyl group at or near the allosteric Glc6P-site.

RESUMEN

La incubación de la forma no fosforilada de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (ortofosfato: oxaloacetato carboxi-liasa (fosforilante), PEPC, EC 4.1.1.31) de hojas de maíz con el reactivo piridoxal-5'-fosfato (PLP) resulta en inactivación e insensibilización al activador glucosa-6-fosfato (Glc6P) y a otros compuestos fosforilados que son también activadores de la enzima. Ambos procesos son reversibles y dependientes del tiempo de incubación. Sin embargo no están relacionados pues cuando la modificación con PLP se realiza en presencia de ligandos del sitio activo a concentraciones saturantes, no se observa inactivación y sí insensibilización, y además, bajo ciertas condiciones experimentales, la reacción de insensibilización es cuatro veces más rápida que la de inactivación. La reacción de insensibilización a Glc6P es de primer orden con respecto a la concentración de PLP y tiene una constante de segundo orden de $4.7 \pm 0.3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, en tanto que la resensibilización tiene una constante de primer orden de $0.0046 \pm 0.0002 \text{ s}^{-1}$. La correlación entre la sensibilidad remanente y el número de residuos de PLP incorporados por mol de subunidad de la enzima indica que hay un residuo de lisina por subunidad involucrado en la sensibilidad a Glc6P. La reactividad de este residuo se aumenta por polietilenglicol y por glicerol, mientras que la reactividad del residuo de lisina del sitio activo no se afecta por estos cosolutos orgánicos. Sólo en la presencia de estos cosolutos, Glc6P por sí misma protege a la enzima frente a insensibilización, y esta protección se incrementa notablemente cuando Mg^{2+} y PEP se incluyen en el medio de modificación, sin importar la presencia o ausencia de cosoluto. En presencia de Glc6P, se aumenta el grado de inactivación de la enzima por PLP. Mientras que PEP, Mg^{2+} y Mg-PEP causan un aumento similar en el grado de insensibilización de la enzima por PLP. En conjunto, estos resultados indican que existe un residuo de lisina altamente reactivo con PLP que se encuentra en o cerca del sitio alostérico para Glc6P en la PEPC de hoja de maíz.

1. INTRODUCCIÓN.

Aproximadamente de un 90 a un 95% de la materia seca de un cultivo se deriva del CO_2 atmosférico asimilado durante la fotosíntesis [Zelitch, 1979]. Por ello, la comprensión de los procesos bioquímicos responsables de la asimilación de este compuesto es del máximo interés, no sólo científico sino también económico, en momentos como los actuales en los que la preocupación por la conservación de las fuentes renovables de energía y el incremento de la producción mundial de alimentos crece día a día.

El maíz pertenece al grupo de plantas con fotosíntesis C_4 , que se caracteriza por un alto nivel de eficiencia de crecimiento bajo condiciones extremas de luz, altas temperaturas y niveles elevados de oxígeno. Las bases moleculares de dichas características de las plantas C_4 estriban en la existencia de la ruta metabólica de los ácidos dicarboxílicos (ciclo C_4) que minimiza la pérdida de energía debida a la fotorrespiración [Leegood & Osmond, 1990].

La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) juega un papel clave en la asimilación fotosintética de CO_2 atmosférico en este tipo de plantas, pues cataliza la primera reacción de fijación del CO_2 en el metabolismo C_4 [Hatch, 1978]. Debido a ello, en los últimos años, la PEPC está siendo objeto de numerosas investigaciones con el fin de llegar a entender su funcionamiento y regulación *in vivo*.

La enzima PEPC de hoja de plantas C_4 posee al menos dos sitios alostéricos activadores, uno que une a la glucosa-6-fosfato (Glc6P) [Ting & Osmond, 1973a] y otro que une a la glicina [Siborová & Leblová, 1985], y un sitio alostérico inhibidor que une al malato [Huber & Edwards, 1975]. Estos metabolitos modulan la actividad de PEPC, de forma que se logra la integración del ciclo C_4 con el ciclo de las pentosas fosfato y con otras rutas biosintéticas. Sin embargo, hasta el momento las propiedades estructurales de estos sitios alostéricos han sido muy pobremente estudiadas.

El sitio alostérico para Glc6P reúne un especial interés porque parece tener propiedades diferentes en la PEPC de plantas C_4 y la de plantas C_3 (grupo al que pertenecen la mayoría de las plantas de interés agrícola, excepto maíz, sorgo y caña de azúcar que son C_4), siendo las plantas C_3 de baja productividad. Por otra parte, a este sitio alostérico se unen análogos del sustrato fosfoenolpiruvato (PEP), que de esta forma se comportan como activadores [Jenkins y col., 1986, Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990]. Este hecho ha llevado a postular que en hojas de plantas C_4 el mismo PEP es a la vez sustrato y activador de la enzima [Jenkins y col., 1986, Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990], lo cual aumenta la importancia de este sitio alostérico desde el punto de vista de regulación de la actividad de la PEPC.

Por lo anterior creemos de gran interés el llevar a cabo un estudio a profundidad del sitio alostérico para Glc6P de PEPC de plantas C_4 , de manera que logremos incrementar nuestros conocimientos sobre los mecanismos regulatorios de esta importante enzima. Concretamente, es importante llegar a conocer los residuos de aminoácido que están involucrados en la unión de Glc6P. Por ello hemos iniciado un plan para mapear el sitio alostérico para Glc6P de la enzima PEPC de hoja de maíz.

En este trabajo, como un primer paso para lograr esos objetivos, encontramos que la modificación química de un residuo de lisina por subunidad de la enzima anula la capacidad de ésta a ser activada por Glc6P y aportamos evidencia experimental que sugiere que esta lisina pertenece al dominio de unión de Glc6P.

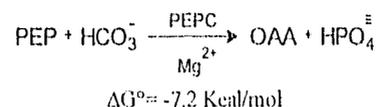
2. ANTECEDENTES.

2.1 FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE PLANTAS.

A la fecha existen diferentes revisiones sobre la enzima PEPC de plantas [O'Leary, 1982, O'Leary, 1983, Andreo y col., 1987, Deroche & Carayol, 1988, Jiao & Chollet, 1991, Rajagopalan y col., 1994]. A continuación se resume lo que se sabe de la enzima.

2.1.1. Reacción catalizada y propiedades cinéticas.

PEPC cataliza la β -carboxilación irreversible de PEP para producir oxalacetato y fosfato inorgánico [Bandurski y col., 1953, Bandurski & Greiner, 1953]:



Esta reacción es altamente exergónica y requiere un catión divalente que fisiológicamente parece ser el Mg^{2+} [Bandurski, 1955, Tehen & Vennesland, 1955], aunque *in vitro* la enzima puede usar Mn^{2+} ó Co^{2+} [Miziorko y col., 1974, O'Leary, 1981, Nguyen y col., 1988]. A diferencia de otras reacciones de carboxilación catalizadas enzimáticamente donde el sustrato es bicarbonato, la reacción de PEPC no es dependiente de biotina [Cooper & Wood, 1971, Mukerji, 1977].

La enzima de hojas de plantas C_4 muestra cooperatividad homotrópica positiva en la cinética de saturación por PEP a pH 7 o cercanos a 7 [Uedan & Sugiyama, 1976, Hayakawa y col., 1981, Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1987a]. Se ha reportado que la afinidad del sitio activo de la enzima por el complejo PEP- Mg^{2+} es mucho mayor que por PEP o Mg^{2+} libres, por lo cual se considera que el complejo es el sustrato preferencial [Wedding y col., 1989, Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990]. El PEP libre se comporta como un activador de la enzima de hoja de maíz, por lo que se ha propuesto que existe un sitio alostérico regulatorio que fija PEP libre y el cual no puede unir Mg^{2+} [Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990].

2.1.2. Características moleculares.

Se ha reportado un peso molecular de alrededor de 400 kDa para la PEPC purificada de hoja de maíz y otras plantas C_4 [Ting & Osmond, 1973b, Marès & Leblová, 1980]. En electroforesis desnaturalizante en geles de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) la enzima de hoja de maíz presenta una única banda de un peso molecular aproximado de 100 kDa, lo que indica que la enzima es un homotetrámero [Uedan & Sugiyama, 1976, Marès & Leblová,

1980]. Algunos autores proponen que la PEPC puede existir en diferentes formas oligoméricas *in vivo*; sin embargo, la forma activa de la PEPC es el homotetrámero, siendo el dímero mucho menos activo o inactivo y el monómero totalmente inactivo [Uedan & Sugiyama, 1976, Marès & Leblová, 1980, Wu & Wedding, 1985, Stiborová & Leblová, 1986]. La forma tetramérica de la enzima se disocia a pHs alcalinos o ácidos [Stiborová & Leblová, 1986, Wagner y col., 1987]. La disociación de la PEPC también es promovida por dilución [Selenioti y col., 1987, Willeford & Wedding, 1992], fuerzas iónicas altas [Stiborová & Leblová, 1986, Walker y col., 1986, Wagner y col., 1987], bajas temperaturas [Selenioti y col., 1987], la ausencia de agentes reductores como el DTT [Iglesias & Andreo, 1984b] y por la presencia de malato [Wu & Wedding, 1985, Willeford y col., 1990]. La oligomerización a tetrámero es favorecida por el sustrato [Willeford y col., 1990], por el activador Glc6P [Willeford & Wedding, 1992] y por la presencia de glicerol [Podestá & Andreo, 1989].

Se conoce la estructura primaria de la PEPC de diferentes tejidos de varias plantas superiores. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos indica que la mitad de la molécula de la enzima correspondiente al C-terminal es conservada y la otra mitad N-terminal, que estaría involucrada en regulación, es variable [Rajagopalan y col., 1994].

Estudios de modificación química con la enzima de hoja de maíz sugieren que residuos de arginina [Iglesias y col., 1984], lisina [Andreo y col., 1986, Podestá y col., 1986, Ryslavá y col., 1988, Wagner y col., 1988], histidina [Iglesias & Andreo, 1983], cisteína [Iglesias & Andreo, 1984a, Manetas & Gavalas, 1982, Raghavendra & Vallejos, 1982] y un grupo carboxilo [Maralihalli & Bhagwat, 1993] son esenciales para la actividad catalítica.

2.1.3. Isoformas y funciones metabólicas.

Con base en la actividad específica de la enzima en los extractos crudos y en los valores de $Km_{(PEP)}$ se ha sugerido que las isoformas de la PEPC pueden clasificarse en cuatro grupos [Ting & Osmond, 1973c]: 1) PEPC de hojas de plantas C_3 con una baja $Km_{(PEP)}$ y una baja actividad específica, 2) PEPC de hojas de plantas C_4 con una alta $Km_{(PEP)}$ y una actividad específica elevada, 3) PEPC de hojas de plantas CAM con una baja $Km_{(PEP)}$ y una elevada actividad específica y 4) PEPC de tipo no autotrófico ó de tejidos no verdes con una $Km_{(PEP)}$ y actividad específica baja.

Se ha encontrado que son tres a cuatro las familias de genes nucleares que codifican para las diferentes isoformas de PEPC de plantas: la forma fotosintética de hoja de plantas C_4 , la forma anaplerótica de hoja etiolada de plantas C_4 y de hoja de plantas C_3 , la forma fotosintética de hoja de plantas CAM y la forma anaplerótica de raíz [Hudspeth y col.,

1986, Hudspeth & Guala, 1989, Crétin y col., 1990, Hermans & Westhoff, 1990, Crétin y col., 1991, Schäffner & Sheen, 1992]. La isoforma PEPC fotosintética de plantas C_4 es codificada por un solo gene en sorgo [Crétin y col., 1991] y en maíz [Hudspeth & Guala, 1989], pero es codificada por genes múltiples en *Flaveria trinervia*, una planta dicotiledónea tipo C_4 [Hermans & Westhoff, 1990, Poetsch y col., 1991].

El estudio de la evolución molecular de la PEPC mediante el alineamiento asistido por computadora de todas las secuencias de PEPCs disponibles, apoyándose en otros datos como las familias de genes que codifican para las formas de PEPC, ha indicado que la isoforma C_3 de la enzima es la forma primitiva de las plantas y que tanto las isoformas C_4 como la CAM se originaron a partir de aquella y de forma independiente durante la evolución [Toh y col., 1994].

En cuanto a las funciones de las diferentes isoformas de PEPC de plantas superiores se pueden agrupar en dos grandes categorías [Toh y col., 1994]:

1. En hojas de plantas C_3 y en los tejidos no fotosintéticos de todo tipo de plantas, PEPC está involucrada en funciones anapleróticas, que incluyen el reabastecimiento de oxaloacetato al ciclo del ácido cítrico para la síntesis de aminoácidos y porfirinas [King y col., 1986, Maxwell y col., 1984, Rosendahl, 1990]. Además, participa en mecanismos bioquímicos para el mantenimiento del pH [Davies, 1986], la regulación de la osmolaridad [Deroche & Carroyol, 1988], la apertura y cierre de estomas [Deroche & Carroyol, 1988], la fijación de nitrógeno [Quy y col., 1991], la generación de NADPH [Van y col., 1991] y la recaptura del CO_2 respirado [Hendley y col., 1975].

2. En hojas de plantas C_4 y CAM la isoforma predominante está asociada a la asimilación fotosintética de CO_2 . En plantas C_4 , la enzima cataliza el primer paso de la ruta metabólica conocida como ruta C_4 . La compartimentalización de las reacciones de fijación de CO_2 por PEPC y por RUBISCO favorece la eficiencia fotosintética de estas plantas [Hatch, 1987]. En plantas CAM la fijación del CO_2 atmosférico por PEPC ocurre durante la noche, acumulándose como malato en las vacuolas. Este mecanismo minimiza las pérdidas de agua en plantas de zonas áridas o semiáridas, en las cuales los estomas se abren sólo durante la noche [Hatch, 1987].

