

115  
2ij



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMEN DE TESIS  
FAC. DE QUIMICA

"PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA  
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE HOJA DE FRIJOL  
(*Phaseolus vulgaris*)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

HELEN YAMPARA IQUISE



MEXICO, D.F.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Trabajo realizado en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM y financiado por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), UNAM. Proyecto No. 203592. La sustentante fue becaria de DGAPA de este mismo proyecto.

**Jurado asignado:**

Presidente:	Prof. Rosario Adelaida Muñoz Clares
Vocal:	Prof. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre
1er. Suplente	Prof. Luz del Carmen Castellanos Román
2do. Suplente	Prof. Manuel Benigno Aguilar Ramírez

Nombre completo y firma del asesor del tema:

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares Rosario Muñoz Clares,

Nombre completo y firma del sustentante:

Helen Yampara Iquise

Helen Yampara I.

*A mis padres:*

*En especial a mi mamá Nieves que  
compartió desde la distancia cada momento  
de mi vida en México, gracias por confiar  
en mí. TE QUIERO MUCHO.*

*A mis hermanos:*

*Rocio, Orlando, Nahir Eliana y  
José Luis por su apoyo y cariño.*

*A mi esposo:*

*Alejandro por su cariño y  
compañía.*

Quiero agradecer:

*A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares, por la dirección de esta tesis y el apoyo que me brindó.*

*A Carlos Mújica por enseñarme y motivarme durante el desarrollo de este trabajo.*

*A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) por haberme otorgado una beca para la realización de este trabajo.*

*A José Elvis mi cuñado por todo el apoyo que me dió.*

*A mi sobrino Mauricio por darme momentos alegres.*

*A mis tios Guillermo y Felicidad por la motivación y su cariño.*

*A mis primos Carlos, Armando, Henry, Vladimir, Guillerma, Osman, Fabiola Helen y Juan Carlos por su cariño.*

*A mis amigos Carmen, María de Jesus (chui), Guido, Adriana, Lisbeth, Elizabeth, Juan Luis y Silverio por su amistad y confianza.*

*A Dulce María por visitar mi Llajta y brindarme su amistad y cariño.*

# ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS.	1
1. INTRODUCCIÓN.	2
2. ANTECEDENTES.	3
2.1 Fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas.	3
2.1.1 Reacción catalizada por PEPC.	
2.1.2 Características moleculares.	
2.1.3 Isoformas y funciones metabólicas.	
2.1.4 Regulación.	
2.2 Fosfoenolpiruvato carboxilasa de leguminosas.	9
3. OBJETIVOS.	11
3.1 Objetivo general.	
3.2 Objetivos particulares.	
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	12
4.1 Equipo.	12
4.2 Reactivos.	12
4.3 Soluciones amortiguadoras.	13
4.4 Material biológico.	13
4.5 Extracción de la enzima PEPC	14
4.6 Ensayo de actividad de PEPC	14
4.7 Estudios cinéticos.	15
4.8 Determinación de la concentración de proteína.	15
4.9 Precipitación con sulfato de amonio.	16
4.10 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE).	16
4.10.1 Bajo condiciones no desnaturalizantes (PAGE-nativa).	
4.10.2 Bajo condiciones desnaturalizantes ( SDS-PAGE).	
4.10.3 Determinación del pl.	
4.11 Métodos cromatográficos.	19
4.11.1 Cromatografía de intercambio iónico.	
- DEAE-Sephacel.	
- Hidroxiapatita.	
- Mono-Q.	
4.11.2 Cromatografía de exclusión molecular.	
- TSK G4000SW acoplado a un sistema de HPLC.	

	- Sephadex G-25 (método de Penefsky).	
5.	RESULTADOS.	21
5.1	Purificación de la enzima PEPC de hoja de frijol.	21
5.1.1	Optimización del método de extracción y estudios de estabilidad.	
5.1.2	Cromatografía de intercambio iónico.	
5.1.3	Cromatografía de exclusión molecular.	
5.1.4	Segunda cromatografía de intercambio iónico.	
5.1.5	Electroforesis en geles de poliacrilamida.	
5.2	Caracterización cinética de la enzima PEPC de hoja de frijol.	25
5.2.1	Determinación de constantes cinéticas.	
5.2.2	Efecto de metabolitos y de cosolutos sobre la actividad.	
6.	FIGURAS.	27
7.	TABLAS.	49
8.	DISCUSIÓN.	52
9.	CONCLUSIONES.	57
10.	BIBLIOGRAFÍA.	58

## ABREVIATURAS.

ASB	Albúmina de suero bovino.
ATP	Trifosfato de adenosina.
C 3	Plantas que fijan CO <sub>2</sub> exclusivamente vía ciclo de Calvin.
C 4	Plantas que poseen el ciclo de los ácidos dicarboxílicos C <sub>4</sub> además del ciclo de Calvin.
CAM	Metabolismo Ácido de las Crasuláceas.
DEAE-Sephacel	Dietilaminoetil-sephacel.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Acido etilendiaminotetracético.
Gluc-6-P	Glucosa-6-fosfato.
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión.
kDa	kilodalton.
<i>K<sub>m</sub></i>	Constante de Michaelis-Menten.
MDH	Málico deshidrogenasa.
<i>n</i>	Número de Hill.
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado.
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido.
OAA	Oxaloacetato.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PEG	Polietilenglicol.
PEP	Fosfoenolpiruvato.
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa.
pI	Punto isoelectrico.
PLP	Piridoxal-5'-fosfato.
PM	Peso molecular.
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo.
PVPP	Polivinilpolipirrolidona.
RPP	Ruta de las pentosas fosfato.
RUBISCO	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
TBS	Amortiguador Tris-salino.
TEA-HCl	Trietanolamina-ácido clorhídrico.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina.
TRIS	Hidroximetil - aminometano.



## 1. INTRODUCCIÓN.

Aproximadamente de un 90 a 95% de la materia seca de un cultivo se deriva del CO<sub>2</sub> atmosférico asimilado durante la fotosíntesis (1). Por ello, la comprensión de los procesos bioquímicos responsables de la asimilación de este compuesto es de 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 la necesidad de incrementar la producción mundial de alimentos crece día a día.

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa cuyo fruto es una vaina (ejote) y es el segundo cultivo en importancia en México debido a que su semilla constituye un producto alimenticio de alto consumo en el país. El hecho de que la semilla del frijol tenga un alto contenido de proteína la hace un alimento indispensable para una gran parte de la población mexicana que no cuenta con los recursos suficientes para abastecerse de proteína de origen animal. Este hecho nos ha planteado la necesidad de conocer con detalle algunos de los procesos metabólicos que se llevan a cabo en esta planta con el objeto de aportar información para ayudar a que el mejoramiento genético pueda ser llevado a cabo de una manera racional.

Una de las funciones más importantes de la PEPC es la anaplerótica, función que cobra especial relevancia en aquellos tejidos o bajo aquellas condiciones en las que hay una síntesis activa de proteínas. En este sentido, PEPC participa en la partición del carbono entre carbohidratos y aminoácidos. La regulación de esta partición en plantas ha sido pobremente estudiada, siendo esta regulación especialmente importante en plantas como frijol, en las que su valor económico radica en su elevada capacidad de almacenar proteína en las semillas.

En hoja de frijol se ha reportado evidencia de la existencia de tres isoenzimas, pero no han sido caracterizadas ni cinética ni molecularmente. Dada la importancia del frijol en México, nosotros iniciamos este estudio sobre las isoenzimas presentes en hoja de frijol como un primer paso para entender la función o funciones metabólicas que esta enzima desempeña en el frijol y de su participación en la productividad de esta planta, productividad entendida como cantidad y calidad de la semilla siendo el contenido proteico un componente fundamental de esta última.

## 2. ANTECEDENTES.

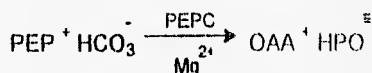
### 2.1 FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE PLANTAS.

PEPC está ampliamente distribuida en plantas: participa en la fotosíntesis de plantas C4 y plantas CAM, en las que está asociada con la fijación inicial de CO<sub>2</sub> (2, 3), y juega un papel muy importante como enzima anaplerótica en el metabolismo de plantas C3 (2, 3, 4).

#### 2.1.1 Reacción catalizada por PEPC.

PEPC cataliza la β-carboxilación irreversible de fosfoenolpiruvato (PEP) para producir oxalacetato y fosfato inorgánico (2).

La reacción catalizada es la siguiente:



$$\Delta G^\circ = -7.2 \text{ Kcal/mol}$$

Esta reacción es altamente exergónica y requiere un catión divalente que *in vivo* parece ser Mg<sup>2+</sup>, aunque *in vitro* puede usar Mn<sup>2+</sup> ó Co<sup>2+</sup> (2). A diferencia de otras reacciones de carboxilación catalizadas enzimáticamente donde el sustrato es bicarbonato, la reacción de PEPC no es dependiente de biotina (5, 6).

Se ha reportado que la afinidad del sitio activo de la enzima por el complejo PEP-Mg<sup>2+</sup> es mucho mayor que por PEP ó Mg<sup>2+</sup> libres, por lo cual se considera que el complejo es el sustrato preferencial de la reacción catalizada por PEPC (7, 8). PEP libre se comporta como un activador de la enzima 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<sup>2+</sup> (7).

#### 2.1.2 Características moleculares.

Se ha reportado un masa molecular de alrededor de 400 kDa para PEPC purificada de hoja de maíz y otras plantas C4 (9, 10). La enzima de hoja de maíz presenta una única banda con una masa molecular aproximada de 100 kDa en SDS-PAGE, lo que indica que la enzima es un homotetrámero (9, 11). Sin embargo, algunos autores proponen que PEPC puede existir en diferentes formas oligoméricas *in vivo* (12, 13, 14). La forma activa de PEPC es el homotetrámero,

siendo el dímero mucho menos activo o inactivo y el monómero inactivo. La existencia de formas diméricas o monoméricas depende del pH, de la fuerza iónica (12, 14, 15), de la temperatura (13, 16) y de la concentración de la PEPC (17). De esta manera la disociación de la enzima es promovida por valores de pH ácidos o alcalinos (12, 14), por fuerzas iónicas altas (14), por bajas temperaturas, por dilución (18) y por la ausencia de agentes reductores como DTT (19). Por otro lado, se ha reportado que la presencia de glicerol estabiliza la estructura nativa y la actividad de la proteína (20).

Casi todas las secuencias muestran un elevado grado de homología. La mitad hacia el extremo carboxilo está muy fuertemente conservada, encontrándose las mayores diferencias hacia el extremo amino terminal (4).

Estudios de modificación química con la enzima de hoja de maíz indican que residuos de arginina (21), lisina (22, 23), histidina (24), cisteína (25) y carboxilo (26) son esenciales para la actividad catalítica.

### *2.1.3 Isoformas y funciones metabólicas.*

En base a la actividad específica de la enzima en los extractos crudos y en los valores de  $Km_{(PEP)}$  se ha sugerido que las isoformas de PEPC pueden clasificarse en cuatro grupos (27):

1. PEPC de hojas de plantas C3 con una baja  $Km_{(PEP)}$  y una baja actividad específica.
2. PEPC de hojas de plantas C4 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.
4. PEPC de tipo no autotrófico ó de tejidos no verdes con una  $Km_{(PEP)}$  y actividad específica bajas.

En cuanto a las funciones de las diferentes isoformas de PEPC de plantas superiores se pueden agrupar en dos grandes categorías (28):

1. En hojas de plantas C3 y en los tejidos no fotosintéticos de todo tipo de plantas PEPC está involucrada en funciones anapleróticas, que incluyen el reabastecimiento de oxaloacetato para la síntesis de aminoácidos y porfirinas y para el relleno del ciclo del ácido cítrico (29, 30, 31). Además participa en mecanismos bioquímicos para el mantenimiento del pH (32), la regulación de la osmolaridad (33), la apertura y cierre de estomas (33), la fijación de nitrógeno

(34), en las lanzaderas de NADPH (34) y en la recaptura del CO<sub>2</sub> respirado (34).

2. En hojas de plantas C4 y CAM la isoforma predominante está asociada a la asimilación fotosintética de CO<sub>2</sub>. En plantas C4, la enzima está localizada en las células de mesófilo y cataliza el primer paso de la ruta metabólica conocida como ruta C4 incorporando el CO<sub>2</sub> atmosférico en un compuesto orgánico de cuatro carbonos (OAA). La existencia de este metabolismo minimiza las pérdidas de carbono y energía producidas por la fotorrespiración y explica la velocidad de crecimiento superior observada en plantas C4 a temperaturas altas y niveles altos de iluminación y de O<sub>2</sub> en comparación con la de plantas C3 (35). En plantas CAM la fijación del CO<sub>2</sub> 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 (36).

En un estudio comparativo tendiente a investigar el grado de homología entre las PEPCs de plantas C3 y C4 en el cual emplearon PAGE e identificaron inmunológicamente a la proteína, se reporta la presencia de varias isoformas con tamaños monoméricos ligeramente distintos: en hojas de trigo y cebada observaron dos bandas, en hojas etioladas de maíz tres bandas y en hojas de arroz cuatro bandas, mientras que en hojas verdes de maíz o tabaco sólo se detectó una banda. Esta información indica que la presencia de distintas isoformas de PEPC en los diferentes tejidos de una planta no es un fenómeno aislado y sugiere que hay múltiples formas de subunidades de PEPC en plantas C3 (35).

El hecho de que existan diferentes isoformas de PEPC que participan en funciones metabólicas diversas ha conducido a la búsqueda del o los genes que las codifican. Se ha encontrado que existen de tres a cuatro familias de genes nucleares que codifican para las diferentes isoformas de PEPC de plantas: las formas fotosintéticas de hojas de plantas C4, las formas anapleróticas de hojas etioladas de plantas C4 y de hojas de plantas C3, las formas fotosintéticas de hojas de plantas CAM y las formas anapleróticas de raíz (37, 38, 39, 40, 41, 42). PEPC fotosintética de plantas C4 está codificada por una copia única de un gen en sorgo (40, 43) y en maíz (36), pero está codificada por genes múltiples en *Flaveria trinervia* (una planta dicotiledónea tipo C4) (41, 44) y en soya (planta tipo C3) (45).

El estudio de la evolución molecular de PEPC mediante el alineamiento de todas las secuencias de PEPCs disponibles, asistido por computadora (28) y apoyados

con otros datos como las familias de genes que codifican para las formas de PEPCs, ha indicado que la forma C3 de la enzima es la forma primitiva de las plantas y que tanto las isoformas C4 y CAM se originaron a partir de ésta y en forma independiente durante la evolución.

#### 2.1.4 Regulación.

##### I. A nivel de la cantidad de enzima:

###### -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.

Algunos autores encontraron que la proporción de las dos enzimas carboxilantes (PEPC y RUBISCO) en la primera hoja de frijol varía dependiendo 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. Estos resultados sugieren que PEPC juega un papel más significativo en el frijol cultivado en nitrato (46). Posteriormente fueron confirmados estos datos al administrar diferentes fuentes de nitrógeno (nitrato o amonio) a plantas de frijol no noduladas, ya que las hojas de plantas cultivadas en nitrato mostraban un mayor incremento en la actividad de la PEPC, expresada en base a la cantidad de proteína, que las cultivadas en amonio (47).

En estudios recientes se encontró que la tercera hoja de trigo responde a la demanda de esqueletos de carbono asociada a alto consumo de nitrógeno con aumentos en la actividad de PEPC y disminución en la actividad de sacarosa fosfato sintetasa (48).

