

00551



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

12

ESTUDIO DE LA RESPUESTA AL DEFICIT DE AGUA DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE HOJA DE FRIJOL

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (Biotecnología)  
P R E S E N T A:

ROBERTO LOPEZ POZOS

00551



ASESOR: DRA. ROSARIO A. MUÑOZ CLARES

MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Dra. Estela Sánchez de Jiménez

**VOCAL:** Dr. Jorge Nieto Sotelo

**SECRETARIO:** Dra. Irma Bernal Lugo

**SUPLENTE:** Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

**SUPLENTE:** Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

**A la memoria de mi padre, Inocencio López Hernández  
que sigue tan presente su ausencia, su ejemplo y  
fortaleza en mi corazón.**

**A María del Rosario, mi compañera incondicional  
de toda la vida, que con su apoyo me fortalece  
para seguir objetivos día a día.**

**A mis hijos Roberto y Omar que con su amor y  
cariño son fuente de inspiración y  
fuerza interior.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Mi agradecimiento a mi madre Lorenza Pozos de la Cruz, por su apoyo incondicional durante el desarrollo de la maestría.**

**A mi suegra María del Carmen González Zavala por su hospitalidad en los momentos más difíciles del desarrollo de este trabajo.**

**Mi mas sincero agradecimiento a la Dra. Rosario A. Muñoz Clares, por la acertada dirección de este trabajo, por su dedicación, apoyo y comprensión.**

**A los miembros del Jurado, por sus valiosas críticas y correcciones aportadas.**

**A Carlos Mújica por su apoyo de siempre.**

**A mis hermanos, por el apoyo y amor fraternal de siempre.**

**A mis compañeros y amigos del Departamento de Bioquímica, en especial a los del Laboratorio 102.**

**Este trabajo se realizó con el  
apoyo de la beca 113419 del  
Consejo Nacional de Ciencia  
y Tecnología.**

**y**

**con el apoyo de la Dirección  
General de Asuntos del  
Personal Académico (DGAPA)  
Proyecto PAPIIT IN 210295**

## CONTENIDO

	pagina
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
I. INTRODUCCIÓN	8
II. ANTECEDENTES	9
<b>II.1. Fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas</b>	9
II.1.1. Reacción catalizada	9
II.1.2. Isoformas de la fosfoenolpiruvato carboxilasa	10
II.1.2.1. Isoformas con función fotosintética	11
II.1.2.2. Isoformas con funciones no fotosintéticas	15
II.1.3. Características químicas y fisicoquímicas de la PEPC	19
II.1.4. Características cinéticas	20
II.1.4.1. Requerimiento de metales	20
II.1.4.2. Saturación por bicarbonato	21
II.1.4.3. Efectos del pH	21
II.1.4.4. Regulación por metabolitos	21
II.1.4.5. Regulación por fosforilación	23
II.1.5. Otros tipos posibles de regulación	24
II.1.5.1. Estado de agregación	24
II.1.5.2. Presencia de cosolutos	24
II.1.5.3. Por síntesis de novo	25
II.1.5.4. Inducción por luz	26
<b>II.2. Respuestas metabólicas de las plantas a deficiencia de agua</b>	26
II.2.1. Metabolismo involucrado en el ajuste osmótico durante el déficit de Agua	27
II.2.2. Acumulación de prolina	27
<b>II.3. Papel de PEPC en la respuesta de plantas a estrés osmótico</b>	29
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31



<b>VII. RESULTADOS</b>	44
<b>VII.1. Caracterización cinética de PEPC en extractos crudos de hoja control y sometidas a déficit de agua</b>	44
VII.1.1. . Cinética de saturación por PEP libre	45
VII.1.2. Efecto de malato sobre la cinética de saturación por PEP	49
VII.1.3. Efecto de Glc6P sobre la cinética de saturación por PEP	53
VII.1.4. Efecto de cosolutos sobre la cinética de saturación por PEP	58
VII.1.5. Efecto del pH sobre la actividad PEPC	62
<b>VII.2. Patrón isoenzimático de PEPC en hoja de frijol</b>	62
<b>VII.3. Purificación parcial de PEPC de hoja de frijol</b>	69
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	74
<b>VIII.1. Propiedades de la enzima PEPC de hoja de frijol</b>	74
<b>VIII.2. Efectos del déficit de agua sobre la enzima PEPC de hoja de frijol</b>	78
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	81
<b>X. REFERENCIAS</b>	82