2.2. REGULACIÓN DE LA PEPC DE PLANTAS.

La PEPC de plantas es una enzima altamente regulada tanto a nivel de la cantidad de enzima existente como a nivel de su estado de activación. A continuación se describen los factores más importantes que intervienen en esta regulación.

2.2.1. A nivel de la cantidad de enzima.

Las condiciones en las que las plantas crecen determinan el grado de síntesis de la enzima, como se indica a continuación.

2.2.1.1. Disponibilidad y fuente de nitrógeno.

Uno de los procesos metabólicos de mayor importancia en los que participa la PEPC es el de síntesis de aminoácidos. Por ello, no es sorprendente que la fuente nitrogenada a la que tiene acceso la planta afecte la actividad de la PEPC.

En hojas de frijol se ha reportado que la proporción de las dos enzimas carboxilantes (PEPC y RUBISCO) depende de la fuente de nitrógeno utilizada en el cultivo de las plantas. La relación RUBISCO/PEPC en plantas cultivadas en nitrato fue menor que las cultivadas en amonio o amonio/nitrato, independientemente de la nodulación de las plantas [Marques y col., 1983, Schweizer & Erismann, 1985].

El trigo responde a la demanda de esqueletos de carbono creada por altos consumos de nitrógeno con aumentos en la actividad de PEPC y disminución en la actividad de sacarosa fosfato sintetasa [Van y col., 1991]. Este efecto parece ser producido por glutamina, producto de la asimilación de nitrógeno, pues la glutamina en plantas de trigo estimula la fosforilación de la PEPC e incrementa la cantidad de RNAm de esta enzima [Manh y col., 1993].

Igualmente, hojas de maíz crecidas en ausencia de nitrógeno y suplementadas con nitrato o glutamina acumulan selectivamente a la PEPC [Sugiharto y col., 1990, Sugiharto y col., 1992]. El suplemento de nitrógeno incrementa el nivel de RNAm y de proteína de PEPC, siendo este incremento más pronunciado con el suplemento de amonio o de glutamina que con nitrato [Sugiharto & Sugiyama, 1992]. La inducción de la isoforma C₄ de PEPC por nitrato, amonio o glutamina está de acuerdo con la elevada eficiencia de uso del nitrógeno que presentan las plantas C₄ [Hatch, 1987].

2.2.1.2. Déficit de agua.

Se ha reportado que la actividad de la PEPC se incrementa en nódulos de alfalfa sometidos a un estrés de agua severo, siendo la PEPC al parecer la única enzima de nódulo cuya actividad se incrementa en estas condiciones [Irigoyen y col., 1992].

Por otra parte, se ha observado que el cambio (provocado por estrés de agua) del metabolismo C₃ a CAM en la planta *Mesembryanthemum crystallinum* va acompañado de un incremento en la actividad de la PEPC y de un aumento en la cantidad del RNAm de esta enzima [Pipenbrock & Schmitt, 1991].

Recientemente en nuestro laboratorio se ha encontrado que la actividad, la proteína y los niveles de RNAm de PEPC se incrementan en hojas de maíz sometidas a estrés hídrico por tratamiento con polietilenglicol (PEG) (M. Rodríguez-Penagos y R.A. Muñoz-Clares, datos no publicados).

2.2.1.3. Luz.

Se ha reportado que durante el enverdecimiento de plántulas etioladas de maíz los niveles de RNAm traducible para PEPC se incrementan tras la iluminación, usando un sistema de traducción libre de células de germen de trigo [Sims & Hague, 1981].

En hojas etioladas de sorgo se observa sólo una forma de PEPC con propiedades funcionales y regulatorias correspondientes a la isoenzima de plantas C_3 . En hojas enverdecidas ocurre un incremento significativo en la actividad de PEPC, incremento que se debe a la aparición de una nueva forma de la enzima con propiedades que son típicas de las de hoja de una planta C_4 [Vidal & Gadal, 1983].

2.2.2. A nivel de la actividad.

La actividad de la enzima se modifica a corto plazo por modificación covalente (fosforilación), por el pH y por ciertos metabolitos del medio intercelular.

2.2.2.1. Regulación por fosforilación.

Estudios realizados con hojas verdes de plantas C_3 , C_4 y CAM tratadas por periodos cortos de iluminación y oscuridad indican que la luz está involucrada en la regulación a corto plazo de la actividad de esta enzima [Karaboumiotis y col., 1983, Wu & Wedding, 1985, Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1987a, Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1987b, Jiao & Chollet, 1988, Duff & Chollet, 1995, Duff y col., 1995]. Esta regulación se lleva a cabo por fosforilación y desfosforilación del grupo hidroxilo de la serina-15 en PEPC de maíz [Jiao & Chollet, 1989] y de serina-8 en el caso de la enzima de sorgo [Lepiniec y col., 1994]. La fosforilación de una serina del extremo amino terminal se ha documentado también para la enzima tipo CAM [Nimmo y col., 1986, Nimmo y col., 1987] y tipo C_3 [Zhang y col., 1995, Duff & Chollet, 1995].

Las formas fosforiladas y no fosforiladas difieren en sus propiedades cinéticas. La enzima fosforilada presenta una actividad catalítica mayor que la forma no fosforilada [Jiao & Chollet, 1988, Jiao & Chollet, 1989]. La afinidad aparente de PEPC para ambos efectores alostéricos malato y Glc6P cambian dramáticamente cuando la enzima es fosforilada, disminuyendo en el caso de malato e incrementándose en el caso de Glc6P [Huber y col.,

1986, Doncaster & Leegood, 1987, Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1987b, Duff & col., 1995].

La fosforilación y desfosforilación de PEPC son catalizadas por una PEP-Cinasa [Carter y col., 1991, Jiao y col., 1991, Jiao & Chollet, 1991] y una proteína fosfatasa tipo A2 [Carter y col., 1990, McNaughton y col., 1991], respectivamente.

En hojas de plantas C_3 y C_4 la forma fosforilada está presente durante el día [Jiao y col., 1991, Jiao & Chollet, 1991, Duff & Chollet, 1995], en plantas CAM de la forma prevalece durante la noche [Nimmo y col., 1986], y en nódulo se presenta cuando la planta transporta fotosintatos a la raíz [Zhang y col., 1995].

2.2.2.2. Regulación por metabolitos.

Se han descrito diversos metabolitos efectores de la actividad de PEPC con sitios alostéricos diferentes para cada uno de ellos. Por su posible relevancia fisiológica destacan la Glc6P [Uedan & Sugiyama, 1976, Stiborová & Leblová, 1985] y la glicina [Nishikido & Takanashi, 1973, Uedan & Sugiyama, 1976, Stiborová & Leblová, 1985] como buenos activadores, así como el inhibidor malato [Huber & Edwards, 1975, O'Leary, 1982]. Su efecto es más pronunciado a valores neutros de pH.

Malato se ha reportado como un inhibidor mixto para la PEPC, ya que incrementa la K_m para el sustrato y disminuye la V_{max} [O'Leary, 1982]. Además, aumenta la cooperatividad para el sustrato [Vau & Wedding, 1985]. Otros estudios indican que el malato produce inhibición competitiva o no competitiva dependiendo del pH del ensayo [González y col., 1984].

2-fosfoglicolato es un análogo del sustrato inhibidor de la enzima. La inhibición por este metabolito es competitiva para PEP y acompetitiva para Mg^{2+} , independientemente del pH [Jawali & Bhagwat, 1987].

Glicina activa la PEPC de la hoja de plantas C_4 monocotiledóneas incrementando la V_{max} y disminuyendo la K_m por el sustrato, independientemente del pH de ensayo. Sin embargo, no afecta a la enzima de hoja de plantas C_4 dicotiledóneas o de plantas C_3 [Nishikido & Takanashi, 1973, Uedan & Sugiyama, 1976, Stiborová & Leblová, 1985].

Glc6P se ha reportado como un activador alostérico, particularmente efectivo a pH neutro [Huber & Edwards, 1975]. Su principal efecto es bajar considerablemente la K_m para el sustrato, y aumentar ligeramente la V_{max} [Coombs y col., 1973, Uedan & Sugiyama, 1976, Maráres & Leblová, 1980, Stiborová & Leblová, 1985]. Adicionalmente, la Glc6P convierte la cinética de saturación sigmoideal por sustrato a una cinética hiperbólica [Coombs y col., 1973, Uedan & Sugiyama, 1976]. Por otra parte, la Glc6P disminuye fuertemente la inhibición de la enzima por malato [Ting & Osmond, 1973]. Ting &

Osmond, 1973c, Huber & Edwards, 1975, Nott & Osmond, 1982, González y col., 1984, Wedding & Black, 1986].

2.2.3. Mecanismo de regulación alostérica.

Como se ha mencionado anteriormente, la isoforma fotosintética de PEPC de hoja de plantas C_4 es una enzima alostérica que a valores de pH cercanos a la neutralidad presenta efectos homotrópicos y heterotrópicos. Sin embargo, a la fecha existen pocos estudios sobre el mecanismo subyacente a estos efectos aún cuando se han propuesto los modelos siguientes:

A) Modelo de asociación-disociación oligomérica [Podestá & Andreo, 1989, Willeford y col., 1990]. Este modelo plantea que la enzima PEPC de maíz puede ser regulada *in vivo* vía un equilibrio dímero-tetramero, donde la forma tetramérica sería la forma totalmente activa y con la mayor afinidad por el sustrato. El modelo se basa en las siguientes observaciones: 1) La enzima diluida (a concentraciones menores de 0.1 mg/ml) es una mezcla de dímeros y tetrameros [Wagner y col., 1987, Willeford y col., 1990]. 2) El sustrato PEP desplaza el equilibrio hacia la forma tetramérica, lo cual explicaría la cooperatividad positiva observada en las cinéticas de saturación por PEP [Uedan & Sugiyama, 1976, Hayakawa y col., 1981, Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1987a]. 3) Glc6P también favorece la forma tetramérica, lo que explicaría la ausencia de cooperatividad positiva y el aumento de la afinidad por PEP en la presencia de Glc6P [Coombs y col., 1973, Uedan & Sugiyama, 1976, Marés & Leblová, 1980, Stiborová & Leblová, 1985]. 4) Malato, que favorece la disociación del tetramero en dímero, tiene efectos contrarios a Glc6P, disminuye la afinidad por el sustrato y aumenta la cooperatividad positiva por el sustrato [O'Leary, 1982, González y col., 1984, Wu & Wedding, 1985]. 5) Glicerol elimina la cooperatividad positiva de la enzima en la cinética de saturación por PEP [Uedan & Sugiyama, 1976, Podestá & Andreo, 1989], lo que concuerda con que la enzima diluida, en la presencia de glicerol al 20% (v:v) se encuentra principalmente en forma tetramérica [Podestá & Andreo, 1989]. Igualmente, es consistente con estos datos el allazgo de que otros cosolutos orgánicos como el glicerol [Uedan & Sugiyama, 1976, Manetas y col., 1986, Gavalas & Manetas, 1988, Podestá & Andreo, 1989], polietilenglicol, betaína, prolina y sorbitol [Manetas y col., 1986, Stamatakis y col., 1988] aumentan la afinidad de la PEPC por PEP.

B) Se ha planteado al modelo concertado [Jawali, 1990] de acuerdo con Monod-Wyman-Changeux [Monod y col., 1965], como el mecanismo de regulación alostérica de la PEPC, sin embargo los resultados experimentales en los que los autores se basan para concluir esto no son claros.

2.3. EL SITIO ALOSTÉRICO DE Glc6P.

Este apartado resume el conocimiento sobre la interacción de la Glc6P con la PEPC, el mapeo del sitio alostérico y la activación de la enzima por otras moléculas fosforiladas.

2.3.1. Estudios cinéticos.

Se ha reportado que la activación de la PEPC de hoja de maíz por Glc6P no se afecta por Mg^{2+} y que la mayor activación se da a pH 7. Además, a pH 7 o menor, las curvas de saturación por Glc6P son sigmoideas, pero a pH 8 o mayor las curvas de saturación son hiperbólicas [Siborová & Leblavá, 1985].

La respuesta de la PEPC de diferentes orígenes (plantas C_3 , C_4 y CAM) a Glc6P en función del pH del medio de ensayo indica que la forma de respuesta a este activador es esencialmente la misma para las tres enzimas; sin embargo, el incremento en la actividad inducida por Glc6P y la afinidad por Glc6P son diferentes. En este estudio se propone que residuos de histidina y de cisteína pueden estar involucrados en la activación por Glc6P [Wedding y col., 1989].

A pH 7.3 la forma fosforilada de la PEPC tiene mayor afinidad por Glc6P que la forma no fosforilada [Duff y col., 1995]; sin embargo, la afinidad de la enzima por Glc6P a pH 8 es independiente del estado de fosforilación [Wang y col., 1992, Duff y col., 1995]. Otro factor que afecta la afinidad de la PEPC por Glc6P es el estado de saturación del sitio activo. Así, la enzima con el sitio activo saturado tiene una K_a para Glc6P menor que la enzima en presencia de concentraciones de sustrato subsaturantes [Duff y col., 1995].

En la Tabla I se muestran los valores de la constante de activación (K_a) reportados.