Cuando las hojas de maíz crecidas en ausencia de nitrógeno son suplementadas con nitrato o glutamina se observa acumulación selectiva de PEPC (49, 50). El suplemento de nitrógeno incrementa el nivel de RNAm y de proteína de PEPC, siendo este incremento más pronunciado con el suplemento amonio o glutamina que con nitrato (51). La inducción de la isoforma C4 de PEPC por nitrato, amonio o glutamina, correlaciona bien con la elevada eficiencia de uso del nitrógeno por las plantas C4, las cuales canalizan la mayoría del nitrógeno de la hoja hacia PEPC (36). Esta vía parece ser regulada específicamente por la glutamina hacia los esqueletos de carbono generados por la PEPC, producto de la asimilación tanto del

nitrate como del amonio, pues la glutamina en plantas de trigo estimula la fosforilación de la PEPC e incrementa la cantidad de RNAm de esta enzima (52).

#### **-Déficit de agua.**

Uno de los estreses ambientales al cual la mayoría de las plantas se ven expuestas en alguna etapa de su vida es el déficit de agua (53, 54, 55).

Se ha reportado que la actividad de PEPC se incrementa en nódulos de alfalfa sometidos a estrés de agua severo, siendo al parecer la PEPC la única enzima de nódulo cuya actividad se incrementa en estas condiciones (56). Por otra parte se ha observado que el cambio del metabolismo C3 a CAM en la planta *Mesembryanthemum crystallinum*, provocado por estrés de agua, va acompañado de un incremento en la actividad de la PEPC y de un aumento en la cantidad del RNAm de esta enzima (57, 58).

Recientemente en nuestro laboratorio se ha encontrado que la actividad, la proteína y los niveles de RNAm de PEPC presentan un incremento en hoja de maíz sometidas a estrés hídrico por tratamiento con PEG (M. Rodríguez Penagos, y R. A. Muñoz Clares, manuscrito en preparación).

#### **- Luz.**

La iluminación de plantas mantenidas previamente en oscuridad incrementa la actividad de la enzima PEPC en plantas C3 y en plantas C4 (59, 60, 61, 62, 63).

En hojas etioladas de sorgo se observa sólo una forma de PEPC con propiedades funcionales y regulatorias correspondientes a la isoenzima de plantas C3. En hojas enverdecidas de esta misma planta 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 la isoforma de hoja de plantas C4 (64).

Se ha reportado que durante el enverdecimiento de plántulas etioladas usando un sistema de traducción libre de células de germen de trigo, los niveles de RNAm traducible para PEPC se incrementan tras la iluminación (65).

## II. A nivel de la actividad:

### - Fosforilación.

Estudios realizados con hojas verdes de plantas C4, C3 y CAM tratadas con periodos cortos de iluminación y oscuridad indican que la luz está involucrada con la regulación a corto plazo de la actividad de esta enzima (13, 66, 67, 68, 69). Esta regulación se lleva a cabo por fosforilación y defosforilación del grupo hidroxilo de la serina-15 en PEPC de maíz (70) y de la serina-8 en el caso de la enzima de sorgo (71).

Se ha observado que PEPC tanto en hojas de plantas C3 y C4 como en hojas de plantas CAM existe en dos formas, una forma fosforilada y una forma no fosforilada que difieren en sus propiedades cinéticas. La enzima fosforilada presenta una actividad catalítica mayor que la forma no fosforilada, tanto en plantas C4 como en plantas CAM (13, 66, 68, 69). La afinidad aparente de PEPC para ambos efectores alostéricos malato y Gluc-6-P cambian dramáticamente e inversamente cuando la enzima es fosforilada (67)

La fosforilación de PEPC es catalizada por una PEPC-cinasa (61, 72, 73) y defosforilación por una proteína fosfatasa tipo A2 (74) las cuales median la interconversión de una forma de PEPC insensible a malato (fosforilada) a una forma de PEPC sensible a malato (no fosforilada).

En plantas C3 y C4 la forma fosforilada está presente en el día (61, 66, 72), mientras que en plantas CAM dicha forma prevalece durante la noche (75).

### - Metabolitos.

Se han descrito diversos metabolitos efectores de la actividad de PEPC y la enzima presenta al menos tres sitios alostéricos diferentes. Por su posible relevancia fisiológica destacan Gluc-6-P (11, 76) y glicina (11, 76, 77) como activadores, así como los inhibidores malato y aspartato (78, 79). El efecto de dichos efectores es más pronunciado a valores de pH neutro.

El principal efecto de Gluc-6-P es bajar considerablemente la  $K_m$  para el sustrato. Además aumenta la  $V_{max}$  a pH cercano a 7. Otro efecto importante de Gluc-6-P es eliminar la cooperatividad positiva por el sustrato que PEPC de hojas de plantas C4 presenta a pH 7 (11, 76).

Se han reportado otros activadores, que por resultados de estudios cinéticos se presume se unen al sitio alostérico para Gluc-6-P. De estos, algunos son de posible relevancia fisiológica como la fructosa-1,6-bisfosfato (9), el fosfato de carbanilo y el acetilfosfato (80) y el 3-fosfoglicerato (81), y otros compuestos no fisiológicos como el fenilfosfato (7) y metil-2(hidroxifosfinoilmetil) 2-propionato (82)

Glicina activa la PEPC de plantas C4 monocotiledóneas aparentemente por incrementar la  $V_{max}$  sin afectar la  $K_m$ , independientemente del pH de ensayo; pero no afecta la enzima de plantas C4 dicotiledóneas o de plantas C3 (76, 77). Glicina se une a un sitio alostérico diferente al de Gluc-6-P (83). Además de glicina se ha reportado (84) que otros aminoácidos activan a la enzima PEPC de hoja de maíz (una planta C4). A diferencia de la enzima de maíz, la enzima de plantas CAM no es activada por aminoácidos.

Malato y aspartato inhiben a PEPC incrementando la  $K_m$  aparente para PEP sin alterar la  $V_{max}$  (79), además, malato produce inhibición competitiva y no competitiva dependiendo del pH del ensayo (85). Gluc-6-P produce una disminución del efecto inhibitorio de malato (85).

El efecto inhibitorio de malato parece ser general para todos los tipos de PEPC, mientras que la activación por Gluc-6-P se presenta principalmente sobre la forma fotosintética. Las isoformas aisladas de plantas C3 (86) y de tejidos no fotosintéticos son en general menos sensibles a Gluc-6-P (87).

## 2.2 FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE

### LEGUMINOSAS.

La enzima PEPC de leguminosas ha sido pobremente estudiada. Los estudios realizados son hasta la fecha en nódulo (33, 88, 89, 90), raíz (91, 92), vaina (93, 94) y hoja (92).

En pared interna de vaina de chícharo se ha reportado que las actividades específicas de RUBISCO y PEPC son elevadas, lo que confiere a la vaina una capacidad de recapturar 66% del  $CO_2$  liberado a su espacio interno por la respiración de la semilla, el cual se aprovecha para el crecimiento del fruto (2, 95). De esta forma, PEPC de la pared de vaina juega un papel significativo en el desarrollo de la semilla (93).

Singal, y Singh, (94) purificaron PEPC de pared de vaina inmadura de garbanzo.



La enzima purificada con masa molecular alrededor de 200 kDa es un tetrámero de cuatro subunidades idénticas diferente a las otras PEPC, presentando una cinética de saturación por PEP hiperbólica y activación por Pi, Gluc-6-P,  $\alpha$ -glicerofosfato, ácido 3-fosfoglicérico y fructosa-1,6-bifosfato, e inhibición por malato y oxalacetato.

Estudios inmunológicos de PEPC en hoja de haba muestran tres proteínas inmunoreactivas en células de epidermis y células guarda con subunidades de masas moleculares de 107, 110 y 112 kDa. Sólo la proteína de 107 kD fue encontrada en extractos de células del mesófilo. Las tres isoenzimas presentaron diferente movilidad electroforética en una PAGE-nativa. Los autores asumen que las subunidades de 110 y 112 kD representan isoformas de PEPC que están involucradas en el movimiento de estomas (96). Por otra parte se ha reportado la existencia de tres isoformas de PEPC en hoja de frijol (92) y dos isoformas en raíz (91, 92) separadas por isoelectroenfoque. En el caso de las isoformas de hoja no se han realizado estudios de sus características cinéticas y de su respuesta frente a los efectores clásicos de PEPCs.

En alfalfa se han reportado la presencia de dos isoformas en raíz y una en nódulo (91), mientras que en nódulo de frijol se han logrado detectar hasta cinco isoformas de PEPC mediante PAGE-nativo en dos dimensiones (90), mientras que por isoelectroenfoque solo se detectaron tres isoformas de PEPC (91).

### 3. OBJETIVOS.

#### 3.1 *Objetivo general.*

Purificar y caracterizar a la fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

#### 3.2 *Objetivos particulares.*

- Investigar la composición isoenzimática de PEPC en hoja de frijol.
- Purificar una de las isoenzimas encontradas.
- Determinar el peso molecular de la forma nativa de esta isoenzima.
- Determinar los parámetros cinéticos de esta isoenzima.
- Estudiar el efecto de diferentes metalolitos sobre la actividad de la isoenzima.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1 EQUIPO.

Balanza analítica Ohaus, capacidad de 210 g X 0.1 mg.  
Potenciómetro  $\Phi$ 32 Beckman.  
Morteros de porcelana.  
Licuadora Osterizer pulse-matic.  
Ultracentrifuga modelo XL-90 Clase S Beckman.  
Microcentrifuga Sorvall MC 12V DUPONT.  
Centrifuga GS-6R Beckman.  
Celdas de espectrofotómetro de 1 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz.  
Espectrofotómetro DU-65 Beckman, con temperatura controlada y registrador integrado.  
Refrigerador Bendix Nofrost 19 a 4 °C y -20 °C.  
Ultracongelador Forma Scientific a -70 °C.  
Microjeringas marca Hamilton de 10, 25, 50 y 100  $\mu$ l.  
Pipetas automáticas Rainin de 100, 250, 1000 y 2500  $\mu$ l.  
Vortex-2 Genie Scientific Industries, INC.  
Platos de agitación magnéticos Thermolyne Nuova II.  
Columnas para cromatografía marca SIGMA de 10 y 50 ml.  
Colector de fracciones Pharmacia LKB-RediFrac.  
Equipo para electroforesis (mini geles) Hoefer Scientific Instruments. San Francisco.  
HPLC con controlador LKB Bromma-Sweedden 2152 y con registrador acoplado marca Pharmacia.

### 4.2 REACTIVOS.

Los reactivos que se emplearon en este trabajo todos fueron de grado analítico, obtenidos de las siguientes casas comerciales:

MERCK: EDTA, bicarbonato de sodio, persulfato de amonio, arena de mar,  $\beta$ -mercaptoetanol, etanol absoluto, metanol, Tris, ácido L-glutámico, L-cisteína, L-glutamina, L-arginina, ácido L-aspártico y dextrán líquido.

Sigma Chemical Co. : PEG, PVPP, NADH, benzamidina, violeta rápido B, PEP, quimostatina, ASB, L-(-)-ácido málico, D-glucosa-6-fosfato, marcadores de peso molecular para SDS-PAGE, betaina, fosfomicina, acrilamida, N,N'-metilen-bis-acrilamida, azul de Coomassie brillante R, glicina, L-fenilalanina, L-serina, L-asparagina, L-alanina, L-histidina, L-prolina y etilénglicol.

BAKER: Cloruro de potasio, cloruro de magnesio, glicerol, ácido fosfórico.

Mallinckrodt: Acido acético glacial, ácido clorhídrico, fosfato de potasio dibásico y fosfato

de potasio monobásico.

Aldrich Chemical, Co.: PMSF.

Pfaltz-&-Bauer: Trietanolamina.

Boehringer Mannheim Biochemica: Proteínas marcadoras de peso molecular para HPLC.

Pharmacia Biotech: Sephadex G-25 Medium.

Eastman: L-treonina.

Chemische Fabrik: L-valina.

### 4.3 SOLUCIONES AMORTIGUADORAS.

Las soluciones amortiguadoras usadas en este trabajo fueron las siguientes:

Amortiguador para extracción de PEPC: TEA-HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, PEG 3 %.(v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, PVPP 2 % (p/v), benzamidina 1 mM, PMSF 1 mM, quimostatina 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Amortiguadores utilizados en la purificación de PEPC:

Amortiguador A:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM, pH 7.3, glicerol 10% (v/v), etilenglicol 10% (v/v), EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM.

Amortiguador B: TEA-HCl 100 mM, pH 7.3, PEG 3% (p/v), EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM.

Amortiguador C: TEA-HCl 100 mM, pH 7.3, glicerol 10 % (v/v), etilenglicol 10 % (v/v), EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM.

Amortiguador D:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.3, glicerol 10% (v/v), etilenglicol 10% (v/v), EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM.

Amortiguador de carga para electroforesis: Tris - HCl 0.25 M, pH 6.8, glicerol 20 % (v/v), etilenglicol 10 % (v/v), azul de bromofenol 4 mg/ml.

Amortiguador de electrodos: Tris HCl 0.025 M, pH 8.3, glicina 0.192 M.

Amortiguador del gel apilador: Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8.

Amortiguador del gel separador: Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8.

Mezcla de reacción para el ensayo estándar de PEPC: TEA-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, NADH 0.2 mM, MDH 5 U/ml, PEP 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{NaHCO}_3$  10 mM.

### 4.4 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se usaron hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. var. Black Valentine) donadas por la Dra. M. Luisa Ortega del Colegio de Postgraduados de Montecillos, México, lugar donde las semillas de frijol se germinaron y crecieron en un

invernadero a temperatura de 28-30 °C, con fotoperiodo natural.

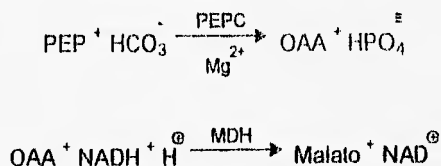
#### 4.5 EXTRACCIÓN DE LA ENZIMA PEPC.

Cuando se requería poca enzima, el tejido fue homogenizado en mortero a 4 °C con amortiguador de extracción en una proporción 1:1 (peso fresco/volumen de amortiguador) usando arena de mar para la molienda. El macerado se centrifugó en una microfuga a 8000xg por 5 minutos; el precipitado se desechó y el sobrenadante se centrifugó en una Centrifuga Beckman TL-100 a 27,178xg por 15 minutos. El sobrenadante de esta última centrifugación fue la fuente de enzima.

Para la purificación de la enzima se utilizaron 100 g de tejido en la extracción en una proporción 1:1 (peso fresco/volumen de amortiguador de extracción). El tejido se homogenizó en una licuadora previamente enfriada a 0 °C, posteriormente se filtró a través de 4 capas de gasa y el filtrado fue centrifugado a 160,000xg por 45 min. Se colectó el sobrenadante para iniciar la purificación. Todo el proceso fue realizado a temperatura de 4 °C.

#### 4.6 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE PEPC.

La actividad de la enzima se determinó empleando como reacción acoplada la catalizada por la enzima málico deshidrogenasa (MDH) (E.C.1.1.1.37) dependiente de NADH, según el método descrito por Uedan y Sugiyama (11). En este sistema el oxalacetato resultante de la carboxilación del fosfoenolpiruvato es reducido a malato por la actividad de la enzima málico deshidrogenasa que paralelamente oxida NADH a NAD<sup>+</sup> según el siguiente esquema de reacciones:



El oxaloacetato producido en la reacción de carboxilación puede medirse siguiendo el descenso de la densidad óptica a 340 nm debido a la conversión de NADH a NAD<sup>+</sup>. El cambio de la densidad óptica por minuto se midió durante los primeros 4 minutos de la reacción y se calculó la velocidad inicial. La reacción se realizó a 30 °C. Se inició la reacción con la adición de la enzima a un amortiguador a pH 8.0 (FEA-HCl 100 mM, EDTA 1.0 mM, NADH 0.2 mM, MDH 5.0 U/ml, PEP 5.0 mM, MgCl<sub>2</sub> 10.0 mM, NaHCO<sub>3</sub> 10.0 mM) y en

un volumen final de 1 ml.

#### CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA:

La actividad enzimática, medida como actividad específica se calculó con la siguiente fórmula:

$$A = \frac{\text{incremento DO}}{t(\text{min})} \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{1}{V(\text{ml})} = (\text{U/ml})$$

donde:

A = actividad de la enzima.

incremento DO = cambio de densidad óptica.

t = tiempo.

V = volumen de la preparación enzimática usada.

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar de NADH a 340 nm  
( $6.22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ).

Se definió una unidad de actividad como la cantidad de enzima capaz de transformar 1  $\mu\text{mol}$  de fosfoenolpiruvato por minuto, bajo nuestras condiciones de ensayo. La actividad específica (unidades  $\text{mg}^{-1}$  proteína) se obtuvo dividiendo el valor de  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$  por los  $\text{mg}$  de proteína contenidos en 1 ml de la preparación enzimática utilizada.

#### 4.7 ESTUDIOS CINÉTICOS.

Los estudios cinéticos de PEPC se hicieron en condiciones subsaturantes a 30 °C en la siguiente mezcla de reacción: TEA-HCl 100 mM, pH 7.3, EDTA 1.0 mM, NADH 0.2 mM, MDH 5.0 U/ml, PEP de 0.02-4.0 mM,  $\text{MgCl}_2$  1.0 mM,  $\text{NaHCO}_3$  10.0 mM. Para los estudios cinéticos de efectores de PEPC se usaron Gluc-6-P 10 mM, malato 10 mM y glicerol 20% (v/v) en la misma mezcla de reacción.

#### 4.8 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.

La cantidad de proteína fue determinada por el método propuesto por Bradford (97), que está basado en la formación de un complejo azul entre el reactivo azul de coomassie (azul brillante G) y los residuos de arginina de las proteínas.

El reactivo de Bradford se preparó de la siguiente forma: azul de coomassie al 0.05

% (p/v) en una solución de etanol-HClO<sub>4</sub> 0.6 % (p/v). Se agitó toda una noche a temperatura ambiente, posteriormente se filtró a través de papel Whatman (0.45 µm) y luego en papel Millipore (0.22 µm) para eliminar residuos no disueltos.

Se hizo una curva patrón o estándar empleando ASB disuelta en agua a una concentración de 1.0 mg/ml. De esta solución se tomaron volúmenes equivalentes a 2, 4, 6, 8 y 10 µg de proteína que se llevaron a tubos de ensayo completando a 800 µl con agua destilada.

Para las muestras problema el volumen de muestra usado fue de 2 a 4 µl (en algunos casos previa dilución 1:5) y se completó a 800 µl con agua destilada.

Tanto a los tubos de la curva patrón como a los de las muestras problema se les adicionó 200 µl del reactivo de Bradford, alcanzándose así un volumen final de 1 ml. Se midió absorbancia a 595 nm, calibrando el espectrofotómetro con un blanco que contenía 800 µl de agua destilada y 200 µl del reactivo de Bradford.

Para la determinación de la concentración de proteína se interpolaron las lectoras de absorbancia de las muestras problema en la curva patrón de ASB.

#### **4.9 PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO.**

Los extractos crudos obtenidos después de la centrifugación se precipitaron con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lentamente con agitación continua hasta alcanzar 30% de saturación. El pH se controló con trietanolamina cuando fue necesario. Después de agregar toda la sal se mantuvo en agitación lenta por 10 min, posteriormente se centrifugó a 33,000xg por 15 min. El precipitado se desechó y el sobrenadante se llevó a un 60% de saturación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en las condiciones antes mencionadas. Después de la segunda centrifugación el precipitado obtenido (30% - 60%) contiene la actividad de PEPC.

#### **4.10 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE).**

##### **4.10.1 Bajo condiciones no desnaturalizantes (PAGE-nativa)**

La electroforesis se realizó bajo condiciones no desnaturalizantes (nativas), usando un sistema discontinuo (dos geles de poliacrilamida, con el tamaño de poro diferente) de acuerdo con la modificación al método de Laemmli (98) como se describe a continuación:

Se emplearon un gel separador (parte inferior) de 5 cm de longitud y de 7.5% T (porcentaje total de monómeros de acrilamida + bisacrilamida) y un gel apilador (parte superior) de 2 cm de longitud y de 4% T. Los dos geles se prepararon mezclando las siguientes soluciones:

	Gel separador 7%T 2.7%C (ml)	Gel apilador 4%T 2.7%C (ml)
Solución de Acrilamida-bisacrilamida (30%T, 2.7%C)	2.31	0.67
Amortiguador del gel separador	2.50	-
Amortiguador del gel apilador	-	1.25
Glicerol	2.0	1.0
Etilénglicol	1.0	0.5
Persulfato de amonio (10% p/v)	0.07	0.07
TEMED	0.015	0.015
H <sub>2</sub> O	2.0	1.58
Volumen final	10.0	5.0

El persulfato de amonio y el TEMED se adicionan después de desgasificar la mezcla por 15 min. mediante el uso de vacío. Las muestras que se iban a someter a electroforesis fueron mezcladas en proporción 1:4 con el amortiguador de carga (ver concentraciones en 4.3).

Se aplicaron a cada carril 50 µl de muestra. La duración de la corrida fue aproximadamente de 6 hrs a 20 mA a temperatura ambiente y con un sistema de enfriamiento por flujo de agua continuo. Se da por terminada la electroforesis cuando el indicador del frente (azul de bromofenol) llega a 0.5 cm del final del gel.

Las bandas con actividad de PEPC se revelaron usando el siguiente medio de reacción: TEA - HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, PEP 10 mM, Fast violet B 0.003 g/ml en un volumen final de 10 ml). Después de unos minutos aparecen bandas visibles que se fijan con una solución de ácido acético 5 % (v/v) por 2 hrs a temperatura ambiente.

#### 4.10.2 Bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

El método es muy parecido al mencionado anteriormente, la diferencia es la adición de SDS 10 % (p/v) a la mezcla de los geles separador y apilador; además el amortiguador de carga lleva 4 % (p/v) de SDS y 0.1 % (p/v) de SDS el amortiguador de electrodos.

Los marcadores usados para determinar las masas moleculares de las bandas de polipéptidos se prepararon igual que la muestra problema. Los marcadores fueron:



PROTEÍNAS	MASA MOLECULAR (kDa)
$\alpha_2$ -Macroglobulina	198
$\beta$ -Galactosidasa	120
Fructosa-6-Fosfato cinasa	88
Piruvato cinasa	70
Fumarasa	56
Láctico deshidrogenasa	38
Triosafofato isomerasa	32

Las bandas de proteína del gel se revelaron mediante tinción con una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.125 % (p/v), metanol 50 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v). Acto seguido es necesario desteñir el gel con una solución de metanol 50 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v), lavando finalmente con varios cambios de una solución de metanol 5 % (v/v), ácido acético 7 % (v/v).

#### 4.10.3 Determinación del pl.

La electroforesis se realizó bajo condiciones no desnaturalizantes, usando un sistema continuo.

Se empleó un solo gel de 9.7 % acrilamida - 0.3 % bisacrilamida de 14 X 16 cm de longitud. La mezcla de la solución se preparó de la siguiente manera:

	VOLUMEN (ml)	CONCENTRACIÓN FINAL (%)
Solución de Acrilamida-bisacrilamida (9.7 % - 0.3 %)	12.88	5
Glicerol % (v/v)	5.00	20
Etilénglicol % (v/v)	2.50	10
Anfolinas (5 a 7)	1.37	7
Persulfato de amonio *	0.25	3
TEMED	0.022	
H <sub>2</sub> O	2.64	
VOLUMEN FINAL	25.0	

\*El persulfato de amonio y TEMED se adicionan después de desgasificar la mezcla por 15-20 min.

Una vez gelificada la mezcla se lavan los carriles con agua destilada y se llenan con solución de sobremuestra (glicerol 5 % (v/v)). La parte inferior del equipo lleva la solución anódica (ácido fosfórico 0.5 M desgasificado 30 min.) y la parte

superior lleva la solución catódica (trietanolamina 0.01 M, desgasificada 30 min). Se precorre el gel a 5 watts por 45 min, con un sistema de enfriamiento por flujo de agua continuo.

Se desecha la solución catódica, se lavan una vez más los carriles con agua destilada, se aplica la muestra disuelta en solución de muestra en una proporción 1:1 (la solución de muestra:glicerol 10 % (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 2 % (v/v)) y después la solución de sobrecarga. Se usa una nueva solución del cátodo y se corre el gel a 2.5 watts por 16 horas, también con un sistema de enfriamiento.

Una vez finalizada la corrida se mide el gradiente de pH formado en el gel con un electrodo de superficie, o usando marcadores de pH.

Las bandas de proteína con actividad de PEPC se revelaron con el siguiente medio de reacción; TEA - HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, PEP 10 mM,  $MgCl_2$  20 mM,  $NaHCO_3$  10 mM y violeta rápido B 3 mg/ml en un volumen final de 20 ml.

#### **4.11 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS:**

##### **4.11.1 Cromatografías de intercambio iónico.**

###### **- DEAE-Sephacel:**

La preparación enzimática obtenida después de resuspender el precipitado 30-60% de  $(NH_4)_2SO_4$  en el amortiguador A de purificación ( $K_2HPO_4$  -  $KH_2PO_4$  20 mM pH 7.3, glicerol 10% (v/v), etilenglicol 10% (v/v), EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM) se desaló en una columna G-25 en el mismo amortiguador y se aplicó a una columna de DEAE-Sephacel (Pharmacia) de 2.6 x 11 cm previamente equilibrada con el amortiguador para purificación. Se lavó la columna con el mismo amortiguador y posteriormente se eluyó con un gradiente de 20 a 400 mM de  $K_2HPO_4$  -  $KH_2PO_4$  preparado en el mismo amortiguador. Se colectaron fracciones de 0.5 ml a las que se midió actividad de PEPC y cantidad de proteína. Las fracciones con actividad de PEPC se reunieron y desalaron en el amortiguador de purificación para aplicar a la siguiente columna.

###### **- Hidroxiapatita:**

El pico de actividad obtenido en DEAE-Sephacel se aplicó a una columna de Hidroxiapatita Ultrogel Bio Rad (HA) de 2 x 6.5 cm equilibrada con el amortiguador A y eluida con un gradiente de  $K_2HPO_4$  -  $KH_2PO_4$  de 20 a 500 mM también en el mismo amortiguador. Se colectaron fracciones de 0.5 ml a las que se les midió actividad y contenido en proteína. Se reunieron las fracciones con actividad de PEPC y se desalaron en el mismo amortiguador para seguir con la

purificación.

Mono-Q:

El pico de actividad de PEPC de hoja de frijol obtenido de una cromatografía de exclusión molecular (TSK G4000SW) se aplicó a una columna de Mono-Q conectada a un sistema HPLC y equilibrada con el amortiguador A. Se usó un registrador montado a un sistema de HPLC para obtener el perfil de proteínas por absorbancia a 280 nm. A las fracciones obtenidas se les midió actividad de PEPC.

#### 4.11.2 Cromatografía de exclusión molecular:

- TSK acoplado a un sistema de HPLC.

El pico de actividad obtenido anteriormente se aplicó a una columna de TSK G4000SW de 1 x 9 cm montada en un sistema de HPLC y equilibrada con el amortiguador C de purificación. Se usó un registrador integrado al equipo para obtener el perfil de proteínas por absorbancia a 280 nm. A las fracciones obtenidas se les midió actividad de PEPC. La columna se calibró previamente con los siguientes marcadores de peso molecular (Boehringer Mannheim):

PROTEÍNAS	PESO MOLECULAR (kDa)
$\beta$ -galactosidasa ( <i>E. coli</i> )	465
IgG (oveja)	150
Fragmento Fab de IgG (oveja)	50
Mioglobina de músculo esquelético (caballo)	17

La cantidad de muestra aplicada fue de 200  $\mu$ l y se requirieron varias inyecciones para purificar toda la enzima recuperada en el paso anterior.

- Sephadex G-25 (método de Penefsky).

Una columna de Sephadex G-25 de 0.5 x 5.8 cm fue equilibrada con el amortiguador D para purificación (fosfatos 50 mM, pH 7.3, glicerol 10 % (v/v), etilenglicol 10 % (v/v), EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM) de acuerdo al método de Penefsky (99). Se hicieron dos pasos de centrifugación en una centrifuga Beckman GS-6R, antes y después de adicionar la muestra. Las centrifugaciones fueron a 400xg por 2 min para eliminar el amortiguador de equilibrado y 2000xg por 3 min para obtener la muestra. La muestra aplicada a la columna fue de 200  $\mu$ l.

## 5. RESULTADOS.

### 5.1 PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA PEPC DE HOJA DE

#### FRIJOL.

La purificación de la enzima se llevó a cabo usando cromatografías de intercambio iónico (DEAE-Sephacel, Ultrogel HA y Mono-Q) y cromatografía de exclusión molecular (TSK G4000SW), como se describe detalladamente a continuación.

#### 5.1.1 Optimización del método de extracción y estudios de estabilidad.

Con el fin de obtener la máxima actividad de PEPC en la extracción y de estabilizar la enzima investigamos el efecto de compuestos orgánicos como el polietilenglicol, etilenglicol y glicerol en el amortiguador TEA-HCl que se emplea rutinariamente en nuestro laboratorio. La extracción de la enzima se realizó bajo las condiciones descritas en Métodos para todos los compuestos orgánicos probados: glicerol 10% y 20% (v/v), etilenglicol 10% (v/v) - glicerol 10% (v/v) y PEG 3% (p/v). Encontramos una mayor actividad específica de PEPC cuando el amortiguador de extracción contenía glicerol 10% (v/v) y etilenglicol 10% (v/v). Los extractos con los diferentes compuestos orgánicos se aplicaron a una electroforesis nativa, en la que se observaron dos bandas de actividad muy similares en todos los casos (Figura 1, pág. 28). En la muestra de PEPC purificada de hoja de maíz, que se corrió como control, se observó por el contrario una sola banda de actividad.

También se investigó el efecto de diferentes concentraciones del amortiguador. Cuando se usó como amortiguador TEA-HCl 50 mM y pH 7.3, el pH final después de la extracción bajó considerablemente, por lo que tuvimos que probar diferentes concentraciones y valores de pH del amortiguador. Encontramos que el amortiguador que nos permitía obtener un pH final de 7.0 a 7.3, en el que la enzima es estable, era TEA-HCl 100 mM, pH 8.0.

Por otro lado, con el fin de conocer si durante el proceso de purificación se podrían congelar las muestras sin desalar previamente. Se estudió la estabilidad. Los resultados obtenidos indican que en presencia de KCl o  $K_2HPO_4 - KH_2PO_4$  400 mM y PEG 3% (p/v) la enzima no es estable a  $-70^\circ C$ . Pero en presencia de KCl o fosfatos 400 mM y PEG 8% (p/v) ó glicerol 25% (v/v) la enzima es estable a esta temperatura.

### 5.1.2 *Cromatografía de intercambio iónico.*

La purificación de PEPC se inició con 100 g de hoja como se describe en Métodos. El primer paso consistió en aplicar el extracto crudo obtenido a una columna de intercambio iónico DEAE-Sephacel de 2.6 x 11 cm, equilibrada y lavada con el amortiguador B para purificación (ver 4.3) y eluida con un gradiente de 0-400 mM de KCl en el mismo amortiguador a un flujo 500 µl/min. Encontramos dos picos de actividad no muy bien separados (Figura 2, pág. 29). Estos resultados mostraban que en hoja de frijol podrían existir al menos dos isoformas de PEPC, como se había reportado (92), y eran totalmente consistentes con los obtenidos en la electroforesis nativa de extracto crudo.