## ABREVIATURAS

BSA	Albúmina de suero bovino
CA	Anhidrasa carbónica
CAM	Plantas con metabolismo ácido crasuláceo
CRA	Contenido relativo de agua
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilén diamino tetra acético
Glc6P	Glucosa 6 fosfato
HEPES	Ácido N-[2-hidroxietyl]piperazina-N-[2-etanosulfónico]
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
kDa	Kilodaltones
$K_i$	Constante de inhibición
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
Mal	Malato
MDH	Malato deshidrogenasa
MPa	Megapascales
$NAD^+$	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
OAA	Oxaloacetato
Pi	Fósforo inorgánico
PEP	Fosfoenolpiruvato
$PEP_L$	Fosfoenolpiruvato libre
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PEG	Polietylénglicol
PMSF	Fluoruro de metilén sulfonil fenilo
PpcI	gen de una isoforma de PEPC
Pyr	Piruvato
P5CS	$\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetasa
P5CR	$\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato reductasa
rpm	Revoluciones por minuto
Rubisco	Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
$V_{max}$	Velocidad máxima

## RESUMEN

En este trabajo se estudiaron algunas características de la enzima PEPC de extractos crudos de hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. var. Valentine) tanto controles como sometidas a déficit de agua. El contenido relativo de agua de las hojas controles fue del 88 - 92 % mientras que el de hojas tratadas fue del 55 - 60 %. Se estudiaron la saturación de la enzima por PEP a pH y concentraciones de  $Mg^{2+}$  cercanas a las fisiológicas; los efectos del inhibidor malato y del activador glucosa-6-fosfato (Glc6P); la dependencia de la velocidad de la reacción catalizada por el pH del medio de ensayo y, el efecto de prolina y glicerol en la cinética de saturación por PEP y en la sensibilidad a malato. También, se determinó el patrón isoenzimático de la enzima por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida nativos.

Los estudios cinéticos en ausencia y presencia de efectores sugieren fuertemente la presencia en los medios de ensayo de dos formas de la enzima que no son interconvertibles, al menos bajo las condiciones de los ensayos enzimáticos. La forma de la enzima con alta afinidad para PEP, PEPC-a, representó el 15 % de la actividad total cuando está saturada por el sustrato. La forma de la enzima de baja afinidad por el sustrato, PEPC-b representó el 85 % de la actividad total. La forma de alta afinidad (PEPC-a) es probablemente la de relevancia fisiológica. La afinidad de esta forma por PEP es 6 veces menor en hoja sometidas a déficit de agua que en hojas controles. La  $K_{mPEP}$  de la forma PEPC-b es aproximadamente 500 veces más alta que la  $K_{mPEP}$  de la forma PEPC-a en hojas controles y más de 100 veces en los extractos de hojas estresadas.

Así mismo, en los ensayos de inhibición por malato a concentración fija de sustrato, se encontró que existen dos formas de la enzima con diferente sensibilidad al inhibidor. En la cinética de saturación por PEP, el malato tuvo un efecto ligero sobre los parámetros cinéticos de las dos formas de PEPC de extractos de hojas controles; la  $V_{max}$  disminuyó entre 1.5 y 2.8 veces y los valores de la  $K_{m(PEP)}$  no se afectaron. En las PEPC de extractos de hojas estresadas, el malato disminuyó la  $K_{m(PEP)}$  en ambas formas, pero la  $V_{max}$  no se afectó significativamente.

La Glc6P disminuyó la  $K_m(\text{PEP})$  de la PEPC-a en ambos tipos de extractos, pero su efecto fue mayor en la enzima de hojas estresadas, en la  $K_m(\text{PEP})$  de la PEPC-b prácticamente no tuvo ningún efecto este metabolito activador en ambos tipos de extractos. Altas concentraciones de prolina en el medio de ensayo también produjeron una importante reducción en la  $K_m(\text{PEP})$  de la forma PEPC-a presente en hojas estresadas.

El tratamiento que provoca déficit de agua en la hojas también produce alteraciones funcionales y estructurales en la PEPC que se manifiestan en una  $K_m(\text{PEP})$  de la forma PEPC-a 6 veces mayor que la de la misma forma de hojas controles y en una mayor estabilidad durante la electroforesis nativa en geles de poliacrilamida, como puede observarse el patrón electroforético en geles de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturizantes y el revelado de las bandas con actividad PEPC que también mostraron también dos formas de la enzima que migran a diferente distancia en el campo electroforético. Las diferencias cinéticas entre la enzima de hojas controles y estresadas son anuladas por los efectos del malato y la glucosa 6 fosfato y por el osmolito prolina.