2.3.2. Estudios de unión.

Los estudios de unión de Glc6P a la enzima son escasos y se han limitado al uso de cambios en la fluorescencia intrínseca y extrínseca de la enzima provocados por Glc6P.

De estudios de unión mediante cambios en la fluorescencia intrínseca de triptófano se ha concluido que la Glc6P requiere de magnesio para unirse a la enzima nativa y que la unión del sustrato PEP al sitio activo no es necesaria para la unión de Glc6P a su sitio alostérico [Wedding & Black, 1988].

Por otra parte, estudios de unión siguiendo los cambios en la fluorescencia extrínseca del complejo enzima-(8-anilino-1-naphthalenesulfonato) sugieren que el PEP se une tanto al sitio activo como al sitio alostérico para Glc6P [Rustín y col., 1991, Rustín y col., 1988].

En la Tabla I se muestran los valores de la constante de disociación ($L_{0.5}$) reportados.

Tabla I. Parámetros cinéticos y de unión reportados para Gle6P. Los valores para K_a y $L_{0.5}$ se expresan en mM. n indica el número de Hill.

ESPECIE	PARÁMETRO	CONDICIONES	REFERENCIA
Maíz (<i>Zea mays</i>) Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) Crásula (<i>C. argentea</i>)	$K_a = 0.68 \pm 0.12$ $K_a = 0.33 \pm 0.09$ $K_a = 0.28 \pm 0.10$	Valores de K_a verdaderos ¹ . Sustrato saturante.	Wedding y col., 1989
Crásula (<i>C. argentea</i>)	$K_a = 0.12 \pm 0.01$ $n = 1.14 \pm 0.07$	Activación a pH 7 Sustrato subsaturante.	Bandarian y col., 1992
Sorgo (<i>Sorghum vulgare</i>)	$K_a = 1.3$ $K_a = 0.55$	Activación a pH 7.3 Sustrato subsaturante. Sustrato saturante.	Duff y col., 1995
Maíz (<i>Zea mays</i>)	$n = 2$ $n = 1.7$ $n = 1$	Activación a diferente pH. 7.0 7.5 8.1 Sustrato subsaturante.	Sifborová & Leblová, 1985
Nódulo de Soya (<i>Glycine max</i>)	$K_a = 1.3$ Sin efecto.	Activación a diferente pH: 7.0 8.0 Sustrato subsaturante.	Schuller y col., 1990b
Crásula (<i>C. argentea</i>)	$L_{0.5} = 0.24 \pm 0.42$ $n = 1.87 \pm 0.86$	Medida por cambios en la fluorescencia intrínseca de triptófano inducidos por la unión de Gle6P a pH 7.0.	Wedding & Black, 1988
Crásula (<i>C. argentea</i>)	$K_a = 0.083 \pm 0.03$ $L_{0.5} = 0.82 \pm 0.03$	Activación a pH 7.0 y sustrato subsaturante. Medida por cambios en la fluorescencia extrínseca del complejo enzima-(8-anilino - 1-naphthaleno-sulfonato) a pH 7.0	Rustin y col., 1988

¹. Estos valores de K_a fueron determinados con un modelo que asume que sólo una especie protonada de la enzima es capaz de unir al activador y ser activada: $K_{a(app)} = K_a (1 + H/K_{Ei} + K_{Ea}/H) / (1 + H/K_{EAI} + K_{EAs}/H)$. Donde K_a es el valor verdadero de la constante de activación, K_{Ea} , K_{Ei} , K_{EAI} y K_{EAs} son las constantes de disociación para la protonación de la enzima libre y del complejo enzima-activador en los lados activantes e inhibidores del perfil de pH, y $K_{a(app)}$ es la K_a a los diferentes pHs.

2.3.3. Mapeo del sitio.

Con el fin de determinar los residuos de aminoácidos involucrados en la unión de la Glc6P a la PEPC se han realizado los estudios de modificación química que se describen a continuación:

Arginina. La incubación de la enzima de hoja de *Crassula argentea* (planta CAM) con butanodiona (un reactivo para modificación química de arginina) no insensibiliza a la activación por Glc6P, por lo que los autores excluyen la posibilidad de que residuos de arginina estén involucrados en la activación de la enzima por Glc6P [Rustín y col., 1988, Rustín y col., 1991].

Histidina. La modificación de PEPC de hoja de *C. argentea* con un reactivo para modificación de histidinas, dietilpirocarbonato (DEPC), no la insensibiliza a la activación por Glc6P [Rustín y col., 1991]; sin embargo, otros autores reportan que la modificación con DEPC en presencia de $MgCl_2$ 5 mM y fosfoglicolato 5 mM (para proteger al sitio activo con el complejo Mg-fosfoglicolato), insensibiliza a la enzima frente a Glc6P sin pérdida de actividad [Taghizadeh y col., 1991]. La Glc6P a una elevada concentración (9.8 mM) no protege frente a la insensibilización, lo que sugirió que DEPC puede estar modificando a la proteína en un sitio cercano, pero no en el sitio de unión para Glc6P [Taghizadeh y col., 1991].

Aspártico o glutámico. PEPC de hoja de *Zea mays* modificada con N-etil-5-fenilisooxazolío-3-sulfonato (reactivo utilizado para la modificación química de grupos carboxilo de proteínas) se insensibiliza frente a Glc6P, indicando que un(os) grupo(s) carboxilo puede(n) estar localizado(s) en el sitio de unión para Glc6P [Maraliballi & Bhagwat, 1993], pero dado que en este estudio no se realizaron experimentos de protección, esta observación no es concluyente.

Cisteína. La incubación de PEPC de hoja de *C. argentea* con p-cloromercuribenzoato (PCMB) provoca la pérdida de la activación por Glc6P. Glc6P protege frente a la insensibilización sólo en la presencia de Mg^{2+} , por lo que los autores de este estudio sugieren que la forma que se une al sitio alostérico es el complejo Glc6P-Mg, y que un grupo -SH está involucrado en su unión. Se reporta que si se incluye Glc6P-Mg 4.33 mM en el medio de modificación, hay una protección aproximada del 50%; sin embargo, no indican si existe protección total a concentraciones más altas del activador [Wedding y col., 1989].

Lisina. La modificación de PEPC de hoja de *C. argentea* con sulfonato de trinitrobenzeno (TNBS) insensibiliza a la enzima frente a Glc6P, pero dicha modificación no afecta al cambio en la fluorescencia extrínseca del complejo enzima-(8-anilino-1-naphthalen sulfonato) inducido por la unión de Glc6P con la enzima, lo que sugiere que los

residuos de lisina modificados responsables de la insensibilización no están involucrados en la unión de Glc6P [Rustín y col., 1991].

PEPC de hoja de *Z. mays* se inactiva y se insensibiliza frente a Glc6P por modificación con isotiocianato. Dado que la insensibilización presenta una cinética diferente a la de inactivación, se concluye que el residuo de lisina involucrado en la inactivación es diferente al involucrado en la insensibilización a Glc6P [Wu & Wedding, 1994]. Puesto que en estos estudios no se llevaron a cabo experimentos de protección con ligandos del sitio alostérico de Glc6P, no es posible concluir si la(s) lisina(s) modificadas están en o cerca de este sitio o están involucradas en la transmisión de la transición alostérica que acompaña a la unión de Glc6P.

2.3.4. Análogos de Glc6P y otros compuestos fosforilados que activan la PEPC.

Además de la Glc6P, otras moléculas (todas con un grupo fosfato o fosfónico en su estructura) activan la PEPC, presumiblemente por unión al sitio alostérico para Glc6P.

a) Análogos.

La activación que análogos de la Glc6P (manosa-6-fosfato, galactosa-6-fosfato, 5-tioglucosa-6-fosfato, mioinositol-1-fosfato, 2-deoxiglucosa-6-fosfato, glucosa-1-fosfato, glucosamina-6-fosfato) tienen sobre la PEPC de hoja de *C. argentea* reveló que la identidad del anillo heterotómico es una característica estructural que afecta significativamente la activación. La activación no fue muy sensible a la orientación del grupo hidroxilo en el segundo o tercer carbono, ni a la presencia o ausencia de un grupo hidroxilo en el segundo carbono; sin embargo, la posición del grupo fosfato es un factor significativo [Bandarlan y col., 1992].

Fructosa-1,6-bisfosfato activa la PEPC de hojas de plantas C4 [Selioniti y col., 1985, Coombs y col., 1973, Wong & Davies, 1973] y de plantas C3 [Singal & Singh, 1986].

b) Triosas fosfato.

El 3-fosfoglicerato se ha descrito como activador alostérico de la PEPC de hojas de plantas C4 [Selioniti y col., 1985, Coombs y col., 1973, Wong & Davies, 1973] y de plantas C3 [Singal & Singh, 1986].

La dihidroxiacetona fosfato [Schuller y col., 1990a] y el glicerol fosfato [Singal & Singh, 1986] activan la enzima de plantas C3.

c) Otros metabolitos.

El AMP actúa como activador moderado de la PEPC de hoja de *C. argentea* y su efecto no es aditivo a la activación por Glc6P; además, AMP incrementa la K_a de Glc6P sugiriendo que AMP se une al sitio de Glc6P [Wedding & Black, 1986].

Dos análogos de los intermediarios propuestos para la reacción de la PEPC (acetil fosfato y carbamil fosfato) activan a la PEPC de hoja de maíz. Los autores suponen que el efecto activador se produce por unión al sitio para Glc6P. El carbamil fosfato además es capaz de unirse al sitio activo y ser desfosforilado [González y col., 1987]. Como el carbamil fosfato es sustrato y activador a concentraciones similares, es muy probable la existencia de gran similitud entre el sitio activo y el sitio activador para Glc6P, a los cuales ambos ésteres de fosfato se unirían.

d) Compuestos no fisiológicos.

Un análogo del PEP como el 2-dihidroxifosfinoilmetil-2-propenoato (MeCH₂PEP) (con el carboxilo metilado y con un fosfonato en lugar de fosfato) actúa como activador de la enzima de maíz [Jenkins y col., 1986], por lo cual los autores sugieren que la PEPC posee dos sitios a los que el PEP se une: el sitio activo y un sitio regulatorio, y que el MeCH₂PEP se une preferencialmente al sitio regulatorio.

En nuestro laboratorio se ha descrito que otro análogo del PEP, fenilfosfato, es activador de la PEPC de hoja de maíz [Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990] y que su efecto activante es competitivo con respecto a al PEP, lo que de nuevo sugiere la existencia de un sitio regulatorio al que puede unirse el propio PEP y que posiblemente sea el sitio para la Glc6P.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Otras preguntas que aun están sin responder son: ¿ la ocupación del sitio activo es o no necesaria para la unión de la Glc6P al sitio alostérico?, ¿al sitio alostérico se une Glc6P o el complejo Glc6P-Mg?, ¿tiene el PEP la capacidad de unirse al sitio activo y al sitio alostérico de la Glc6P y por lo tanto de actuar como sustrato y activador?.

Del conjunto de los trabajos citados sobre modificación química que provoca pérdida de activación por Glc6P es difícil sacar conclusiones claras acerca de los residuos de aminoácido que forman parte del sitio alostérico para este activador, ya que: 1) en ninguno de ellos se realizó el estudio cinético de la modificación; 2) no se determinó la estequiometría del proceso de modificación y su correlación con la pérdida de la sensibilidad a Glc6P; y 3) desafortunadamente la mayoría de los reportes carecen de información sobre protección por Glc6P frente a insensibilización [Rustin y col., 1991, Maralihalli & Bhagwat, 1993, Wu & Wedding, 1994] y en aquellos en los que sí estudian el efecto de Glc6P sobre la insensibilización, los resultados no son concluyentes [Wedding y col., 1989, Taghizadeh y col., 1991].

Finalmente, la activación de la PEPC por otros compuestos fosforilados se ha supuesto se debe a que se unen al mismo sitio que Glc6P, pero no se ha dado ninguna prueba de que así sea.

Por otra parte, muchos de los estudios reportados hasta la fecha han sido realizados usando enzima purificada en condiciones en las que se proteoliza el extremo NH₂-terminal [Ausenhuis & O'Leary, 1992, Wang y col., 1992], que incluye el sitio de fosforilación [Jiao & Chollet, 1989, Lepiniec y col., 1994]. Dicha proteólisis disminuye la sensibilidad de PEPC frente a malato [Ausenhuis & O'Leary, 1992, Wang y col., 1992] y aumenta la sensibilidad a Glc6P [Qun & Jiao-nai, 1988]. Por ello, los resultados obtenidos con PEPC proteolizada en el extremo NH₂-terminal no reflejan las características alostéricas de la PEPC nativa.

Todo esto hace importante una investigación a fondo del sitio alostérico para Glc6P en el que se intenten contestar estas preguntas usando la enzima no truncada.

4. OBJETIVOS.

Con el fin de conocer al menos uno de los residuos de aminoácido involucrados en la unión de Glc6P, nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo general.

Modificar covalentemente a la enzima PEPC de hoja de maíz (*Zea mays*), forma de oscuridad (no fosforilada), de manera que pierda la capacidad de ser activada por Glc6P.

Objetivos particulares.

1. Identificar un reactivo que insensibilice a la enzima a activación por Glc6P.
2. Estudiar la cinética de la reacción de insensibilización.
3. Determinar la estequiometría de la modificación química, es decir, el número de residuos modificados por subunidad necesarios para insensibilizar a la enzima a Glc6P.
4. Establecer la especificidad de la modificación mediante estudios de protección, usando Glc6P y otros activadores con fosfato en su estructura que se han propuesto como ligandos de este sitio alostérico.
5. Evaluar el efecto del sustrato y otros efectores alostéricos sobre la reactividad del grupo modificable con el fin de inferir si el (los) residuo(s) modificado(s) se localiza(n) en el sitio alostérico o está(n) involucrado(s) en la transición alostérica provocada por la unión de Glc6P.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1. Reactivos.