Debido a la pobre separación de los dos picos de actividad PEPC decidimos eluir a la enzima por pasos con KCl, pudiéndose así separar claramente los dos picos de actividad. El pico I eluyó a 250 mM de KCl y el pico II a 350 mM de KCl (Figura 3, pág. 30). Se reunieron las fracciones de cada pico y se determinó la cantidad de proteína presentando el pico II una mayor actividad específica.

Se decidió seguir la purificación de la PEPC contenida en el pico II tomando en cuenta la mayor actividad específica de la enzima en este pico. Para ello, se desalaron las fracciones de este pico y se recromatografiaron en una columna de intercambio iónico DEAE-Sephacel de menor volumen (1.6 x 10 cm) equilibrada como en el paso anterior y eluida de nuevo con KCl por pasos. De nuevo se obtuvieron dos picos de actividad: el pico I a 250 mM de KCl y el pico II a 350 mM (Figura 4, pág. 31). Se repitió de nuevo esta cromatografía usando una columna de 1.6 x 5 cm y aplicando, como en el paso anterior, sólo las fracciones del pico II obtenidas anteriormente. El resultado fue nuevamente la separación clara de dos picos de actividad que eluyeron a 250 y 350 mM de KCl. Si bien ahora la actividad específica de la enzima fue mayor en el pico I que en el pico II (Figura 5, pág. 32).

Las recromatografías indicaban que había una interconversión de las dos isoformas, pues aunque aislábamos el pico II al someterlo a las mismas condiciones cromatográficas volvía a aparecer el pico I, en proporción relativa creciente. Por ello decidimos buscar condiciones en las que sólo tuviésemos una de estas isoformas, lo que se consiguió haciendo la cromatografía en presencia de glicerol 10% (v/v) y etilglicol 10% (v/v) en lugar de PEG usado en los experimentos anteriores, como se describe a continuación:

Se repitió la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel a 4 °C y en presencia de glicerol 10% (v/v) - etilenglicol 10% (v/v) y se eluyó por pasos con KCl, encontrándose un solo pico de actividad de PEPC que eluye a 250 mM de KCl (Figura 6, pág. 33).

Se rechromatografiaron las fracciones del pico de actividad en una columna de DEAE-Sephacel, equilibrada con el amortiguador C de purificación que contenía glicerol 10% (v/v) - y etilenglicol 10% (v/v) como en el paso anterior. Se eluyó por pasos con KCl en el mismo amortiguador, obteniéndose otra vez un solo pico de actividad que eluye igualmente a 250 mM de KCl (Figura 7, pág. 34). Estos resultados mostraban que en presencia de glicerol y etilenglicol solo existía una forma de la enzima

En base a estos resultados, decidimos llevar a cabo el paso de cromatografía de intercambio iónico usando el amortiguador C (TEA-HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v) - etilenglicol 10% (v/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM) y eluyendo con un gradiente de KCl, ya que la elución por gradiente generalmente permite una mejor separación de la proteína de interés del resto de las proteínas que la elución por pasos.

De esta forma, el extracto crudo, obtenido a partir de 100 g de hojas en presencia de TEA-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v), etilenglicol 10% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, PVPP 2% (p/v), quimostatina 5  $\mu$ g/ml, benzamidina 1 mM y PMSF 1 mM, se aplicó a una columna de intercambio iónico DEAE-Sephacel de 8.5 x 2.7 cm, equilibrada con el amortiguador C que incluye glicerol 10% (v/v), etilenglicol 10% (v/v) y eluida con un gradiente de 0 a 400 mM de fosfatos en el mismo amortiguador. Nuestros resultados fueron los esperados, obteniéndose un solo pico de actividad de la enzima a una concentración de 250 mM de fosfatos (Figura 8, pág. 35).

Se reunieron las fracciones del pico de actividad separando las fracciones que tienen una baja actividad y antes de aplicarlas a la siguiente columna se disminuyó su concentración de sales diluyéndolas hasta tener una concentración final de 20 mM de fosfatos. Posteriormente se aplicaron a una columna de hidroxiapatita (Ultrogel-HA) de 5 x 2.7 cm, equilibrada y eluida con el mismo amortiguador que el usado en la cromatografía anterior. El pico de actividad de PEPC eluyó a una concentración de 150 mM de fosfatos (Figura 9, pág. 36).

### *5.1.3 Cromatografía de exclusión molecular.*

Las fracciones con actividad PEPC colectadas de la columna anterior se reunieron y se aplicaron a una columna de exclusión molecular TSK G4000SW de 7.5 x 600 mm montada en un sistema de HPLC (se aplicaron varias veces volúmenes de 200 µl de muestra ). La columna se equilibró y eluyó con el amortiguador de purificación C (en presencia de glicerol 10% (v/v) - etilenglicol 10% (v/v)). PEPC eluye como un único pico de actividad (Figura 10, pág. 37). Este paso cromatográfico permitió además obtener el peso molecular de la enzima nativa, para lo cual se calibró la columna con los marcadores de peso molecular indicados en el pie de la Figura 11 (pág. 38) donde se muestra el resultado de esta determinación.

### *5.1.4 Segunda cromatografía de intercambio iónico.*

Las fracciones obtenidas de la columna de exclusión molecular con actividad de PEPC se aplicaron a una columna de intercambio iónico Mono-Q, montada también en un sistema de HPLC, equilibrada y eluida con el amortiguador C. De manera similar a las anteriores columnas se obtuvo un solo pico de actividad de la enzima, el cual eluyó alrededor de 275 mM de fosfitos (Figura 12, pág. 39).

Los resultados obtenidos en los pasos de purificación descritos se resumen en la Tabla I (pág. 50). Se logró purificar la enzima aproximadamente unas 100 veces con un rendimiento final del 5%. La actividad específica de la preparación final fue de 17.25 u/mg proteína.

### *5.1.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida.*

En ciertos pasos de purificación se hizo una PAGE-nativa (Figura 13, pág. 40), observándose una sola banda de actividad de PEPC en todos los casos, banda que migra más lentamente que la de PEPC purificada de hoja de maíz.

Por otra parte, las fracciones con actividad de PEPC obtenidas del último paso de purificación se sometieron a SDS-PAGE con el fin de evaluar su grado de pureza. Como se puede observar en la Figura 14 (pág. 41), la banda de PEPC es la mayoritaria, observándose solamente otra banda de proteína, muy débil.

En SDS-PAGE se encontró que la subunidad de PEPC tiene un peso molecular de 100 kDa, lo cual indica que la enzima nativa es un homotetrámero.

La enzima pura se sometió también a electroenfoque analítico no desnaturalizante en geles de poliacrilamida, encontrándose una sola banda de actividad con un  $pI$  aproximado de 5.3 (Figura 15, pág. 41). Este valor de  $pI$  coincide con el determinado para la enzima purificada de hoja de maíz, que se usó como control en este experimento.

## 5.2 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA ENZIMA PEPC DE HOJA DE FRIJOL.

### 5.2.1 *Determinación de constantes cinéticas.*

La curva de saturación para el sustrato PEP-Mg se determinó a pH 7.3 y 30 °C usando una concentración fija de  $Mg^{2+}$  libre de 1 mM. Se hicieron determinaciones con los extractos crudos, con los dos picos de actividad que se obtuvieron después de la cromatografía de intercambio iónico en presencia de PEG 3% (p/v) y con la enzima pura. Los resultados se muestran en las Figuras 16-19 (págs. 42-45) y los valores de  $K_m$  aparentes estimados en cada caso se resumen en la Tabla II (pág. 50).

### 5.2.2 *Efecto de metabolitos y de casolutos sobre la actividad.*

Las velocidades iniciales se midieron a pH 7.3 y 30 °C usando 1 mM  $Mg^{2+}$  total y 1 mM PEP total y los compuestos indicados a una concentración de 10 mM.

En primer lugar se usaron extractos crudos como fuente de la enzima PEPC para explorar el efecto que sobre su actividad tenían los siguientes cuatro tipos de compuestos:

- a) Ácidos dicarboxílicos análogos de malato, que pueden unirse al mismo sitio alostérico que este inhibidor (79, 85).
- b) Compuestos fosforilados que pudiesen ser análogos de Gluc-6-P y como tal unirse al sitio alostérico para este conocido activador de PEPC (11, 76, 84).
- c) Aminoácidos neutros o básicos que podrían actuar como activadores, tal como se ha descrito se comporta glicina en el caso de PEPC de hojas de plantas C4 monocotiledóneas (11, 76, 84).
- d) Compuestos orgánicos que pueden alterar el estado de agregación de la enzima (20).



La enzima de hoja de frijol podría poseer cooperatividad negativa, si bien el ajuste a la ecuación de Hill no es mejor que el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten, por lo que preferimos mostrar el del modelo más sencillo.

En la Figura 20 (pág. 46) se muestran los resultados obtenidos. Como puede observarse, con respecto al primer grupo, malato inhibió mientras que aspartato no tuvo ningún efecto sobre la actividad y glutámico produjo un ligero incremento. De los compuestos fosforilados probados sólo fosfomicina y Gluc-6-P tuvieron un claro efecto activador, mientras que dihidroxiacetona-P inhibió a la concentración usada. Los aminoácidos neutros o básicos resultaron todos activadores muy pobres. Finalmente todos los cosolutos probados activaron a la enzima, siendo muy notable la activación por dioxano.

En base a los resultados anteriores, investigamos detalladamente el efecto tanto de malato como de Gluc-6-P sobre la cinética de saturación por sustrato de la enzima de extractos crudos como sobre la cinética de la enzima pura. Para ello, determinamos la cinética de saturación por PEP-Mg en presencia de estos efectores. Las Figuras 21 y 22 (págs. 47-48) muestran los resultados obtenidos con extractos crudos y con la enzima pura, respectivamente, y los parámetros cinéticos obtenidos tras ajustar los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten se incluyen en la Tabla III (pág. 51). Como puede observarse malato se comportó como un inhibidor competitivo en los dos casos, no afectando  $V_{max}$  y aumentando notablemente la  $Km_{ap}$  (PEP-Mg). Por el contrario el efecto de Gluc-6-P fue diferente sobre la enzima de extractos crudos, donde disminuyó ligeramente la  $V_{max}$  y apreciablemente la  $Km_{ap}$  (PEP-Mg) y la enzima pura, sobre la que Gluc-6-P no tuvo un efecto aparente.

## **6. FIGURAS.**

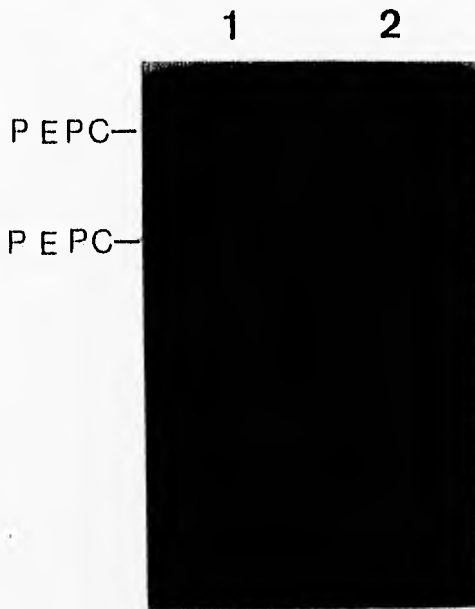


Figura 1. PAGE-nativa del extracto crudo de hoja de frijol. Se aplicaron 17 mU al carril 1 (extracto crudo de hoja de frijol) y 20 mU de PEPC pura de hoja de maíz al carril 2. El gel se reveló con el siguiente medio de: TEA-HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM y PEP 10 mM.

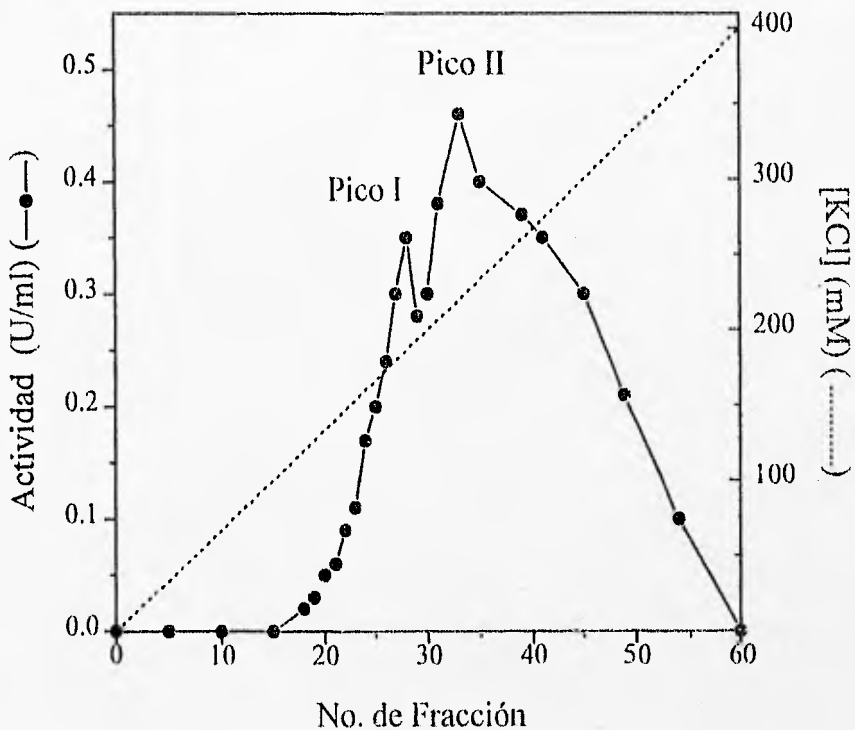


Figura 2. Perfil de elución de la actividad de PEPC de hoja de frijol de una columna de DEAE-Sephacel. El amortiguador de equilibrado y elución a pH 7.3 contenía 3% (p/v) de PEG. La elución se hizo con un gradiente de 0-400 mM de KCl.

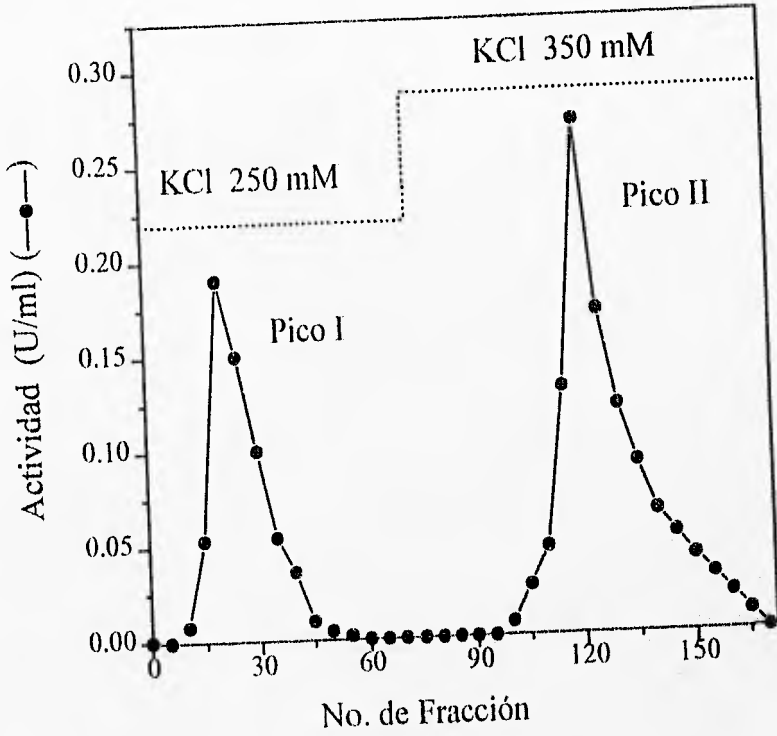


Figura 3. Perfil de elución de la actividad de PEPC de hoja de frijol de una columna de DEAE-Sepharcel. El amortiguador de elución y de equilibrado incluye PEG 3% (p/v) a un pH de 7.3. Elución con KCl, a las concentraciones indicadas, en dos pasos.