## I. INTRODUCCIÓN

En contraste con los numerosos estudios realizados en laboratorios de todo el mundo sobre la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E.C.4.1.1.31) de hoja de plantas  $C_4$  o de metabolismo ácido crasuláceo (CAM), la enzima de hoja de plantas  $C_3$  ha sido muy poco estudiada y, por consiguiente, se desconocen la mayor parte de sus propiedades cinéticas o fisicoquímicas y los mecanismos que regulan su actividad. Poco se ha avanzado desde el trabajo pionero de Ting y Osmond (1973), en el que establecían claras diferencias cinéticas entre las isoenzimas presentes en extractos crudos de hoja de los tres tipos de plantas,  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM. Ello en parte se ha debido al gran interés despertado por las isoenzimas fotosintéticas involucradas en la alta productividad de las plantas  $C_4$  (Edwards y Huber, 1981) o en la eficiente respuesta metabólica al estrés osmótico de las plantas CAM (Hatch, 1978; Hatch, 1987), que por un tiempo ha opacado a las isoenzimas no fotosintéticas o a las de hoja de plantas  $C_3$ .

En el caso concreto de las leguminosas, ha merecido también gran atención el estudio de la isoenzima de nódulo, que juega un papel clave en el suministro de los esqueletos carbonados necesarios para la fijación del  $N_2$  atmosférico por el simbiote (Maxwell *et al.*, 1984; King *et al.*, 1986). Sin embargo, el hecho de que la PEPC catalice la reacción anaplerótica más importante en las plantas justifica sobradamente el interés del estudio de las isoenzimas no fotosintéticas.

En el trabajo que constituye esta tesis de maestría nos propusimos llenar el vacío de información que existe acerca de las isoenzimas PEPC no involucradas directamente en el proceso fotosintético. Además, debido al posible papel que podría jugar esta actividad enzimática en la respuesta metabólica de las plantas a la sequía, participando por un lado en la generación de energía mediante el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, ya que la fotosíntesis se inhibe bajo estas condiciones adversas (Boyer, 1976; Hanson y Tully, 1979), por otro, en el aporte de esqueletos de carbono para la biosíntesis incrementada de prolina, que es el osmoprotector principal en plantas como el frijol, investigamos si el déficit de agua se traduce en cambios en algunas propiedades de la PEPC de hoja de frijol.

## II. ANTECEDENTES

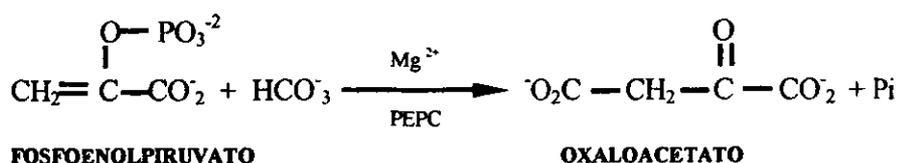
### II.1. Fosfoenolpiruvato carboxilasa

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) es una enzima citoplasmática ampliamente distribuida en células vegetales, en algunas bacterias, cianobacterias y algas verdes. Sus propiedades difieren dependiendo de la fuente de donde se obtenga (O' Leary, 1982, Chollet *et al.*, 1996). La enzima está aparentemente ausente en tejidos animales (O' Leary, 1982).

En plantas, esta enzima ha sido descrita como una enzima con una gran variedad de funciones. Así, participa en procesos tan diversos como la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico en las rutas fotosintéticas de plantas C<sub>4</sub> (Hatch, 1978; Coombs, 1979; Ray y Black, 1979; Kludge, 1983) y con metabolismo ácido crasuláceo (CAM; Brulfert y Glüclús, 1983; Kludge, 1983; Osmond 1978; Osmond y Haltum 1981; Ting, 1985), la asimilación de nitrógeno en nódulos de leguminosas (King *et al.*, 1986, Deroche y Carrayol, 1988, Rosendhal, *et al.*, 1990, Maxwell *et al.*, 1991), en los mecanismos de regulación de pH citoplasmático (Latzko y Kelly, 1983; Guern *et al.*, 1983; Davies, 1986), el crecimiento estimulado por auxinas (Latzko y Kelly 1983), formación y germinación de semillas, maduración de frutos (Geirgenberger *et al.*, 1991; Leblová *et al.*, 1991; Osuna *et al.*, 1996) y apertura y cierre de los estomas (Willmer, 1983). Además de ser la enzima anaplerótica más importante de todos los tejidos vegetales (Latzko y Kelly 1983; O' Leary, 1982).

#### II.1.1. Reacción catalizada

La enzima PEPC cataliza la  $\beta$ -carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP; Bandurski y Greiner, 1953) utilizando bicarbonato como sustrato, para producir oxaloacetato (OAA) y fosfato inorgánico (Pi), de acuerdo a la siguiente reacción:



Esta reacción es altamente exergónica debido a que presenta un cambio de energía libre muy negativo ( $\Delta G^\circ = -6$  a  $-8$  Kcal/mol) y es prácticamente irreversible bajo condiciones celulares (O' Leary, 1982).