PEP, NADH, málico deshidrogenasa de corazón de cerdo, PEG (peso molecular de 6000), DTT, Glc6P, fosfoglicolato, HEPES, malato y PLP fueron adquiridos de Sigma Chemical Co, EDTA de Merck, NaBH_3CN de Aldrich, y glicerol de Mallinckrodt, Inc. Todos los otros reactivos de grado analítico se adquirieron de los proveedores habituales.

5.2. PEPC.

En el presente trabajo se utilizó enzima para previamente extraída, purificada y caracterizada en nuestro laboratorio por el Biólogo Carlos Mújica Jiménez.

La extracción fue hecha de hojas totalmente expandidas de plantas de maíz (*Zea mays* L., cv. Chalqueño) de 6-8 semanas de edad, previamente sometidas a 24 hr de oscuridad.

La enzima utilizada en este trabajo tenía una pureza mayor al 99 % y su actividad específica era de $42 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

El I_{50} para malato de la enzima fue de $0.14 \pm 0.01 \text{ mM}$ y su valor no disminuyó después de incubación exhaustiva con fosfatasa alcalina. Además, la incubación de la enzima con proteína cinasa A incrementó el I_{50} para malato a $2.2 \pm 0.02 \text{ mM}$. En conjunto, estos datos nos indican que la enzima PEPC utilizada estaba completa (no proteolizada) y que no estaba fosforilada (forma de oscuridad), de acuerdo con lo reportado por Wang y col. (1992) y por Duff y col. (1995).

La enzima (0.46 mg ml^{-1}) usada en los experimentos de modificación estaba en la forma tetramérica, en ausencia o presencia de cosolutos orgánicos, lo que se determinó por cromatografía de exclusión molecular en Superosa 6/HR (conectada a un sistema de HPLC Waters), bajo las mismas condiciones en que se llevó a cabo la modificación de la enzima.

5.3. Cuantificación de proteína.

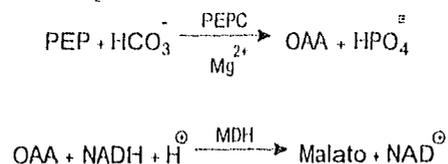
La cantidad de proteína fue determinada por el método de Bradford (1976).

5.4. Determinación de la actividad de PEPC.

La actividad PEPC se midió espectrofotométricamente mediante un ensayo acoplado, usando málico deshidrogenasa, y siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm en un volumen final de 0.5 ml con un espectrofotómetro Beckman DU-7500 equipado con un programa cinético. La temperatura del ensayo se mantuvo a $30 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ con un equipo de circulación de agua con temperatura controlada. El amortiguador de actividad consistió en trietanolamina-HCl 100 mM, pH 7.3, conteniendo EDTA 1 mM, NaHCO_3 10 mM, NADH

0.2 mM, MgCl₂ 5 mM, PEP 1 mM y 4 unidades de málico deshidrogenasa. Las determinaciones se realizaron por triplicado siendo la desviación estándar menor al ±10% en todos los casos.

El ensayo acoplado fue el siguiente:



En los experimentos en los que se usó como sustrato el complejo Mg-PEP, la cantidad de Mg²⁺ total y de PEP total se calculó utilizando el programa de cómputo descrito por Rodríguez-Sotres (1990).

5.5. Determinación de la sensibilidad a Glc6P.

Nosotros definimos la sensibilidad a Glc6P como: $(v_a - v_0)/v_0$, donde v_a y v_0 son la actividad enzimática en presencia y en ausencia de Glc6P 10 mM, respectivamente.

5.6. Reacción de la PEPC con PLP.

Se utilizó siempre una solución de PLP recién preparada en amortiguador de modificación (50 mM trietilamina-HCl, pH 7.3, 1 mM EDTA y 5 mM DTT). La concentración de PLP en esta solución se determinó a 388 nm usando el valor 4900 M⁻¹ cm⁻¹ como coeficiente de extinción molar [Blackburn & Schachman, 1976]. Inmediatamente antes de cada experimento, una alícuota de PEPC pura fue filtrada a través de una columna de Sephadex-G25 equilibrada con el amortiguador de modificación con o sin PEG al 6% (p:v), o glicerol al 20% (v:v).

La enzima disuelta en el amortiguador de modificación se incubó con PLP a 22 °C en ausencia o presencia de los ligandos indicados en cada experimento. Las incubaciones se realizaron en tubos cubiertos con papel aluminio para protegerlas de la luz. A intervalos específicos se tomaron alícuotas de 5 l y se determinó la actividad enzimática en presencia y en ausencia de Glc6P 10 mM. La dilución de la alícuota en la cubeta de reacción (100 veces) evita que continúe la inactivación y la insensibilización. Ninguno de los compuestos presentes en la incubación afectan la estabilidad del PLP bajo nuestras condiciones experimentales.

En el experimento de resensibilización, la enzima previamente modificada con PLP se diluyó 100 veces en el amortiguador de actividad (sin $MgCl_2$ y PEP), tras lo cual a los tiempos indicados se tomaron alícuotas a las que se les determinó la sensibilidad a Glc6P.

5.7. Determinación de la estequiometría de la reacción de insensibilización por PLP.

La enzima se incubó bajo las condiciones descritas en el apartado anterior con la concentración indicada de PLP en presencia de fosfoglicolato 15 mM y $MgCl_2$ 25 mM (para evitar la inactivación) por 1 hr. Este tiempo es suficiente para alcanzar el equilibrio en el proceso de insensibilización. De cada incubación se tomaron alícuotas para determinar la sensibilidad a Glc6P. Otra alícuota se redujo adicionando unos granos de $NaBH_3CN$, suficientes para producir la decoloración de la muestra, e incubando por 20 min en la oscuridad. Posteriormente, estas alícuotas fueron desaladas en el medio de modificación sin PLP utilizando la técnica de desalado rápido por centrifugación descrito por Penefsky (1977). Las alícuotas reducidas y desaladas se utilizaron para determinar la incorporación de PLP a la enzima. Para ello se obtuvo el espectro diferencial de la enzima-PLP reducida y la enzima reducida en un espectrofotómetro Beckman DU 7500, y el número de moléculas de PLP unidas por mol de subunidad de PEPC se estimó por el valor de absorbancia a 327 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar para N^6 -(fosfopiridoxil)-lisina de $10700 M^{-1} cm^{-1}$ [Fischer y col., 1963] y considerando un peso molecular de 400000 para el tetramero de PEPC [Uedan & Sugiyama, 1976].

5.8. Análisis de datos.

Los datos se analizaron utilizando el programa de regresión no lineal MicroCal Origin (Microcal Software, Inc. Northhampton, MA, USA).

Para el análisis de las cinéticas de inactivación, insensibilización o resensibilización se usaron las ecuaciones 1 y 2, respectivamente.

$$E = (E_{\infty} - E_0)(1 - e^{-kt}) + E_0 \quad (1)$$

$$S = (S_{\infty} - S_0)(1 - e^{-kt}) + S_0 \quad (2)$$

donde E, E_0 , E_{∞} , S, S_0 , y S_{∞} son respectivamente la actividad y la sensibilidad de la enzima a Glc6P al tiempo t, al tiempo cero, y al equilibrio (tiempo ∞). La constante de velocidad de pseudo-primer orden para la insensibilización, k, es la suma de dos constantes de primer orden ($k = k_1[PLP] + k_{-1}$).

Los datos obtenidos durante los tiempos iniciales de la cinética de insensibilización se ajustaron a la forma lineal de una ecuación simple exponencial (ecuación 3).

$$\ln S = \ln S_0 - kt \quad (3)$$

donde k es la constante de velocidad de pseudoprimer orden de insensibilización, la cual bajo estas condiciones da una estimación de la constante de velocidad de pseudoprimer orden de insensibilización ($k_1 \cdot [\text{PLP}]$).

El orden de la reacción, n , con respecto a PLP se determinó aplicando la ecuación descrita por Levy y col. (1963).

$$\ln k = \ln k_1 + n \ln [\text{PLP}] \quad (4)$$

donde k es la constante de velocidad de pseudoprimer orden de insensibilización, k_1 es la constante de segundo orden y n el orden de reacción.

Los datos de las cinéticas de saturación por Mg-PEP se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten.

$$v_0 = (V_{\max} \cdot [S]) / ([S] + Km) \quad (5)$$

6. RESULTADOS.

6.1. Ensayo de actividad de la enzima modificada con PLP.

La incubación de la enzima con PLP produce pérdida de la actividad y de la sensibilidad a Glc6P (Fig. 1). Sin embargo, el cambio de la absorbancia en función del tiempo en el ensayo de actividad (en ausencia o en presencia de Glc6P) de la enzima no modificada con PLP es lineal durante 1.5 min (Fig. 1A), mientras que, en el caso de la enzima modificada con PLP, el cambio de la absorbancia en función del tiempo en este periodo de tiempo no es lineal (Fig. 1B). A partir de los 30 s se incrementa progresivamente, lo que indica una reactivación de la enzima y/o una resensibilización al activador Glc6P debida a la dilución que conlleva el ensayo. Este resultado está de acuerdo con la conocida reversibilidad de la reacción de PLP con residuos de lisina [Chen & Engel, 1975], y ya había sido observada por Podestá y col. (1986) estudiando la inactivación de la PEPC con PLP. Debido a lo anterior, los ensayos de actividad de la enzima modificada y no modificada reportados en este trabajo se llevaron a cabo sólo por 30 s, ya que en este tiempo no se observó en ningún caso recuperación alguna de la actividad, tanto en ausencia o en presencia de Glc6P (Fig. 1).

6.2. Cinética de la reacción de la PEPC con PLP.

La incubación de la enzima con PLP en el amortiguador de incubación con PEG al 6% (p:v) produce pérdida de la actividad y de la sensibilidad a Glc6P. La incubación de la enzima bajo las mismas condiciones en ausencia de PLP no cambia ni su actividad ni su sensibilidad a Glc6P. La Fig. 2 muestra el efecto de incubar la enzima con PLP 1.19 mM sobre la actividad enzimática (determinada en ausencia o presencia de Glc6P). En cada tiempo, la sensibilidad a Glc6P remanente de la enzima (inserto Fig. 2A) se determinó como se indica en la sección 5.5. El ajuste de los datos de la pérdida de actividad y de sensibilidad se realizó usando la ecuación para una reacción reversible (ecuaciones 1 y 2, respectivamente). La constante aparente de pseudoprimer orden calculada para la inactivación es $0.0020 \pm 0.0005 \text{ s}^{-1}$ y para la insensibilización es $0.0086 \pm 0.0009 \text{ s}^{-1}$ (Fig. 2), mostrando que bajo estas condiciones la insensibilización es cuatro veces más rápida que la inactivación. Cuando la modificación con PLP se realizó en presencia de fosfoglicolato 15 mM y MgCl_2 25 mM no se observó inactivación, pero sí insensibilización.

La modificación con PLP también insensibiliza a la enzima frente a otros compuestos fosforilados (Tabla II) que activan la enzima presumiblemente por unión al sitio alostérico de Glc6P como se menciona en la sección 2.3.4.

Con el fin de caracterizar la insensibilización a Glc6P por PLP, determinamos la dependencia de la velocidad de insensibilización con respecto a la concentración del reactivo, en un intervalo de 0.19 mM a 1.19 mM (Fig. 3), en presencia de concentraciones saturantes de ligandos del sitio activo (fosfoglicolato 15 mM y $MgCl_2$ 25 mM) para evitar la inactivación. Como se puede observar en la Fig. 3, la sensibilidad de la enzima a Glc6P disminuye hasta alcanzar el equilibrio después de 5-10 min de incubación, y la sensibilidad residual es dependiente de la concentración de PLP. Estos resultados son consistentes con la reversibilidad de la insensibilización por PLP. La gráfica de los valores de la constante de velocidad aparente, estimados a partir del ajuste de los datos mostrados en la Fig. 3 a la ecuación 2, versus la concentración de PLP (inserto Fig. 3) permite calcular una constante de velocidad de insensibilización de segundo orden (k_1) de $4.7 \pm 0.3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y una constante de resensibilización de primer orden (k_{-1}) de $0.0046 \pm 0.0002 \text{ s}^{-1}$. La linealidad de este gráfico es consistente con que durante el proceso de insensibilización no se acumula un complejo no covalente enzima PLP, al menos en el rango de concentración de PLP utilizado. A partir de estos valores es posible estimar una constante de equilibrio de 1020 M^{-1} para la reacción de PLP con el(los) grupo(s) de lisina invaluable(s) en la activación alostérica de PEPC de maíz por Glc6P.

