

RODRIGUEZ SOTRES, ROGELIO
ESTUDIOS SOBRE LA REGULACION DE LA ENZIMA
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE HOJA DE -
MAIZ. -- MEXICO : UNAM, FACULTAD DE QUIMICA,
s.a.

p.v.

Incluye artículo en inglés en colaboración con
la Dra. Rosario Muñoz Clares:

STUDIES ON THE "IN VIVO" ACTIVITY OF MAIZE
LEAF PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXILASE UNDER LIGTH
AND DARK CONDITIONS



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.

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	3
1.FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE HOJA DE PLANTAS C4.....	3
2. RUTA C4 EN MAIZ.....	4
3. REGULACION DE LA RUTA C4 POR LUZ.....	9
3.1 REGULACION POR SINTESIS DE NOVO DE PROTEINAS.....	9
3.2 REGULACION POR EL ESTADO DE ACTIVACION DE ENZIMAS.....	12
3.2.1 ENZIMAS CUYA REGULACION HA SIDO DESCRITA.....	13
3.2.1.1 PIRUVATO ORTOFOSFATO DICINASA (PPDK)....	13
3.2.1.2 MALICO DESHIDROGENASA DEPENDIENTE DE NADP.....	14
3.2.2 ENZIMAS CUYA REGULACION POR LUZ NO HA SIDO AUN DILUCIDADA.....	16
3.2.2.1 MALICO DESHIDROGENASA DESCARBOXILANTE DEPENDIENTE DE NADP.....	16
3.2.2.2 FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA.....	17
HIPOTESIS DE TRABAJO.....	23
METAS.....	23
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
DISCUSION DE RESULTADOS.....	24
ARTICULO I.....	24
ARTICULO II.....	28

INTRODUCCION

Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E.C. 4.1.1.31) es una enzima que parece existir en todas las células vegetales ya sean fotosintéticas o no (1). Esta amplia distribución se explica por las muchas diferentes funciones que la enzima realiza en los tejidos vegetales (2,3). Así, su actividad ha sido implicada en un mecanismo regulador del pH citoplásmico (3,4), en la apertura y cierre de estomas (5,6,7), en el crecimiento estimulado por auxinas (8), en reacciones anapleróticas de relleno del ciclo de Krebs (2,3), en la fijación de nitrógeno en nódulos de leguminosas (3,8) y en las rutas fotosintéticas de asimilación de CO₂ atmosférico en plantas C₄ (1,2,10-14) y con metabolismo ácido crasuláceo (CAM) (15-19).

El interés por el estudio de esta enzima dentro del contexto del metabolismo C₄ y del metabolismo CAM es fácilmente comprensible si se toma en cuenta la posible trascendencia de este conocimiento a nivel agrícola y biotecnológico. Las plantas C₄ presentan una productividad superior a las plantas con metabolismo C₃ bajo condiciones de iluminación y temperatura elevadas y son capaces de sobrevivir en ambientes relativamente áridos. Por su parte, las plantas CAM pueden desarrollarse en climas desérticos, constituyendo así la única alternativa de productividad en este tipo de ambientes. Se ve pues claramente, que el conocimiento de estos metabolismos y naturalmente de sus enzimas claves como PEPC, puede guiarnos hacia la obtención de variedades agrícolas más convenientes y útiles.

De entre los varios factores ambientales que influyen la

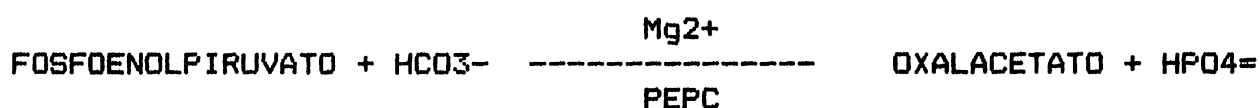
actividad de PEPC asociada al proceso fotosintético destaca como cabe esperar, la luz. De hecho, está bien establecido que la luz induce la síntesis de novo de PEPC en varias plantas C₄ (incluyendo maíz cfr. ref. 19-29) y CAM (30-32). Por otra parte, se ha reportado que la luz modula el estado de activación de PEPC en varias especies CAM (33-35) y C₄ (36-38), haciendo que en las primeras la enzima sea más activa durante la noche que durante el día y lo inverso en las segundas. Sin embargo, no se ha aclarado si existe este efecto regulador de la luz en el caso de maíz, una de las especies más interesantes desde el punto de vista agrícola. Basados en el hecho de que la fijación de CO₂ de la atmósfera se detiene rápidamente cuando la luz es apagada y en que el nivel de PEP en hoja completa de maíz no disminuye si las plantas preiluminadas son transferidas a oscuridad en atmósfera libre de CO₂, Samejima y Miyachi (10) han concluido, de manera no muy clara, que esta enzima sufre una rápida inactivación en la oscuridad. Por su parte Iglesias y Andreo (39) han reportado que la actividad de PEPC de un extracto crudo obtenido de hojas de maíz iluminadas fue un 60% superior a aquella encontrada en extractos crudos de hojas de plantas mantenidas en oscuridad. Otros autores, por el contrario, no lograron detectar ninguna fotoactivación de PEPC de hoja de maíz, aún cuando sí la encontraron en otras especies C₄ (36,37). Además, mientras unos autores reportan que la fijación de CO₂ en la oscuridad a través de beta-carboxilación continúa hasta tres horas después de la transición (41), otros autores encuentran que esta fijación de CO₂ se detiene casi inmediatamente después de que las plantas son transferidas a la oscuridad (42-44). En vista de estos

resultados contradictorios se consideró de interés reinvestigar la regulación a corto plazo de la actividad de PEPC por la luz en hoja de maíz, con el doble objetivo de tratar de establecer si esta regulación es un fenómeno general en las plantas C₄ (que de serlo, estaría presente en maíz) y de lograr, mediante su estudio, una mejor comprensión del metabolismo fotosintético de asimilación de CO₂ atmosférico, factor determinante de la productividad de una planta, en una especie de importancia agrícola excepcional como es el maíz.

ANTECEDENTES

1. FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE HOJA DE PLANTAS C₄.

La enzima PEPC cataliza la beta-carboxilación del fosfoenolpiruvato según la reacción siguiente:



Esta reacción tiene un cambio de energía libre muy negativo (entre -6 y -8 Kcal/Mol) y es prácticamente irreversible (14). PEPC es la única carboxilasa, a la fecha reportada, que utiliza bicarbonato como sustrato y que no requiere biotina (45,46).

Se ha reportado la existencia de formas isoenzimáticas de PEPC en hoja verde de varias plantas C₄ como son sorgo (47), caña de azúcar (48) y maíz (46,49,50). La forma predominante (como % de la actividad total de PEPC) muestra las características cinéticas de la isoenzima fotosintética que participa en la ruta C₄ (20,23,26,49) y además, su síntesis es

inducida por exposición de la planta a la luz (20-26,52) como cabría esperar de una enzima fotosintética. Las otras formas existentes en hoja, cuya síntesis no es regulada por luz, podrían estar desempeñando alguna función en el metabolismo intermediario de la hoja. De hecho las características cinéticas y de regulación de éstas últimas permiten incluirlas dentro del grupo de isoformas no fotosintéticas de PEPC (45).

Esta enzima, cuya importancia ya se ha señalado, ha sido objeto de una considerable cantidad de estudios. Los resultados de estos trabajos han sido revisados recientemente por O'Leary (14).

2. RUTA C EN MAÍZ.

4

Maíz, al igual que la mayoría de las plantas C₄, presenta dos tipos de células diferenciadas participando en el metabolismo fotosintético de la hoja (11-13,52-54,56). La figura 1 muestra un esquema simplificado del metabolismo C₄. Las células llamadas de mesófilo se encuentran cerca de la superficie externa de la hoja y toman CO₂ atmosférico directamente para asimilarlo en forma de oxalacetato (OAA) mediante la enzima PEPC. Este metabolito se transporta al interior del cloroplasto en donde se convierte en malato mediante la enzima málico deshidrogenasa dependiente de NADP (NADP-MDH). El malato, en intercambio con el OAA que se está produciendo, es transportado a citoplasma para, posteriormente, ser llevado a las células de vaina vascular, las cuales se localizan en la periferia de los haces vasculares (Fig. 2), en donde se encuentran bastante aisladas del intercambio directo de CO₂ con la atmósfera. En las células de vaina vascular, el malato

2

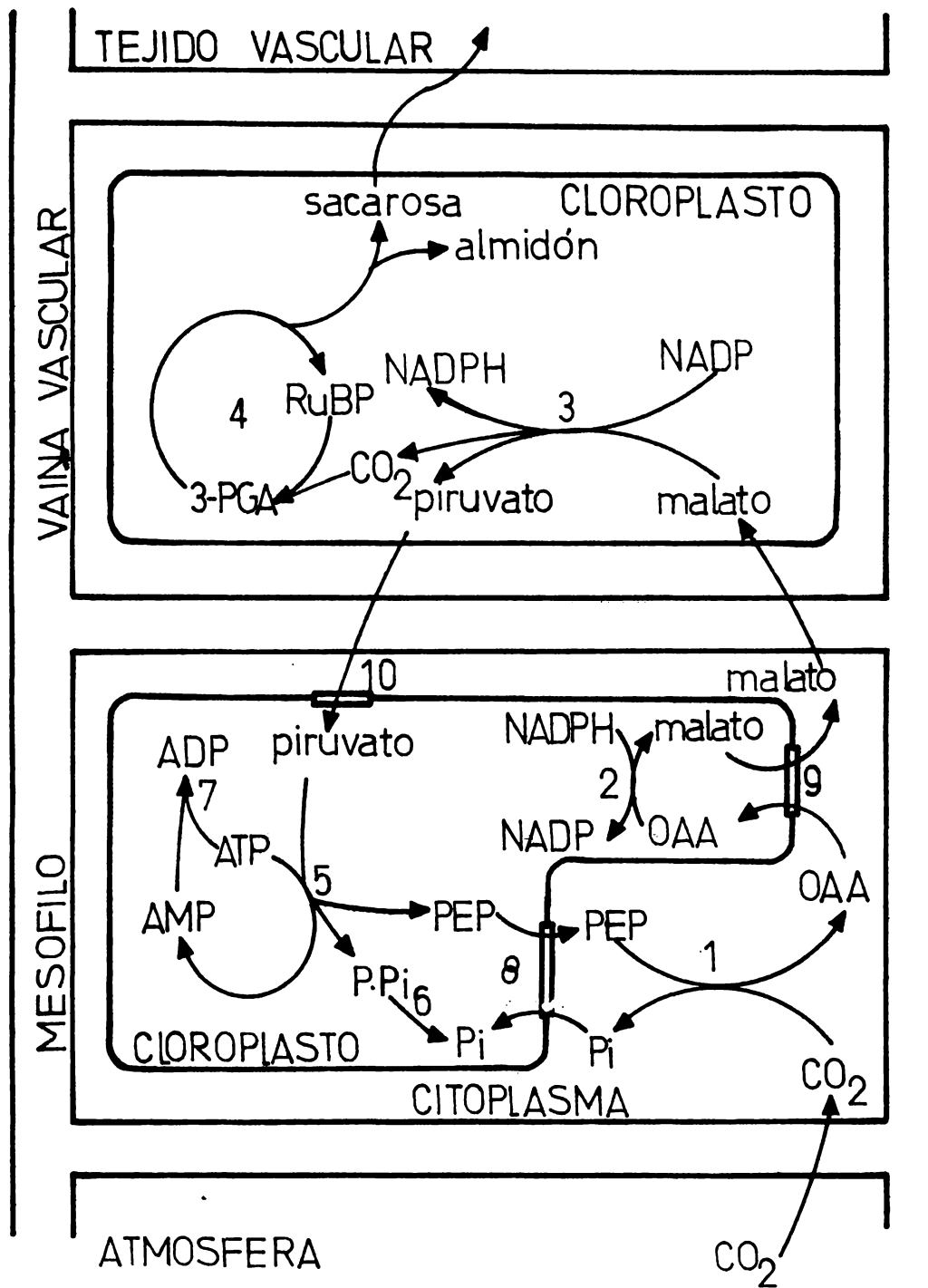


Figura 1. Esquema del metabolismo C₄ de maíz
 Enzimas: 1. Fosfoenolpiruvato carboxilasa; 2. NADP-malato deshidrogenasa; 3. enzima málica-NADP; 4. Ciclo de Calvin; 5. Piruvato entofosfato dicinasa; 6. Pirofosfatasa; 7. Adenilato cinasa; 8. Translocador de PEP- fosfato; 9. Traslocador de dicarboxilatos;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

se descarboxila mediante la enzima málico deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP (enzima málica-NADP) y el CO_2 producido se utiliza para la síntesis de carbohidratos que, a través del ciclo de Calvin, tiene lugar en estas células. El piruvato producto de la descarboxilación, regresa a las células de mesófilo y es transportado al interior del cloroplasto en donde produce fosfoenolpiruvato (PEP) en una reacción catalizada por la enzima piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK), con el consumo de dos equivalentes de ATP. El PEP resultante se transporta a citoplasma en intercambio con fosfato para seguir alimentando esta ruta (12,13,53,57,58).

Las plantas que poseen ruta C₄ usan parte de la energía solar captada para mantener esta ruta extra, pero a pesar de ello su eficiencia energética es superior a la de las plantas C₃ que sólo poseen ciclo de Calvin, cuando las condiciones de temperatura e iluminación les son favorables. Es un sistema fotosintético que además puede operar con pérdidas de agua menores por dos razones: i) Gracias a que la afinidad por el CO_2 es muy superior en plantas C₄. Estos organismos, pueden mantener altas velocidades de fijación de carbono con apertura estomal limitada permitiendo así una fotosíntesis activa en condiciones de relativa aridez y con bajas concentraciones de CO_2 . Esta última es condición frecuente cuando las plantas están fotosintetizando activamente ya que consumen con rapidez el CO_2 de las capas cercanas de la atmósfera. ii) Pueden intercambiar CO_2 por agua más eficientemente que las plantas C₃ debido a que la concentración interna de CO_2 es mucho más baja que en estas últimas. Por otra parte, debido a que su



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

asimilación de CO₂ es más eficiente, las plantas C₄ poseen la capacidad de aprovechar mayor cantidad de energía luminosa y crecer mejor bajo condiciones de alta intensidad lumínica. En consecuencia las plantas C₄ son bastante productivas, por lo que representan magníficos candidatos para lograr incrementar la productividad en ambientes desfavorables, como son los climas áridos (55).

Dado que en la ruta C₄ participan dos tipos de células y varios compartimentos celulares, los mecanismos de transporte, inter e intracelulares, se revisten de un especial interés y es conveniente hacer una breve descripción de los mismos.

i) Transporte intercelular. Hasta la fecha las evidencias existentes indican que el transporte de metabolitos de las células de mesófilo a las células de vaina vascular y viceversa, ocurre por difusión simplástica a través de comunicaciones intercelulares aisladas por una capa de suberina, bastante permeables a moléculas pequeñas y relativamente impermeables a gases, que se denominan plasmodesmata (11,56). De acuerdo con cálculos teóricos esta superficie de intercambio tiene las características necesarias para justificar los flujos observados durante la fotosíntesis (11). Además, los protoplastos aislados de mesófilo son bastante permeables a varios de los metabolitos implicados en el ciclo C₄ (59).

ii) Transporte intracelular. Debido a limitaciones de tipo metodológico, sólo los cloroplastos de mesófilo han sido aislados en forma íntegra con rendimientos suficientes para facilitar su estudio (11). Se han caracterizado tres transportadores de evidente importancia en el metabolismo C₄. Un

translocador de dicarboxilatos que intercambia malato, oxalacetato, glutamato, aspartato y oxoglutarato (60), un translocador de PEP, 3-fosfoglicerato (3-PGA) y fosfato (Pi) (57,61,62) y un transportador de piruvato (11,63). Este último es capaz de acumular piruvato en el interior del cloroplasto en contra de un gradiente de concentración cuando dicho organelo está iluminado, pero no lo hace ni en la oscuridad, ni en presencia del desacoplante m-clorofenilhidrazona carbonil cianuro (CCCP) indicando que requiere del potencial electroquímico transmembranal, que se forma por el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones bajo condiciones de iluminación (63). No se han caracterizado aún otros transportadores involucrados en este metabolismo, aunque es de esperar que existan varios más, por lo menos en cloroplasto de vaina vascular.

3. REGULACION DE LA RUTA C POR LUZ.

4

3.1 Regulación por síntesis de novo de proteínas.

Las plantas han desarrollado varios mecanismos de respuesta a variaciones del medio ambiente de manera que su desarrollo se ha supeditado en gran medida a la aparición de muchos de estos cambios. Lógicamente una de las señales más importantes para el desarrollo de la planta es la luz, que induce la síntesis de numerosas proteínas enzimáticas y estructurales necesarias para el establecimiento del organismo fotosintético adulto. Se han propuesto tres clases de fotorreceptores que median respuestas del desarrollo a la luz: fotoclorofílido, fitocromo y varios receptores de luz azul y luz ultravioleta no bien caracterizados

(28). Aún cuando la participación de los receptores de luz azul en la regulación de la síntesis de proteínas ha sido bien demostrada sólomente para el caso de algas (64-67), las evidencias señalan que estos juegan un papel importante también en plantas superiores (28,64,68-70). Recientemente se ha demostrado que la biosíntesis de varias enzimas que participan en la síntesis de terpenoides es regulada por luz ultravioleta aún cuando, el o los receptores involucrados no se han identificado (28). De los anteriormente mencionados, sin duda el fotorreceptor mejor caracterizado y el único que ha sido aislado es fitocromo (28,72). Se sabe que la estimulación de la planta por luz roja es capaz de inducir el establecimiento de la capacidad autotrófica, entendida como la capacidad de asimilación de carbono que se acompaña de un incremento en la actividad de varias enzimas participantes del ciclo de Calvin, como son ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa (21,22,52), ribulosa-5-fosfato cinasa (21,22), fuctosa-1,6-bifosfatasa (21,22,73) y NADP-Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (21,22,32); de varias implicadas en el ciclo C que son piruvato ortofosfato dicinasa (21,52,72), NADP-⁴málico deshidrogenasa (22,74), NADP-málico deshidrogenasa descarboxilante (22,27,74), adenilato cinasa (21,52), pirofosfatasa (52) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (12,20-26, 52,75). Este incremento se acompaña de un aumento en los niveles de ARN mensajero específico, como se ha demostrado para NADP-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (28,46), piruvato ortofosfato dicinasa (28,50), NADP-málico deshidrogenasa descarboxilante (27) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (28,73); y en la cantidad de proteína específica, como ha sido demostrado

para las enzimas ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa (24,29,76), fructosa-1,6-bifosfatasa (72), NADP-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (24,29,76), NADP-málico deshidrogenasa descarboxilante (27) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (23-26). Estos efectos son revertidos por pulsos de luz roja lejana indicando la participación de fitocromo (21,28,29).