A diferencia de otras reacciones de carboxilación catalizadas enzimáticamente que usan  $\text{CO}_2$  (Cooper y Wood, 1971; Rubio, 1986; Maruyama *et al.*, 1966), la reacción catalizada por PEPC no requiere de biotina como cofactor (Rubio, 1986; Mukerji, 1977; Bandurski y Greiner, 1953). Requiere de un ion metálico divalente para la actividad (Bandurski, 1955). La afinidad de PEPC por el complejo Mg-PEP es mayor que la afinidad por PEP o  $\text{Mg}^{2+}$ , por lo que se considera al complejo el sustrato verdadero de la enzima (Mukerji, 1977; Wedding, 1988; Meyer *et al.*, 1990; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990, Tovar-Méndez *et al.*, 1998). Aunque se propone que el  $\text{Mg}^{2+}$  es el ion utilizado *in vivo* para la catálisis (O'Leary, 1982), la PEPC puede utilizar otros cationes divalentes para su reacción, entre ellos el  $\text{Mn}^{2+}$  (N'guyen *et al.*, 1988).

### II.1.2. Isoformas de la fosfoenolpiruvato carboxilasa

Las enzimas que catalizan una misma reacción con similar o idéntica especificidad del sustrato y que tienen múltiples formas enzimáticas presentes en un mismo organismo se denominan isoenzimas (Market y Moller, 1959). Las isoenzimas poseen características que les permiten satisfacer los requerimientos específicos de la ruta metabólica a la que están integradas y pueden diferir en alguno o varios de los siguientes aspectos: propiedades fisicoquímicas (estructura de la proteína, peso molecular, carga superficial neta, estabilidad frente a pH o temperatura), propiedades catalíticas (valores de  $K_m$ ,  $V_{max}$ , grado de especificidad por el sustrato o cofactor, pH o temperaturas óptimas de catálisis, respuestas a

inhibidores o activadores), localización celular o subcelular y regulación de su síntesis y degradación (Muñoz-Clares, 1986).

Se ha descrito que existen varias formas moleculares con actividad de PEPC asociadas a diferentes funciones fisiológicas; pero, hasta el momento son bien conocidas tres isoenzimas de PEPC en plantas superiores: la isoenzima fotosintética de hoja de plantas  $C_4$  que cataliza la fijación de  $CO_2$  en la primera reacción de la ruta  $C_4$ ; la isoenzima de plantas CAM con una función también fotosintética, presente en plantas de clima desértico, en donde la fijación de  $CO_2$  ocurre durante la noche cuando la planta abre sus estomas, para reducir así la pérdida de agua (Hatch, 1978; Hatch, 1987) y la isoenzima anaplerótica, que desempeña un papel muy importante en el abastecimiento de compuestos de cuatro carbonos al Ciclo de Krebs, cuando los intermediarios de este ciclo están siendo usados para biosíntesis como las de aminoácidos (O'Leary, 1982; Andreo *et al.*, 1987). Estas isoformas están codificadas por genes diferentes, y pueden ser distinguibles por sus propiedades cinéticas y por su comportamiento cromatográfico.

#### II.1.2.1. Isoformas con función fotosintética

La mayoría de las plantas  $C_4$  presentan dos tipos de células diferenciadas participando en el metabolismo fotosintético de la hoja (Hatch y Osmond, 1976; Oshugi y Murata, 1980; Welkie y Coldwell, 1970). La Figura 1 muestra un esquema simplificado de metabolismo  $C_4$ . Las células del mesófilo se encuentran cerca de la superficie externa de la hoja y toman  $CO_2$  directamente de la atmósfera, hidratándolo a bicarbonato en el citosol por la enzima anhidrasa carbónica (CA) y, subsecuentemente, asimilándolo en forma de OAA, un ácido de cuatro carbonos, mediante la enzima PEPC (Hatch, 1987). Este metabolito se transporta al interior del cloroplasto en donde se convierte en malato mediante la enzima málico deshidrogenasa (MDH) dependiente de  $NADP^+$  (NADP-MDH). El malato, en intercambio con el OAA que se está produciendo, es transportado al citoplasma para, posteriormente, ser llevado a las células de la vaina vascular, las cuales se localizan en la periferia de las haces vasculares (Figura 2) en donde están aisladas del intercambio directo de  $CO_2$  con la atmósfera. En las células de la vaina vascular, el malato es descarboxilado mediante la

enzima málico deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP<sup>+</sup> (enzima málica-NADP) y el CO<sub>2</sub> producido se utiliza para la síntesis de carbohidratos mediante el Ciclo de Calvin que tiene lugar en estas células. El piruvato producto de la descarboxilación regresa a las células del mesófilo y es transportado al interior del cloroplasto en donde produce PEP en una reacción catalizada por la enzima piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK), con el consumo de dos equivalentes de ATP. El PEP resultante se transporta al citoplasma, en intercambio con el fosfato, para seguir alimentando esta ruta (Hatch, 1978; Ray y Black, 1979; Day y Hatch, 1981; Edwards y Huber, 1981; Rathman, 1978). La función principal de la ruta C<sub>4</sub> es concentrar CO<sub>2</sub> en las células internas del haz vascular, donde se encuentra la enzima Rubisco, para así suprimir su actividad de oxigenasa y la fotorrespiración asociada.