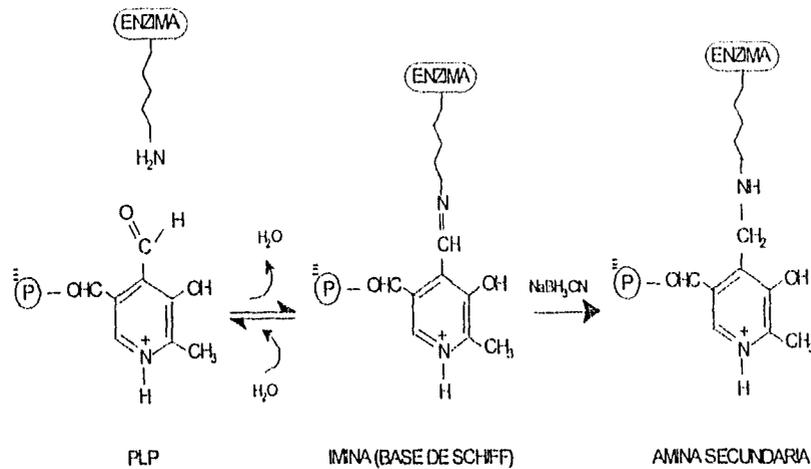
La reversibilidad de esta reacción de insensibilización se confirmó por la reactivación por dilución de la enzima previamente modificada con PLP que se muestra en la Fig. 4. La enzima se incubó con PLP hasta que perdió 60% de la sensibilidad a Glc6P, luego de lo cual se diluyó cien veces recuperando gradualmente el 100% de la sensibilidad original a Glc6P. La reactivación sigue una cinética de pseudoprimer orden en los primeros minutos (inserto Fig. 4) permitiendo estimar una constante de resensibilización de primer orden (k_{-1}) de $0.0030 \pm 0.0003 \text{ s}^{-1}$. Este valor es bastante cercano al obtenido a partir de los datos de la Fig. 3.

El estudio de la dependencia de la sensibilidad remanente en función de la concentración de PLP también se realizó durante los primeros tiempos del proceso de insensibilización, antes de que el equilibrio se alcanzara y de que la reacción reversa fuera significativa. Cuando estos datos se ajustaron a la ecuación 3, obtuvimos un gráfico semilogarítmico lineal (Fig. 5A), a partir del cual calculamos constantes de insensibilización de pseudoprimer orden para cada concentración de PLP. La gráfica de estas constantes de pseudoprimer orden versus la concentración de PLP es lineal y pasa por el origen (Fig. 5B), sugiriendo nuevamente que, en el intervalo de concentración de PLP usado en la modificación, la reacción de la enzima con PLP no involucra la formación de un complejo transitorio, no covalente, enzima PLP. A partir de esta gráfica calculamos una constante de velocidad de insensibilización de segundo orden (k_1) de $8.8 \pm 0.1 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Este valor es similar al estimado independientemente en los experimentos en los que se alcanzó el equilibrio de la reacción de modificación. La gráfica del logaritmo de la constante de insensibilización de pseudoprimer orden versus el logaritmo de la concentración de PLP es lineal con una pendiente de 1.1 ± 0.1 ($r = 0.98$) (Fig. 5C), consistente con una reacción de primer orden respecto a PLP. Este resultado sugiere que la insensibilización ocurre como consecuencia de la modificación de un solo residuo.

6.3. Evidencia de que el grupo modificado por PLP es una lisina.

La reacción de PLP con un grupo amino de las proteínas da la formación de una base de schiff, reacción que es reversible y para que esta modificación sea irreversible se requiere la formación de una amina secundaria (N6-(fosfopiridoxil)-lisina) por reducción con NaBH_3CN , como se muestra a continuación:



La evidencia de que la formación de la base de Schiff entre PLP y un grupo ϵ -amino de lisina de la PEPC es la causante de la insensibilización, fue que el espectro de absorción diferencial de la enzima modificada con PLP y reducida presenta un máximo de absorción a 327 nm [Fischer y col., 1963, McKinley-McKee & Marris, 1972] como se muestra en el inserto de la Fig. 6.

6.4. Determinación del número de moléculas de PLP unidas por subunidad de PEPC.

La correlación entre la pérdida de sensibilidad a Glc6P y el número de moles de PLP unidas por mol de subunidad de PEPC se determinó en el experimento mostrado en la Fig. 6. Como se puede ver, existe una relación directa entre ambas que extrapola a un valor límite de 1.05 mol de PLP unido por mol de subunidad de enzima cuando la enzima es totalmente insensible al activador.

6.5. Efecto de Glc6P sobre los parámetros cinéticos de la PEPC nativa y de la PEPC modificada con PLP.

Pudiera pensarse que la modificación con PLP del sitio alostérico activador de la enzima la activara permanentemente, es decir, una PEPC alterada con una baja $Km_{(Mg-PEP)}$, como se ha mostrado que ocurre con la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa [Charng y col., 1994]. Por lo que nos pareció importante evaluar la $Km_{(Mg-PEP)}$, para lo cual, la enzima se modificó con PLP 1.2 mM por 1 hr en presencia de sustrato saturante (Mg-PEP 4 mM, Mg^{2+} libre 4.4 mM y PEP libre 5 mM) para evitar la inactivación. La enzima control fue incubada en las mismas condiciones pero sin PLP. La $Km_{(Mg-PEP)}$ se determinó bajo las condiciones del ensayo estándar (sección 5.4.), pero usando Mg-PEP como sustrato variable a PEP libre 5 mM constante. Las cinéticas de saturación se muestran en la Fig. 7.

La $Km_{(Mg-PEP)}$ determinada para la enzima control fue de 0.93 ± 0.06 mM, y este valor disminuyó a 0.11 ± 0.01 mM en presencia de Glc6P 10 mM. En contraste, en el caso de la enzima modificada con PLP, el valor de la $Km_{(Mg-PEP)}$ fue esencialmente el mismo en ausencia o presencia de Glc6P 10 mM (0.87 ± 0.10 mM y 0.95 ± 0.12 mM, respectivamente), y corresponde al valor de la $Km_{(Mg-PEP)}$ que presenta la enzima control en ausencia de Glc6P. El hecho de que la PEPC de maíz insensibilizada con PLP presente la misma $Km_{(Mg-PEP)}$ que la enzima nativa, puede deberse a que PLP no posee los requerimientos estructurales necesarios para producir la transición alostérica.

6.6. Protección por ligandos de PEPC frente a inactivación e insensibilización a Glc6P por PLP.

Con el fin de obtener información acerca de los sitios funcionales a los que PLP se está uniendo, examinamos el efecto de ligandos del sitio activo y del sitio alostérico de Glc6P, en ausencia y en presencia de 6% (p:v) PEG o 20 % (v:v) glicerol, sobre la inactivación y sobre la insensibilización a Glc6P por modificación con PLP. En estos experimentos la enzima se incubó con una concentración fija de PLP en presencia y en ausencia de los ligandos indicados. Después del tiempo necesario para que el proceso de inactivación y el de insensibilización alcanzaran el equilibrio, determinamos la actividad y

la sensibilidad remanente. En la Tabla III se resumen los resultados de este experimento expresados como porcentaje de los valores iniciales.

Como se observa, en ausencia de cosoluto, Glc6P 10 mM no afecta ni a la inactivación ni a la insensibilización, a pesar de que ésta es una concentración relativamente alta comparada con la K_a reportada para Glc6P (Tabla I). Este resultado sugiere que bajo las condiciones del experimento, cuando Glc6P es el único ligando presente, no se une o se une muy pobremente a su sitio alostérico. En presencia de un cosoluto orgánico (PEG o glicerol), Glc6P sí es capaz por sí misma de proteger significativamente frente a la insensibilización y al mismo tiempo incrementa el grado de inactivación de la enzima. Cuando se incluye Mg-PEP en el amortiguador de incubación, Glc6P 10 mM ofrece protección total a la insensibilización independientemente de la presencia o ausencia de cosoluto.

El Mg-PEP y PEP presentaron un efecto contrario al de Glc6P: protegen a la enzima frente a la inactivación y aumentan notablemente la insensibilización. Mg^{2+} libre no protege a la enzima frente a la inactivación, resultado que concuerda con lo reportado previamente [Podestá y col., 1986]. Sin embargo, esta carencia de protección parece deberse a que el metal se une a una región del sitio activo diferente a aquella en la que se encuentra la lisina modificada por PLP, y no a que Mg^{2+} libre no pueda unirse al sitio activo, ya que Mg^{2+} tiene el mismo efecto que Mg-PEP y PEP sobre la reactividad de la lisina del sitio alostérico con PLP, disminuyendo marcadamente la sensibilidad a Glc6P tras alcanzarse el equilibrio de la modificación.

Los resultados de la Tabla III muestran que la Glc6P no requiere magnesio para unirse a su sitio alostérico, contrariamente a lo que previamente se ha sugerido [Wedding & Black, 1988]. Sin embargo, Glc6P ofrece mayor protección frente a insensibilización en combinación con Mg^{2+} , PEP, o Mg-PEP, lo que sugiere que la ocupación del sitio activo por cualquiera de estos ligandos aumenta la unión de Glc6P al sitio alostérico. Estos resultados no son sorprendentes, pues cambios conformacionales en el sitio activo que se manifiestan como una disminución de la $K_m(Mg-PEP)$ son debidos a la unión de Glc6P a su sitio alostérico, y concuerda con el incremento en la afinidad de PEP por Glc6P a concentraciones saturantes de sustrato encontrado en estudios cinéticos [Duff y col., 1995, Castellanos-Martínez, Mújica-Jiménez, C. & Muñoz-Clares, R.A., datos no publicados].

Por otra parte, los datos de la Tabla III muestran que la presencia de PEG o glicerol en el amortiguador de modificación afecta la reactividad frente a PLP de la lisina del sitio alostérico, y no la reactividad de la lisina del sitio activo. Así, en presencia de PEG o glicerol la lisina involucrada en la respuesta a Glc6P es mucho más reactiva con PLP que la

lisina del sitio activo, mientras que presentan una reactividad similar en ausencia del casoluto.

Finalmente, los activadores fosforilados incluidos en la Tabla II protegen a la enzima del proceso de insensibilización a Glc6P cuando se incluyen en el medio de modificación. El grado de protección que ofrecen estos compuestos (Tabla IV) correlaciona con el grado de activación que producen en la enzima (Tabla II), lo cual concuerda con que este grupo de activadores se une al mismo sitio que Glc6P.

6.7 Tablas y Figuras de los Resultados.

En este apartado se incluyen las tablas y las figuras referidas en los resultados

Tabla II. Efecto de PLP sobre la activación de la PEPC^a por compuestos fosforilados.

Activador (10 mM)	Actividad (% del control) ^b	
	No modificada	Modificada
Glc6P	425	112
Fenilfosfato	190	99
Dihidroxiacetona fosfato	158	101
Glicerol fosfato	157	97
AMP	140	100

^a La enzima se incubó con PLP 0.65 mM en la presencia de PEG al 6% (p:v) bajo las condiciones indicadas en la sección 5.6.

^b La actividad fue determinada en ausencia (control) o en presencia de Glc6P 10 mM a tiempo cero (enzima no modificada) y después de 1 hr de incubación con PLP (enzima modificada).

Tabla III. Efecto de ligandos de PEPC sobre la inactivación y la insensibilización provocada por PLP.

[Ligando]	Actividad ^a (% del control)	Sensibilidad ^a (% del control)
A) Sin cosoluto		
-----	69	60
Glc6P 10 mM	74	59
Mg-PEP 4 mM	100	26
Glc6P 10 mM, Mg-PEP 4 mM ^b	100	99
B) PEG 6%		
-----	70	23
Glc6P 10 mM	59	68
PEP 10 mM	97	34
MgCl ₂ 10 mM	69	1
Mg-PEP 4 mM ^b	100	9
Glc6P 10 mM, Mg-PEP 4 mM ^b	100	98
Glc6P 10 mM, PEP 10 mM	95	100
Glc6P 10 mM, MgCl ₂ 10 mM	71	89
C) Glicerol 20%		
-----	68	45
Glc6P 10 mM	44	65
Glc6P 10 mM, Mg-PEP 4 mM ^b	98	100

^a La actividad y la sensibilidad a Glc6P de la enzima se determinó a tiempo cero (control) después de 1 hr de incubación con PLP 0.6 mM, en presencia de los ligandos y de los cosolutos indicados.

^b Mg²⁺ libre 4.4 mM y PEP libre 5 mM.

Tabla IV. Protección por activadores fosforilados de PEPC frente de la insensibilización causada por PLP.

Activador (10 mM)	Sensibilidad ^a (% del control)
—————	14
Glc6P	60
Fenilfosfato	54
Dihidroxiacetona fosfato	34
Glicerol fosfato	35
AMP	28

^a La sensibilidad a Glc6P se determinó a tiempo cero (control) y después de 1 hr de incubación con PLP 0.65 mM, en la presencia de PEG al 6% (p:v) y de los ligandos indicados.