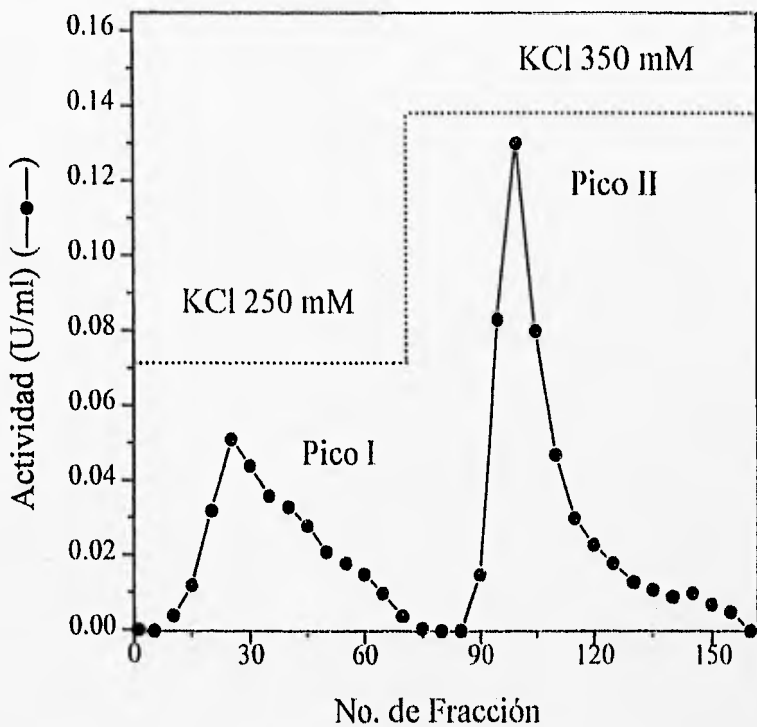


Figura 4. Primera recromatografía del pico II de la cromatografía anterior (Figura 3) en columna de DEAE-Sephacel. Elución por pasos como en Figura 3.

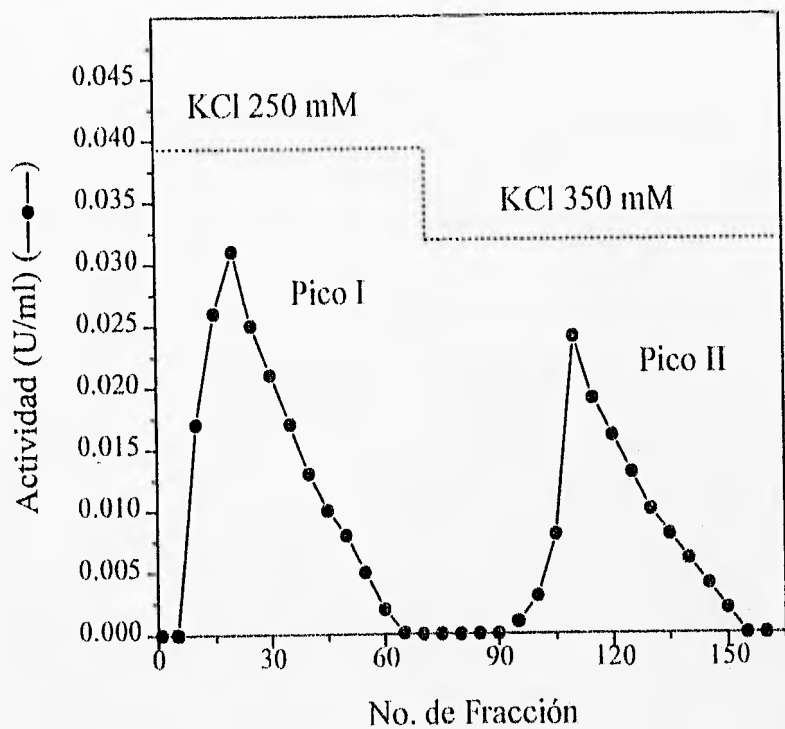


Figura 5. 2da. recromatografía en columna de DEAE-Sephacel del pico II obtenido en la cromatografía mostrada en la Figura 4. Elución por pasos como en Figura 3.

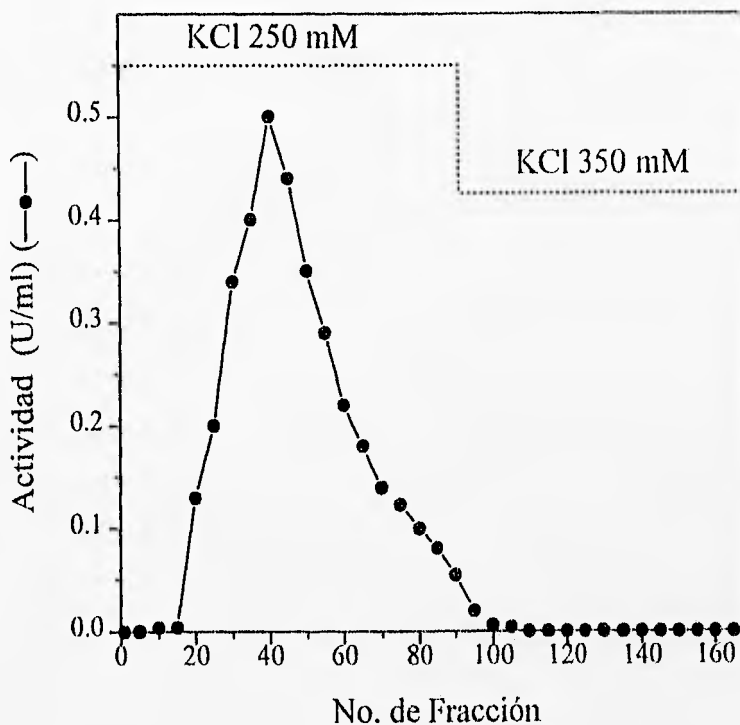


Figura 6. Perfil de elución de la actividad de PEPC de hoja de frijol en una columna de DEAE-Sephacel. Amortiguador de equilibrado y elución a pH 7.3 conteniendo glicerol 10% (v/v) y etilenglicol 10% (v/v).



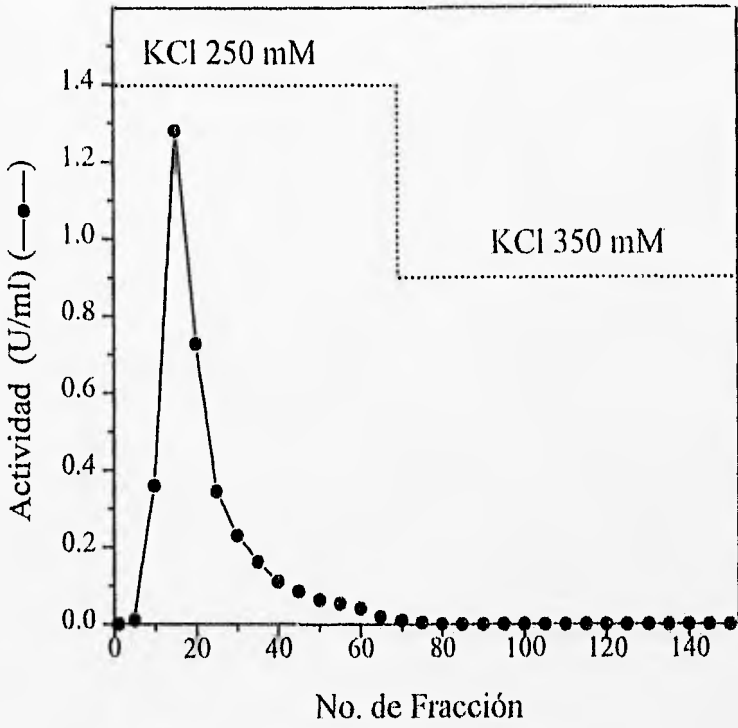


Figura 7. Recromatografía del pico de actividad de PEPC la cromatografía de anterior (Figura 6) en una columna de DEAE-Sephacel. Elución de la actividad por pasos con KCl.

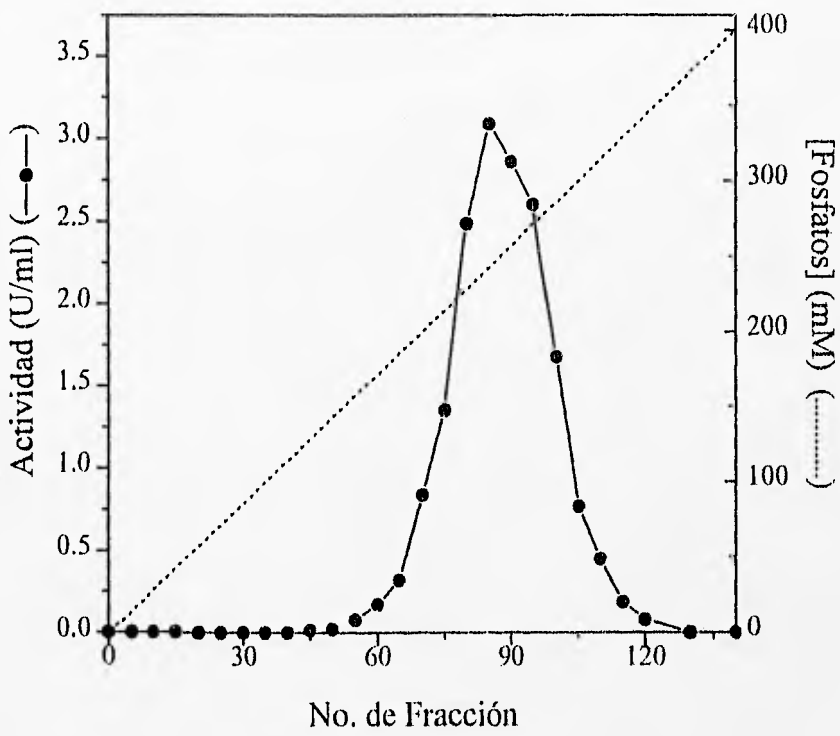


Figura 8. Perfil de elución de la actividad de PEPC de hoja de frijol en una columna de DEAE-Sephacel. Elución con un gradiente de fosfatos de 0-400 mM. Amortiguador de equilibrado y elución a pH 7.3 conteniendo glicerol 10% (v/v) y etilenglicol 10% (v/v).

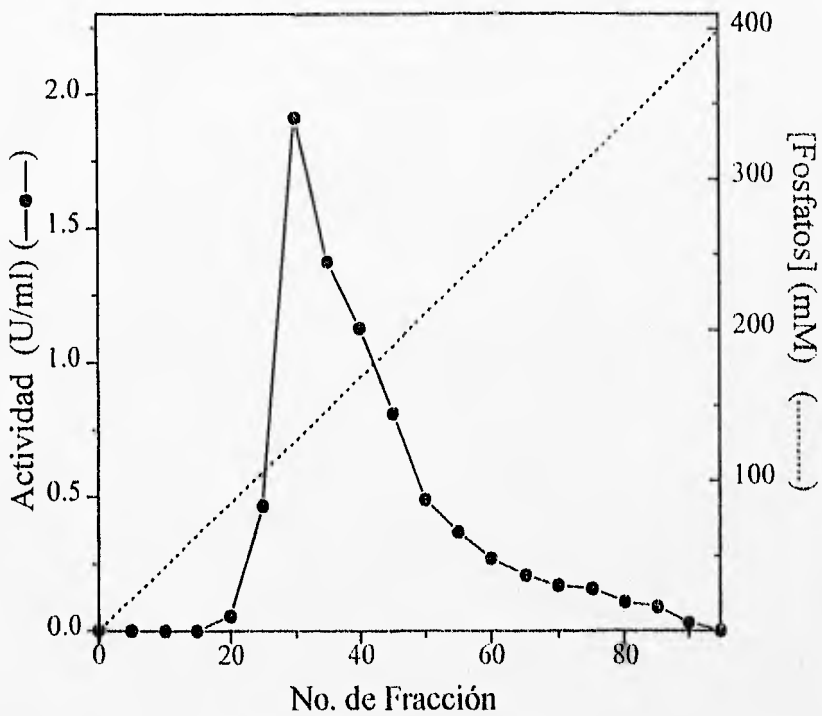


Figura 9. Perfil de elución de la actividad PEPC en una columna de Ultrogel HA. Elución con un gradiente de fosfatos.

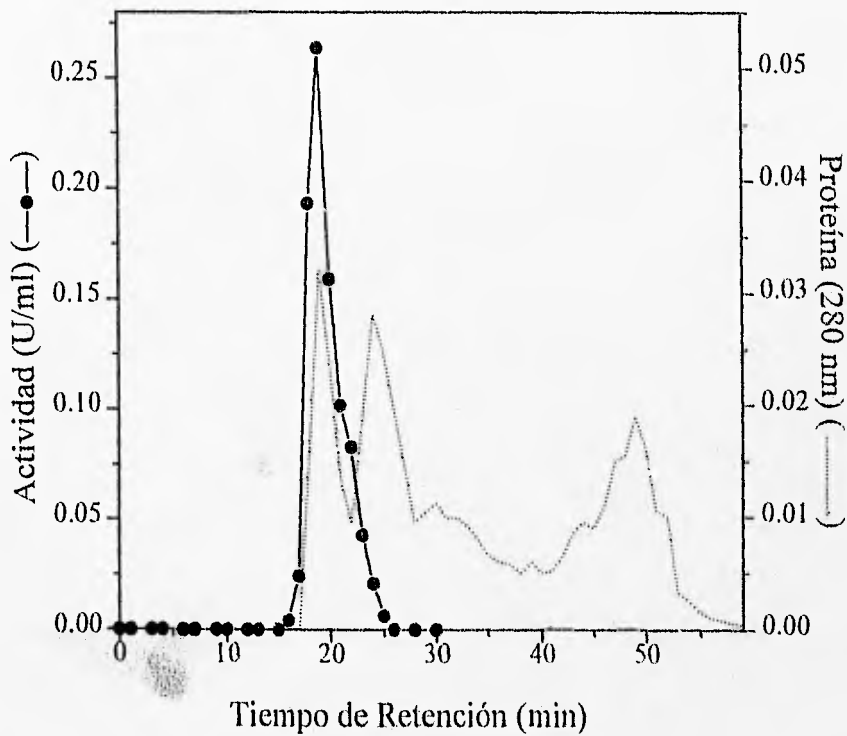


Figura 10. Perfil de elución de la actividad de PEPC de hoja de frijol en una columna de filtración molecular (TSK G4000SW montada en un sistema HPLC).