Con respecto a PEPC la forma de la enzima cuya síntesis es inducida durante el proceso de enverdecimiento de plantas C₄ etioladas expuestas a la luz es la que posee las características de la isoforma fotosintética, tanto en el caso de maíz (20), como también en el de sorgo (23,26).

Poco se sabe acerca del mecanismo molecular a través del cual fitocromo es capaz de transducir la señal luminosa, aunque se ha reportado que: i) incrementa la degradación del ARN mensajero que codifica para el fitocromo mismo (71); ii) estimula la transcripción en núcleos aislados (29) y, iii) media respuestas en organelos aislados, siendo en apariencia las membranas el sitio de acción de este fotorreceptor (77,78). Es por esto que se han propuesto varios mecanismos para explicar su participación en la regulación por luz de la expresión genética, pero ninguno de ellos está a la fecha apoyado por suficiente evidencia experimental (79).

3.2 Regulación por el estado de activación de enzimas.

La necesidad de mecanismos de regulación de la actividad enzimática por la luz a corto plazo surge de la ausencia relativa de compartimentalización en el citoplasma y dentro del cloroplasto, que separe a las enzimas degradativas de las enzimas fotosintéticas, las cuales, de funcionar simultáneamente darían lugar a la generación de ciclos inútiles, con el consecuente desperdicio de energía, esqueletos carbonados, nitrógeno, etc. que esto supone (80). Por esto, no es sorprendente encontrar que además de regular la expresión genética, la luz puede regular la actividad enzimática a nivel post-traducciona (29,80,81). Algunas respuestas dependientes de luz azul o de luz roja que no están ligadas a la expresión genética podrían ser de este tipo (29,72,82). Sin embargo, los mecanismos de regulación de la actividad enzimática mejor estudiados son fosforilación-desfosforilación de proteínas dependiente de la fotofosforilación, y oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo el que a su vez depende de la cadena de transporte de electrones. Ambos procesos están activos bajo condiciones de iluminación y capaces de modular *in vitro* e *in vivo* la actividad de un número considerable de enzimas de cloroplasto involucradas en el ciclo de Calvin (80,83-85) y ruta C₄ (80,81,86-89), así como enzimas cloroplásticas y citoplasmáticas que participan en la glucólisis (81,84,90) y el ciclo de las pentosas fosfato (80,81,91). Estos dos mecanismos se describen a continuación en relación con la regulación de dos de las principales enzimas del metabolismo C₄. Dado que dichos mecanismos producen una modificación estructural relativamente estable de las enzimas, la cual va ligada a un

cambio en la actividad, no deben confundirse con los efectos regulatorios de la luz mediados por cambios en la concentración de metabolitos, pH y/o iones.

3.2.1 Enzimas cuya regulación por luz ha sido descrita.

3.2.1.1 Piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK)

Esta es, a la fecha, la única enzima fotosintética para la cual está demostrado que se regula *in vivo* por un mecanismo de fosforilación-desfosforilación. Esta proteína puede encontrarse en una forma fosforilada inactiva presente durante la noche y en una forma no fosforilada activa que está presente durante el día (89,92,93). Se ha identificado además una proteína capaz de catalizar la fosforilación de esta enzima (93-95) utilizando ADP como sustrato (89,92) y requiriendo bajas concentraciones de ATP como efector alostérico (89,96). La misma proteína es también capaz de llevar a cabo la desfosforilación de la PPDK fosforilada y al parecer esta actividad es dependiente de fosfato inorgánico (89,92,93,97).

Este mecanismo de regulación de la actividad enzimática por fosforilación-desfosforilación regulada por luz podría ser más general, puesto que se ha reportado, que algunas cinasas de cloroplasto de plantas C₃ son capaces de fosforilar *in vitro* en presencia de luz, a polipéptidos no identificados (98,99). Y por otra parte, Nimmo y colaboradores, trabajando con PEPC de plantas CAM, han aportado datos experimentales que sugieren que dicho mecanismo podría ser operante también en citoplasma (100).

3.2.1.2 Máfico deshidrogenasa dependiente de NADP.

Esta es una enzima del estroma de cloroplasto de las células de mesófilo que presenta un estado inactivo (con ciertos grupos sulfhidrilo oxidados) que se encuentra in vivo durante la noche y un estado activo (con los grupos sulfhidrilos antes mencionados en estado reducido) presente durante el día (87,93,101,102). Más conocido y mejor estudiado que el anterior, el mecanismo de oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo da lugar a la regulación por luz de la actividad in vivo de un número considerable de enzimas tanto cloroplásticas como citoplásmicas que sufren un cambio estructural reversible, ligado al cambio de sus características cinéticas, cuando ciertos puentes disulfuro específicos de la proteína son reducidos a sulfhidrilos (Fig.3B, ref.80). Se han aislado proteínas solubles llamadas tiorredoxinas tanto en especies C₃ (66,80,90,103), como de especies C₄ (103), presentes en cloroplasto y también en citoplasma y que contienen grupos sulfhidrilo de potencial redox muy negativo siendo por tanto, capaces de reducir in vitro con cierta especificidad, los puentes disulfuro responsables del control de la actividad de varias enzimas de las que se sabe que están sujetas in vivo a este mecanismo regulatorio (80,103). Las tiorredoxinas pueden a su vez, ser reducidas in vitro en presencia de luz, por preparaciones crudas de la enzima tiorredoxina-reductasa dependiente de ferredoxina obtenidas de organismos fotosintéticos (80). Se han aislado además sistemas membranales capaces de reducir in vitro en presencia de luz varias de las enzimas reguladas por oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo (fig. 3A, ref.81,88). Estos sistemas membranales

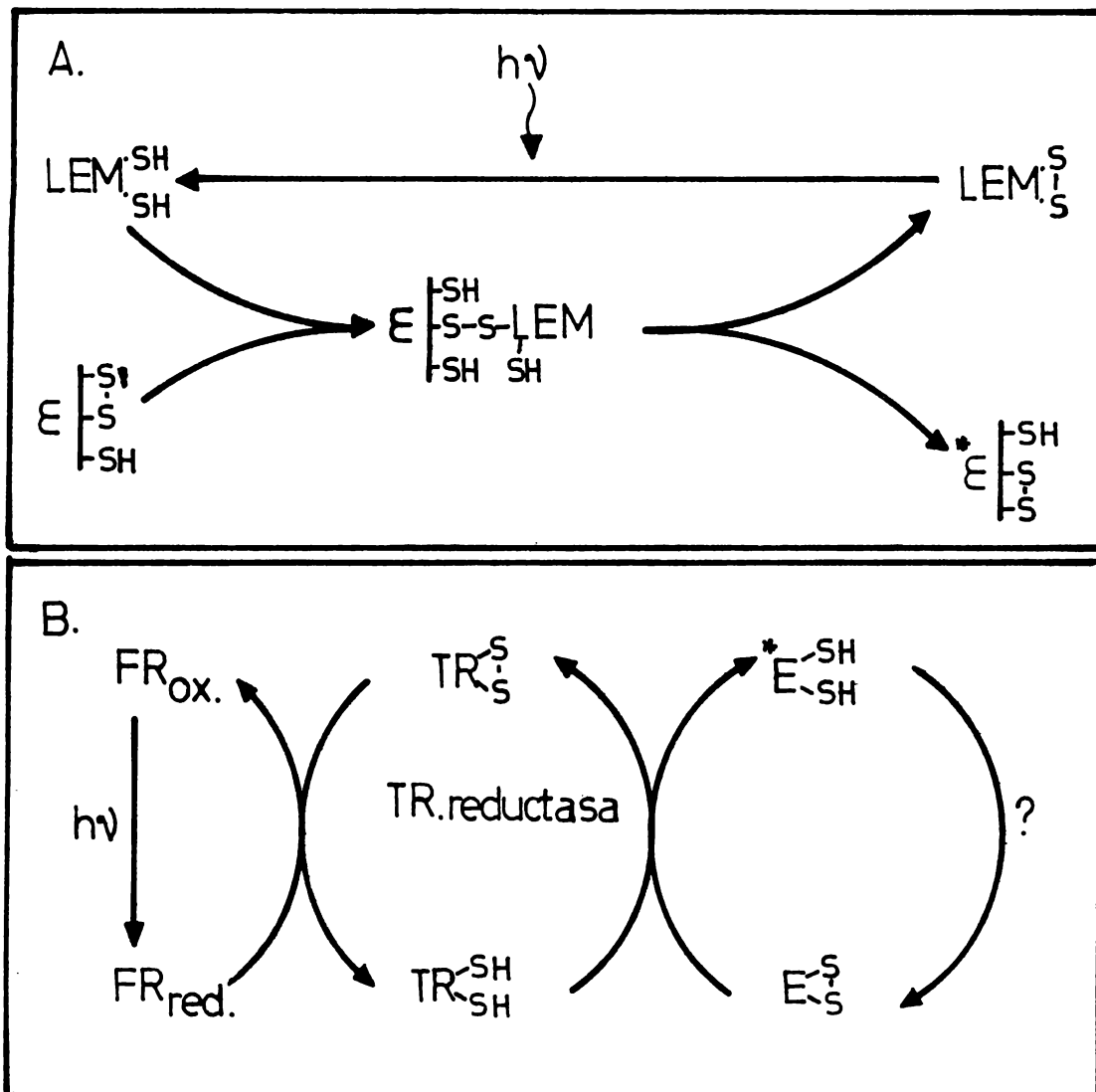


Figura 3. Mecanismos propuestos para explicar el mecanismo molecular de regulación de la actividad enzimática por oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo. A. mecanismo propuesto por Anderson (81). LEM. proteína mediadora del efecto reductor de la luz; E. Enzima oxidada, forma de noche; E*. Enzima reducida, forma de día. B. Mecanismo propuesto por Buchanann (80). FR. Ferredoxina; TR. Tiorredoxina; E y E* igual que en la parte A.

llamados LEMs (Light Effect Mediators) podrían ser también operantes en la regulación in vivo de dichas enzimas, no habiéndose aclarado aún si ambos mecanismos operan in vivo simultáneamente ya sea en forma conjunta o independiente (104).

3.2.2 Enzimas cuya regulación por luz no ha sido aún dilucidada.

3.2.2.1 Malato deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP.

Esta es una enzima del estroma de cloroplasto de vaina vascular responsable de la descarboxilación de la mayor parte del malato que proviene del mesófilo, al menos en maíz (11,12,104). Hasta la fecha no hay reportes en la literatura de que esta enzima obtenida de planta C sufra cambios en sus propiedades moleculares como consecuencia de la iluminación. La regulación de su actividad podría más bien ejercerse a través de los cambios en la concentración de sustrato, cofactor y/o pH que ocurran en el estroma del cloroplasto al pasar de luz a oscuridad o viceversa.

Se sabe que el pH óptimo de esta enzima es 7.5, y que a este pH la enzima presenta inhibición por exceso de sustrato. Sin embargo, esta inhibición disminuye de modo gradual a medida que el pH se incrementa. El resultado de ambos fenómenos actuando simultáneamente es un cambio en el pH óptimo a concentración elevada de sustrato (74). Esta propiedad podría constituir un mecanismo regulatorio por luz (12), ya que el pH del estroma del cloroplasto oscila entre 7.5 (en oscuridad) y 8.2 (bajo intensa iluminación) (105). Puesto que las concentraciones de malato existentes en el estroma del cloroplasto de vaina vascular no han

no han sido determinadas todavía, no es posible concluir si dicho mecanismo es o no realmente operante in vivo. Por otra parte, se ha demostrado que los cloroplastos aislados de células de vaina vascular de maíz descarboxilan (4- C) malato con lentitud, tanto en luz como en oscuridad, a no ser que se les suministre un sustrato exógeno como 3-PGA. Este hecho indica que la iluminación no es el factor responsable de la regulación de la actividad de esta enzima en forma directa, sino que la actividad de esta enzima se coordina con las actividades que consumen NADPH, posiblemente, a través de la disponibilidad del cofactor oxidado (11,105). Esto no es sorprendente, en virtud de que el cloroplasto de vaina vascular es deficiente en fotosistema II y, por tanto, una parte importante del poder reductor empleado en este organelo durante fotosíntesis proviene de la descarboxilación oxidativa de malato (11). Otros autores han propuesto, además, que los niveles de fructosa-1,6-difosfato, que es un inhibidor alostérico de esta enzima, podrían tener un efecto regulatorio de su actividad in vivo (107,108). Sin embargo, dado que se ha reportado que las concentraciones de fructosa-1,6-difosfato, así como las de otros azúcares fosfato, se incrementan durante los periodos de luz (42,109,110), es poco probable que éste sea un factor regulatorio in vivo.

3.2.2.2 Fosfoenolpiruvato carboxilasa.

La acción concertada de la luz sobre la actividad de las enzimas PPDK y MDH-NADP, ya antes discutida, parecería ser suficiente para explicar la regulación noche-día de la sección de la ruta C que tiene lugar en la célula de mesófilo. No obstante,

deben tenerse en cuenta los siguientes hechos:

i) La reacción catalizada por PEPC es prácticamente irreversible bajo las condiciones imperantes en la célula. Por tanto esta enzima actúa virtualmente como una bomba capaz de canalizar su sustrato hacia la formación de malato y/o aspartato, moléculas que actúan como transportadoras del CO₂ a las células de vaina vascular. Debido a que no existe reacción inversa, cuando el producto no es requerido en esta ruta metabólica (recuérdese que la fijación de CO₂ está detenida durante la noche. cfr. ref. 40,42-44), la bomba debe ser apagada para evitar una acumulación de intermediarios (OAA, malato y aspartato).

ii) PEP el sustrato de PEPC es un metabolito central en el metabolismo general de las plantas (111) (fig. 4), siendo glucólisis una de las rutas más importantes en que participa. En varias plantas C₄ se ha demostrado que las enzimas glucolíticas enolasa y piruvato cinasa, cuyo sustrato es PEP, se encuentran, al igual que PEPC, en el citoplasma (112), y si bien, hay reportes sobre la existencia de isoenzimas con estas actividades en el cloroplasto (112,113), en plantas C₄, estas parecen ser minoritarias (59). Por tanto, durante la noche cuando la producción de PEP vía PPDK se detiene (PPDK se encuentra inactiva en la oscuridad cfr. 2.2.1.1), PEPC podría competir por el mismo sustrato con las enzimas glucolíticas, que sí están activas durante los períodos de oscuridad. Dada la gran cantidad de PEPC presente en mesófilo de plantas C₄ [se ha reportado que constituye hasta el 15% de la proteína total soluble de la hoja en este tipo de planta (114-116)], que se traduce en una elevada capacidad catalítica [su velocidad máxima en extractos crudos de

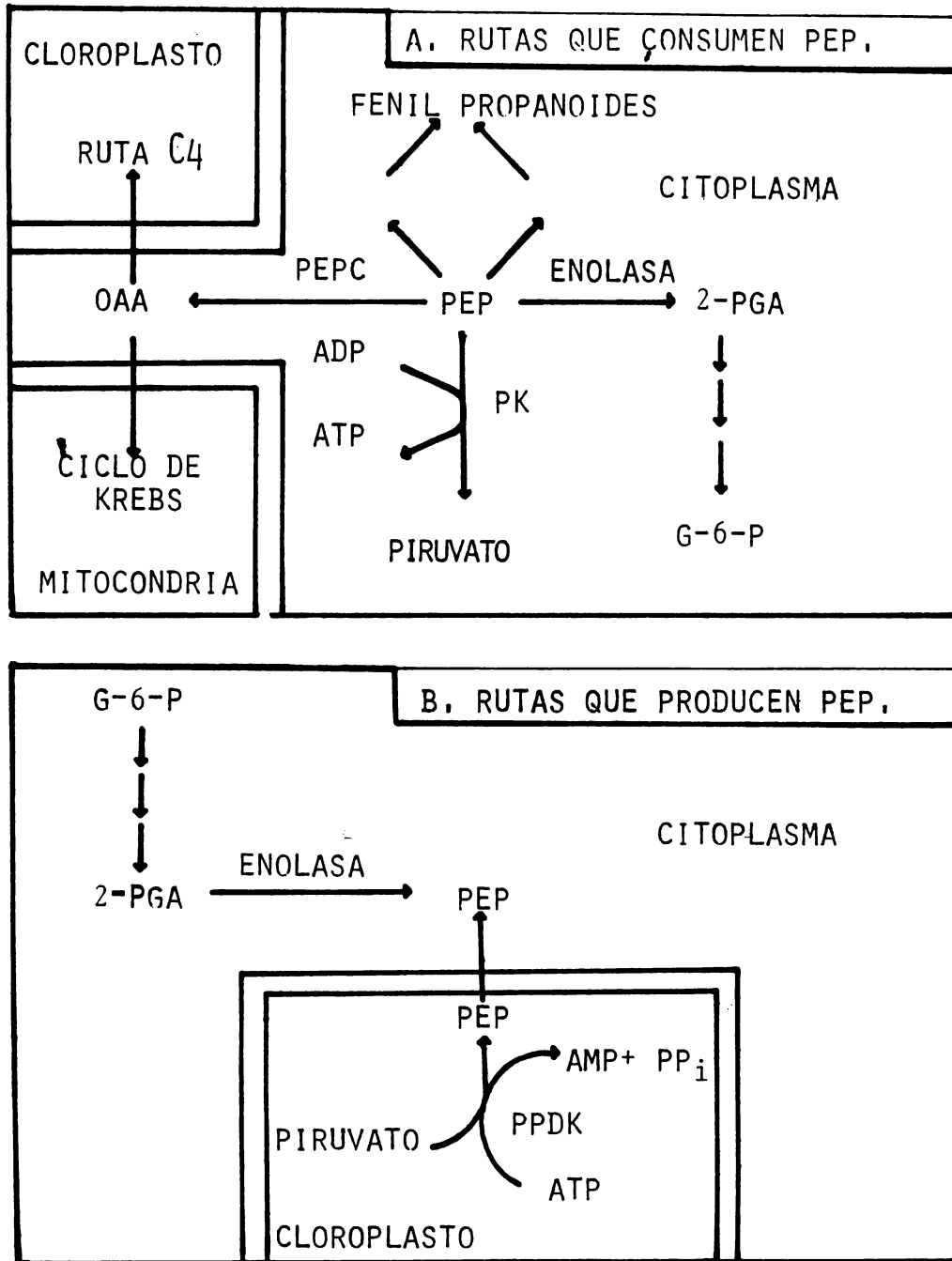


Figura 4. esquema de las rutas metabólicas que consumen (parte A) y que producen (parte B) fosfoenolpiruvato (PEP) en el metabolismo de las plantas C₄.