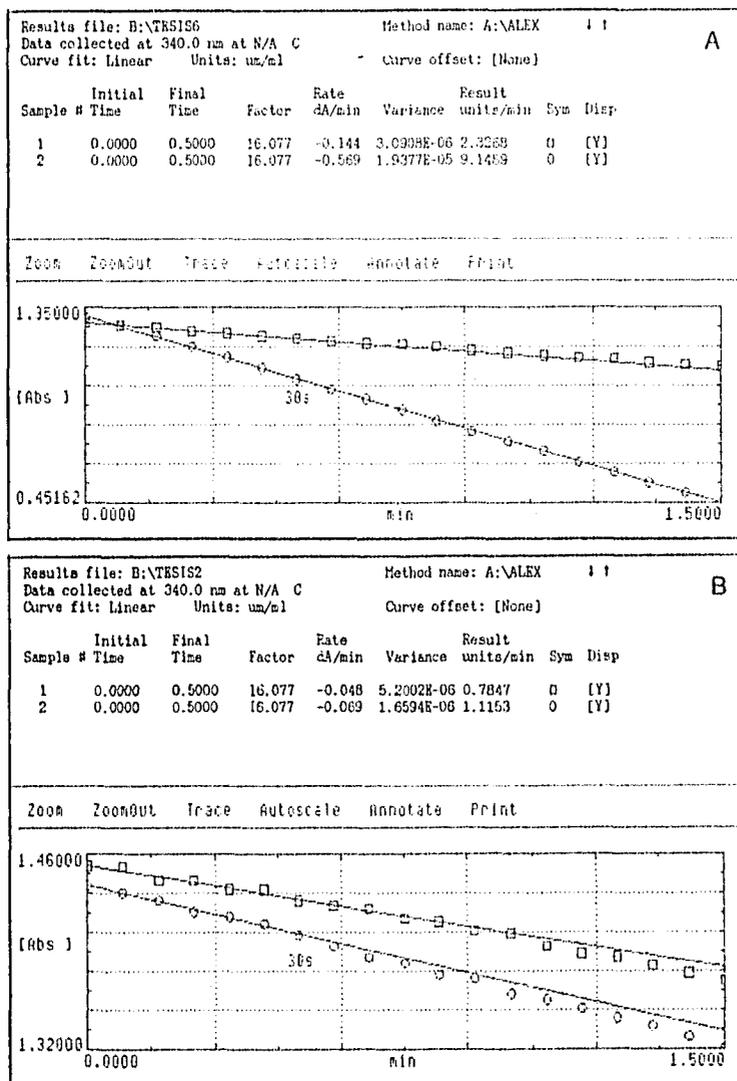


Fig. 1. Curva de progreso de la reacción catalizada por PEPC no modificada (A) y modificada con PLP (B). La enzima se incubó en ausencia o en presencia de PLP 1.0 mM a 30 °C en el amortiguador de incubación conteniendo PEG al 6% (p:v), como se describe en la sección 5.6. Después de una hr de incubación, se tomaron alícuotas para determinarles la actividad en ausencia (□) o en presencia de Glc6P 10 mM (○). En la parte superior de los paneles se muestra la actividad determinada considerando sólo los primeros 30 s.

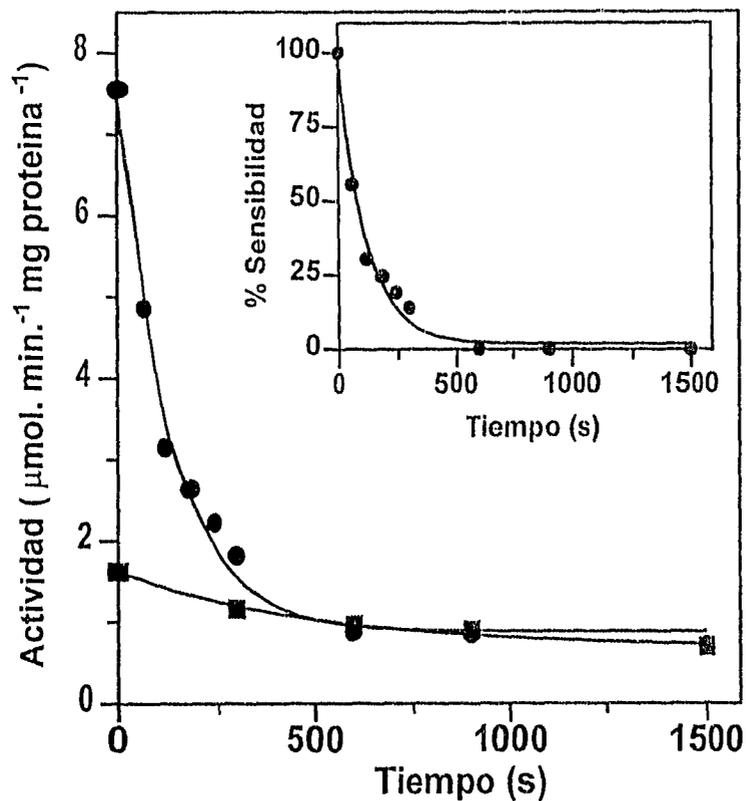


Fig. 2. Efecto de PLP sobre la actividad y la sensibilidad a Glc6P de la PEPC de hoja de maíz. La enzima se incubó con PLP 1.19 mM bajo las condiciones descritas en la Fig. 1. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinarles la actividad en ausencia (■), o en presencia de Glc6P 10 mM (●). Las líneas son los mejores ajustes de los datos experimentales a la ecuación 1 por regresión no lineal. Inserto: Sensibilidad residual a Glc6P. Los puntos se generaron a partir de los datos de la figura principal como se describe en el texto y la línea es el mejor ajuste a la ecuación 2.

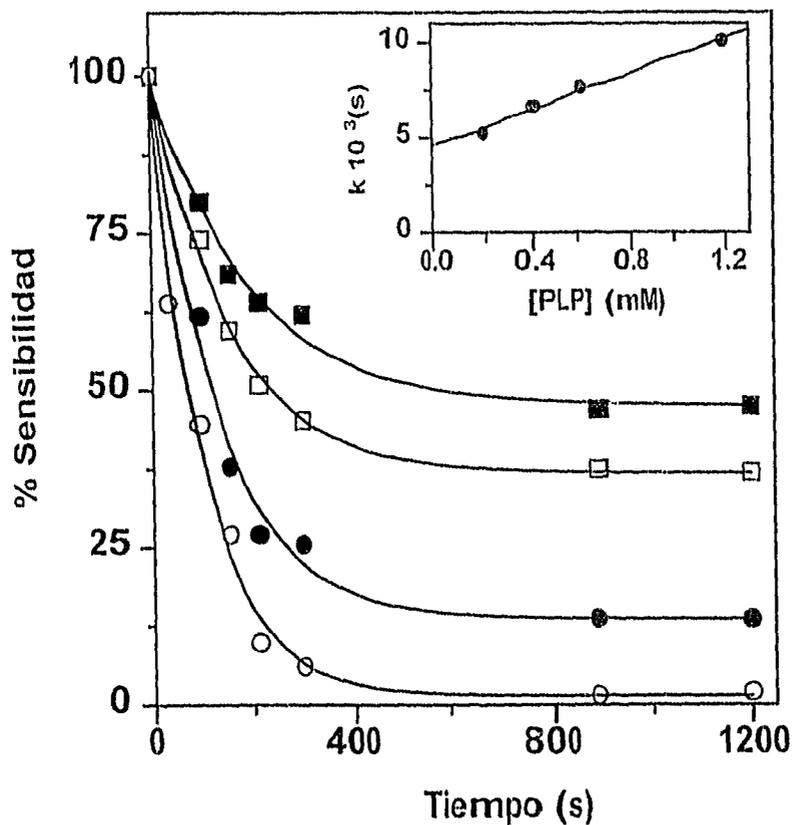


Fig. 3. Dependencia de la insensibilización de PEPC a activación por Glc6P en función de la concentración de PLP. La enzima se incubó con PLP 0.19 (■), 0.4 (□), 0.62 (●) o 1.19 (○) mM bajo las condiciones descritas en la Fig. 1 en la presencia de fosfoglicolato 15 mM y de MgCl_2 25 mM. A los tiempos indicados se tomaron alieutas que fueron ensayadas como se indica en la Fig. 1. Las líneas son los mejores ajustes de los datos experimentales a la ecuación 2. Inseto: gráfico de las constantes aparentes de velocidad (k) para la pérdida de activación por Glc6P versus concentración de PLP. La línea es el mejor ajuste a la ecuación $k = k_{+1} [\text{PLP}] + k_1$.

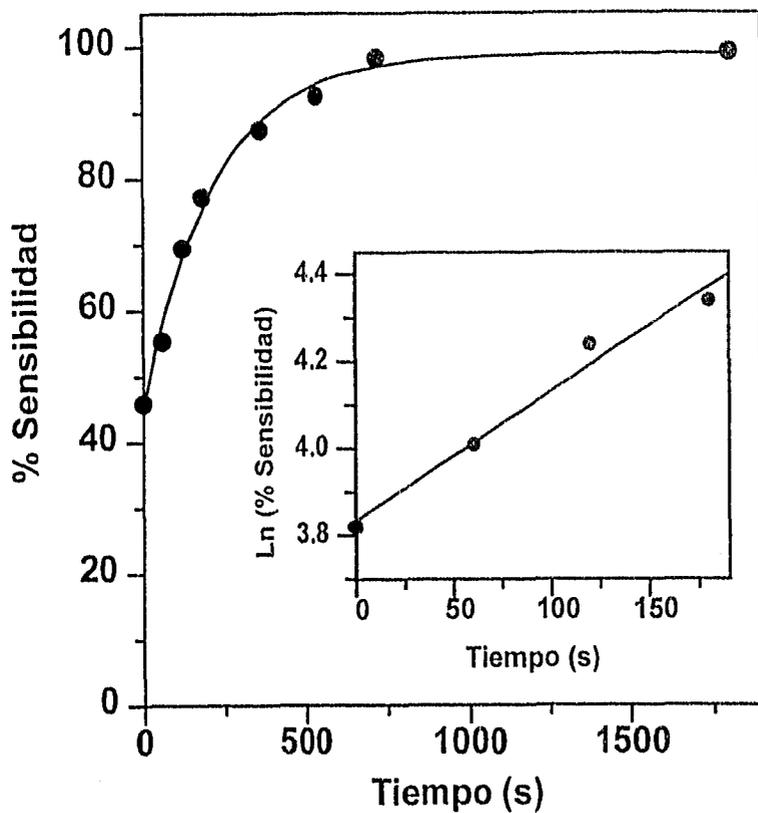


Fig. 4. Reversión de la insensibilización de PEPC a Glc6P causada por PLP. La enzima se incubó con PLP 0.4 mM como se indica en la Fig. 3. Después de 60 min la mezcla de incubación se diluyó 100 veces en el amortiguador de actividad. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas a las que se les determinó la sensibilidad a Glc6P. Los datos se ajustaron por regresión no lineal a la ecuación 2. Inserto: gráfico semilogarítmico del porcentaje de sensibilidad residual versus tiempo. Se consideraron sólo los primeros 3 min de la reacción de resensibilización. La línea es el resultado del ajuste a la ecuación 3.

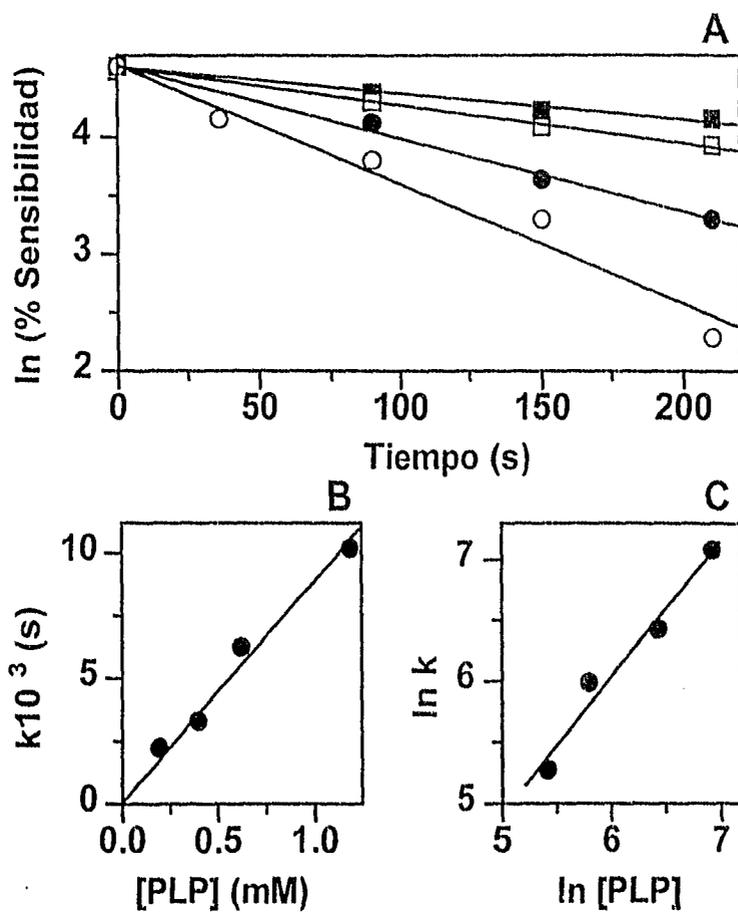


Fig. 5. Cinética de pseudoprimer orden de la insensibilización de PEPC a Glc6P por PLP. (A) Gráfico semilogarítmico del porcentaje de sensibilidad residual versus tiempo de incubación con PLP 0.19 (■), 0.4 (□), 0.62 (●) o 1.19 (○) mM. Las líneas son el mejor ajuste de los datos a la ecuación 3. (B) Dependencia de la constante de velocidad de insensibilización de pseudoprimer orden de la concentración de PLP. (C) Determinación del orden de reacción para PLP acorde a la ecuación 4.