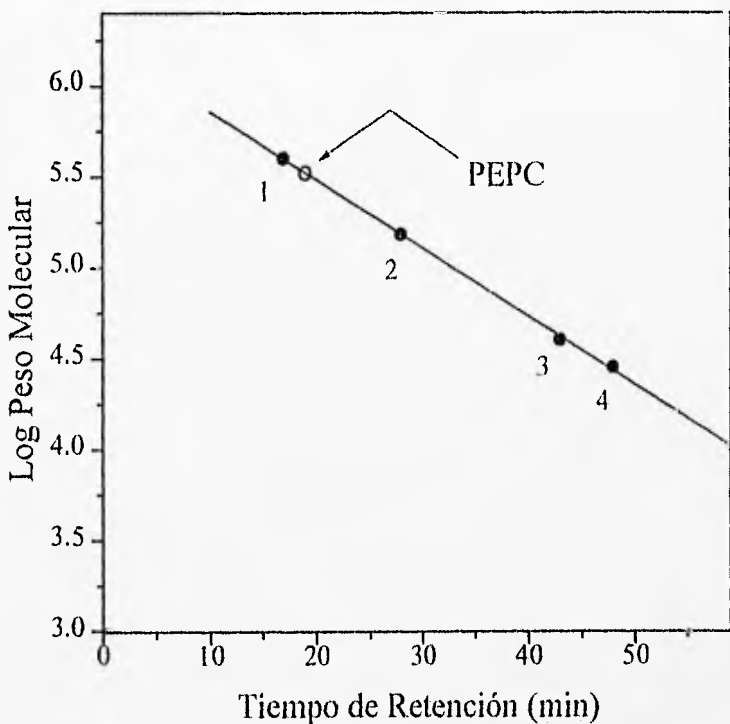


Figura 11. Determinación del peso molecular de PEPC de hoja de frijol en una columna de exclusión molecular TSK G40000SW. Se usaron los siguientes marcadores de peso molecular para equilibrar la columna:

- |                           |              |
|---------------------------|--------------|
| 1) $\beta$ -Galactosidasa | (Mr 465,000) |
| 2) IgG                    | (Mr 150,000) |
| 3) Fragmento Fab          | (Mr 50,000)  |
| 4) Mioglobina             | (Mr 17,000)  |
| ° PEPC (hoja de frijol)   | (Mr 400,000) |

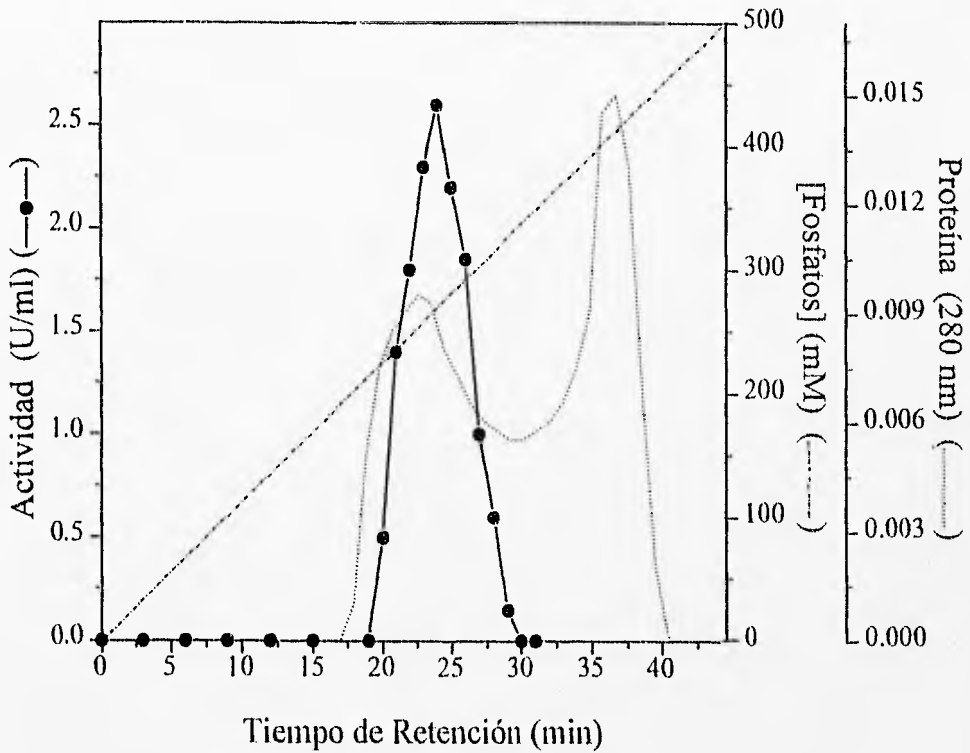


Figura. 12 Perfil de elución en una columna de Mono-Q montada en un sistema HPLC. Elución con un gradiente de fosfatos.

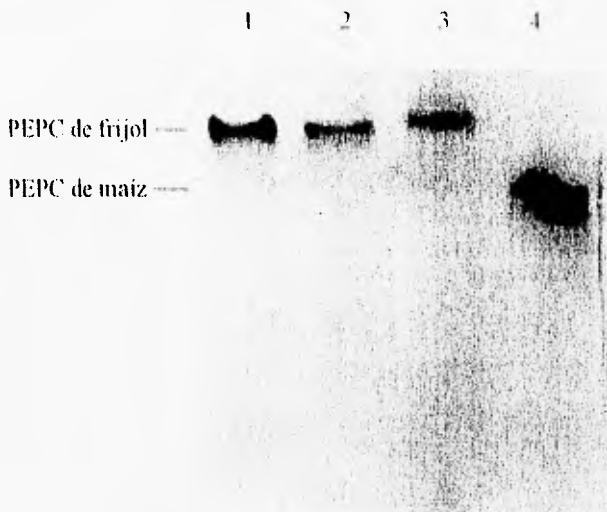


Figura 13. PAGE-nativa de las preparaciones de PEPC de hoja de obtenidas durante el proceso de purificación. Se aplicaron 0.1 U al carril 1 (PEPC pura de hoja de maíz), 0.005 U al carril 2 (PEPC de hoja de frijol en extracto crudo), 0.01 U al carril 3 (Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel) y 0.05 U al carril 4 (Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel). El gel se reveló en las mismas condiciones que las de la Figura 1.

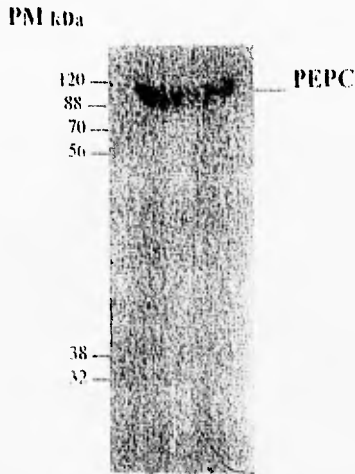


Figura 14. SDS-PAGE del último paso de purificación de PEPC de hoja de frijol. Se aplicaron 110 µg de proteína al carril



Figura 15. Electroenfoque en PAGE de PEPC purificada de hoja de frijol. Se aplicaron 0.06 U al carril 1 (enzima purificada de hoja de frijol) y 0.32 U al carril 2 (enzima purificada de hoja de maíz). Las bandas de actividad se revelaron con TEA-HCl 100 mM a pH 8.0, NaHCO<sub>3</sub> 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, PEP 10 mM y violeta rápido B 3 mg/ml.



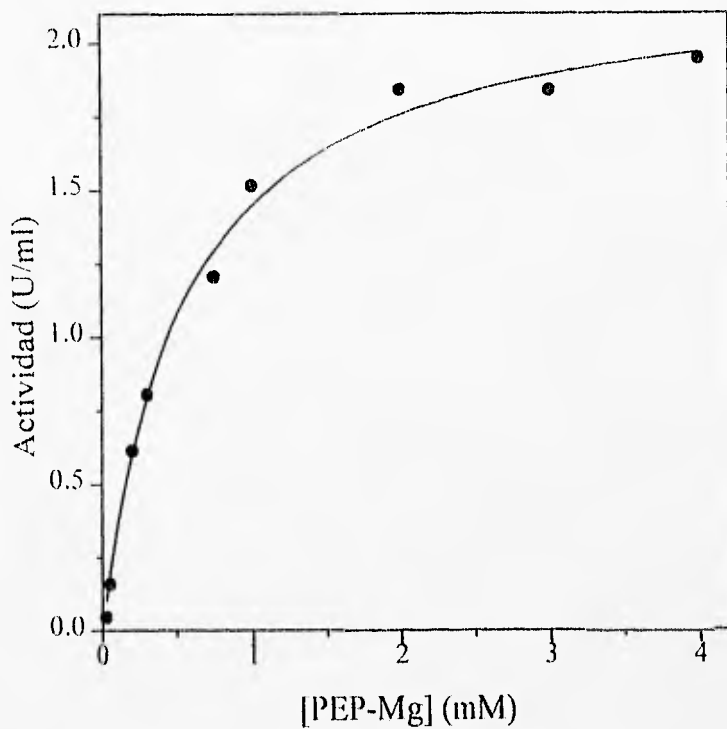


Figura 16. Cinética de saturación para PEP-Mg de la actividad de PEPC de extracto crudo. Medio de ensayo a pH 7.3,  $Mg^{2+}$  1 mM libre.

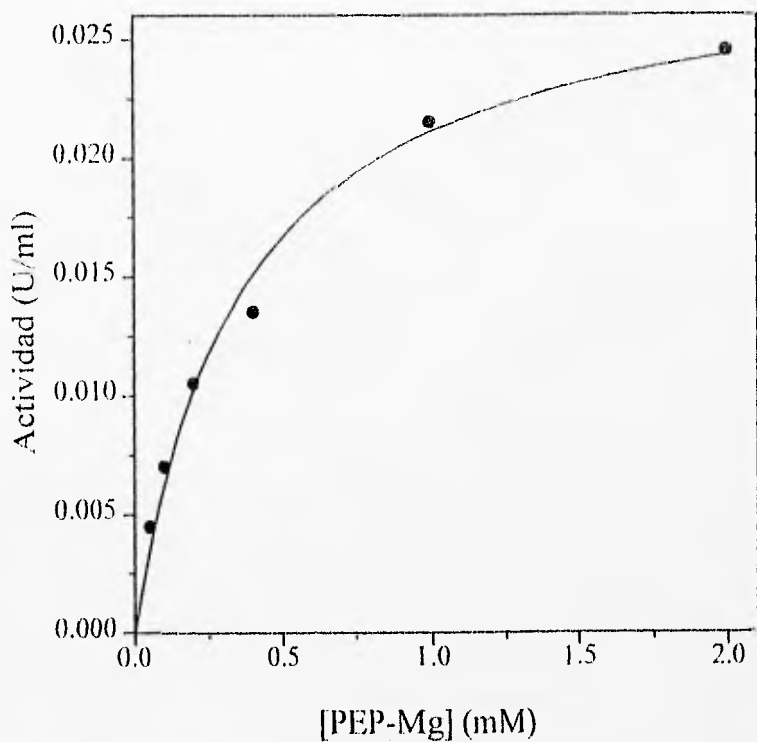


Figura. 17 Cinética de saturación para PEP-Mg del pico I de actividad de PEPC obtenido de una columna de DEAE-Sephacel (Figura 3). Medio de ensayo a pH 7.3,  $Mg^{2+}$  libre constante 1 mM.

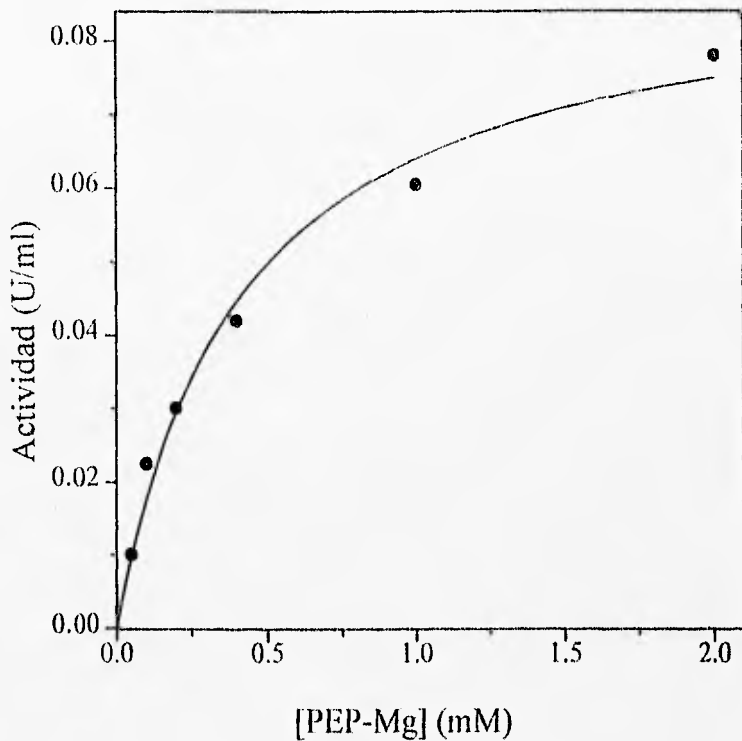


Figura. 18 Cinética de saturación para PEP-Mg del pico II de una columna de DEAE - Sephacel (Figura 3). Condiciones de ensayo  $Mg^{2+}$  libre constante 1 mM, pH 7.3

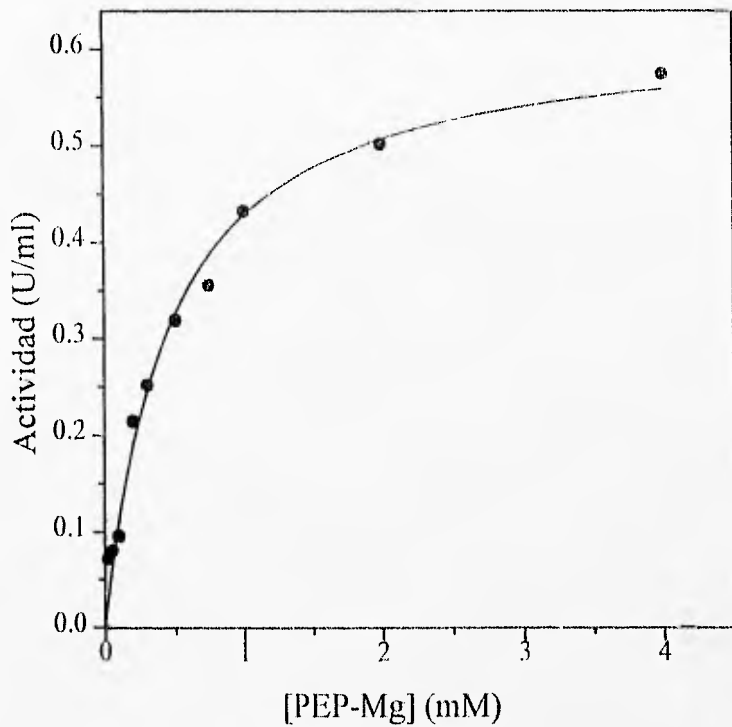


Figura 19. Cinética de saturación de PEPC pura de hoja de frijol para PEP-Mg. Medio de ensayo a pH 7.3 y  $Mg^{2+}$  libre 1 mM.

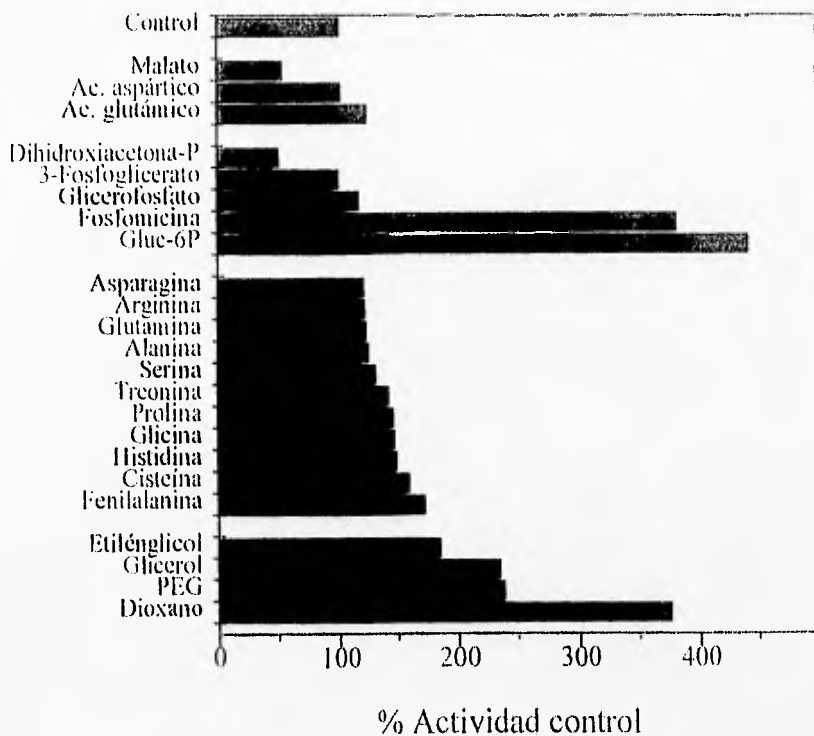


Figura 20. Efecto de diferentes metabolitos sobre la actividad de PEPC en extracto crudo de hoja de frijol. Etilénglicol y PEG se usaron al 10% (v/v y p/v, respectivamente), dioxano y glicerol al 20% (v/v) y los demás efectores a 10 mM. Los ensayos se realizaron a pH 7.3 y 30° C. con  $Mg^{2+}$  total 1 mM y PEP total 1 mM.