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

maíz, es aproximadamente diez veces superior a la isoforma no fotosintética presente en hojas de plantas C₃. (117,118)1, sería de esperar que en caso de que esta enzima tuviera acceso al PEP citoplásmico producido por glicólisis interfiriera de manera notable con el funcionamiento de esta importante ruta metabólica constituyendo una ruta alternativa de consumo de carbohidratos que reporta menor ganancia de energía y que además, produce acumulación de intermediarios del ciclo de Krebs (fig. 5).

La existencia de una regulación por luz a corto plazo de esta enzima fue reportada como ya se ha mencionado (ver introducción) por Karabourniotis y col., para varias plantas C₄ (36,37) y por Iglesias y Andreo para maíz (39), cuando este trabajo se encontraba en proceso. Sin embargo, los primeros no fueron capaces de detectar ningún cambio en la enzima extraída de hojas de plantas de maíz mantenidas en luz o en oscuridad, generando así serias dudas sobre el reporte de Iglesias y Andreo (que es de suyo poco concluyente) y sobre la necesidad de una regulación de la actividad de PEPC in vivo, ya que parece no ser un fenómeno de ocurrencia general en plantas C₄.

Iglesias y Andreo en su estudio con PEPC de hoja de maíz (39) proponen un mecanismo de regulación de la actividad de esta enzima basado en la oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo de la proteína, apoyados en el hecho de que tras la incubación de un extracto crudo, obtenidos de hojas mantenidas en oscuridad, con DTT, la actividad de PEPC se incrementa hasta los valores que obtuvieron cuando el extracto fue obtenido de hojas preiluminadas, sobre el que además, DTT no tenía ningún efecto. Karabourniotis y col. (36,37,38) proponen un mecanismo similar

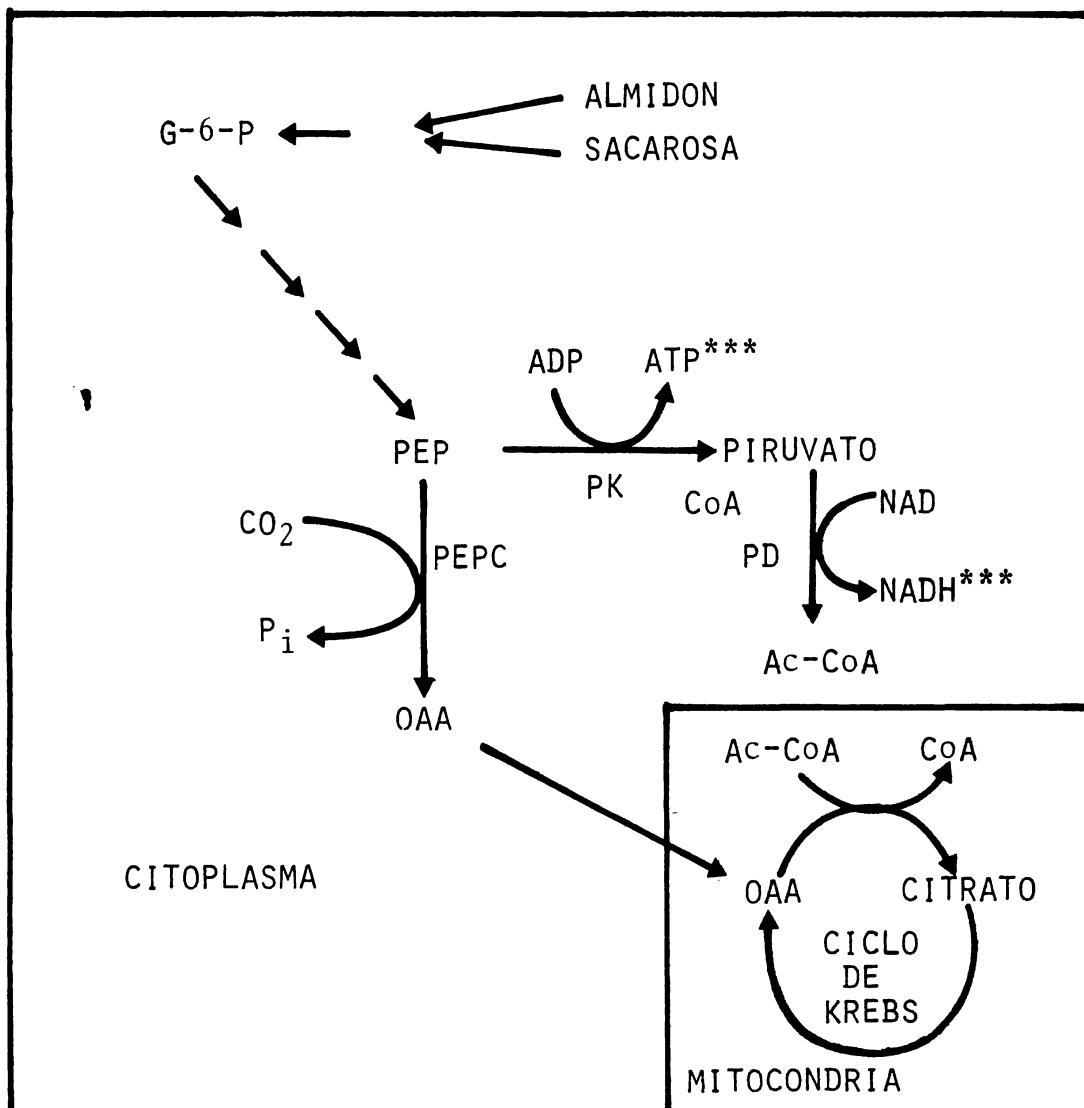


Figura 5. Esquema que ilustra la competencia que se presentaría si tanto glucólisis como PEPC estuvieran activas al mismo tiempo, con acceso a la misma poza metabólica de PEP.

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

para la regulación por luz de la actividad de PEPC en aquellas especies C⁴ en que la detectaron. Más aún, estos autores reportan que el tratamiento de las hojas iluminadas con DCMU (un inhibidor de la cadena de transporte de electrones) anula la fotoactivación de PEPC y concluyen de esta observación que el sistema de transporte de electrones del cloroplasto debe estar implicado en el mecanismo de regulación probablemente, porque provee los equivalentes de reducción que finalmente producirían la activación de PEPC al reducir un puente disulfuro específico. Sin embargo, ninguna de las pruebas aportadas son con mucho concluyentes y por otro lado, en las especies CAM, en las que PEPC también posee una función fotosintética, se ha demostrado de manera clara que la regulación de esta actividad por luz se realiza a través del paso de la forma de noche que es un tetrámero activo, a una forma dimerica inactiva presente durante el día. La inactivación, en este último caso, procede a través de una disociación inducida por un incremento en los niveles de malato (uno de los inhibidores más importantes de esta enzima) y un descenso en el pH citoplásmico (34,120). Puesto que, a pesar de pertenecer a grupos de plantas diferentes, las propiedades moleculares de PEPC de hoja de plantas C⁴ y CAM no parecen diferir notablemente [inmunológicamente presentan reactividad cruzada (23,26,119)], no resulta ilógico pensar que este mecanismo de regulación pudiera operar también en plantas C⁴. En vista de estos antecedentes creimos de interés reinvestigar si de hecho existe esta regulación por luz de PEPC en maíz y el mecanismo molecular por el que se lleva a cabo en caso de existir.

HIPOTESIS DE TRABAJO.

Se plantea como hipótesis de trabajo que el estado de activación de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz se encuentra regulado por la luz, de tal manera, que está activa durante el día y parcial o totalmente inactiva durante la noche.

METAS:

1. Determinar los niveles en hoja completa de maíz de los metabolitos más relevantes de la sección de la ruta C que tiene lugar en las células de mesófilo (es decir malato, fosfoenolpiruvato, OAA y piruvato) durante un ciclo luz-obscuridad, con el fin de obtener una indicación sobre el funcionamiento in vivo de PEPC durante este periodo.

2. Determinar las características cinéticas de PEPC en extractos de hojas de plantas mantenidas en luz o en obscuridad.

3. En el caso de que fuese posible detectar diferencias entre la enzima extraída bajo condiciones de iluminación y la extraída bajo condiciones de obscuridad, investigar si alguno de los dos mecanismos moleculares de regulación de actividad enzimática por luz conocidos (oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo, o fosforilación-desfosforilación de la molécula protéica), está operando en el caso de PEPC.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

1. Se determinarán los niveles totales de piruvato, fosfoenolpiruvato y malato en hoja completa durante un período de 12 horas de luz y las siguientes 12 de obscuridad. (Los niveles de OAA no serán determinados debido a que la inestabilidad de este metabolito hace poco confiables las medidas de su contenido.)

2. Se investigarán las diferencias cinéticas de PEPC usando diferentes condiciones de extracción y de medida de la actividad. Los parámetros a determinar serán Km y Vmax para PEP. Con el fin de evitar, en la medida de lo posible, los cambios en el estado de activación de la enzima presente in vivo, que pudieran ocurrir como consecuencia de la extracción, tanto ésta como el desalado inmediato, se realizarán en el menor tiempo posible.

3. Se estudiará el efecto que sobre estas diferencias cinéticas tenga la adición de agentes reductores de puentes disulfuro (DTT y 2-mercaptoetanol) o de inhibidores de las actividades de fosfoproteína fosfatasa (F Na₄ y/o Mo O₄ Na₄).

DISCUSION DE RESULTADOS.

Artículo I.

Estudios sobre la actividad in vivo de fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz bajo condiciones de luz y de obscuridad.

Con el fin de obtener una indicación de la actividad in

in vivo de PEPC en hojas verdes de maíz, se midieron los niveles totales en hoja completa de los intermediarios metabólicos de la sección de la ruta C que se lleva a cabo en mesófilo, es decir, piruvato, fosfoenolpiruvato y malato. La gran inestabilidad de oxalacetato hace poco confiable su cuantificación, por lo que no se incluyó en este estudio. Los cambios en la concentración de estos intermediarios al variar las condiciones de iluminación a las que se somete a la planta, reflejan los cambios en la actividad de las enzimas implicadas en su formación y/o transformación. Debido a que el funcionamiento de la ruta C requiere una organización anatómica y estructural compleja que implica a dos tipos de células y a diferentes compartimentos celulares dentro de estas (Fig. 2), no es posible medir los niveles de estos metabolitos presentes in vivo bajo condiciones fisiológicas en células de mesófilo aisladas (protoplastos), puesto que el procedimiento de aislamiento altera de forma inevitable su metabolismo fotosintético. Recientemente, se han reportado técnicas de aislamiento rápido que permiten medir las pozas de metabolitos en los diferentes tipos de células (121,122). Sin embargo, dado que las reacciones que consumen fosfoenolpiruvato, incluyendo la catalizada por PEPC, son citoplásmicas, no sería posible distinguir la poza de PEP que se metaboliza vía glucólisis de la que se metaboliza vía PEPC, aún cuando midieramos la concentración de este metabolito en citoplasma. Por ello, para la interpretación de los resultados obtenidos hubo que basarse en los siguientes hechos: i) durante el día la ruta C es la operante en hoja y por lo tanto, los metabolitos medidos están siendo formados y transformados por las

enzimas integrantes de esta ruta metabólica. En cambio, durante los periodos de obscuridad, el flujo de metabolitos a través de esta ruta se detiene (11-13) y predominan la glucólisis y el metabolismo oxidativo (90,91,123,124)y, ii) si bien los niveles de metabolitos fueron determinados en hoja completa, lo que incluye a células de mesófilo y de vaina vascular en el caso de maíz, dado que las células de mesófilo son mayoritarias (128), podemos considerar que los cambios en los niveles de metabolitos que puedan observarse durante los periodos de luz o de obscuridad o durante las transiciones luz-obscuridad y viceversa, pueden correlacionarse con los cambios que tienen lugar en mesófilo y que por tanto, constituirán buenos indicadores de la actividad in vivo de PEPC.

Los niveles de piruvato se incrementan rápidamente en forma notable durante los primeros minutos de obscuridad(fig.1B Art.I), lo que parece indicar que se sigue produciendo (la enzima málica dependiente de NADP sigue activa al menos durante ese corto periodo) y que al mismo tiempo, su consumo se detiene [PPDK se inactiva rápidamente en obscuridad (93)]. El descenso posterior en la concentración de este metabolito puede deberse a la operación del metabolismo oxidativo, hasta que se alcanzan los niveles de estado estacionario en estas condiciones. Los niveles de PEP, por el contrario permanecen constantes, independientemente de que las plantas se hallen expuestas a la luz o a la obscuridad, aún cuando cabría esperar un descenso rápido y notable en la concentración de este metabolito, ya que su síntesis vía ruta C se detiene (93), como además, muestran

Los cambios en los niveles de piruvato que acabamos de discutir. Sin embargo, no se observó tal descenso (fig. 1A Art. I), lo que fuertemente sugiere que la enzima que consume PEP, es decir PEPC, se inactiva conjuntamente con PPDK. Aún cuando la concentración de PEP en el microambiente en donde se localiza PEPC no sea saturante, permitiendo así que su actividad se regule por cambios en la concentración de su sustrato, deberíamos poder detectar un descenso en la concentración de PEP antes de que la enzima ajuste su velocidad de catálisis a las nuevas condiciones, a no ser que exista cierto grado de inactivación de esta enzima. Los cambios opuestos serían de esperar en el paso de oscuridad a luz. Nuevamente, la ausencia de cambios en la concentración de PEP sugiere que existe una reactivación conjunta de PPDK y de PEPC.

PEP puede también ser formado vía glucólisis. Por tanto existe la posibilidad, de que el incremento en la producción de PEP por esta ruta metabólica al inicio del periodo de oscuridad pueda evitar el descenso en concentración producido por la inactivación de PPDK. Esta posibilidad no puede descartarse mediante la presente estrategia experimental, habría que determinar los flujos metabólicos de la ruta C y de glucólisis, así como su regulación por luz. A este respecto cabe cuestionarse si el citoplasma de una célula de mesófilo de maíz posee algún tipo de compartimentalización o canalización metabólica que permita a los intermediarios de la ruta C o de glucólisis permanecer dentro de la ruta en que se produjeron, es decir, si existen pozas separadas de intermediarios para ambas rutas. Si este fuera el caso, no existiría competencia entre PEPC y PPDK

por el sustrato PEP y por tanto, no sería necesaria una inactivación de PEPC durante los períodos de oscuridad, puesto que no tendría acceso a su sustrato, evitando así un desperdicio de este metabolito durante los periodos de oscuridad. Sin embargo, dicha compartimentalización no ha sido descrita hasta la fecha en tejidos vegetales. Por el contrario se ha reportado que 3-PGA puede inducir fijación de CO₂ en células, protoplastos y extractos de protoplastos de mesófilo de *Digitaria sanguinalis* (59), lo que claramente indica que el PEP generado por las enzimas glucolíticas puede ser un sustrato para PEPC in vivo. Por tanto, si no hubiera un fenómeno de inactivación de PEPC en la oscuridad, el PEP citoplasmático que se forma vía glucólisis (bajo condiciones de oscuridad) o vía ruta C₄ (bajo condiciones de luz) sería metabolizado por piruvato cinasa o PEPC de acuerdo a las características cinéticas de ambas enzimas, como ha discutido Davies (111). En el caso de células fotosintéticas de plantas tipo C₃ (que carecen de la ruta C₄, pero que poseen actividad de PEPC en citoplasma junto con piruvato cinasa), el reparto de PEP entre una y otra enzima podría regularse de esta forma, pero dada en mesófilo de planta C₃, la alta actividad de PEPC, esta enzima podría competir por el PEP con piruvato cinasa, consumiendo la mayor parte del sustrato durante los periodos de oscuridad. Esto sería perjudicial para la célula, en virtud de que esta vía de consumo de PEP reporta menor ganancia de energía que la glucólisis, además de conducir a acumulación de OAA y malato.

Con respecto a malato, se observa que las concentraciones de

este metabolito son superiores durante el periodo de luz, a las existentes durante el periodo de obscuridad (fig. 2 Art. I). Puesto que este metabolito es producido en la ruta C por la enzima cloroplástica de mesófilo NADP-MDH, que transforma oxaloacetato a malato, y esta enzima está activa sólo durante los periodos de iluminación, la disminución en la concentración de malato que se observa después de la transición luz-oscuridad es bastante acorde con lo que se podría esperar y probablemente se acompañe de un aumento en la concentración de DAA. Sin embargo, aún cuando no se pudieron determinar los niveles de este metabolito con suficiente confiabilidad, se encontró que no existen cambios en su concentración durante los primeros 15 minutos de oscuridad (datos que no se muestran). La evidencia anterior está igualmente apoyando la posibilidad de una inactivación rápida de PEP carboxilasa ya que la reacción catalizada por esta enzima es prácticamente irreversible. Debe considerarse además que la razón $\frac{\text{NADH}}{\text{NAD}^+}$ en ausencia de luz es tal, que la conversión de oxalacetato a malato por otras málico deshidrogenasas presentes en la célula no está favorecida (125) y por ello, PEPC debe producir cantidades muy bajas de DAA bajo estas condiciones, dado que su consumo es probablemente bastante menor en oscuridad.