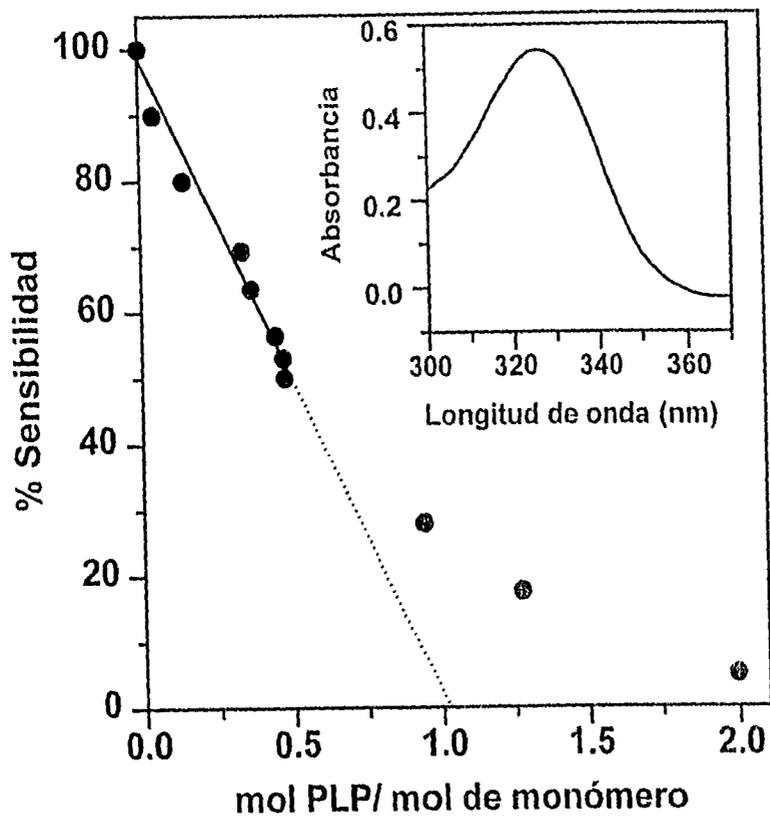


Fig. 6. Relación entre la sensibilidad de la enzima a Glc6P y la unión de PLP a la PEPC. Muestras de PEPC pura (1.8 μ M) fueron incubadas con diferentes concentraciones de PLP (de 0 a 1.19 mM) bajo las mismas condiciones que las descritas en el pie de la Fig. 3. La incorporación de las moléculas de PLP a la proteína se determinaron como se describe en la sección 5.7. Inserto: Espectro diferencial de la enzima (2.9 μ M) no modificada y la enzima (2.9 μ M) modificada con PLP 1.2 mM, y reducidas con NaBH₃CN como se describe en la misma sección.

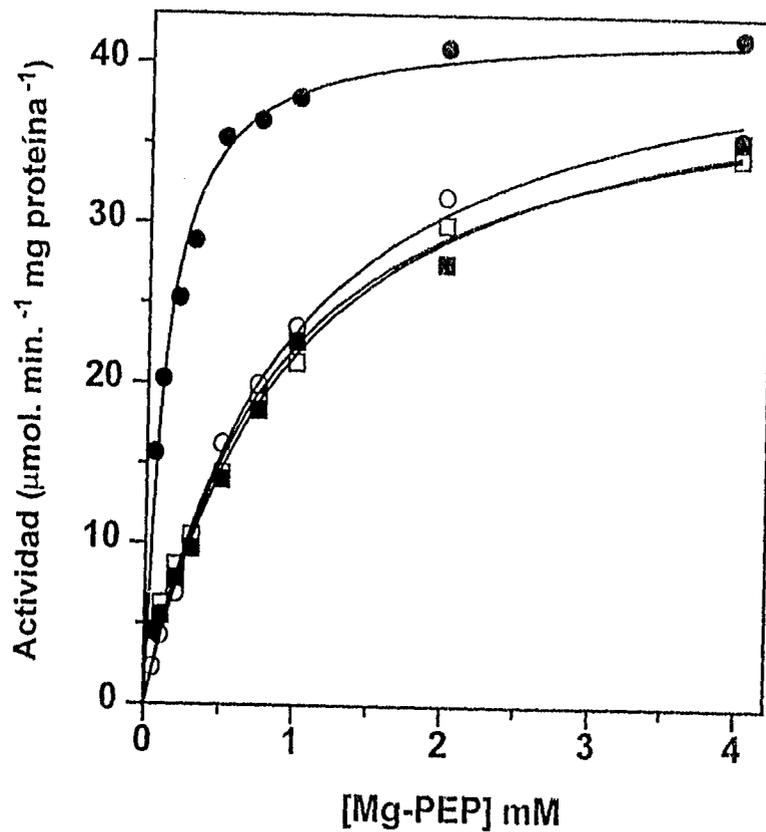


Fig. 7. Cinética de saturación por Mg-PEP (PEP libre 5 mM constante) de la PEPC nativa (O, ●) y de PEPC modificada con PLP (□, ■) en ausencia (O, □) o presencia de Glc6P (●, ■). La enzima se incubó por 1 hr en el amortiguador de incubación en presencia de Mg-PEP 4 mM (Mg^{2+} libre 4.4 mM y PEP libre 5 mM) sin (PEPC nativa) o con PLP (PEPC modificada). Los puntos corresponden a los valores de velocidad inicial obtenidos experimentalmente y las líneas son el mejor ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten.

7. DISCUSIÓN.

La insensibilización a la Glc6P producida por el PLP estudiada en este trabajo puede ser el resultado de la modificación de una lisina localizada en o cerca del sitio alostérico, impidiendo de esta manera la unión del activador por un efecto estérico, o bien de una lisina que esté involucrada en la transición alostérica provocada por la unión de Glc6P a la enzima. En el último caso, la protección ejercida por Glc6P puede explicarse si la lisina está expuesta en la enzima libre y total o parcialmente escondida después de que se lleve a cabo la transición alostérica. En los dos modelos propuestos para la regulación alostérica de la isoforma tipo C4 de PEPC, el modelo de asociación-disociación oligomérica [Podestá & Andreo, 1989, Willeford y col., 1990] y el modelo concertado [Jawali, 1990b], el mismo equilibrio se afecta por ligandos homotrópicos y heterotrópicos, de manera que la transición alostérica causada por la unión del sustrato debería afectar la reactividad de esta lisina en forma similar a la transición alostérica causada por la unión de Glc6P, en el caso de que este residuo estuviera involucrada en la transición alostérica más que en la unión de Glc6P. Nuestra evidencia experimental muestra que este no es el caso, pues la saturación del sitio activo no sólo no protege frente a la insensibilización, sino que notablemente aumenta el grado de insensibilización y, viceversa, la saturación del sitio alostérico protege frente a la insensibilización e incrementa la inactivación. Estos resultados sugieren que la unión del sustrato al sitio activo "abre" el sitio alostérico y que la unión de Glc6P al sitio alostérico "abre" el sitio activo, de total acuerdo con el principio termodinámico de unión, el cual establece que los efectos de unión heterotrópicos están relacionados con los efectos de unión homotrópicos [Wyman, 1964]. En total consistencia con esto, la protección ejercida por Glc6P contra insensibilización requiere o se aumenta por la saturación del sitio activo, como se muestra en la Tabla III.

Se ha propuesto que PEP en su forma libre actúa como activador uniéndose al sitio alostérico de Glc6P [Jenkins y col., 1986., Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990]; sin embargo, como se muestra en la Tabla III, PEP protege la inactivación pero no la insensibilización, lo cual indica que PEP no se une al sitio alostérico de Glc6P.

Los cosolutos orgánicos PEG y glicerol aumentan la insensibilización y al mismo tiempo favorecen la protección contra insensibilización dada por Glc6P. Estos dos resultados sugieren que el sitio alostérico es más accesible al PLP y al activador en presencia de los cosolutos, lo cual está de acuerdo con el efecto de PEG y glicerol sobre la afinidad de PEPC por Glc6P: ambos cosolutos disminuyen la K_a para este activador [Castellanos-Martínez, A., Mújica-Jiménez, C. & Muñoz-Clares, R.A., datos no publicados]. El efecto de los cosolutos orgánicos sobre la cinética de la PEPC se ha

explicado [Podestá & Andreo, 1989, Wedding y col., 1990, Wedding y col., 1994] a través del modelo de asociación disociación oligomérica (sección 2.2.3.) y de la teoría del "volumen de exclusión" [Gekko & Timasheff, 1981], de acuerdo con la cual, la repulsión entre la PEPC y tales cosolutos provoca el confinamiento de la enzima en una pequeña fracción del volumen total, favoreciendo la forma tetramérica activa de la PEPC. Sin embargo, es importante hacer notar que el efecto de glicerol y PEG sobre la unión de Glc6P y la reactividad de la lisina del sitio alostérico se determinó usando una preparación de enzima muy concentrada y tetramérica, mientras que el efecto de los cosolutos sobre la K_a se determinó en estudios cinéticos de velocidad inicial, en los que se utiliza enzima muy diluida [Castellanos-Martínez, A., Mújica-Jiménez, C. & Muñoz-Clares, R.A., datos no publicados]. Por lo tanto, pensamos que los efectos observados en este trabajo no se deben a la conocida capacidad de los cosolutos de desplazar el equilibrio dímero-tetramero hacia la forma tetramérica [Podestá & Andreo, 1989], sino a que provocan, además, cambios conformacionales que no involucran asociación de subunidades.

8. CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos, las principales conclusiones de este trabajo son:

1) La modificación con PLP de la enzima PEPC de hoja de maíz causa su insensibilización a activación por Glc6P. Dada la correlación entre el número de moléculas de PLP incorporadas a la enzima y dado el orden de reacción para el PLP, se concluye que la modificación de un residuo de lisina por monómero de la enzima es la responsable de la insensibilización a Glc6P de la enzima PEPC de hoja de maíz.

2) El efecto competitivo de Glc6P con respecto al PLP, junto con el efecto opuesto que tiene sobre la inactivación sugiere que la lisina modificada se localiza en o cerca del sitio de unión para Glc6P.

3) La enzima insensible a Glc6P también es insensible a otros activadores que tienen un grupo fosfato en su estructura. Ello, unido a la protección que dichos activadores presentan frente a la insensibilización por PLP, permite concluir que este grupo de activadores se une al sitio activador alostérico de Glc6P.

4) La modificación química de la lisina ha permitido detectar estados conformacionales de la enzima, provocados por la unión de diversos ligandos o por la presencia de cosolutos orgánicos en el medio en que se encuentra la enzima.

9. PERSPECTIVAS.

En este trabajo se ha dado un primer paso para el estudio de la correlación de la estructura función del sitio alostérico para Glc6P de la enzima PEPC de hoja de maíz al detectar la presencia de un residuo de lisina en este sitio alostérico.

Como punto importante resta el localizar dicha lisina en la estructura primaria de la enzima. Ello permitirá la construcción de enzimas mutadas en dicha posición y así confirmar o no la participación directa de este residuo de aminoácido en la unión de Glc6P a su sitio alostérico

Por otra parte, dado que PLP inactiva e insensibiliza a la enzima por modificación de dos residuos de lisina diferentes y que tanto la actividad como la sensibilidad residuales tras alcanzarse el equilibrio de la reacción de modificación son dependientes de la presencia y concentración de diferentes ligandos de la enzima, este modelo experimental nos permitirá determinar las constantes de disociación de ligandos del sitio activo y del sitio alostérico activador de Glc6P bajo diferentes condiciones, así como evaluar las interacciones entre estos dos sitios y entre ellos y otros sitios alostéricos (por ejemplo los sitios para malato y para glicina). En definitiva, nos permitirá profundizar en el conocimiento del mecanismo de la regulación alostérica de esta importante enzima.

Finalmente, el disponer de una enzima modificada insensible a Glc6P permitirá explorar de manera directa la posible activación de la enzima por PEP libre. De la misma manera permitirá determinar el mecanismo cinético de la enzima, sin la complicación del posible efecto activador del sustrato, ya que los patrones cinéticos obtenidos con la enzima nativa son bastante complejos y difíciles de interpretar.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Andreo, C.S., González, D.H. & Iglesias, A.A. (1987). *FEBS Lett.* **213**, 1-8.
- Andreo, C.S., Iglesias, A.A., Podestá, F.E. & Wagner, R. (1986). *Biochim. Biophys. Acta.* **870**, 292-301.
- Ausenhuis, S.L. & O'Leary, M.H. (1992). *Biochemistry.* **31**, 6427-6431.
- Bandarian, V., Poehner, W.J. & Grover, S.D. (1992). *Plant Physiol.* **100**, 1411-1416.
- Bandurski, R.S. (1955). *J. Biol. Chem.* **217**, 137-150.
- Bandurski, R.S., Greiner, C.M. & Bonner, J. (1953). *J. Biol. Chem.* **204**, 781-786.
- Bandurski, R.S. & Greiner, C.M. (1953). *Fed. Proc.* **12**, 17-23.
- Blackburn, M.N. & Schachman, H.K. (1976). *Biochemistry.* **15**, 1316-1323.
- Bradford, M.M. (1976). *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Carter, P.J., Nimmo, H.G., Fewson, C.A. & Wilkins, M.B. (1991). *EMBO J.* **10**, 2063-2068.
- Carter, P.J., Nimmo, H.G., Fewson, C.A. & Wilkins, M.B. (1990). *FEBS Lett.* **263**, 233-236.
- Chang, Y.-y., Iglesias, A.A. & Preiss, J. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 24107-24113.
- Chen, S-S. & Engel, P.C. (1975). *Biochem. J.* **147**, 351-358.
- Coombs, J., Baldry, C.W. & Bucke, C. (1973). *Planta.* **110**, 95-107.
- Cooper, T.G. & Wood, H.G. (1971). *J. Biol. Chem.* **246**, 5488-5490.
- Crétin, C., Keryer, E., Tagu, D., Lepiniec, L., Vidal, J. & Gadal, P. (1990). *Nucleic Acids Res.* **18**, 658.
- Crétin, C., Santi, S., Keryer, E., Lepiniec, L., Tagu, D., Vidal, J. & Gadal, P. (1991). *Gene* **99**, 87-94.
- Davies, D.D. (1986). *Physiol. Plant.* **30**, 131-158.
- Deroche, M.E. & Carroyol, E. (1988). *Physiol. Plant.* **74**, 775-782.
- Doncaster, H.D. & Leegood, R.C. (1987). *Plant Physiol.* **84**, 82-87.
- Duff, S.M.G., Andreo, C.S., Paequit, V., Lepiniec, L., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, J., Gadal, P. & Chollet, R. (1995). *Eur. J. Biochem.* **228**, 92-95.
- Duff, S.M.G. & Chollet, R. (1995). *Plant Physiol.* **107**, 775-782.
- Fischer, E.H., Forrey, A.W., Hedrick, J.L., Hughes, R.C., Kent, A.A. & Krebs, H.G. (1963). En: *Chemical & Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis* (Snell, E.E., Fasella, P.M., Brownstein, A. & Rossi-Fanetti, A., eds.) pp 543. Pergamon Press, New York.
- Gekko, K. & Timasheff, S.N. (1981). *Biochemistry.* **20**, 4667-4676.
- González, D.H., Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1987). *Biochem. J.* **241**, 543-548.
- González, D.H., Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1984). *J. Plant Physiol.* **116**, 425-434.
- Hatch, M.D. (1978). En *Current Topics in Cellular Regulation.* **14**, 1-27.