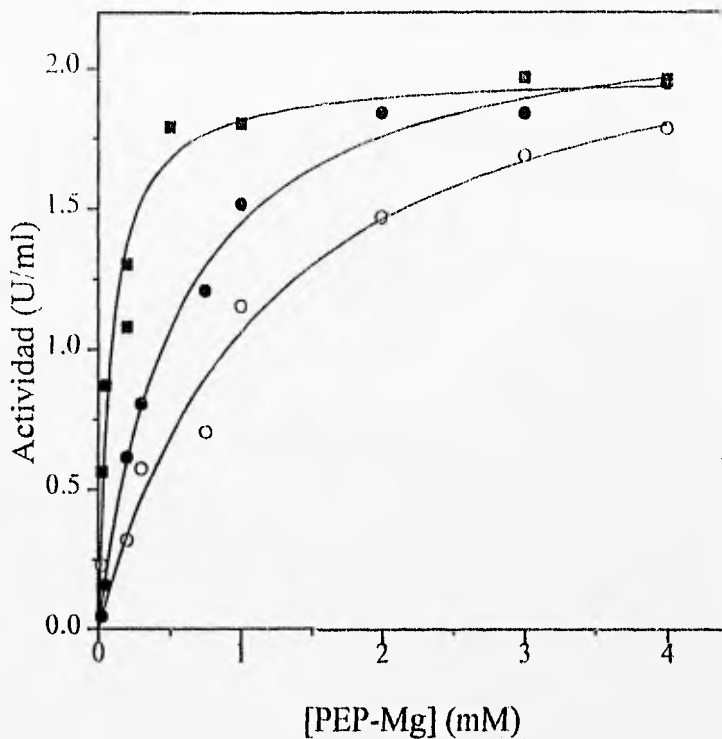


Figura 21. Cinética de saturación de PEPC de extracto crudo de hoja de frijol para PEP-Mg en ausencia ( ● ) y en presencia de gluc-6-P 10 mM ( ■ ) o malato 10 mM ( ○ ). La actividad se midió en el siguiente medio ensayo: TEA-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NADH 0.2 mM,  $\text{NaHCO}_3$  10 mM y  $\text{Mg}^{2+}$  1 mM.

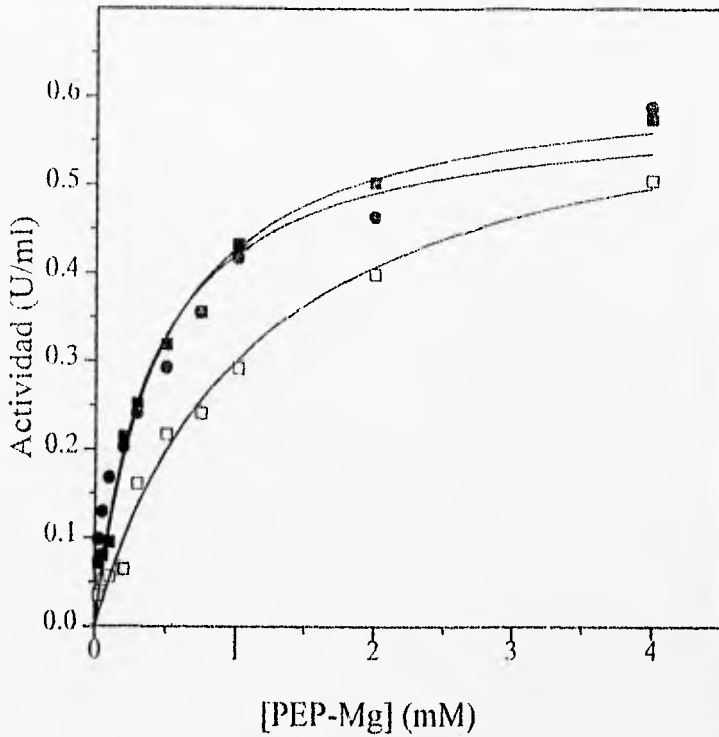


Figura 22. Cinética de saturación de PEPC purificada de hoja de frijo I para PEP-Mg en ausencia ( ■ ) y en presencia de Gluc-6P 10 mM ( ● ) o malato 10 mM ( □ ). Medio de ensayo a pH 7.3, TEA-HCl 100 mM, EDTA 1 mM, NADH 0.2 mM,  $\text{NaHCO}_3$  10 mM y Mg 1 mM.

## 7. TABLAS.



**TABLA I. Resumen de purificación de PEPC de hoja de frijol.**

Paso	Proteína total (mg)	Actividad (U total)	Act. esp. (U/mg)	Veces de purificación	Rendimiento* (%)
Extracto crudo	324	52.5	0.16	1	100
DEAE-Sephacel	287	47.6	0.17	1	90
Ultrogel-HA	10.9	23.4	2.15	13	40
TSK G4000SW	2.4	12.6	5.33	33	24
Mono-Q	0.16	2.8	17.25	108	5

\* Con la intención de lograr una mejor purificación, después de cada paso se tomaron solamente las fracciones con mayor actividad específica para aplicar a la siguiente columna, por esta razón los rendimientos aparentan ser muy bajos.

**TABLA II. Valores aparentes de las constantes cinéticas de PEPC de hoja de frijol.**

Muestra	$Km_{ap}$ (PEP-Mg) (mM)
Extracto crudo*	$0.69 \pm 0.10$
Pico I (DEAE-Sephacel)**	$0.36 \pm 0.05$
Pico II (DEAE-Sephacel)**	$0.41 \pm 0.07$
Enzima pura*	$0.46 \pm 0.05$

\* En presencia de glicerol 10% (v/v) y etilénical 10% (v/v).

\*\* En presencia de PEG 3% (p/v).

**TABLA III. Efecto del activador Gluc-6P y del inhibidor malato sobre los valores aparentes de las constantes cinéticas de PEPC.**

Condiciones	V <sub>max</sub> (U/ml)	K <sub>m<sub>ap</sub></sub> (PEP-Mg) (mM)
<b>EXTRACTO CRUDO</b>		
Control	2.34 ± 0.12	0.69 ± 0.10
+ Gluc-6-P 10 mM	1.97 ± 0.10	0.10 ± 0.02
+ Malato 10 mM	2.33 ± 0.21	1.20 ± 0.28
<b>ENZIMA PURA</b>		
Control	0.62 ± 0.02	0.46 ± 0.05
+ Gluc-6-P 10 mM	0.59 ± 0.05	0.39 ± 0.09
+ Malato 10 mM	0.63 ± 0.04	1.11 ± 0.16

## 8. DISCUSIÓN.

### 6.1 PURIFICACIÓN.

Puesto que reportes previos en la bibliografía (92, 100), y nuestros propios experimentos preliminares (Figura 1, pág. 28), indicaban la existencia de más de una isoenzima PEPC en hoja de frijol, nos propusimos purificar y caracterizar la que fuese más abundante. Para ello, seguimos inicialmente un protocolo experimental similar al que usamos en nuestro laboratorio en forma rutinaria para la purificación de la enzima de hoja de maíz. Sin embargo, debido a las grandes pérdidas de actividad que ocurrían durante la purificación y a la interconversión de las dos formas de la enzima (Figuras 3-5, págs. 30-32) tuvimos que modificar el método de purificación. La inclusión de glicerol y etilénglicol en lugar del polietilénglicol que se usa en el caso de maíz permitió mejorar notablemente el rendimiento de esta purificación y trabajar con una sola forma de la enzima.

Por el momento no tenemos una explicación concluyente sobre la naturaleza de las dos formas encontradas en presencia de PEG y el mecanismo por el cual se interconvierten. Sin embargo, a manera de especulación, pensamos que podría estar involucrado un proceso de asociación-disociación en el que una forma tetramérica se convertiría en una dimérica y viceversa. De ser esto cierto, no sólo la forma tetramérica sería activa como ocurre con PEPC de hoja de maíz (101), sino también la dimérica, aún cuando la actividad de esta última es probablemente menor que la de la tetramérica. Las bases que sustentan esta propuesta son las siguientes:

1º) Se conoce la marcada inestabilidad de la actividad de PEPC en extracciones acuosas o en medios de ensayo cuando no se adiciona glicerol (11, 18, 102). Esta inestabilidad se debe a la disociación de la forma tetramérica activa de la enzima. Se ha propuesto que la presencia de este compuesto orgánico estabiliza la estructura tetramérica, y por tanto evita la inactivación de la enzima, al incrementar la interacción proteína-proteína (20).

Así, la inclusión de glicerol evitaría por un lado las grandes pérdidas de actividad observadas en su ausencia y por otro la aparición de la otra forma, que podría ser el dímero.

2º) A diferencia de glicerol, PEG puede estabilizar formas desagregadas en otros sistemas (18). Por ello, en su presencia podrían existir tanto la forma tetramérica

como la dimérica.

3º) Puesto que en electroenfoque analítico la enzima aparece como una forma única, las dos bandas de actividad que observamos en los extractos crudos en PAGE-nativa (Figura 1, pág. 28) indicativas de dos formas con diferente movilidad electroforética, pueden deberse a diferencias entre ellas de tamaño nativo más que de carga. Estas diferencias de tamaño nativo podrían ser las existentes entre dímero y tetrámero, ya que como se encontró en los experimentos de SDS-PAGE y de filtración molecular (Figuras 11 y 14 respectivamente. págs. 38 y 41) la enzima de hoja de frijol es un homotetrámero de aproximadamente 400 kDa, al igual que la mayoría de las PEPCs encontradas hasta la fecha (9, 10, 11).

4º) Cuando se estudió la cinética de saturación por PEP-Mg de la enzima tanto en extractos crudos como en la preparación purificada se observó que los datos experimentales de velocidad inicial pueden ajustarse también a la ecuación de Hill (103) con una mayor desviación que en la de Michaelis-Menten, siendo el valor estimado del número de Hill inferior a uno en todos los casos (datos no mostrados). Esto es indicativo de cooperatividad negativa o de la presencia de dos formas de la enzima catalizando la misma reacción (103). Se puede pensar que al diluir la enzima en el medio de ensayo parte de ella se disocia a dímero, dando como consecuencia esta aparente cooperatividad negativa. Sin embargo, dado que la bondad de los ajustes a la ecuación de Hill es inferior a la de los ajustes a la ecuación de Michaelis-Menten mostramos los resultados de estos últimos.

Es claro que se requieren de experimentos adicionales para validar o descartar la hipótesis de que las formas de PEPC de hoja de frijol que aparecen bajo las condiciones experimentales mencionadas anteriormente se deben a la disociación de la enzima.

La inclusión de etilenglicol en los medios de purificación y en las electroforesis nativas permitió mejoras considerables en la estabilidad de la enzima durante las electroforesis y las cromatografías usadas en la purificación. Este efecto protector podría deberse a que etilenglicol minimiza las interacciones de tipo hidrofóbico de la proteína con las resinas y con otras proteínas, interacciones que muy probablemente contribuyen a obtener bajos rendimientos durante el proceso de purificación o a pérdidas de actividad durante la electroforesis.

Con el esquema de purificación modificado que se describe en este trabajo logramos obtener enzima casi pura (estimamos con un grado de pureza de más del

90%, en base al resultado de SDS-PAGE y a la actividad específica de la preparación final), si bien el rendimiento de la purificación fue bajo. A este respecto, es importante considerar que aquellas fracciones cromatográficas que tenían poca actividad se eliminaron en cada paso, con el fin de seguir la purificación con las más concentradas.

Teniendo en cuenta nuestros resultados y las consideraciones que acabamos de hacer, pensamos que en la hoja del frijol (*Phaseolus vulgaris*) existe una sola isoenzima de PEPC. Sin embargo hay reportes sobre la existencia de tres formas de PEPC en hoja de frijol, formas que difieren en la fuerza iónica a la que eluyen de una columna de intercambio iónico DEAE-celulosa (92). Esta discrepancia entre nuestros resultados y los publicados podría deberse a que los autores de este trabajo no incluyen en su amortiguador de extracción ni en los usados en la cromatografía cosolutos orgánicos, por lo que las formas obtenidas por ellos podrían ser resultado de una disociación como discutimos anteriormente.

También existen reportes de hoja de algodón, una planta C3, sobre la presencia de tres isoenzimas obtenidas de una columna de intercambio iónico DEAE-celulosa y eluidas a diferente fuerza iónica. En este caso tampoco se incluyeron cosolutos orgánicos ni en los medios de extracción ni en la cromatografía (104).

## 6.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

Las características moleculares de PEPC de hoja de frijol estudiadas en este trabajo (peso molecular de la enzima nativa, peso molecular de la subunidad y punto isoelectrico) son muy similares a las de PEPC de otros tejidos de plantas (9, 10, 11).

Ello está de acuerdo con el elevado grado de homología que se conoce existe entre las secuencias de las diferentes PEPC que se han clonado hasta el momento (28, 105). Si bien aún no se conoce la secuencia de aminoácidos de PEPC procedente de ningún tejido de frijol. Se ha reportado que la enzima de hoja de soya (45) muestra un grado de homología de nucleótidos del 86.7% y un 92.5% de homología de aminoácidos comparada con tabaco .

## 6.3 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA.

Las propiedades cinéticas y de regulación que presentó PEPC tanto en extractos crudos como purificada de hoja de frijol corresponden típicamente a las características de las isoenzimas anapleróticas. Así, el valor de  $K_m$  (PEP-Mg) de la

enzima de hoja de frijol encontrada en este trabajo es de  $0.46 \pm 0.05$  mM (Figura 19, pág. 45), mientras que las enzimas de hoja de plantas C4 presentan valores alrededor de cinco veces superiores de 2 mM (69, 78). El hecho de que la enzima de hoja de frijol presente una  $K_m$  para PEP-Mg considerablemente más baja que la de hojas de plantas C4, apoya la conclusión de que es una enzima anaplerótica (27). Además, la cinética de saturación por PEP-Mg de PEPC de hoja de frijol a pH cercano a la neutralidad es michaeliana, mientras que la isoenzima fotosintética de hoja de plantas C4 presenta una clara cinética sigmoideal indicativa de cooperatividad positiva.

La enzima se activa por Gluc-6-P y se inhibe por malato, siendo el efecto de estos metabolitos fundamentalmente a nivel de  $K_m$  (PEP-Mg) al igual que el resto de las PEPCs estudiadas hasta la fecha (8, 76, 79)

Es de notar que la enzima pura perdió la sensibilidad a Gluc-6-P, y por el momento no sabemos que pudo causar esta insensibilización. A este respecto, observando cuidadosamente el gel de PAGE-nativa que se muestra en la Figura 13 (pág. 40), puede notarse que durante la purificación la enzima muestra una ligera movilidad electroforética que en el extracto crudo, lo que podría deberse a una proteólisis parcial ocurrida en el transcurso de la purificación. De haber ocurrido esta proteólisis, el trozo eliminado debe ser pequeño, puesto que no se observaron notables diferencias en el peso molecular nativo de la enzima purificada con respecto a las isoenzimas purificadas de otras fuentes (35, 96).