En virtud de lo anteriormente expuesto y basándonos en los resultados obtenidos, consideramos efectivamente que PEPC está inactiva in vivo, durante los periodos de oscuridad.

Fotoactivación de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz.

Como un lógico primer paso en el estudio de la posible inactivación de la enzima PEPC de hoja de maíz durante la obscuridad, se determinó la actividad específica de la enzima en extractos crudos obtenidos bajo diferentes condiciones de extracción de hojas de plantas mantenidas en luz o en obscuridad durante un periodo previo. Se encontró que los valores del cociente de la actividad en el extracto de plantas iluminadas con respecto al extracto de plantas mantenidas en obscuridad fueron bastante constantes (ver tabla I Art. II), aún cuando hubo considerable variación en los niveles de actividad de PEPC extraída. El valor del cociente luz/obscuridad fue menor a uno cuando se empleó el procedimiento de extracción A, independientemente de que 2-mercaptoetanol estuviera o no presente en el medio de extracción. Este valor puede deberse a diferencias en la estabilidad de la enzima en ambos tipos de extractos, a pesar de la presencia en el medio de extracción de glicerol, que es un conocido agente estabilizante de la enzima (14), cuando se empleó el procedimiento de extracción B, el valor de este cociente fue cercano a uno ó incluso superior. En consecuencia, el procedimiento de extracción resultó ser un factor importante a considerar para la detección de la fotoactivación de PEPC, como habían señalado Karabourniotis y col. (36,37). Se eligió como más apropiado el procedimiento B, el cual se empleó para los estudios posteriores.

Propiedades cinéticas de PEPC en extractos crudos, desalados, rápidamente preparados a partir de hojas de maíz mantenidas en luz o en obscuridad durante un periodo previo a la extracción.

Los valores de K_m y V_{max} para PEP se determinaron en ambos tipos de extractos a partir de las gráficas de Lineweaver-Burk, las cuales se obtuvieron empleando un rango de concentraciones de PEP de 0.5 a 5 mM a pH 8.3 y de 2.5 a 40 mM a pH 7.0. Aún cuando los valores del coeficiente de correlación obtenido de los datos anteriores fueron mayores a 0.99, el valor de n calculado mediante la gráfica de Hill fue ligeramente superior a uno (variando entre 1.04 y 1.14; ver tabla 2. Art. II), este parámetro, seguramente refleja la cinética anormal de esta enzima en los extractos crudos cuando se ensaya a pH 7.0 y a concentraciones de sustrato inferiores a 2.5 mM. En la tabla 2 (Art. II), se muestra que el cociente entre las actividades a pH 7.0 medidas a 5 mM de PEP y a 1 mM de PEP (cociente 5/1), es en varios casos superior a 5. Dicho parámetro, que resultó ser muy útil para detectar las diferencias de la enzima de luz y de obscuridad, debería ser menor a 5 si la cinética de PEPC fuera de tipo Michaelis-Menten en este rango, sin embargo, la cinética de la enzima a este pH y en este rango de concentraciones es claramente anormal (ver fig. 1 Art. II.), siendo este fenómeno más evidente para los extractos de obscuridad. Poco se puede discutir sobre su significado fisiológico, ya que a bajas concentraciones de sustrato otras proteínas presentes en el extracto crudo pueden interferir con el ensayo y por esta razón, la naturaleza de este comportamiento, si es que sigue presentándose, deberá determinarse en estudios con enzima

purificada. Como se muestra en la tabla 2 (Art. II.), no hay diferencias evidentes entre los dos tipos de extractos en cuanto a los parámetros cinéticos de PEPC determinados a pH 8.3. En cambio, cuando las medidas se realizan a pH 7.0, la K_m de la enzima en los extractos de oscuridad es claramente superior al de la enzima en los extractos de luz, siendo igual la V_{max} en ambos casos. Estas diferencias en los valores de K_m indican la presencia de, al menos, dos formas interconvertibles de PEPC de hoja de maíz, una predominante durante el día y la otra mayoritaria durante los periodos de oscuridad. Si bien no se conocen reportes sobre los valores de pH del citoplasma de las células de mesófilo a lo largo del día, es de suponer que el valor fisiológico estará más cerca de 7.0 que de 8.3, y por tanto resulta factible que las diferencias detectadas en el valor de K_m a pH neutro para ambas condiciones de iluminación sean de relevancia fisiológica.

Como se ha indicado en el artículo anterior, la producción de PEP vía PFDK se detiene durante la noche, lo cual podría inducir a suponer que la poza de PEP disponible para PEPC disminuye durante la noche en la célula de mesófilo. A este respecto, Leegood y Furbank (42) han reportado que los niveles totales de PEP en hoja completa de maíz disminuyen notablemente durante los primeros minutos de oscuridad, es importante, sin embargo, hacer notar que el valor que estos autores reportan al tiempo cero de iluminación (después de que las plantas han sido mantenidas varias horas en oscuridad) es muy similar al que encuentran al tiempo cero de oscuridad. Este hecho y el de que

estos autores reporten pocas medidas que abarcan un corto periodo de tiempo, reduce la confiabilidad de sus datos, los cuales se contraponen a lo reportado en el artículo anterior, en el que se señala que no hay cambios en los niveles totales de este metabolito en hoja completa a lo largo del día. El hecho de que la forma de noche presente una menor afinidad por el sustrato, puede constituir un mecanismo regulatorio que permitiría explicar la considerable reducción en la fijación de CO₂ que se observa durante la noche (40,42-44) conjuntamente con otros factores, como podrían ser cambios en la concentración de activadores ó inhibidores de esta enzima que acompañen a los cambios en las condiciones de iluminación.

Efecto de agentes reductores de puentes disulfuro en la actividad extraíble de PEPC.

Karabourniotis y col. (37) reportaron que la inclusión en el medio de extracción para PEPC de un agente reductor de puentes disulfuro, tal como 2-mercaptoetanol, elimina las diferencias que ellos observaron en la actividad de esta enzima extraída de plantas C mantenidas en luz o en obscuridad. Sin embargo, los resultados que se presentan en la tabla 1 (Art. II.), muestran que no en todas las condiciones experimentales se detectó fotoactivación, en algunos casos, aún en ausencia de 2-mercaptoetanol. Por otro lado, Iglesias y Andreo (39) reportaron que el tratamiento de un extracto crudo obtenido de plantas mantenidas en obscuridad con DTT, producía un incremento en la actividad de la enzima hasta un nivel similar a aquel que encontraron en un extracto obtenido de plantas mantenidas en luz, sobre el que además, DTT no tenía ningún efecto. A fin de

confirmar este resultado y de comprobar si el mecanismo de la fotoactivación de esta enzima consistía en una reducción de uno ó varios puentes disulfuro, como estos dos grupos de investigadores proponían, se determinó la actividad de PEPC en extractos crudos, empleando el mismo protocolo experimental que Iglesias y Andreo (39). Sin embargo como se muestra en la tabla 3 (Art. II.), el tratamiento con DTT produce sólo ligeros incrementos de actividad de PEPC en algunos casos, en tanto que, produce ligeros descensos en otros, Además, ambos tipos de extractos (de plantas tratadas con luz ó oscuridad) mostraron un comportamiento similar. El hecho de que la incubación con DTT incremente la actividad de PEPC podría indicar que existe una cierta población de moléculas en un estado oxidado inactivo susceptible de reactivación. A este respecto, la existencia de grupos sulfhidrilo en la enzima cuya reacción con agentes bloqueantes específicos conlleva a una inactivación de la proteína ha sido reportada anteriormente en estudios realizados *in vitro* con enzima de hoja de maíz (39,126,127) y de otras especies (38). De cualquier manera, ya sea que la enzima sufre oxidación parcial durante la extracción, o que una proporción variable de moléculas se encuentra en un estado oxidado *in vivo*, los resultados obtenidos señalan que no existe relación entre la regulación por luz de esta actividad enzimática y el estado redox de estos grupos sulfhidrilo. Por otro lado, los descensos en la actividad de PEPC también observados pueden indicar que existen puentes disulfuro cuya reducción por DTT conduce a inactivación. De hecho, se ha reportado la presencia de dos puentes disulfuro

por molécula de PEPC en un estudio sobre la enzima purificada de hoja de maíz (39). Una explicación alternativa a esta inactivación de PEPC, observada tras incubación con DTT, sería la de que en los extractos existe algún factor inactivante de esta enzima, activable a su vez por DTT. Sea cual sea la verdadera hipótesis, se muestra en la figura 2 (Art. II.) que los extractos crudos son estables en presencia de 50 mM DTT en comparación con los extractos desalados, lo que parece indicar la presencia en aquellos de un compuesto de bajo peso molecular capaz de proteger a PEPC. Se observa, además, que la actividad de PEPC se pierde más rápidamente en los extractos desalados obtenidos de plantas en luz, tratados con DTT. Estas diferencias en estabilidad pudieran explicar el diferente comportamiento reportado por Iglesias y Andreo (39) para los extractos de plantas mantenidas en luz ó en obscuridad. Un apoyo adicional a la conclusión expresada anteriormente de que la oxidación de los grupos sulfhidrilo de PEPC de hoja de maíz no está implicada en la regulación por luz de su actividad, viene dada por los resultados que se muestran en la tabla 4 (Art. II.) como puede observarse la incubación de los extractos con DTT no modifica las diferencias encontradas en el cociente 5/1, el cual como se ha mencionado, permite detectar las diferencias cinéticas de la actividad de PEPC en ambos tipos de extractos.

Efecto de los inhibidores de fosfoproteína fosfatasa en la actividad extraíble de PEPC.

Nimmo y col. (100) han reportado que la fosforilación de la forma de obscuridad de PEPC de la planta CAM *Bryophyllum fedtschenkoi* pudiera estar implicada en la modulación por la luz

del estado de activación de esta enzima in vivo. Trantando de invistigar si un mecanismo regulatorio de este tipo media la regulación por luz a corto plazo de la enzima de maíz, se determinó la actividad de PEPC en ambos tipos de extractos, es decir luz y oscuridad, con la inclusión de Na F (30 mM) y Na MoO_4 (30 mM) en el medio de extracción, ya que ambos compuestos son inhibidores conocidos de la actividad de fofoproteína fosfatasa y por tanto, capaces de evitar la posible defosforilación que pudiera sufrir PEPC durante la extracción, en caso de que este mecanismo fuese operante. Los resultados que se muestran en la tabla 5 (Art. II.), sugieren que este no es el caso, ya que no se encontraron diferencias entre los extractos que se realizaron en la presencia de Na Cl (el cual se añadió para igualar la fuerza iónica) y los extractos hechos en presencia de los inhibidores ya mencionados, en cuanto a los parámetros cinéticos determinados. Además, las diferencias luz-obscuridad están aún presentes lo que parece indicar que, de existir una fosforilación de esta enzima, esta no está relacionada con la regulación luz-obscuridad de la actividad de la misma.

CONCLUSIONES.

En base a los resultados anteriores, se puede concluir:

- 1) La actividad in vivo de la enzima PEPC de hoja verde de maíz, está sujeta a regulación noche-día.
- 2) Dicha regulación, Probablemente, no está mediada por una modificación covalente de la proteína que implique

oxidorreducción de grupos sulfhidrilo, ó fosforilación-desfosforilación; sino, tal vez, por un cambio en la conformación y/o en el estado de agregación de la proteína. Variaciones en la concentración de PEP, protones y/o efectores varios pueden tener lugar en la vecindad de esta enzima al pasar la planta de condiciones de luz a condiciones de obscuridad, lo que podría disparar el mecanismo molecular de conversión de la forma de día a la forma de noche de PEPC y viceversa, en forma semejante a lo reportado para la enzima de hoja de plantas CAM (34).

Finalmente, cabe mencionar que los mecanismos moleculares que median la regulación por luz de la actividad de PEPC de hoja verde de maíz podrían posiblemente elucidarse mediante el estudio de las propiedades moleculares de esta enzima empleando la proteína purificada, aspecto que escapa a los propósitos del presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Kluge, M. 1983. The role of phosphoenolpyruvate carboxylase in C4-photosynthesis and Crassulacean acid metabolism. *Physiol. Veg.* 21(5):817-825.
2. Brulfert, J., Kluge, M. y Queiroz, O. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase a key-enzyme in plants. *Physiol. Veg.* 21(5):803-804.
3. Latzko, E. y Kelly, G.J. 1983. The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C3 plants. *Physiol. Veg.* 21(5):805-815.
4. Guern, J., Mathiew, Y. y Kurkdjian, A. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and the regulation of intracellular pH in plant cells. *Physiol. Veg.* 21(5):855-866.
5. Willmer, C.M. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and stomatal operation. *Physiol. Veg.* 21(5):943-953.
6. Schnabl, H. 1983. The key role of phosphoenolpyruvate carboxylase during the volume change of guard cell protoplasts. *Physiol. Veg.* 21(5):955-962.
7. Thorpe, N. 1983. The role of phosphoenolpyruvate carboxylase in the guard cell of *Commelina cyanea*. *Plant. Science. Lett.* 30:331-338.
8. Haschke, H.P. y Luttge, J. 1975. Stoichiometric correlation of malate accumulation with auxin-dependent K⁺-H⁺ exchange and growth in avena coleoptile segments. *Plant. Physiol.* 56:696-698.
9. Popp, M., Osmond, C.B., Summons, R.E. 1982. Pathway of malic acid synthesis in response to ion uptake in wheat and lupin roots: evidence from fixation of 14-C and 13-C. *Plant. Physiol.* 69:1289-1292.
10. Coombs, J. 1979. Enzymes of C4 metabolism. En: *Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series.* ed. M. Gibbs y E. Latzko. 6:251-262. Springer. New York.
11. Hatch, M.D. y Osmond, C.B. 1976. Compartmentation and transport in C4 photosynthesis. En: *Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series.* ed. M. Gibbs y E. Latzko. 3:144-184. Springer. New York.
12. Hatch, M.D. 1978. Regulation of enzymes of C4 metabolism. En: *Current topics in cellular regulation.* 14:1-27. Academic press. U.S.A.

13. Ray, T.B. y Black, C.C. 1979. The C4 pathway and its regulation. En: Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series. ed. M. Gibbs. y E. Latsko. 6:77-99. Springer. New York.
14. O'Leary, M.H. 1982. Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's view. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33:297-315.
15. Brulfert, J. y Glóciú, S. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a control point for photoperiodism in Crassulacean acid metabolism. *Physiol. Veg.* 21(5):987-995.
16. Kluge, M. 1983. The role of phosphoenolpyruvate carboxylase in C4-photosynthesis and Crassulacean acid metabolism. *Physiol. Veg.* 21(5):817-825.
17. Osmond, C.B. 1978. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29:379-414.
18. Osmond, C.B. y Haltum, J.A.M. 1981. Crassulacean acid metabolism En: *The Biochemistry of Plants*. ed. P.F. Stumps y E.E. Conn. 8:283-328. Academic Press. New York.
19. Ting, I.P. 1985. Crassulacean acid metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 36:595-622.
20. Deleens, E. y Brulfert, J. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase capacity and establishment of autotrophy in maize seedlings. *Physiol. Veg.* 21(5):827-834.
21. Graham, D., Hatch, M.D., Slack, C.R. y Smile, R.M. 1970. Light-Induced formation of enzymes of the C4-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis in detached leaves. *Phytochem.* 9:521-532.
22. Kobayashi, H., Asami, S. y Akazawa, T. 1980. Development of enzymes involved in photosynthetic carbon assimilation in greening seedlings of maize (*Zea mays*). *Plant. Physiol.* 65:198-203.
23. Vidal, J. Godbillon, G. y Gadal, P. 1983. Influence of light on phosphoenolpyruvate carboxylase in sorghum leaves II. Immunochemical study. *Physiol. Plant.* 57:124-128.
24. Hague, D.R. y Sims, T.L. 1980. Evidence for light-stimulated synthesis of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of maize. *Plant Physiol.* 66:505-509.
25. Hayakawa, S., Matsunaga, K. y Sugiyama, T. 1981. Light induction of phosphoenolpyruvate carboxylase in etiolated maize leaf tissue. *Plant. Physiol.* 67:133-138.
26. Vidal, J., Cretin, C. y Gadal, P. 1983. The mechanism of photocontrol of phosphoenolpyruvate carboxylase in sorghum leaves. *Physiol. Veg.* 21(5):977-986.

27. Collins, P.D. y Hague, D.R. 1983. Light-stimulated synthesis of NADP-malic enzyme in leaves of maize. *J. Biol. Chem.* 258(6):4012-4018.
28. Tobin, E.M. y Silverthorne, J. 1985. Light regulation of gene expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 36:569-593.
29. Schopfer, P. 1977. Phytochrome control of enzymes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 28:223-252.
30. Brulfert, J., Arracaba, M.C. y Guerrier, O. 1979. Changes in the isoenzymatic pattern of phosphoenolpyruvate carboxylase. An early step in photoperiodic control of Crassulacean acid metabolism level. *Planta* 146:129-133.
31. von Willeret, D.J. y von Willert, K. 1979. Light modulation of the activity of the phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants in the Mesembryanthaceae. *Z. Pflanzenphysiol.* 95:43-49.
32. Brulfert, J., Muller, D., Kluge, M. y Queroz, O. 1982. Photoperiodism and Crassulacean acid metabolism I. Immunological and kinetic evidences for different patterns of phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in photoperiodically inducible and non-inducible Crassulacean acid metabolism. *Planta.* 154:326-331.
33. Winter, K. 1982. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in rapidly prepared desalted leaf extracts of the Crassulacean acid metabolism plant Mesembryanthemum crystallinum L. *Planta.* 154:298-308.
34. Wu, M.-X. y Wedding, R.T. 1985. Diurnal regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from Crassula. *Plant. Physiol.* 77:667-675.
35. Queiroz, O. 1979. CAM: Rhythms of enzyme capacity and activity as adaptative mechanisms. En: Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series. ed. M. Gibbs y E. Latsko. 6:126-139. Springer. New York.
36. Karabournitis, G., Manetas, Y. y Gavalas, N.A. 1985. Detecting photoactivation of Phosphoenolpyruvate carboxylase in C4 plants. An effect of pH. *Plant. Physiol.* 77:300-302.
37. Karabourniotis, G., Manetas, Y. y Gavalas, N.A. 1983. Photoregulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in Salsola soda L. and other C4 plants. *Plant. Physiol.* 73:735-739.
38. Manetas, Y. y Gavalas, N.A. 1983. Post-translational regulation of C4 and CAM phosphoenolpyruvate carboxylase. *Physiol. Veg.* 21(5):911-917.

39. Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. 1984. On the molecular mechanism of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activation by thiol compounds. *Plant. Physiol.* 75:983-987.
40. Samejima, M. y Miyachi, S. 1978. Photosynthetic and light enhanced dark fixation of carbon-14 dioxide from the ambient atmosphere and ^{14}C -bicarbonate infiltrates through vascular bundles in maize leaves. *Plant. Cell. Physiol.* 19:907-916.
41. Levi, C., Perchorowics, J.T. y Gibbs, M. 1978. Malate synthesis by dark carbon dioxide fixation in leaves. *Plant. Physiol.* 61:477-480.
42. Leegood, R.C. y Furbank, R.T. 1984. Carbon metabolism and gas exchange in leaves of *Zea mays* L. Changes in CO_2 fixation, chlorophyll a fluorescence and metabolite levels during photosynthetic induction. *Planta* 162:450-456.
43. Furbank, R.T. y Walker, D.A. 1985. Photosynthetic induction in C_4 leaves. An investigation using infra-red gas analysis and chlorophyll a fluorescence. *Planta.* 163:75-83.
44. Usuda, H. y Edwards, G.E. 1984. Is photosynthesis during the induction period in maize limited by the availability of intracellular carbon dioxide?. *Plant. Science. Lett.* 37:41-45.
45. Cooper, T.G. y Wood, A.G. 1971. The carboxylation of phosphoenolpyruvate and Pyruvate. The active species of CO_2 utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 246:5488-5490.
46. Cerff, P., Kloppstech, K. 1982. Structural diversity and differential light control of m-RNA's coding for angiosperm glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:7624-7628.
47. Vidal, J. y Gavalie, G. 1976. Etude de la Phosphoenol-pyruvate carboxylase du Haricot et du Sorgho electroforese sur gel de polyacryamide. *Plant. Sci. Lett.* 7:256-270.
48. Goatly, M.B. y Smith, H. 1974. Differential properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from etiolated and green sugar cane. *Planta.* 117:67-73.
49. Ting, I.P. y Osmond, C.B. 1973. Multiple forms of plant phosphoenolpyruvate carboxylase associated with different metabolic pathways. *Plant. Physiol.* 51:448-453.
50. Hague, D.D., Uhler, M. y Collins, P.D. 1983. Cloning of c-DNA for pyruvate $-\text{P}_i$ -dikinase from maize leaves. *Nucleic. Acids. Res.* 11:4853-4865.

51. Hatch, M.D., Slack, C.R. y Bull, T.A. 1969. Light-induced changes in the content of some enzymes of the C4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis and its effect on the characteristics of photosynthesis. *Phytochem.* 8:697-706.
52. Welkie, G.W. y Coldwell, M. 1970. Leaf anatomy of species in some dicotyledonian families as related to the C3 or C4 pathways of carbon fixation. *Can. J. Bot.* 48:2135-2146.
53. Rathman, C.K.M. 1978. C4-Photosynthesis: The pathway of carbon in bundle sheath cells. *Sci. Prog. Oxf.* 65:409-435.
54. Oshugi, R. y Murata, T. 1980. Leaf anatomy post-illumination CO₂ burst and NADP-malic enzyme activity of Panicum dichotomiflorum. *Plant. Cell. Physiol.* 21(7):1329-1333.
55. Good, M.E. y Bell, D.H. 1980. Photosynthesis, plant productivity and crop yield. En: The biology of crop productivity. ed. P.S. Carlson. pp.3-51. Academic Press, New York.
56. Laetsch, W.M. 1974. The C4 syndrome: A structural analysis. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25:27-52.
57. Day, D.A. y Hatch, M.D. 1981. Transport of 3-phosphoglyceric acid, phosphoenolpyruvate, and inorganic phosphate in maize mesophyll chloroplasts, and the effect of 3-phosphoglyceric acid on malate and phosphoenolpyruvate production. *Arch. Biochem. Biophys.* 21(2):743-749.
58. Edwards, G.E. y Huber, S.C. 1981. The C4 pathway. En: The biochemistry of plants. ed. M.D. Hatch y N.K. Boardman. 8:237-281. Academic Press, New York.
59. Huber, S.C. y Edwards, G.E. 1975. Light-dependent CO₂ fixation by mesophyll cells, protoplasts and protoplast extracts of Digitaria sanguinalis. *Plant. Physiol.* 55:835-844.
60. Day, D.A. y Hatch, M.D. 1981. Dicarboxylate transport in maize mesophyll chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 211(2):738-742.
61. Huber, S.C. y Edwards, G.E. 1977. Transport in C4 mesophyll chloroplasts: evidence for an exchange of inorganic phosphate and phosphoenolpyruvate. *Biochem. Biophys. Acta.* 462:603-612.
62. Rumpho, M.E. y Edwards, G.E. 1984. Inhibition of 3-phosphoglycerate-dependent CO₂ evolution by phosphoenolpyruvate in C4 mesophyll chloroplasts of Digitaria sanguinalis (L.) Scop. *Plant. Physiol.* 76:711-718.

63. Flugge, U.F., Stilt, M.S. y Heldt, H.W. 1985. Light-driven uptake of pyruvate into mesophyll chloroplasts from maize. *FEBS Lett.* 183(2):335-339.
64. Gressel, J. 1980. Blue light and transcription. *En: The blue light syndrome.* pp. 133-153. ed. H. Senger. Springer, Berlin/Heilderberg/New York.
65. Hase, E. 1980. Effects of blue light on greening in microalgae. *En: The blue light syndrome.* pp. 512-540. ed. H. Senger. Springer, Berlin/Heilderberg/New York.
66. Kamiya, A.D., y Shigetoh, M. 1975. Blue light-induced formation of phosphoenolpyruvate carboxylase in colorless *Chlorella* mutant cells. *Plant. Cell. Physiol.* 16:729-736.
67. Senger, H., Klein, O., Durnemann, D. y porra, R.J. 1980. The action of blue light on 5-aminolevulinic acid formation. *En: The blue light syndrome.* pp. 541-551. ed. H. Senger. Springer, Berlin/Heilderberg/New York.
68. Gaba, V. y Black, M. 1979. Two separate photoreceptors control hypocoty growth in greenn seedlings. *Nature.* 278:51-54.
69. Smith, H. 1982. Light quality photoreception and plant strategy. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 33:481-548.
70. Lichenthaler, H.K. Busmann, C. y Rahmsdorf, V. 1980. The importance of blue light for the development of Sun-type chloroplasts. *En: The blue light syndrome.* pp. 485-494. ed. H. Senger. Springer, Berlin/Heilderberg/New York.
71. Qual, P.H. 1984. Phytochrome: a regulatory photoreceptor that controls the espression of its own gene. *Trends. Biochem. Sci.* 9(10):450-453.
72. Checa, A. Lázaro, J.S. y Gorge, J.L. 1984. Light-induced nuclear synthesis of spinach chloroplasts fructose-1,6-biphosphatase. *Plant. Physiol.* 75:539-541.
73. Sims, T.L. y Hague, D.R. 1981. Light-stimulated increase of translatable mRNA for PEP carboxylase in leaves of maize. *J. Biol. Chem.* 256:8252-8257.
74. Johnson, H.S. y Hatch, M.D. 1970. Properties ond regulation of leaf nicotinamide-adenine dinucleotide phophate-malate dehydrogenase and malic enzyme in plants with the C4 dicarboxylic acid pathway. *Biochem. J.* 119:273-280.
75. Goatly, M.B., Coombs, J. y Smith, H. 1975. Development of C4 photosynthesis in sugar cane: change in properties of phosphoenolpyruvate carboxylase during greening. *Planta.* 125:15-24.

76. Coruzzi, G., Broglie, R., Edwards, C. y Chua, N. -H. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *EMBO J.* 3(8):1671-1679.
77. Marme, D. 1977. Phytochrome: membranes as possible sites of primary action. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 28:173-198.
78. Manabe, K. y Furuya, M. 1974. Phytochrome-dependent reduction of nicotinamide nucleotides in the mitochondrial fraction isolated from etiolated pea epicotyls. *Plant. Physiol.* 53:343-347.
79. Kendrick, R.E. y Frankland, B. 1983. *Phytochrome and plant growth.* (segunda edición). Edward Arnold Publishers. Ltd. London.
80. Buchanann, B.B. 1980. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 31:341-374.
81. Anderson, L.E. 1979. Interaction between photochemistry and activity of enzymes. En: Photosynthesis IV. Photosynthetic carbon metabolism and related processes. *Encyclopaedia of Plant Physiology.* ed. M. Gibbs y E. Latsko. 6:271-281. Springer, New York.
82. Kowallick, W. 1982. Blue light effects on respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33:51-72.
83. Nishizawa, A.N. y Buchanann, B.B. 1981. Enzyme regulation in C4 photosynthesis. Purification and properties of ferredoxin-linked fructose biphosphatase and sedoheptulose biphosphatase from corn leaves. *J. Biol. Chem.* 256(12):6119-6126.
84. Wolosiuk, R.A. y Buchanann, B.B. 1978. Activation of chloroplast NADP-linked glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the ferredoxin/thioredoxin system. *Plant. Physiol.* 61:669-671.
85. Leegood, R.C. y Walker, P.A. 1982. Regulation of Fructose-1,6-biphosphatase activity in leaves. *Planta.* 156:449-456.
86. Wolosiuk, R.A., Buchanann, B.B. y Crawford, N.A. 1977. Regulation of NADP-malate dehydrogenase by the light-activated ferredoxin/thioredoxin system of chloroplast. *FEBS Lett.* 81(2):253-258.
87. Kagawa, T. y Hatch, M.D. 1977. Regulation of C4 photosynthesis: characterization of a protein factor mediating the activation and inactivation of NADP-malate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 184:290-297.

88. Mohamed, A.H. y Anderson, L.E. 1981. Extraction of chloroplast Light Effect Mediators and reconstitution of light activation of NADP-linked malate dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. 209(2):606-612.
89. Ashton, A.R., Burnell, J.N. y Hatch, M.D. 1984. Regulation of C4 photosynthesis: inactivation of pyruvate, Pi, dikinase by ADP-dependent phosphorylation and activation by phosphorolysis. Arch. Biochem. Biophys. 230(2):492-505.
90. Krachru, R.B. y Anderson, L.E. 1975. Inactivation of pea leaf phosphofructokinase by light and DTT. Plant Physiol. 55:199-202.
91. Anderson, L.E., Ng, T.C.L. y Park, K.E.Y. 1974. Inactivation of pea leaf chloroplastic and cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase by light and DTT. Plant. Physiol. 53:835-849.
92. Ashton, R.D. y Hatch, M.D. 1983. Regulation of C4 photosynthesis: regulation of pyruvate, Pi, dikinase by ADP-dependent phosphorylation and dephosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 115(1):53-60.
93. Edwards, G.E., Nakamoto, H., Burnell, J.N. y Hatch, M.D. 1985. Pyruvate, Pi, dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C4 photosynthesis: properties and mechanism of light/dark regulation. Ann. Rev. Plant. Physiol. 36:255-286.
94. Burnell, J.N. y Hatch, M.D. 1983. Dark-light regulation of pyruvate, Pi, dikinase in C4 plant: evidence that the same protein catalyses activation and inactivation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 111(1):288-293.
95. Hatch, M.D. y Burnell, J.N. 1983. Regulation of C4 photosynthesis: stability and other characteristics of the ATP-ADP-dependent inactivation of pyruvate, Pi, dikinase in maize chloroplast extracts. Aust. J. Plant. Physiol. 10:179-186.
96. Sugiyama, T. y Hatch, M.D. 1981. Regulation of C4 photosynthesis: inactivation of pyruvate, Pi, dikinase in leaf and chloroplast extracts in relation to dark-light regulation in vivo. Plant. Cell. Physiol. 22(1):115-126.
97. Nakamoto, H. y Sugiyama, T. 1982. Partial characterization of the in vitro activation of inactive pyruvate, Pi, dikinase from darkened maize leaves. Plant. Physiol. 69:749-753.
98. Bennett, J. 1977. Phosphorylation of chloroplast membrane polypeptides. Nature 269:344-346.
99. Lucero, H.A., Lin, Z.-F. y Racker, F. 1982. Protein kinases from spinach chloroplasts. J. Biol. Chem. 257(20):12157-12160.

100. Nimmo, G.A., Nimmo, H.G., Fewson, C.A. y Wilkins, M.B. 1984. Diurnal changes in the properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in Bryophyllum leaves: a possible covalent modification. FEBS Lett. 178:199-203.
101. Leegood, R.C. y Walker, D.A. 1983. Modulation of NADP-malate dehydrogenase activity in maize mesophyll chloroplasts. Plant Physiol. 71:513-518.
102. Nakamoto, H. y Edwards, G.E. 1983. Influence of oxygen and temperature on the dark inactivation of pyruvate, Pi, dikinase and NADP-malate dehydrogenase in maize. Plant. Physiol. 71:568-575.
103. Buchanann, B.B., Wolosiuk, R.A. y Schurmann, P. 1979. Thioredoxin and enzyme regulation. Trends. Biochem. Sci. 4:93-96.
104. Slack, C.R., Hatch, M.D. y Goodchild, D.C. 1969. Distribution of enzymes in maize leaves in relation to the C4-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Biochem. J. 114:489-498.
105. Ziegler, I. 1974. Malate dehydrogenase in Zea maiz. Properties and inhibition by sulfite. Biochem. Biophys. Acta. 364:28-37.
106. Rathman, C.K. y Edwards, G.E. 1977. C4 acid decarboxylation an CO2 donation to photosynthesis in bundle sheath strands and chloroplasts from species representing three groups of C4 plants. Arch. Biochem. Biophys. 182:1-13.
107. Bhagwat, A.S. y Sane, P.V. 1977. Studies on enzymes of C4 pathway: Part IV -comparative study of inhibitors of malic enzyme isolated from CAM, C4 and C3 plants. Indian J. Exp. Biol. 15:1013-1015.
108. Bagwat, A.S., Mitra, J. y Sane, P.V. 1977. Studies on enzymes of C4 pathway: Part III -regulation of malic enzyme of Zea maiz by Fructose-1,6-diphosphate and other metabolites. Indian. J. Exp. Biol. 15:1008-1012.
109. Bassham, J.A. 1977. The reductive pentose and its regulation. Eni Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series. ed. M. Gibbs y E. Latsko. 6:9-31. Springer. New York.
110. Stilt, M. Wirts, W. y Heldt, H.W. 1980. Metabolite levels during induction in the chloroplast and extra-chloroplast compartments of spinach protoplasts. Biochem. Biophys. Acta. 593:85-102.
111. Davies, D.D. 1979. The central role of phophoenolpyruvate in plant metabolism. Ann. Rev. Plant. Physiol. 30:131-158.

112. Dennis, D.T. y Miernyk, J.A. 1982. Compartamentation of non-photosynthetic carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 33:27-50.
113. Murphy, D.V. y Leech, R.M. 1977. Lipid biosynthesis from (14-C)-bicarbonate, 2-(14-C)-pyruvate and 1-(14-C)-acetate during photosynthesis by isolated chloroplasts. *FEBS Lett.* 77:164-168.
114. Hague, D.R. y Sims, T.L. 1980. Evidence for lighth-stimulated synthesis of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of maize. *Plant Physiol.* 66:505-509.
115. Hayakawa, S., Matsunaga, K. y Sugiyama, T. 1981. Lighth induction of phosphoenolpyruvate carboxylase in etiolated maize leaf tissue. *Plant. Physiol.* 67:133-138.
116. Uedam, K. y Sugiyama, T. 1976. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of maize, sorghum and millet. *Photosynthetica.* 14:25-31.
117. von Willert, D.J., Treichel, S., Kirst, G.O. y Curdts, E. 1976. *Phytochem.* 15:1435-1436.
118. Huber, H. y Edwards, G.E. 1975. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase of C4 plants by malate and aspartate. *Can. J. Bot.* 53:1925-1923.
119. Crétin, C., Perrot-Rechenmann, C., Vidal, J., Gadat, P., Loubinoux, B. y Tabach, S. 1983. Study on plant phosphoenolpyruvate carboxylases sensitivity to herbicides and immunochemical reactivity. *Physiol. Veg.* 21(5):927-933.
120. Gavalas, N.A., Caravatas, S. y Manetas, Y. 1982. Factors affecting a fast and reversible inactivation of photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase. *Photosynthetica.* 16(1):49-58.
121. Gernarnt, R. y Heldt, N.M. 1984. Measurement of subcelular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stoped material in non-aqueous media. *Plant. Physiol.* 75:542-547.
122. Lilley, R. McC., Stilt, M. Mader, G. y Heldt, H.W. 1982. Rapid fractionation of wheath leaf protoplasts using membrane filtration. *Plant Physiol.* 70:965-970.
123. Akamba, L.M. y Anderson, L.E. 1981. Lighth modulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase by photosynthetic electron flow in pea chloroplasts. *Plant. Physiol.* 67:197-200.

124. Lendxian, K.J. 1980. Modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by NADP, NADP+ y dithiothreitol at variable NADPH/NADP+ ratios in an illuminated reconstituted spinach (*Spinacia oleracea* L.) chloroplast system. *Planta*. 148:1-6.
125. Graham, D. y Walker, D.A. 1962. Some effects of light on the interconversion of metabolites in green leaves. *Biochem. J.* 82:554-560.
126. Manetas, Y y Gavalas, N.A. 1982. Evidence for essential sulphhydryl group(s) in photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase: protection by substrate, metal substrate and glucose-6-phosphate against p-chloromercuribenzoate inhibition. *Photosynthetica*. 16:59-66.
127. Stiborová, M. y Levlová, S. 1983. The role of cystein SH groups in the phosphoenolpyruvate carboxylase molecule of maize. *Physiol. Veg.* 21(5):935-942.
128. Hatch, M.D. 1979. Mechanism of C4 photosynthesis in *Chloris gayana*: pool sizes and kinetics of ¹⁴-CO₂ incorporation into 4-carbon and 3-carbon intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.* 194(1):117-127.