- Hatch, M.D. (1987). *Biochim. Biophys. Acta* **895**, 81-106.
- Hayakawa, S., Matsunaga, K. & Sugiyama, T. (1981). *Plant Physiol.* **67**, 133-138.
- Hedley, C.L., Harvey, D.M. & Keely, R.J. (1975). *Nature*. **258**, 352-354.
- Hermans, J. & Westhoff, P. (1990). *Mol. Gen Genet.* **224**, 459-468.
- Huber, S.C., Sugiyama, T. & Akazawa, T. (1986). *Plant Physiol.* **82**, 550-554.
- Huber, S.C. & Edwards, G.E. (1975). *Can. J. Bot.* **53**, 1925-1933.
- Hudspeth, R.L., Glackin, C.A., Bonner, J. & Grula, J.W. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 2884-2888.
- Hudspeth, R.L., & Grula, J.W. (1989). *Plant Mol Biol.* **12**, 579-589.
- Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1984b). *Plant Physiol.* **75**, 983-987.
- Iglesias, A.A., Gonz ales, D.H & Andreo C.S. (1984). *Biochim. Biophys. Acta.* **788**, 41-47.
- Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1983). *Biochim. Biophys. Acta.* **749**, 9-17.
- Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1984a). *Photosynth. Res.* **5**, 215-226.
- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. & S anchez, D.M. (1992). *Physiol. Plant* **84**, 61-66.
- Jawali, N. (1990 a) *Arch. Biochem. Biophys.* **277**, 61-68.
- Jawali, N. (1990 b) *Arch. Biochem. Biophys.* **277**, 69-73.
- Jawali, N. & Bhagwat, A.S. (1987) *Photosynth. Res.* **11**, 153-159.
- Jenkins, C.L.D., Harris, R.L.N. & McFadden, H.G. (1986). *Biochem. Int.* **12**, 619-625.
- Jiao, J.A., Echevarria, C., Vidal, J. & Chollet, R. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 2712-2715.
- Jiao, J.A. & Chollet, R. (1988). *Arch. Biochem. Biophys.* **261**, 409-417.
- Jiao, J.A. & Chollet, R. (1989). *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 526-535.
- Jiao, J.A. & Chollet, R. (1991). *Plant Physiol.* **95**, 981-985.
- Karabourniotis, G., Manetas, Y. & Gavalas, N.A. (1983). *Plant Physiol.* **73**, 735-739.
- King, B.J., Layzell, D.B. & Canvin, D.T. (1986). *Plant Physiol.* **81**, 200-205.
- Leegood, R.C. & Osmond, C.B. (1990). En: *Plant physiology, biochemistry & molecular biology*. Dennis, D.T. & Turpin, D.H. (Eds.). 274-298 pp. Longman Scientific & Technical. England.
- Lepiniec, L., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P. & Cretin, C. (1994). *Plant Sci.* **99**, 110-124.
- Levy, H.M., Leber, P.D. & Ryan, E.M. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 3654-3659.
- Manetas, Y. & Gavalas, N.A. (1982). *Photosynthetica.* **16**, 59-66.
- Manetas, Y., Petropoulou, Y. & Karabourniotis, G. (1986). *Plant Cell Environ.* **9**, 145-151.
- Manh, C.T., Bismuth, E., Boutin, J.P., Provot, M. & Champigny, M.L. (1993). *Physiol. Plant.* **89**, 460-466.
- MaralihalI, G.B., Bhagwat, A.S. (1993). *J. of Protein Chemistry.* **12**, 451-457.
- Mar s, J. & Leblová, S. (1980). *Photosynthetica* **14**, 25-31.

- Marques, I.A., Oberholzer, M.J. & Erismann, K.H. (1983). *Plant Physiol.* **71**, 555-561.
- Maxwell, C.A., Vance, C.P., Heichel, G.H. & Stadel, S. (1984). *Crop Science* **24**, 257-264.
- Mekinsley-McKee, J.S. & Morris, D.L. (1972). *Eur. J. Biochem.* **28**, 1-11.
- McNaughton, G.A.L., MacIntosh, C., Fewson, C.A., Wilkins, M.B. & Nimmo, H.G. (1991). *Biochim. Biophys. Acta.* **1093**, 189-195.
- Mizioroko, H.W., Nowak, T. & Mildvan, A.S. (1974). *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 378-389.
- Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J-P. (1965) *J. Mol. Biol.* **12**, 88-118.
- Mukerji, S.K. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* **182**, 360-365.
- Naide, A., Izui, K., Yoshinaya, T. & Katsuki, H. (1979) *J. Biochem.* **85**, 423-432.
- Nguyen, T.T., Ngam, E.K., Jenkins, J. & Grover, S.D. (1988). *Plant Physiol.* **86**, 104-107.
- Nimmo, G.A., Nimmo, H.G., Hamilton, I.D., Fewson, C.A. & Wilkins, M.B. (1986). *Biochem. J.* **239**, 213-220.
- Nimmo, G.A., Wilkins, M.B., Fewson, C.A. & Nimmo, H.G. (1987). *Planta.* **170**, 408-415.
- Nishikido, T. & Takanashi, H. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **53**, 126-133.
- Nott, D. L. & Osmond, C.B. (1982). *J. Plant Physiol.* **9**, 409-422.
- O'Leary, M.H. (1981). *Biochemistry.* **20**, 7308-7314.
- O'Leary, M.H. (1982). *Ann Rev. Plant Physiol.* **33**:297-315.
- O'Leary, M.H. (1983). *Physiol. Vég.* **21**, 883-888.
- Penefsky, H.S. (1977). *J. Biol. Chem.* **252**, 2891-2899.
- Pipenbrock, M. & Schmitt, J.M. (1991). *Plant Physiol.* **97**, 998-1003.
- Podestá, F.E., Iglesias, A.A., & Andreo, C.S. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 546-553.
- Podestá, F.E. & Andreo, C.S. (1989). *Plant Physiol.* **90**, 427-433.
- Poetsch, W., Hermans, J. & Westhoff, P. (1991). *FEBS Lett.* **292**, 133-136.
- Qun, C., & Jiao-nai, S. (1988). *Chinese Journal of Biochemistry & Biophysics.* **20**, 47-56.
- Quy, L.U., Foyer, C. & Champigny, M.L. (1991). *Plant Physiol.* **97**, 1476-1482.
- Raghavendra, A.S. & Vallejos, R.H. (1982). *Indian. J. Exp. Biol.* **20**, 619-622.
- Rajagopalan, A.V., Devi, M.T. & Raghavendra A.S. (1994). *Photosynth. Res.* **39**, 115-135.
- Rodríguez-Sotres, R. (1990). Tesis Doctoral. Facultad de Química UNAM, México D.F.
- Rodríguez-Sotres, R. & Muñoz-Clares, R.A. (1990). *Arch. Biochem. Biophys.* **276**, 180-190.
- Rodríguez-Sotres, R. Muñoz-Clares, R.A. (1987a). *J. Plant Physiol.* **128**, 361-369.
- Rodríguez-Sotres, R. Muñoz-Clares, R.A. (1987b). *J. Plant Physiol.* **129**, 191-199.
- Rosendahl, L., Vance, C.P. & Pedersen, W.B. (1990). *Plant Physiol.* **93**, 12-19.
- Rustin, P., Meyer, C.R. & Wedding, R.T. (1991). *Plant Physiol.* **97**, 1011-1016.
- Rustin, P., Meyer, C.R. & Wedding, R.T. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**, 17611-17614.
- Ryslavá, H., Stivorová, M., & Leblová, S. (1988) *Photosynthetica.* **22**, 83-89.

- Schäffner, A.R. & Sheen, J. (1992). *Plant J.* **2**, 221-232.
- Schuller, K.A., Plaxton, W.C. & Turpin, D.H. (1990a) *Plant Physiol.* **93**, 1303-1311.
- Schuller, K.A., Turpin, D.H. & Plaxton, W.C. (1990b). *Plant Physiol.* **94**, 1429-1435.
- Schweizer, P. & Erisman, K.H. (1985). *Plant Physiol.* **78**, 455-458.
- Selenioti, E., Nikolopoulos, D. & Manetas, Y. (1987). *Aust. J. Plant Physiol.* **14**, 203-210.
- Selioniti, E., Karabouniotis, G., Manetas, Y. & Gavalas, N.A. (1985). *J. Plant Physiol.* **121**, 353-360.
- Sims, T.L. & Hague, D.R. (1981). *J. Biol. Chem.* **256**, 8252-8255.
- Singal, H.R. & Singh, R. (1986) *Plant Physiol.* **80**, 369-373.
- Stamatakis, K., Gavalas, N.A., & Manetas, Y. (1988). *Aus. J. Plant Physiol.* **15**, 621-623.
- Štíborová, M. & Leblková, S. (1985). *Photosynthetica.* **19**, 177-182.
- Štíborová, M. & Leblková, S. (1986) *FEBS Lett.* **205**, 32-34.
- Sugiharto, B., Miyata, K., Nakamoyo, H., Sasakawa, H. & Sugiyama, T. (1990). *Plant Physiol.* **92**, 963-969.
- Sugiharto, B., Suzuki, I., Burnell, J.N. & Sugiyama, T. (1992). *Plant Physiol.* **100**, 2066-2070.
- Sugiharto, B. & Sugiyama, T. (1992). *Plant Physiol.* **98**, 1403-1408.
- Taghizadeh, S.K., Jacoby, F.J. & Grover, S.D. (1991). *Plant Physiol.* **95**, 1237-1242.
- Tchen, T.T. & Vennesland, B. (1955). *J. Biol. Chem.* **213**, 533-546.
- Ting, I.P. & Osmond, C.B. (1973a). *Plant Sci. Letters.* **1**, 123-128.
- Ting, I.P. & Osmond, C.B. (1973b). *Plant Physiol.* **51**, 439-447.
- Ting, I.P. & Osmond, C.B. (1973c). *Plant Physiol.* **51**, 448-453.
- Toh, H., Kawamura, T. & Izui, K. (1994). *Plant, Cell & Environment.* **17**, 31-43.
- Uedan, K. & Sugiyama, T. (1976). *Plant Physiol.* **57**, 906-910.
- Van, Q. L., Foyer, C. & Champigny, M. L. (1991). *Plant Physiol.* **97**, 1476-1482.
- Vidal, J. & Gadal, P. (1983). *Physiol. Plant.* **57**, 119-123.
- Wagner, R., González, D.H., Podestá, F.E. & Andreo, C.S. (1987). *Eur. J. Biochem.* **164**, 661-666.
- Wagner, R., Podestá, F.E., González, D.H. & Andreo, C.S. (1988). *Eur. J. Biochem.* **173**, 561-568.
- Walker, G.H., Ku, M.S.B. & Edwards, G.E. (1986). *Plant Physiol.* **80**, 848-855.
- Wang, Y-H., Duff, S.M.G., Lepiniec, L., Crétin, C., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, J., Gadal, P. & Chollet, R. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 16759-16762.
- Wedding, R.T. & Black, M.K. (1986). *Plant Physiol.* **82**, 985-990.
- Wedding, R.T. & Black, M.K. (1988). *Plant Physiol.* **87**, 443-446.
- Wedding, R.T., Black, M.K. & Meyer, C.R. (1989). *Plant Physiol.* **90**, 648-652.

- Wedding, R.T., Black, M.K. & Meyer, C.R. (1990). *Plant Physiol.* **92**, 456-461.
- Wedding, R.T. O'Brien, C.E. & Kline, K. (1994). *Plant Physiol.* **104**, 613-616.
- Willeford, K.O. & Wedding, R.T. (1992). *Plant Physiol.* **99**, 755-758.
- Willeford, K.O., Wu, M-X., Meyer, C.R. & Wedding, R.T. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **168**, 778-785.
- Wong, K. F. & Davies, D. D. (1973). *Biochem. J.* **131**, 451-455.
- Wu, M.X. & Wedding, R.T. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **240**, 655-662.
- Wu, M.X. & Wedding, R.T. (1994). *Plant Cell Physiol.* **35**, 569-574.
- Wyman, J. (1964). In: *Adv. Prot. Chem.* (Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Anson, M.L. & Richards, F.M., eds.) Vol 19, pp 223-286. Academic Press, New York & London.
- Zelitch, I. (1979). *Chem. Eng. News.* **57**, 28-48.
- Zhang, X-Q., Li-B. & Chollet, R. (1995). *Plant Physiol.* **108**, 1561-1568.