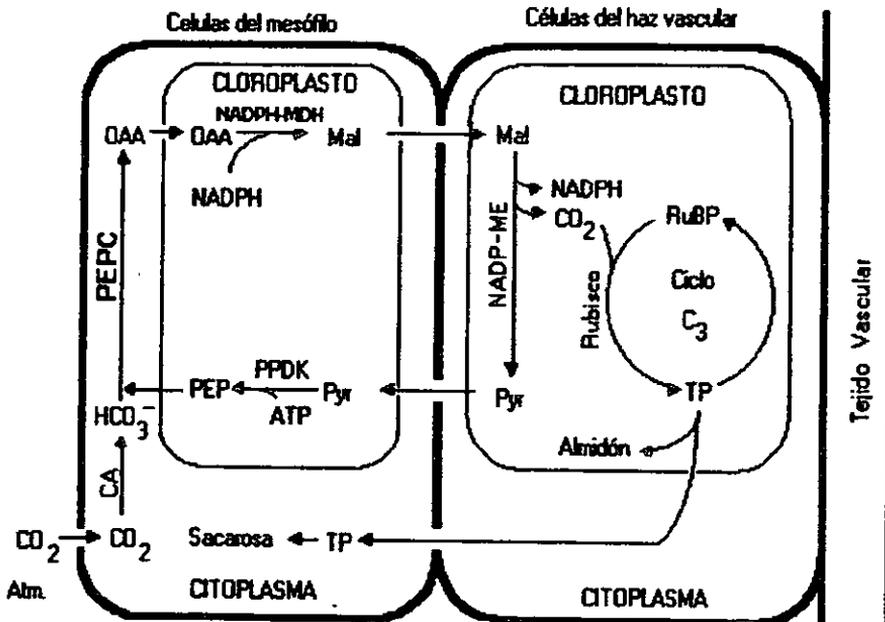


Figura 1. Esquema de la ruta C<sub>4</sub> de la fotosíntesis en maíz. (adaptado de Dai *et al.*, 1993). OAA, Oxaloacetato; NADP-MDH, NADP-malato deshidrogenasa; Mal, malato; Pyr, piruvato; RuBP, ribulosa-1,5-bisfosfato; TP, triosa-5-fosfato; Atm. CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> atmosférico.

Las plantas que poseen la ruta  $C_4$  usan parte de la energía solar captada para mantener esta ruta extra, pero a pesar de ello, cuando las condiciones de temperatura e iluminación les son favorables, su eficiencia fotosintética es superior a la de las plantas  $C_3$ , que sólo poseen Ciclo de Calvin. Las plantas  $C_4$  también presentan una aparente falta de fotorrespiración, un proceso complejo que consume energía y que resulta en la pérdida de carbono previamente asimilado (Edwards y Huber, 1981).

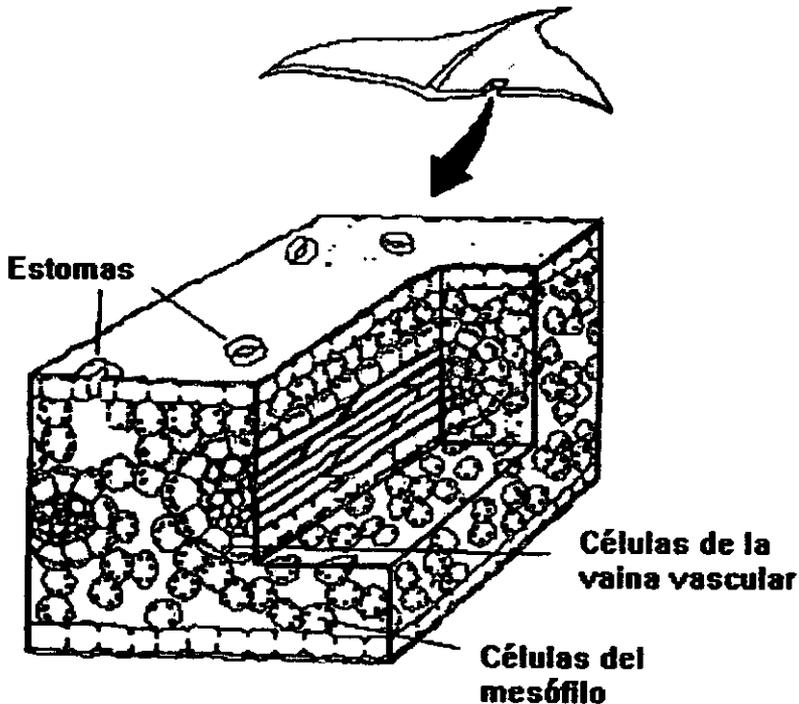


Figura 2. Modelo de una hoja  $C_4$  donde se muestra la anatomía típica Kranz característica de este grupo de plantas