STUDIES ON THE "IN VIVO" ACTIVITY OF MAIZE LEAF
PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE UNDER LIGHT
AND DARK CONDITIONS.

Rogelio Rodríguez-Sotres and Rosario A. Muñoz-Clares.

Departamento de Bioquímica vegetal DEPg, Facultad de
Química, Ciudad Universitaria, Av. Insurgentes Sur y
Copilco, Delegación Coyoacán, 04510. México D.F.,
México.

Correspondence: Dra. R.A. Muñoz-Clares, above address.

SUMMARY

In order to obtain an indication of the "*in vivo*" activity of the enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, E.C. 4.1.1.31) in green leaves of maize under light or dark conditions we measured the levels of metabolite intermediates of the mesophyll section of the C_4 pathway. Levels of pyruvate and malate were significantly lower in the dark than in the light period, while those of phosphoenolpyruvate (PEP) were fairly constant under both experimental conditions. The amount of pyruvate present in green leaves showed a marked increase immediately after the light was turned off, which may reflect the rapid inactivation of the enzyme pyruvate, Pi dikinase (PPDK). This increase was not accompanied by a concomitant decrease in the levels of PEP, which suggest that PEPC is undergoing an "*in vivo*" inactivation simultaneous to that of PPDK. The possible significance of these results in relation to the diurnal regulation of the metabolism of carbohydrates in green leaves of maize is discussed.

Key words: Maize leaf - phosphoenolpyruvate carboxylase - C_4 metabolism - Photoactivation - Pyruvate levels - Phosphoenolpyruvate levels - Malate levels.

Abbreviations: NAD, β -nicotinamide adenine dinucleotide; NADH, β -nicotinamide adenine dinucleotide reduced form; NADP-MDH, NADP Malate dehydrogenase; PEP, phosphoenolpyruvate; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; 3PGA, 3-phosphoglyceric acid; PPDK, pyruvate, Pi dikinase.

INTRODUCTION

The activity of the enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) of green leaves of maize plants is associated with the photosynthetic processes of assimilation of atmospheric CO_2 , as a constituent of the C_4 pathway. The fact that the reaction catalyzed by PEPC is irreversible [1] and that the enzyme's substrate and product, PEP and oxalacetate, are involved in other metabolic pathways, has prompted many authors to suggest that the control of activity might be a critical point in the regulation of photosynthetic metabolism in C_4 plants. As a photosynthetic enzyme, one is tempted to suggest that its activity must be regulated by light.

In fact, it has been well established that light induces the synthesis of the maize leaf PEPC [2-5]. Nevertheless, it is not clear at the present if light has any regulatory function on the state of activation of this enzyme, although claims have been made to this effect. Thus, a rapid inactivation of PEPC following darkness have been suggested in studies involving intact maize leaves [6], and the PEPC activity in a crude extract obtained from illuminated maize leaves was found higher than that of a crude extract obtained from leaves kept in the dark [7]. On the contrary, other authors failed to detect any photoactivation of the maize leaf PEPC, although they did find such activation in several other C_4 plants [8,9], and dark CO_2 fixation through β -carboxylation was found to continue for up to 3 hours when leaves of maize were exposed to darkness [10]. In view of these antecedents in the literature, we considered it of interest to reinvestigate the possible short-term regulation of maize leaf PEPC by light using a new approach: The measurement of the changes elicited by darkness in the main intermediate metabolites of the C_4 pathway in mesophyll cells, as these changes might reflect the "*in vivo*" activity of the enzymes involved in this pathway, including that of PEPC.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and Biochemicals

Phosphoenolpyruvate (Tri(cyclohexylammonium) salt), L-malic acid (disodium salt), pyruvic acid (sodium salt), β -NADH (disodium salt), porcine heart malic dehydrogenase, rabbit muscle lactic dehydrogenase and pyruvate kinase were purchased from Sigma Chemical Co. Activated charcoal was from Eastman. All other chemicals of analytical grade were from standard suppliers.

Plant Material

Seeds of maize (Zea mays, var. H-30) were germinated in soil and grown in a naturally illuminated green house at temperature between 20 and 30°C. The fourth and fifth leaves were used for the experiments.

Light and Dark Treatments

The leaves to be used were illuminated (40,000 + 50,000 lux) for a twelve hour period following a twelve hour period of darkness, or viceversa. At the times indicated in results the leaves were detached from the plant, quickly frozen and used subsequently for the determination of metabolite concentrations.

Determination of Metabolite Levels

About 0.25 g (fresh weight) of leaves were quickly frozen in liquid nitrogen, ground in a precooled mortar and suspended in 1.25 ml of ice-cold 0.6 N perchloric acid. The homogenate was centrifuged at 5000 g for 15 min at 4°C and the pellet reextracted in 0.5 ml of ice-cold 0.3 N perchloric acid and centrifuged as before. Both supernatants were adjusted to pH 7.0 with 0.5 M triethanolamine hydrochloride, pH 7.4 containing 2 M-KOH. The resulting precipitate of potassium perchlorate was discarded after further

centrifugation as before at 4°C. The supernatants were treated with activated charcoal (5 mg/ml final concentration). After thorough mixing and standing on ice for 10 min, the samples were centrifuged at 8,000 x g for 2 min at 4°C in a microfuge, and assayed immediately. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and malate were analyzed by standard enzymatic methods adapted from [11,12]. All assays were performed at least in duplicate with "zero enzyme" controls. With all metabolites the recoveries of the commercial compounds subjected to the same extraction and assay procedures were greater than 90%. The limit of reliable detection of these metabolites was near 0.01 $\mu\text{mol/g}$ fresh weight.

RESULTS AND DISCUSSION

The evolving concentrations of pyruvate and malate during a twelve hour period of light or dark are shown in Figs. 1B and 2, respectively. As it can be seen, both metabolites behaved in a similar manner under light conditions, reaching their maximum values at about two hours after the light was turned on. These values remained stable during the rest of the light period. During darkness, the concentrations of both metabolites decreased; but while the levels of malate decreased steadily from the beginning of the dark period, the levels of pyruvate showed a large and transitory increase immediately after the light was extinguished. Furthermore, rapidly following this abrupt increase in pyruvate concentration, an equally abrupt and steep decrease is observed. The concentrations of pyruvate and PEP are of the same order of magnitude, but, interestingly enough, the levels of phosphoenolpyruvate remained fairly constant, regardless of the conditions (light or darkness) to which the leaves were exposed (Fig. 1A), in contrast to the pyruvate levels.

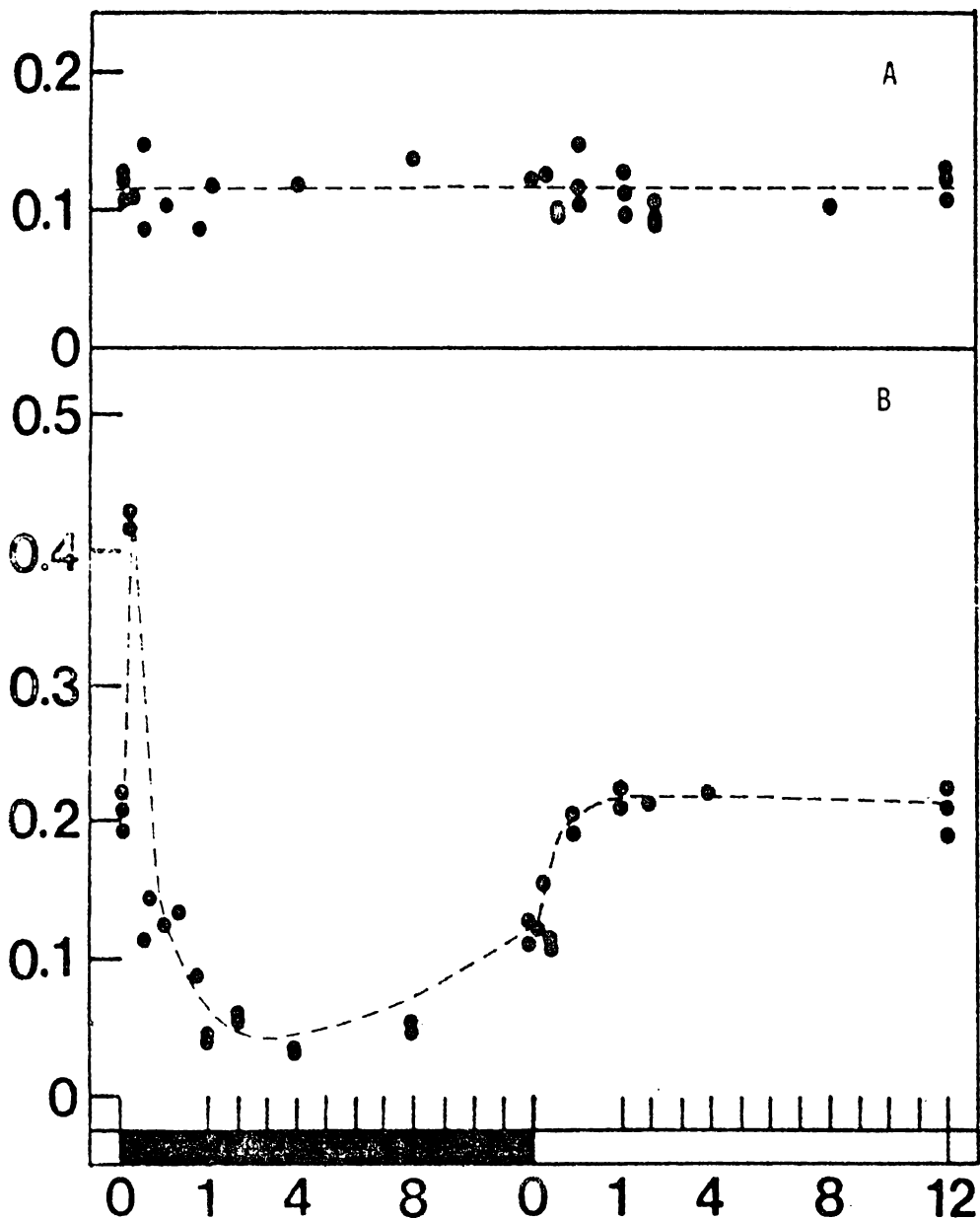


Fig. 1. Leaf content of phosphoenolpyruvate (A) and pyruvate (B) during a 12 h light - 12 h dark cycle. All points are the mean of at least two determinations. Note that the concentration of both metabolites are expressed in the same scale. The first hour of the light or dark treatment is in a scale expanded by a factor of four. The plants were illuminated by a General Electric 300 W tungsten lamp. The light was filtered and concentrated through a spherical glass container, 15 cm diameter, filled with 0.15% (w:v) Cu_2SO_4 solution. The intensity of light was 40,000 - 50,000 lux, measured at the leaf surface. Ordinate = $\mu\text{mol g fresh weight}^{-1}$; abscissa = Time (hours).

We were chiefly interested in the changes that take place during the first minutes following the transition light-darkness or viceversa, as these changes could be indicative of possible rapid modulation of the state of activation of the C_4 pathway enzymes.

We assumed that under light conditions the metabolites measured are being formed and transformed mainly by C_4 pathway and that on passing to darkness the flux through this pathway is arrested and glycolysis and oxidative metabolism predominate (see Fig. 3). Based in this assumption, we interpret the rapid increase in the levels of pyruvate that followed the onset of darkness as a result of the reported equally rapid dark-mediated inactivation of the enzyme pyruvate, Pi dikinase (PPDK) [13]. The following decrease in the concentration of this metabolite may be due to the operation of oxidative metabolism until the levels of the new steady state are reached. Since PPDK catalyzes the formation of PEP via the C_4 pathway, the fact that the levels of this intermediate did not show any significant decrease shortly after the light was extinguished strongly suggests that the enzyme that consumes PEP, i.e. PEPC, has also been rapidly inactivated. In other words, if the production and consumption of PEP are stopped simultaneously, we would not find any changes in its concentration, at least during the initial time of darkness, as in fact does occur. Even though, the concentration of PEP in the PEPC environment may not be saturating, permitting the activity of this enzyme to be regulated by changes in the concentration of this substrate, we should be able to detect a lowered concentration of PEP before the enzyme adjusts its rate of catalysis to the new supply of substrate, unless some inactivation is taking place.

The next step in the C_4 pathway is catalyzed by the chloroplastic enzyme NADP-malate dehydrogenase (NADP-MDH) which transform oxalacetate to malate. As this enzyme is rapidly inactivated in leaves of maize in the dark, and reactivated following illumination [14] one may logically expect a rapid

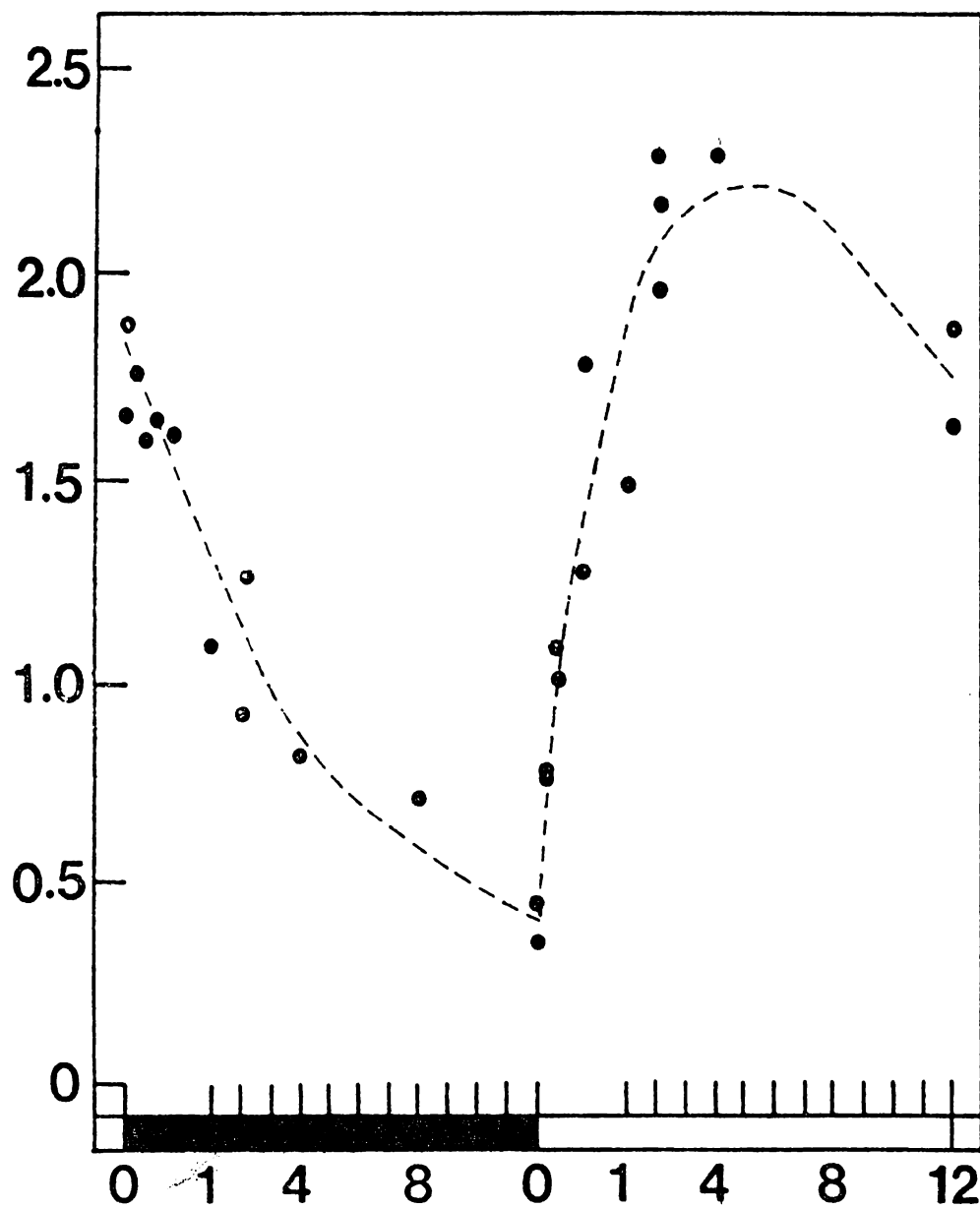
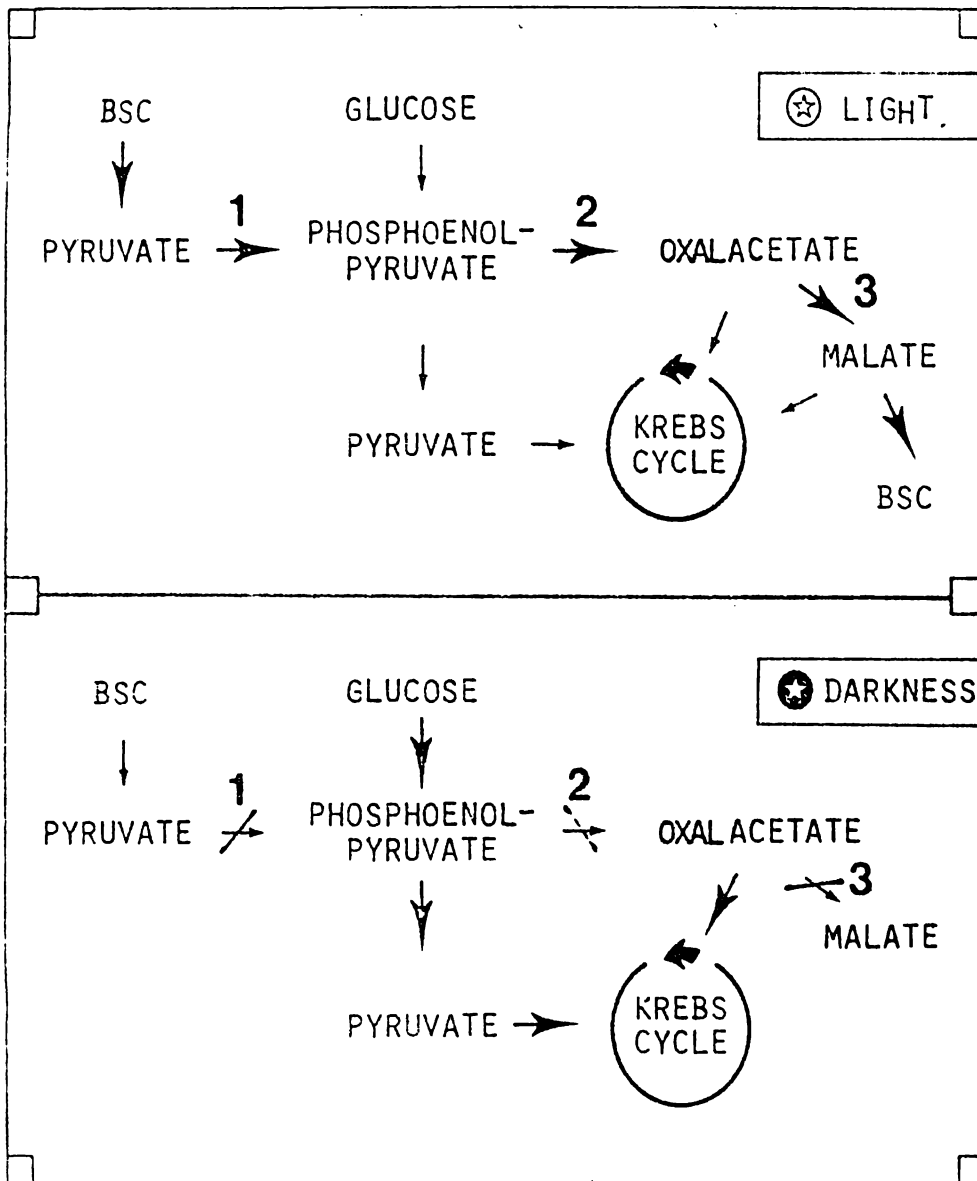


Fig. 2. Leaf content of malate during a 12 h light - 12 h dark cycle. All points are the mean of at least two determinations. The first hour of the light or dark treatment is in a scale expanded by a factor of four. The light treatment was as described in legend to Fig. 1. Ordinate = $\mu\text{mol g fresh weight}^{-1}$; abscissa = time (hours).