Es bien conocida la facilidad con la que el extremo  $\text{NH}_2$ -terminal de la PEPC extraída de muy diversas fuentes se proteoliza si en el medio de extracción no se incluye un inhibidor de proteasas del tipo de la quimostatina (106, 107). Sin embargo, esta proteólisis parcial conlleva pérdidas en la sensibilidad a malato, no a Gluc-6-P como nosotros encontramos (106, 107). Es importante señalar que nuestro medio de extracción contenía quimostatina, que es el inhibidor de proteasas usado en nuestro laboratorio, y en aquellos en los que se estudia PEPC, para evitar la pérdida del extremo  $\text{NH}_2$ -terminal (108, 109). Además, como puede observarse en la Tabla III (pág. 51), la sensibilidad de la enzima pura al inhibidor malato es muy similar a la de la enzima en extracto crudo, lo que demuestra que no ha habido proteólisis en el extremo  $\text{NH}_2$ -terminal durante el proceso de purificación. Por todo ello, de haber ocurrido proteólisis, pensamos que debe haber afectado al extremo carboxilo terminal, lo cual no ha sido documentado en ninguna de las PEPC estudiadas hasta la fecha.

Este es, por tanto, un punto importante a tener en cuenta para futuras purificaciones, en las que se habrán de incluir otros inhibidores de proteasas en los amortiguadores de al menos los primeros pasos de purificación para evitar este posible artefacto. Deberá igualmente medirse la sensibilidad a Gluc-6-P en todos los pasos para detectar en cual de ellos se produce la pérdida de sensibilidad a Gluc-6-P, si ésta llegara a ocurrir.

A la isoenzima de PEPC de hoja de plantas C3, como es el caso de hoja de frijol, se le ha brindado menos atención que a la enzima de hoja de plantas C4 y CAM, debido quizás a que no participa directamente en el proceso fotosintético. Sin embargo, dada la gran importancia de la función anaplerótica que PEPC desempeña en estos tejidos (110), creemos de gran interés el profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción y regulación de esta isoenzima C3. Confiamos en que la puesta a punto de un método de purificación como el que se describe en esta tesis, sea el primer paso que permita avanzar el estudio de esta interesante enzima.

## 9. CONCLUSIONES.

Las principales conclusiones que se derivan de los resultados obtenidos en este estudio son las siguientes:

- La inclusión de glicerol y etilénglicol en el medio de extracción permite mejorar notablemente el rendimiento de la purificación de PEPC de hoja de frijol y obtener una sola forma de la enzima.
- El peso molecular y el pI obtenido para la enzima de hoja de frijol es similar al reportado para la enzima de hoja de maíz y de otras de plantas y tejidos.
- Las propiedades cinéticas de la enzima concuerdan con que la función en la hoja de frijol sea fundamentalmente anaplerótica.



## 10. BIBLIOGRAFIA.

1. Zelitch, I. (1979) *Chem. Eng. News* 57, 28-48.
2. O'Leary, M.H. (1982) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 297-315.
3. Andreo, C.S., González, D.H. & Iglesias, A.A. (1987) *FEBS Lett.* 213, 1-8.
4. Rajagopalan, A.V., Devi, M.T. & Raghavendra, A.S. (1994) *Photosynth. Res.* 39, 115-135.
5. Cooper, T.G., & Wood, H.G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5488-5490.
6. Mukerji, S.K. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 182, 360-365.
7. Rodriguez-Sotres, R. & Muñoz-Clares, R.A. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 276, 180-190.
8. Wedding, R.T., Black, M. K. & Meyer, C.R. (1989) *Plant Physiol.* 90, 648-652.
9. Marés, J. & Leblová, S. (1980) *Photosynthetica* 14, 25-31.
10. Ting, I.P. & Osmond, C.B. (1973) *Plant Physiol.* 51, 439-447.
11. Uedan, K. & Sugiyama, T. (1976) *Plant Physiol.* 57, 906-910.
12. Stiborová, M. & Leblová, S. (1986) *FEBS. Lett.* 205, 32-34.
13. Wu, M.-X. & Wedding, R.T. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 240, 655-662.
14. Wagner, R., González, D.H., Podestá, F.E. & Andreo, C.S. (1987) *Eur. J. Biochem.* 164, 661-666.
15. Walker, G.H., Ku, M.S.B. & Edwards, G.E. (1986) *Plant Physiol.* 80, 848-855.
16. Wu, M.-X. & Wedding, R.T. (1985) *Plant Physiol.* 85, 497-501.
17. Willeford, K.O. & Wedding, R.T. (1992) *Plant Physiol.* 99, 755-758.
18. Selenioti, E., Nikolopoulos, D. & Manetas, Y. (1987) *Aust. J. Plant Physiol.* 14, 203-210.
19. Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1984) *Plant Physiol.* 75, 983-987.
20. Gekko, K. & Timasheff, S.N. (1981) *Biochemistry* 20, 4667-4676.
21. Iglesias, A.A., Gonzalez, D.H. & Andreo, C.S. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 788, 41-47.
22. Podestá, F.E., Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 246-253.
23. Wagner, R., Podestá, F.E., González, D.H. & Andreo, C.S. (1988) *Eur. J. Biochem.* 173, 561-568.
24. Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 749, 9-17.
25. Chardot, T.P. & Wedding, R.T. (1992) *Plant Physiol.* 98, 780-783.
26. Maralilalli, G.B. & Bhagwat, A.S. (1993) *J. Protein Chem.* 12, 451-457.
27. Ting, I.P. & Osmond, C.B. (1973) *Plant Physiol.* 51, 448-453.
28. Toh, H., Kawamura, T. & Izui, K. (1994) *Plant Cell Environ.* 17, 31-43.
29. King, B.J., Layzell, D.B. & Canvin, D.T. (1986) *Plant Physiol.* 81, 200-205.
30. Maxwell, C.A., Vance, C.P., Heichel, G.H. & Stode, S. (1984) *Crop Sci.* 24, 257-264.
31. Rosendahl, L., Vance, C.P. & Pedersen, W.B. (1990) *Plant Physiol.* 93, 12-19.
32. Davies, D.D. (1986) *Physiol. Plant.* 67, 702-706.
33. Deroche, M.E. & Carrayol, E. (1988) *Physiol. Plant.* 74, 775-782.
34. Van, Q. L., Foyer, C. & Chantigny, M.L. (1991) *Plant Physiol.* 97, 1476-1482.

35. Matsuoka, M. & Hata, S. (1987) *Plant Physiol.* **85**, 947-951.
36. Hatch, M.D. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **895**, 81-106.
37. Hudspeth, R.L., Glackin, C.A., Bonner, J. & Grula, J.W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2884-2888.
38. Hudspeth, R.L. & Grula, J.W. (1989) *Plant Mol. Biol.* **12**, 579-589.
39. Crétin, C., Keryer, E., Tagu, D., Lepiniec, L., Vidal, J. & Gadal, P. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 658.
40. Crétin, C., Santi, S., Keryer, E., Lepiniec, L., Tagu, D., Vidal, J. & Gadal, P. (1991) *Gene* **99**, 87-94.
41. Hermans, J. & Westhoff, P. (1990) *Mol. Gen Genet.* **224**, 459-468.
42. Schläffner, A.R. & Sheen, J. (1992) *Plant J.* **2**, 221-232.
43. Lepiniec, L., Keryer, E., Philippe, H., Gadal, P. & Crétin, C. (1993) *Plant Mol. Biol.* **21**, 487-502.
44. Poetsch, W., Hermans, J. & Westhoff, P. (1991) *FEBS Lett.* **292**, 133-136.
45. Vázquez-Tello, A., Whittier, R.F., Kawasaki, T., Sugimoto, T., Kawamura, Y. and Shibata, D. (1993) *Plant Physiol.* **103**, 1025-1026.
46. Marques, I.A., Oberholzer, M.J. & Erismann, K.H. (1983) *Plant Physiol.* **71**, 555-561.
47. Schweizer, P. & Erismann, K.H. (1985) *Plant Physiol.* **78**, 455-458.
48. Van, Q. L., Foyer, C. & Champigny, M. L. (1991) *Plant Physiol.* **97**, 1476-1482.
49. Sugiharto, B., Miyata, K., Nakamoto, H., Sasakawa, H. & Sugiyama, T. (1990) *Plant Physiol.* **92**, 963-969.
50. Sugiharto, B., Suzuki, I., Burnell, J.N. & Sugiyama, T. (1992) *Plant Physiol.* **100**, 2066-2070.
51. Sugiharto, B. & Sugiyama, T. (1992) *Plant Physiol.* **98**, 1403-1408.
52. Manh, C.T., Bismuth, E., Boutin, J.P., Provot, M. & Champigny, M.L. (1993) *Physiol. Plant.* **89**, 460-466.
53. Morgan, J.M. (1984) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**, 299-319.
54. Dancer, J. & Stitt, D.M. (1990) *Plant Cell Environ.* **13**, 957-964.
55. Quick, W.P., Chaves, M. M., Wendler, R., David, M., Rodrigues, M. L., Passaharinho, J. A., Pereira, J. S., Adeock, M. D., Leegood, R. C. & Stitt, M. (1992) *Plant Cell Environ.* **15**, 25-35.
56. Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. & Sánchez, D.M. (1992) *Physiol. Plant* **84**, 61-66.
57. Brulfert, J., Güclü, S., Taybi, T. & Pierre, J.N. (1993) *Plant Physiol. Biochem.* **31**, 491-497.
58. Pipenbrock, M. & Schmitt, J.M. (1991) *Plant Physiol.* **97**, 998-1003.
59. Gupta, S.K., Ku, M.S.B., Liu, J-H., Zhang, D. & Edwards, G.E. (1994) *Photosynth. Res.* **42**, 133-143.
60. Huber, S.C., Sugiyama, T. & Akazawa, T. (1986) *Plant Physiol.* **82**, 550-554.

61. Jiao, J-A., Echevarría, C., Vidal, J. & Chollet, R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci* **88**, 2712-2715.
62. Nimmo, G.A., McNaughton, G.A.L., Fewson, C.A., Wilkins, M.B. & Nimmo, H.G. (1987) *FEBS Lett.* **213**, 18-22.
63. Wang, C., Tang, X.Y. & Shi, J.N. (1989) *Acta Bot. Bor-Occ. Sinica* **9**, 177-182.
64. Vidal, J. & Gadal, P. (1983) *Physiol. Plant.* **57**, 119-123.
65. Sims, T.L. & Hague, D.R. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 8252-8255.
66. Duff, S.M.G. & Chollet, R. (1995) *Plant Physiol.* **107**, 775-782.
67. Duff, S.M.G., Andreo, C.S. Pacquit, V., Lepiniec, L., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, J., Gadal, P. & Chollet, R. (1995) *Eur. J. Biochem.* **228**, 92-95.
68. Jiao, J-A. & Chollet, R. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **261**, 409-417.
69. Karabourniotis, G., Manetas, Y. & Gavalas, N.A. (1983) *Plant Physiol.* **73**, 735-739.
70. Jiao, J-A. & Chollet, R. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 526-535.
71. Lepiniec, L., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P. & Cretin, C. (1994) *Plant Sci.* **99**, 111-124.
72. Jiao, J-A. & Chollet, R. (1991) *Plant Physiol.* **95**, 981-985.
73. Carter, P.J., Nimmo, H.G., Fewson, C.A. & Wilkins, M.B. (1991) *EMBO J.* **10**, 2063-2068.
74. McNaughton, G.A.L., MacIntosh, C., Fewson, C.A., Wilkins, M.B. & Nimmo, (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1093**, 189-195.
75. Nimmo, G.A., Nimmo, H.G., Hamilton, I.D., Fewson, C.A. & Wilkins, M.B., (1986) *Biochem. J.* **289**, 213-220.
76. Šiborová, M. & Leblková, S. (1985) *Photosynthetica* **19**, 177-182.
77. Nishikido, T. & Takanashi, H. (1973) *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **53**, 126-133.
78. Rodríguez-Sotres, R. & Muñoz-Clares, R.A. (1987) *J. Plant Physiol.* **128**, 361-369.
79. Huber, S.C. & Edwards, G.E. (1975) *Can. J. Bot.* **53**, 1925-1933.
80. González, D.H., Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1987) *Biochem. J.* **241**, 543-548.
81. Guidici-Orticoni, M.T., Vidal, J., Le Maréchal, P., Thomas, M., Gadal, P. & Rémy, R. (1988) *Biochimie* **70**, 769-772.
82. Jenkins, C. L. D., Harris, R. L. N. & McFadden, H.G. (1986) *Biochem. International* **12**, 619-625.
83. Gillinta, J. & Grover, S. D. (1995) *Photosynth. Res.* **45**, 121-126.
84. Bandarjan, V., Poehner, W.J. & Grover, S.D. (1992) *Plant Physiol.* **100**, 1411-1416.
85. González, D.H., Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1984) *J. Plant Physiol.* **116**, 425-434.
86. Tarczynski, M.C. & Outlaw, Jr. W.H. (1993) *Plant Physiol.* **103**, 1189-1194.
87. Schuller, K.A. Turpin, D.H. & Plaxton, W.C. (1990) *Plant Physiol.* **94**, 1429-1435.
88. Deroche, M.E. & Carrayol, E. (1989) *Plant Physiol. Biochem.* **27**, 379-386.
89. Goatly, M.B. & Smith, H. (1974) *Planta* **117**, 67-73.
90. Peterson, J.B. & Evans, H.J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **567**, 445-452.
91. Deroche, M.E., Carrayol, E. & Jolivet, E. (1983) *Physiol. Vég.* **21**, 1075-1081

92. Vidal, J. & Cavalie, G. (1974) *Physiol. Vég.* **12**, 175-188.
93. Luthra, Y.P., Sheoran, I.S. & Singh, R. (1983) *Photosynthetica* **17**, 210-215.
94. Singal, H.R. & Singh, R. (1986) *Plant Physiol.* **80**, 369-373.
95. Price, D.N. & Hedley, C.L. (1980) *J. Ann. Bot.* **45**, 283-294.
96. Schutz, M., Hunte, C. & Schnabl, H. (1992) *Physiol. Plant.* **86**, 315-321.
97. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
98. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680.
99. Penefsky, H.S. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 2891-2899.
100. Vidal, J., Cavalie, G. & Gadal, P. (1976) *Plant Sci. Lett.* **7**, 265-270.
101. Jones, R., Wilkings, M. D., Coggins, J. R., Fewson, C. A. & Malcom, S. D. B. (1978) *Biochem. J.* **175**, 391-406.
102. Manetas, Y., Petropoulou, Y. & Karabourniotis, G. (1986) *Plant Cell Environ.* **9**, 145-151.
103. Segel, I. H. (1975) *Enzyme Kinetics*. John Wiley & Sons. New York, Toronto. Págs. 371-373, 377-381.
104. Mukerji, S.K. & Ting I.P. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **143**, 297-317.
105. Yanagisawa, S., Izui, K., Yamaguchi, Y., Shigesada, K. & Katsuki, H. (1988) *FEBS Lett.* **229**, 107-110.
106. McNaughton, G. A. L., Fewson, C. A., Wilkins, M. B. & Nimmo, H. G. (1989) *Biochem. J.* **261**, 349-355.
107. Baur, B., Dietz, K.-J. & Winter, K. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 95-101.
108. Sangvan, R. S., Singh, N., & Plaxton, W. C. (1992) *Plant Physiol.* **99**, 445-449.
109. 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.
110. Latzko, E. & Kelly, G. J. (1993) *Physiol. Vég.* **21**, 805-815.