El sistema fotosintético  $C_4$  opera además con pérdidas de agua menores que la fotosíntesis  $C_3$  por dos razones: 1) Gracias a que la afinidad por  $CO_2$  es superior en estas plantas, pueden mantener altas velocidades de fijación con apertura estomatal limitada, permitiendo así una fotosíntesis activa en condiciones de relativa aridez y con bajas concentraciones de  $CO_2$ , condición frecuente esta última cuando las plantas están fotosintetizando activamente, ya que consumen con rapidez el  $CO_2$  de las capas cercanas de la atmósfera, 2) Pueden intercambiar  $CO_2$  por agua más eficientemente que las plantas  $C_3$ , debido a que la concentración interna de  $CO_2$  es mucho más baja que en estas últimas. Por otra parte, debido a que la asimilación de  $CO_2$  es más eficiente, las plantas  $C_4$  poseen la capacidad de aprovechar mayor cantidad de energía luminosa y crecer mejor bajo condiciones de alta intensidad lumínica. En consecuencia, las plantas  $C_4$  son más productivas por lo que son magníficos candidatos para incrementar la productividad (Good y Bell, 1980).

La importancia de la PEPC en el metabolismo  $C_4$  está indicada por su gran abundancia en las células de mesófilo, donde llega a constituir el 15 % de la proteína total soluble en hoja de maíz (Uedan y Sugiyama, 1976) y por ser una enzima altamente regulada, como se describirá más adelante.

En las plantas CAM, la fijación del  $CO_2$  ocurre en forma similar a las  $C_4$ , sin embargo, las actividades de las enzimas carboxilantes, Rubisco y PEPC están separadas en el tiempo y no en el espacio como ocurre en las plantas  $C_4$ . Las enzimas involucradas en la fotosíntesis se encuentran en una misma célula y sus actividades se expresan de forma diferente a lo largo del día (Ting, 1985). En estas plantas se observa lo siguiente: durante la noche cuando la temperatura y la evaporación de agua es baja, los estomas se encuentran abiertos y permiten el libre intercambio de gases. En este mismo periodo, la enzima PEPC se encuentra fosforilada y su actividad es alta, por lo que el  $CO_2$  es fijado activamente, produciendo OAA a partir de PEP. El OAA se transforma en malato que se almacena en vacuolas hasta el día siguiente (Ting, 1985). En las primeras horas de la mañana, la fijación del  $CO_2$  la llevan a cabo conjuntamente PEPC y Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), pero al aumentar la temperatura e intensidad de luz, los

estomas se cierran para evitar la pérdida excesiva de agua. Es entonces cuando el malato es movilizado desde las vacuolas y la actividad de PEPC disminuye debido a que es defosforilada y está en presencia de su inhibidor. Una rápida descarboxilación del malato crea una concentración elevada de CO<sub>2</sub>, el cual es utilizado por la Rubisco en la misma forma que lo hacen los cloroplastos de hojas de plantas C<sub>3</sub> (Ting, 1985).

#### II.1.2.2. Isoformas con funciones no fotosintéticas

La PEPC, además de existir en hojas de las plantas C<sub>4</sub> y CAM en donde participa en el metabolismo fotosintético, se encuentra en células de los tejidos no fotosintéticos de las plantas C<sub>4</sub> (O'Leary, 1982), en los tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos de plantas C<sub>3</sub> (Amánancio *et al.*, 1993; Vance *et al.*, 1994), en semillas (Leblová *et al.*, 1991; Osuna *et al.*, 1996) y en frutos (Law y Plaxton, 1995), en donde funciona como una enzima anaplerótica. PEPC desempeña un importante papel como enzima anaplerótica, ya que reabastece al ciclo de los ácidos tricarbónicos de OAA, cuando sus intermediarios son empleados para síntesis de porfirinas o aminoácidos como el glutamato.