14

Fig. 3. Postulated major carbohydrate metabolic pathways operating under light and under dark in mesophyll cells of maize leaves. Heavy arrows indicate the principal metabolite flux under each of these conditions. No compartmentation is considered in this scheme. Dark-inactivation of enzymes is indicated by diagonals. The broken-line diagonal indicates the postulated dark-inactivation of PEPC. 1, PPK; 2, PEPC; 3, NADP-MDH.

decrease in the concentration of malate when the light is turned off, which is in accordance with our results, and a simultaneous increase in that of oxalacetate, which has not been detected (the levels of oxalacetate remained stable over the first 15 minutes of darkness, data not shown). Again, these results point to an inactivation of PEPC, since if this enzyme were active under darkness a build up of oxalacetate would follow because of the irreversibility of the reaction catalyzed by this enzyme. In addition, the redox conditions of the cell in darkness (NADH/NAD^+ ratio lower than that under illumination) are such that the conversion of malate into oxalacetate by the other malate dehydrogenases present in the cell is favoured [15]. This oxidation of malate to oxalacetate would contribute to the decrease in malate concentration and could compensate for the effect of a possible inactivation of PEPC on the oxalacetate levels, accounting for their maintenance.)

On going from dark to light the reverse changes are to be expected. Again, if there is a simultaneous reactivation of PPDK and PEPC no changes in the levels of PEP are to be expected, in agreement with our data. On the other hand, the reactivation of NADP-MDH accounts for the increase in the concentration of malate.

The suggestion that a rapid dark inactivation of PEPC occurs in maize leaves is not in accordance with the published observation that $^{14}\text{CO}_2$ continues to be incorporated into malate up to 3 hours after dark treatment [10]. However, in these experiments the initial CO_2 concentration used (0.4%) was much higher than the atmospheric one and it cannot be ruled out that the high CO_2 concentration have an effect on the activity of PEPC.

PEP may also be formed via glycolysis. Therefore, the possibility exists that an increased production of PEP by this pathway at the beginning of the dark period may nullify the decrease in its concentration that would

follow the inactivation of PPK. This alternative explanation does not require dark inactivation of PEPC. If this is the case, the cytoplasmic PEP formed via glycolysis (mainly under dark conditions) or via C_4 pathway (under light conditions) will be partitioned between pyruvate kinase and PEPC according to the kinetics characteristics of both enzymes, as discussed by [16]. Thus the state of activation of the two cytoplasmic enzymes which metabolize PEP would need not be regulated by light. But, while this may be true in the case of a C_3 type photosynthetic cell, it is not in keeping with the characteristics of a mesophyll C_4 type photosynthetic cell, where the high PEPC capacity (it has been estimated that approximately 10% of the total cell protein is PEPC [17]) may result in a waste of PEP, a high energy enolic phosphate, during the night. In darkness the metabolic role of the reaction catalyzed by PEPC, if any, must be an anaplerotic one, and it must be remembered that the V_{max} values of the anaplerotic PEPC enzymes are much lower than those of the photosynthetic ones [18]. So any degree of inactivation of PEPC during night seems quite reasonable.

One third possible explanation of our results is that the mesophyll C_4 type cell has some kind of compartmentalization or metabolic channelling that allows the PEP formed via C_4 pathway or via glycolysis to remain in the pathway in which it was produced. In such a case, again no dark inactivation of the enzyme PEPC would be necessary, since the lack of its substrate (PEP is not formed via PPK in the dark) permits the cell to circumvent a competition between PEPC and PK and a possible waste of PEP. To our knowledge no such compartmentation has been found in leaves of green plants. On the contrary, it was found that 3PGA can induce CO_2 fixation in mesophyll cells, protoplasts and protoplast extracts of *D. sanguinalis* [19], which clearly indicates that PEP generated by glycolytic enzymes can be a substrate for PEPC "in vivo", at least in this C_4 plant. However, this possibility cannot be

ruled out by our results, since we measured the concentration of these metabolites in the whole leaf. Although this fact makes the results difficult to be interpreted, it was not possible to carry out this study with isolated mesophyll protoplasts, since the time required for their isolation and purification severely alters the carbohydrate metabolism. This is specially true for the C_4 pathway, as its functioning requires a complex anatomical and structural organization implying two cell types and different cell compartments.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are particularly grateful to Dr. I. Bernál-Lugo for critical reading of the manuscript and to Dr. M. Newcomer for her help in the writing of the english version.

REFERENCES

- 1 B. Vennesland, T.T. Tchen and V.A. Loewus, J. Am. Chem. Soc., 76 (1954) 3358.
- 2 S. Hayakawa, K. Matsunaga and T. Sugiyama, Plant Physiol., 67 (1981) 133.
- 3 H. Kobayashi, S. Asami and T. Akazawa, Plant Physiol., 65 (1980) 198.
- 4 D. R. Hague and T.L. Sims, Plant Physiol., 66 (1980) 505.
- 5 T. L. Sims and D.R. Hague, J. Biol. Chem., 256 (1981) 8252.
- 6 M. Samejima and S. Miyachi, Plant & Cell Physiol., 19 (1978) 907.
- 7 A. A. Iglesias and C.S. Andreo, Plant Physiol., 75 (1984) 983.
- 8 A. Karabourniotis, Y. Manetas and N.A. Gavalas, Plant Physiol., 73 (1983) 735.
- 9 G. Karabourniotis, Y. Manetas and N.A. Gavalas, Plant Physiol., 77 (1985) 300.
- 10 C. Levi, J.T. Perchorowicz and M. Gibbs, Plant Physiol., 61 (1978) 477.

- 11 R. Czok and W. Lamprecht, Pyruvate, Phosphoenolpyruvate and b-glycerate-2-phosphate in H.U. Bergmeyer (Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, New York. San Francisco, London, 1974, p. 1446.
- 12 I. Gutmann and A. W. Wahlefeld, L(-)-malate Determination with Malate Dehydrogenase and NAD in H.U. Bergmeyer (Ed.) Methods of Enzymatic Analysis, Verlag Chemic Weinheim Academic Press, New York, San Francisco, London 1974, p. 1585.
- 13 M.D. Hatch, Curr. Top. Cell. Regul., 14 (1978) 1.
- 14 H.S. Johnson and M.D. Hatch, Biochem. J., 119 (1970) 273.
- 15 D. Graham and D.A. Walker, Biochem. J., 82 (1962) 554.
- 16 D.D. Davies, Ann. Rev. Plant Physiol., 30 (1979) 131.
- 17 K. Uedan and T. Sugiyama, Plant Physiol., 57 (1976) 906.
- 18 I.P. Ting and C.B. Osmond, Plant Physiol., 51 (1973) 439.
- 19 S.C. Huber and C.E. Edwards, Plant Physiol., 55 (1975) 835.

Short-term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate
carboxylase by light.

Rogelio Rodríguez-Sotres and Rosario A. Muñoz-Clares.

Departamento de Bioquímica Vegetal, DEPg, Facultad de
Química, UNAM, 04510 México, D.F.

SUMMARY

Maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) in rapidly prepared and desalted extracts from light-treated plants exhibited considerably lower k_m for PEP values than the enzyme in extracts from dark-treated plants when the assays were performed at pH 7.0. This suggests that maize leaf PEPC may exist in at least two interconvertible forms, one predominating under illumination and another under darkness. The kinetics differences found between both kind of extracts point out to a decrease in the "in vivo" CO₂ fixation via PEPC in maize during the night.

The addition of DTT or the presence of phosphoprotein phosphatase inhibitors during the extraction procedure had no effect on the kinetic properties of PEPC in the light and dark extracts. Therefore, it appears that neither oxidation of the enzyme sulphhydryl groups, nor phosphorylation are the molecular events underlying the interconversion of the day and night PEPC forms.

Key words: Zea mays L., phosphoenolpyruvate carboxylase, photoactivation, sulphhydryl groups, phosphorylation.

Abbreviations: DTT, dithiothreitol; HEPES, N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; PEP, phosphoenolpyruvate; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; Et-SH, β -mercaptoethanol.

INTRODUCTION

The activation state of the photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) from several C₄ and CAM plants has been reported to be regulated by light (Karabourniotis et al., 1983, 1985; Winter, 1982; Wu and Wedding, 1985a, 1985b). Regarding the maize leaf PEPC, a rapid inactivation in intact maize leaves following darkness has been suggested by Samejima and Miyachi (1978). Iglesias and Andreo (1984) found a higher activity in a crude extract from illuminated maize leaves than in a crude extract obtained from leaves kept in the dark. The former authors suggested that an oxidation-reduction of thiol groups of the enzyme may be responsible for these differences, as Manetas and Gavalas (1982), proposed before for other C₄ species. Nevertheless, it is not clear at the present if the activity of maize leaf PEPC undergoes a short-term regulation by light, since Levy et al. (1978), reported that CO₂ fixation through β -carboxylation in maize leaves continue for up to 3 h after the onset of darkness, and Karabourniotis et al. (1983) could not detect any photoactivation of this enzyme, although they did find such activation in several other C₄ plants. In view of these apparent discrepancies in the literature, we considered of interest to reinvestigate the possible short term regulation of maize leaf PEPC by light and the mechanism involved.

In the present paper we report that two interconvertible PEPC forms have been detected in rapidly prepared and desalted leaf extracts from light- and dark- treated maize plants. Our

results does not support that the interconversion of these forms is mediated by oxidation reduction of sulphydryl groups or phosphorylation-dephosphorylation.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Biochemicals

PEP (tri(cyclohexylammonium) sal), β -mercaptoethanol, DTT and porcine heart malic dehydrogenase were purchased from Sigma Chemical Co. All other chemicals of analytical grade were from standard suppliers.

Plant Material

Seeds of maize (Zea mays L., cv. Chalqueño) were germinated in agrolite and watered with tap water for the first seven days and with Hogland solution thereafter. Plants were grown in a naturally illuminated greenhouse at temperature between 20 and 30°. The fourth and fifth leaves were used for the experiments.

Light and Dark Treatments

Plants were kept in darkness or illuminated (40-50 Klux) for 3 h prior to extraction. The dark and light treatments always followed a 4 h period under natural light.

Phosphoenolpyruvate Carboxylase Extraction.

The enzyme was extracted by two different procedures: A) Leaves were frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder in a precooled mortar and pestle. This powder was suspended either in 100 mM Tris-PO₄ or in 100 mM Hepes-KOH pH 7.5, containing 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 15% (v:v) glycerol and moistened PVPP (0.1 g/ml extraction buffer) in a 1:4 (w:v) ratio. The resulting suspension was filtered through four layers of

Miracloth and the filtrate centrifuged at 10,000 g for 30 s in a microcentrifuge. B) Leaves were extracted at 0°C in 100 mM Tris-HCl, pH 7.3, containing 4 mM EDTA, in a 1:10 (w:v) ratio using a Polytron homogenizer (Kinematica GMBH, Luzern) at high speed and centrifuged as in procedure A. The supernatants were immediately desalted and/or used for PEPC activity assays. Desalting was carried out in the extraction buffer (minus PVPP in procedure A) at room temperature. When performing the dark experiments, the enzyme was extracted and kept in complete darkness until assay.

Phosphoenolpyruvate Carboxylase Assay.

PEPC activity was measured spectrophotometrically at 30°C in a coupled enzyme assay measuring NADH oxidation by the decrease in extinction at 340 nm in a PYE UNICAM SP 1800 recording spectrophotometer. The assay system contained in a final volume of 1 ml: 100 mM Tris-HCl, pH 8.3 or 100 mM TEA-HCl pH 7.0, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 0.2 mM NADH, two units of malate dehydrogenase and varying amounts of PEP. Reaction was started by the addition of crude or desalted extract. The same amount of enzyme in the assay cuvette was used throughout each experiment and only initial rates were reported, since reactivation or inactivation of the enzyme during the assay was observed. Rates in the absence of PEP were negligible. Each determination was performed at least in duplicate.

Protein Determination

Protein concentrations were estimated by a modification of the dye-binding method of Bradford (1976). Leaf extracts were precipitated with 72% (w:v) trichloroacetic acid and 0.15% (w:v) sodium deoxycholate as described by Peterson (1977). Precipitates were redissolved in 0.1 M NaOH (one fifth of the original sample volume) and incubated for 15 min at 60°C. We found this alkaline treatment necessary to establish a linear relationship between color yield and protein concentration.

RESULTS AND DISCUSSION

Extractable PEPC Activity from Illuminated and Darkened Maize Leaves.

As a logical first step in our study of possible dark inactivation of maize PEPC, we measured the specific activity levels of the enzyme extracted from leaves of light- and dark-treated plants under several conditions. The ratios of the PEPC specific activity in light extracts to that in dark ones are shown in Table 1. We found these values fairly constant in each series of experiments, although there were considerable variations in the levels of PEPC activity extracted. As can be seen, these ratios were below one when the extraction procedure A was used, regardless of the extraction medium or the inclusion of 20 mM β -mercaptoethanol, which might be due to differences between the light and dark extracts in the enzyme stability under these conditions, even though glycerol, a known stabilizer of PEPC, was present. The ratios became close to one or even higher when the enzyme was extracted by procedure B and assayed under different conditions. Therefore, the extraction procedure and the assay conditions appear to be important factors to be considered for the detection of PEPC photoactivation, as previously suggested by Karabourniotis et al. (1983, 1985). In view of the above results, we used the extraction procedure B in all the following studies.

PEPC Kinetics Properties in Rapidly Desalted Extracts from Illuminated or Darkened Maize Leaves.

We determined V_{max} and K_m for PEP values in both series of

TABLE 1. Extractable PEPC Activity from Illuminated and Darkened
Maize Leaves.

Extraction buffer	Assay Conditions		Specific Activity Ratio (Light/Dark)
	pH	[PEP] mM	
*Hepes KOH, 20 mM Et-SH	8.3	5 mM	0.64 ± 0.21 (3)
*Tris-PO ₄ , 20 mM Et-SH	8.3	5 mM	0.56 ± 0.12 (3)
*Tris-PO ₄	8.3	5 mM	0.68 ± 0.05 (3)
**Tris-ClH	8.3	5 mM	0.98 ± 0.10 (4)
	8.3	1 mM	1.58 ± 0.53 (4)
	7.0	5 mM	1.43 ± 0.42 (3)
	7.0	1 mM	5.0 ± 1.17 (5)

* Extracted by procedure A. ** Extracted by procedure B.

The number of experiments are given within parenthesis.

extracts from Lineweaver-Burk plots using a PEP concentration range of 5 to 0.5 mM at pH 8.3 and 40 to 2.5 mM at pH 7.0. Good straight lines (correlations coefficients greater than 0.99) were obtained in all plots of this sort (even though Hill plots of these data gave n values slightly higher than one in both series of extracts, ranging from 1.05 to 1.14). These results, summarized in Table 2, show that at pH 8.3 both series of extracts showed a similar kinetic behaviour, while at pH 7.0 significant differences in the K_m for PEP values were found, suggesting that maize leaf PEPC may exist in at least two interconvertible forms, one predominating under light and another under dark conditions. Although, to our knowledge, there are no data in the literature about the cytoplasmic pH values of maize mesophyll cells during the light and dark periods, it seem to us that a pH value of 7.0 would be closer to the physiological one than a value of 8.3. Thus, we think that the kinetic differences found might be of relevance in the "in vivo" operation of this enzyme. Leegood and Furbank (1984) reported that the total PEP pool in maize leaves decrease under darkness. Therefore, it can be logically expected that PEPC has a lower substrate availability during the dark than during the light period, which added to our finding of a higher K_m for PEP of the dark PEPC form may result in an important reduction of the "in vivo" CO_2 fixation via PEPC in the dark. However, our results do not allow us to ascertain the extent of this reduction, since it is quite likely that other factors, such as changes in PEPC inhibitors and/or activators levels following changes in the illumination

TABLE 2. Kinetic Properties of Leaf PEPC in Rapidly Desalted Extracts from Light- and Dark-Treated Maize Plants.