Las isoformas de PEPC no fotosintéticas estudiadas a la fecha poseen propiedades cinéticas diferentes a las isoformas fotosintéticas de hojas de plantas C<sub>4</sub> y CAM. Tienen una mayor afinidad y, por tanto, una *K<sub>m</sub>* menor para el sustrato PEP (Ting y Osmond, 1973; Holaday y Black 1981). Por otra parte, las isoformas no fotosintéticas de PEPC son mucho menos abundantes que las isoformas fotosintéticas y tienen diferente sensibilidad hacia los efectores (Ludwig y Burnell, 1995).

La función anaplerótica de PEPC es de vital importancia en la asimilación de nitrógeno en reacciones fotosintéticas. Se ha observado que la actividad de PEPC en nódulos aumenta, cuando se requiere de esqueletos carbonados para la asimilación de nitrógeno (Schuller *et al.*, 1990; Vanlerberghe *et al.*, 1990; Díaz *et al.*, 1996).

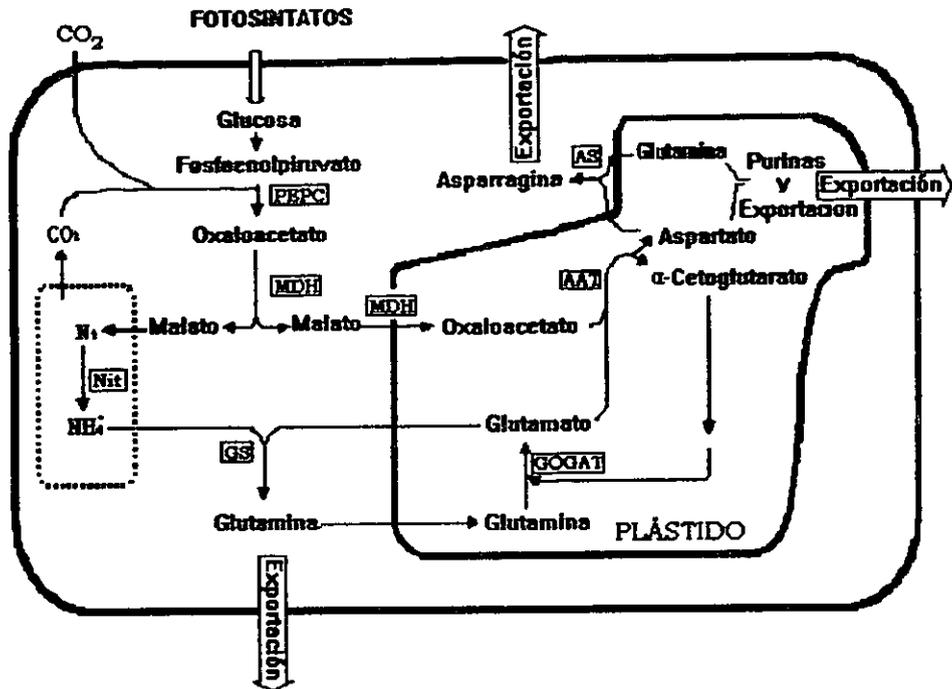


Figura 3. Metabolismo de asimilación primaria de N en nódulos de alfalfa. Observe la relación de los metabolismos del N y del C. AAT, aspartato aminotransferasa; AS, asparagina sintetasa; GOGAT, NADH-glutamato sintasa; GS, glutamina sintetasa; MDH, malato deshidrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa (adaptado de Vance *et al.*, 1994).

La asimilación primaria de  $\text{NH}_4^+$  en aminoácidos ocurre mediante la acción concertada de 4 enzimas como se muestra en la Figura 3. Los esqueletos de carbono requeridos para la asimilación inicial de N se derivan del ciclo de los ácidos tricarbónicos como  $\alpha$ -cetoglutarato y oxalacetato (Vance y Gantt, 1992; Schubert, 1986). En nódulos de raíz de leguminosas, PEPC proporciona una cantidad sustancial de carbono para rellenar la poza de ácidos orgánicos para la síntesis de malato (Vance, 1990; Vance y Gantt, 1992; Schubert, 1986) Se ha determinado que hasta el 25 % del carbono requerido para la actividad de nitrogenasa y la asimilación de nitrógeno podría ser aportada por PEPC (Maxwell *et al.*, 1984; King *et al.*, 1986). PEPC puede comprender hasta el 2 % del total de la proteína soluble del nódulo en especies que transportan amidas (Miller *et al.*, 1989). Así, la

asimilación primaria de nitrógeno está estrechamente relacionada con el metabolismo del carbono y con la actividad de PEPC.