Assay pH	V _{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)		K _m for PEP (mM)		Activity Ratio*	
	Light	Dark	Light	Dark	Light	Dark
8.3	1.30 \pm 0.18	1.25 \pm 0.2	1.36 \pm 0.26	1.16 \pm 0.15	1.6 \pm 0.3	2.0 \pm 0.2
7.0	9.20 \pm 0.60	9.17 \pm 0.74	6.55 \pm 0.96	11.80 \pm 1.13	3.4 \pm 0.1	10.1 \pm 0.7

*) Ratio of the activity assayed at [PEP] 5 mM to that at [PEP] 1 mM.

Values are the mean \pm SD of three separate experiments.

conditions to which the plant is subjected, play an important role in determining the day and night kinetic behavior of PEPC "in vivo".

We include in Table 2 the ratio values of the PEPC activity measured at pH 7.0 and [PEP] of 5 to that of [PEP] at 1 mM for the light and dark desalted extracts, since we found these ratios very useful to characterize both forms, as it is simple to determine and very reproducible. These ratios should be lower than 5 if the enzyme follows a Michaelis-Menten kinetics. However, under our experimental conditions, they were higher than this value in the dark extracts, which reflect the anomalous kinetic behavior exhibited by the dark form at relatively low PEP concentrations (Fig. 1). These deviations from Michaelis-Menten kinetic were also present in the light extracts, but to a lesser extent. Further studies with the purified day and night forms are required to establish the nature of this complex behavior and its possible physiological significance, since at low PEP concentrations interferences of other proteins of the crude extracts with the PEPC assay might occur.

Effect of Reducing Agents on Extractable PEPC Activity.

Gavalas et al. (1981) reported that the difference in activities between the day and night forms of PEPC from leaves of some C_4 species is abolished if a reducing agent, such as β -mercaptoethanol is included in the extraction media. However, in our hands, when β -mercaptoethanol was omitted the same general pattern as that in its presence was found (Table 1). On the other hand, it is known that the effect of light on the activity of

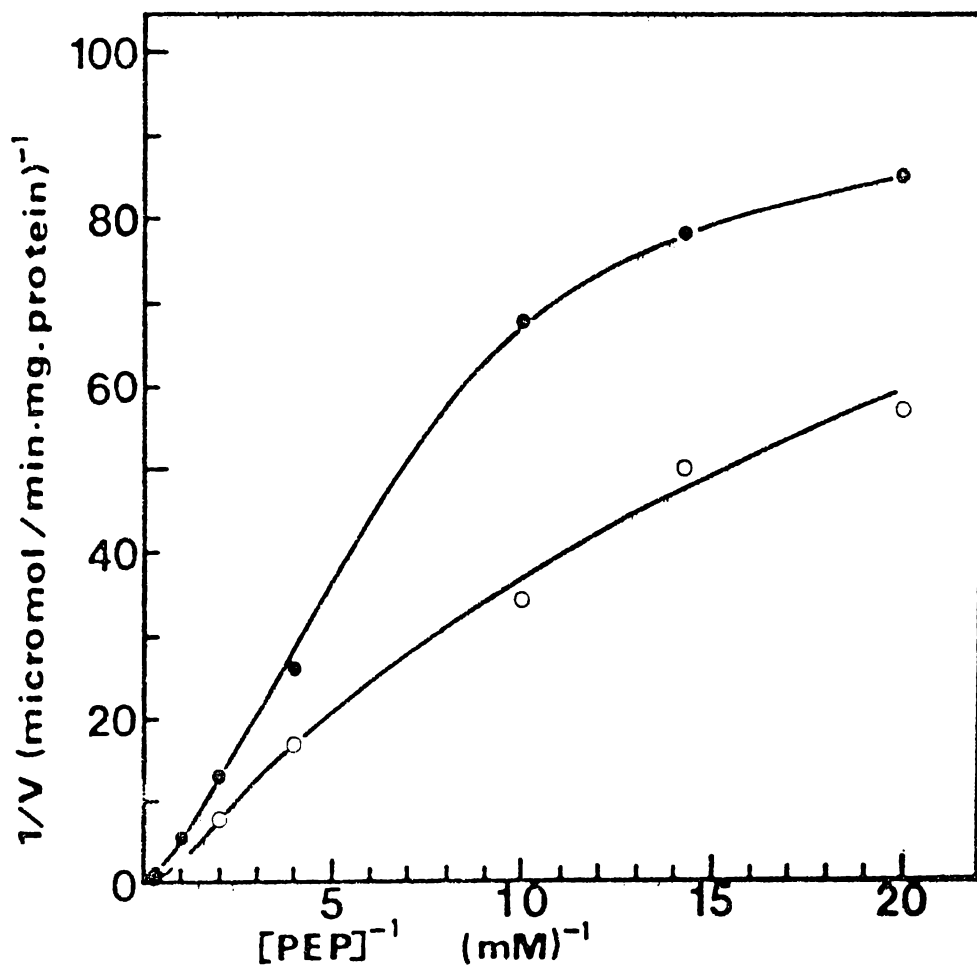


FIGURE 1. Double-reciprocal plots showing phosphoenolpyruvate kinetics of phosphoenolpyruvate carboxylase in rapidly desalted leaf extracts from light- (○) and dark- (●) treated maize plants. Activities were measured under standard assay conditions (30°C, pH 7.0) using a concentration range of PEP of 2.5 to 0.05 mM. The results of a typical experiment are shown.

some photosynthetic enzymes can be simulated by treatment of the extracts with DTT, while another reducing agents such as β -mercaptoethanol may be ineffective (Buchanan, 1980). Regarding maize leaf PEPC, Iglesias and Andreo (1984) reported that the incubation of an extract from dark-treated leaves with DTT increases the enzyme activity, while it had no effect on that of the extract from illuminated leaves. In an effort to elucidate the molecular mechanism responsible for the short-term photoregulation of maize leaf PEPC, we attempted to confirm this effect of DTT by using the same experimental protocol described by these authors, but when PEPC was assayed under several conditions after 5 min of incubation with 50 mM DTT at room temperature, both series of extracts (from light- and dark-treated plants) showed a similar behavior. Only small differences with respect to the controls (no DTT added) were found (Table 3). In some cases there was an increase in activity, suggesting that a certain amount of the enzyme molecules may be in a less active, or inactive, state due to formation of disulfide bridges, as it has been reported (Manetas and Gavalas, 1982; Iglesias and Andreo, 1984). The enzyme may undergo on oxidation during the extraction procedure, or a variable proportion of PEPC molecules may be in an oxidized state "in vivo". In any case, this ability of certain sulphhydryl groups of PEPC to become oxidized appears not to be related with the regulation by light of its activity. Decreases in PEPC activity with respect to the controls were also detected, which might imply that maize leaf PEPC has also at least one disulfide bridge essential for activity. In fact,

TABLE 3. Effect of DTT on PEPC Activity Extracted from Light- and Dark-Treated Maize Plants.

<u>Assay conditions</u>		<u>PEPC activity (% of the control)</u>			
pH	PEP mM	<u>Crude Extracts</u>		<u>Desalted Extracts</u>	
		Light	Dark	Light	Dark
8.3	5	89 ± 9	111 ± 11	83 ± 10	89 ± 3
7.0	5	107 ± 7	103 ± 16	95 ± 6	102 ± 14
7.0	1	91 ± 8	86 ± 6	91 ± 8	97 ± 5

Values are the mean ± SD of three separate experiments.

Iglesias and Andreo (1984) reported that purified maize leaf has two disulfide bridges by molecule. One alternative explanation to these decreases in activity may be that an inactivating factor, activable itself by DTT, is present in the extracts.

When the incubation time with DTT was increased up to 2 h, we found that the light desalted extracts lost about 90% of their PEPC activity, while the dark desalted ones lost only about 15% (Fig. 2). Both series of crude extracts were stable, which may be due to the presence of some unknown low molecular weight compound that may protect PEPC from inactivation. Thus, whichever the inactivating factor is, the light PEPC form is much more sensitive to it than the dark PEPC form. This complex behavior of PEPC in crude and desalted extracts when incubated with DTT may account for the results published by Iglesias and Andreo (1984). Clearly, more work is needed to decide upon the two possibilities discussed.

We also determined the effect of incubation with DTT on the ratio of the activity assayed at pH 7.0 and 5 mM PEP to that at 1.0 mM PEP, since, as discussed before, the light and dark extracts showed significant different ratio values. The results in Table 4 show that the differences between the light and dark extracts remain unchanged after incubation with DTT, giving additional support to our conclusion that oxidation of sulphhydryl groups is not related to the interconversion of both forms.

Effect of Inhibitors of Phosphoprotein Phosphatase Activity on Extractable PEPC Activity.

Nimmo et al. (1984) reported that phosphorylation of the

TABLE 4. Effect of DTT on The Kinetic Behavior of Leaf PEPC in Extracts from Light- and Dark-Treated Maize Plants.

Activity Ratio*			
Light		Dark	
Control	+ DTT	Control	+ DTT
Crude Extracts			
4.4 ± 0.8	5.7 ± 0.8	4.7 ± 0.1	5.8 ± 0.7
Desalted Extracts			
3.52 ± 0.5	4.57 ± 0.7	10.0 ± 0.3	12.2 ± 0.4

* Ratio of the activity assayed at [PEP] 5 mM to that at [PEP] 1 mM.

Values are the mean ± SD of three separate experiments.

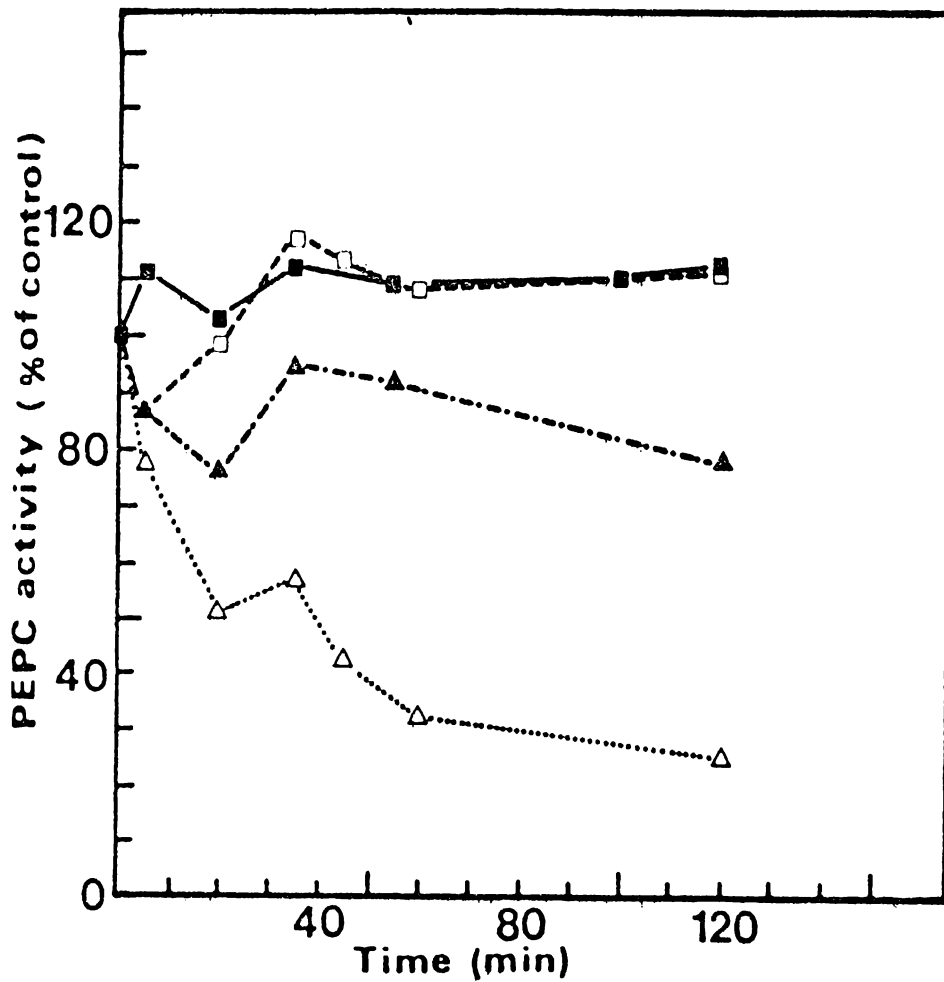


FIGURE II. Effect of time of incubation with 50 mM DTT on the phosphoenolpyruvate carboxylase activity of crude, and rapidly desalted leaf extracts from light- and dark-treated maize plants. Activities were measured under standard assay conditions (30°C, pH 8.3 and [PEP] 5 mM). The incubations were performed at room temperature. Each point is the average of three separate experiments. (□) crude light extracts; (△) desalted light extracts; (■) crude dark extracts; (▲) desalted dark extracts.

night form of leaf PEPC from the CAM plant Bryophyllum fedtschenkoi may mediate the modulation by light of the state of activation of this enzyme. To check this possibility in the case of maize leaf PEPC, we carried out extractions in the presence of 30 mM NaF and 30 mM Na₂MoO₄, as both compounds are well known inhibitors of phosphoprotein phosphatase activity, and thus would block possible dephosphorylation of the protein during extraction. Light- or dark-treated leaves were extracted in light or dark according to prior treatment, desalted and immediately assayed under several conditions. Our results (Table 5) do not suggest that a phosphorylation process is involved in the "in vivo" light regulation of maize leaf PEPC as we could not detect any significant differences between the extracts made in the presence of NaCl and those made in the presence of phosphoprotein phosphatase activity inhibitors. In addition, the differences in the activity ratio at pH 7.0 and 5 mM and 1 mM PEP, used by us to characterize light and dark extracts, were still present. Therefore, it seems that if any phosphorylation is taking place in passing from light to darkness, or viceversa, has no effect on the kinetic characteristics of both forms of the enzyme, although it may be of relevance for other regulatory events.

CONCLUDING REMARKS

In view of our results we can likely exclude a covalent modification of the enzyme molecule, involving reversible reduction of disulfide bridges or reversible phosphorylation, as the mechanism underlying light regulation of maize leaf PEPC. It

TABLE 5. Effect of the Addition of Inhibitors of Phosphoprotein Phosphatase Activity to the Extraction Medium on the Kinetic Behavior of Leaf PEPC in Extracts from Light- and Dark-Treated Maize Plant.

Assay pH	Activity Ratio*			
	Light		Dark	
	Control**	+Inhibitors	Control	+Inhibitors
8.3	1.43 ± 0.10	1.70 ± 0.42	1.91 ± 0.64	1.46 ± 0.20
7.0	6.66 ± 0.3	6.05 ± 0.42	9.64 ± 1.26	9.84 ± 1.03

* Ratio of the activity assayed at [PEP]5 mM to that at [PEP] 1 mM.

** The control extraction medium contained 90 mM NaCl, to equalize ionic strength.

Values are the mean ± SD of three separate experiments.

seems more likely that reversible changes in protein conformation and/or aggregation state are implicated in this regulation. These could be triggered by a change in the concentration of PEP and/or effectors or H^+ in the vicinity of the enzyme molecule as it has been found for Crassula leaf PEPC (Wu and Wedding, 1985a, 1985b). The knowledge of the interactions of the purified light and dark forms of leaf maize PEPC with substrate, effectors and pH may well provide insight into possible mechanisms of light-regulation of the state of activation of C_4 PEPC "in vivo". We are currently pursuing this line of investigation in our laboratory.

REFERENCES

- BUCHANAN, B.B.: Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 341-374 (1980).
- BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).
- GAVALAS, N.A., S. CARAVATAS and Y. MANETAS: Sigmoid rate curves of photosynthetic (C₄)PEP carboxylase as an artifact of the assay: Factors affecting inactivation-reativation of the enzyme. In: G. Akoyunoglou (ed.), *Photosynthesis. Vol. IV*, pp 91-98, Balaban Int. Sci. Services, Philadelphia (1981).
- IGLESIAS, A.A. and C.S. ANDREO: On the molecular mechanism of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activation by thiol compounds. *Plant Physiol.* 75, 983-987 (1984).
- KARABOURNIOTIS, G., Y. MANETAS and N.A. GAVALAS: Photoregulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in Salsola soda L. and other C₄ Plants. *Plant Physiol.* 73, 735-739 (1983).
- KARABOURNIOTIS, G., Y. MANETAS and N.A. GAVALAS: Detecting photoactivation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄ plants. An effect of pH. *Plant Physiol.* 77, 300-302 (1985).
- LEEGOOD, R.C. and R.T. FURBANK: Carbon metabolism and gas exchange in leaves of Zea mays L. Changes in CO₂ fixation, chlorophyll a fluorescence and metabolite levels during photosynthetic induction. *Planta* 162, 450-456 (1984).
- LEVI, C., J.T. PERCHOROWICZ and M. GIBBS: Malate synthesis by dark carbon dioxide fixation in leaves. *Plant Physiol.* 61,

477-480 (1978).

MANETAS, Y. and N.A. GAVALAS: Evidence for essential sulphhydryl group(s) in photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase: Protection by substrate, metal substrate and glucose-6-phosphate against p-chloromercuribenzoate inhibition. *Photosynthetica* 16, 59-66 (1982).

NIMMO, G.A., H.G. NIMMO, C.A. FEWSON and M.B. WILKINS: Diurnal changes in the properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in Bryophyllum leaves: a possible covalent modification. *FEBS Lett.* 178, 199-203 (1984).

SAMEJIMA, M. and S. MIYACHI: Photosynthetic and light-enhanced dark fixation of carbon-14 dioxide from the ambient atmosphere and ¹⁴C-bicarbonate infiltrated through vascular bundles in maize leaves. *Plant Cell Physiol.* 19, 907-916 (1978).

WINTER, K.: Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in rapidly prepared desalted leaf extracts of the Crassulacean acid metabolism plant Mesembryanthemum crystallinum L. *Planta* 154, 298-308 (1982).

WU, M.-X. and R.T. WEDDING: Diurnal regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from Crassula. *Plant Physiol.* 77, 667-675 (1985a).

WU, M.-X. and R.T. WEDDING: Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from Crassula by interconversion of oligomeric forms. *Arch. Biochem. Biophys.* 240, 655-662 (1985b).