Se ha propuesto que el incremento de la glucólisis durante la asimilación activa del nitrógeno, no sólo aporta esqueletos carbonados para las reacciones de transaminación, sino que es también necesario para cubrir las demandas de ATP (Geirgenberger y Stitt, 1991; Baysdofer y Bassham, 1984; Van Quy *et al.*, 1991)

#### Participación de la PEPC en la formación, maduración y germinación de las semillas

Estudios de inmunolocalización han revelado la presencia de altas cantidades de PEPC en tejidos con alta actividad metabólica y en el tejido vascular en las semillas en formación (González *et al.*, 1998). Durante la diferenciación, la aleurona también tiene un alto contenido de PEPC, coincidente con la actividad mitótica en esas células y que podría estar relacionada con la acumulación de malato en el endospermo almidonoso, en los últimos estados de desarrollo del grano (González *et al.*, 1998, Macnicol y Jacobsen, 1992). Se ha propuesto, que el gran incremento de la actividad de PEPC durante la maduración en las semillas de ricino está involucrado en la generación de malato para la síntesis de lípidos de reserva (Sangwuan *et al.*, 1992).

Se ha propuesto que la PEPC del endospermo en la fase temprana de la germinación, cumple una función crítica para desarrollar pozas de ácidos de cuatro carbonos necesarios para disparar la actividad del ciclo de Krebs y la del ciclo del glioxilato (Sangwuan *et al.*, 1992). Un papel subsecuente sería nutrir anapleróticamente de intermediarios del ciclo del ácido cítrico eliminados en el anabolismo (Podestá y Plaxton, 1994b). Funciones similares pueden ser atribuidas a la PEPC de los cotiledones, en donde se ha observado que el ARNm de PEPC se acumula transitoriamente en el escutelo y aleurona con un pico máximo 24 horas después de la imbibición en trigo (González *et al.*, 1998) y sorgo (Khayat *et al.*, 1991).

Durante la germinación de las semillas la glucólisis citosólica se estimula al adicionar glutamina o  $\text{NH}_4^+$ . Inicialmente hay una disminución en los niveles de PEP y 3-PGA, lo que indica que las enzimas PEPC y la piruvato cinasa ( $\text{PK}_c$ ) se activan, la fructosa 2,6-bifosfato aumenta, lo que indica que la sacarosa esta siendo utilizada para la producción de esqueletos carbonados del ciclo de Krebs, para la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  o de la glutamina (Geirgenberger y Stitt, 1991).

### Participación de PEPC en la maduración de frutos

La función de PEPC es especialmente importante durante la maduración en frutos, debido a que participa en la regulación del flujo del carbono glucolítico y gluconeogénico. Hay una disminución e incremento en las concentraciones de PEP y piruvato, respectivamente, asociados con el inicio de la liberación rápida de  $\text{CO}_2$  (o respiración climaterica) en la maduración del fruto del plátano (Beaudry *et al.*, 1989), esto sugiere la activación de PEPC y/o  $\text{PK}_c$  en el inicio al climaterio (Law y Plaxton, 1995). Otros estudios revelan que las cantidades de PEPC y  $\text{PK}_c$  permanecen equivalentes y uniformes en fruto en el estado preclimaterico, climaterico y postclimaterico, lo que sugiere que ambas enzimas compiten por una poza común de PEP citosólico y la activación de las enzimas resulta de un control fino de enzimas preexistentes, más que de síntesis *de novo* de PEPC y  $\text{PK}_c$  (Beaudry *et al.*, 1989). PEPC está presente en todos los estados fisiológicos del fruto, principalmente en forma desfosforilada y es activada por una PEPC-cinasa endógena que se expresa en la maduración del fruto de plátano (Law y Plaxton, 1997).

### Otras funciones en que participa PEPC

Otras funciones importantes en las que participa la PEPC es en la estabilización del pH en las células guarda de los estomas manteniendo el balance de cargas al acumularse aniones orgánicos, principalmente malato (Tarczynski y Outlaw, 1993). De igual forma regula el

pH celular, ya que la síntesis de malato genera iones  $H^+$  y su degradación iones  $OH^-$  (Kurdjan y Guern, 1989; Martinoia y Rentsch, 1994). También, participa en el transporte de equivalentes reductores de la mitocondria al citoplasma o del cloroplasto al peroxisoma y contribuye al mantenimiento del balance de cargas en la célula y fluidos de la planta, aumentando la concentración del malato cuando existe un exceso de cationes (Deroche y Carrayol, 1988, Kurdjan y Guern, 1989; Martinoia y Rentsch 1994).

### II.1.3. Características químicas y fisicoquímicas de la PEPC

La PEPC ha sido purificada de diversas fuentes (Plantas  $C_3$ ,  $C_4$  y CAM; O'Leary, 1982; Chollet *et al.*, 1996). En su forma nativa tiene una masa molecular de aproximadamente 400 kDa y una estructura tetramérica formada por cuatro subunidades idénticas de masa molecular aproximada de 100 kDa (O'Leary, 1982; Maruyama *et al.*, 1966; Marés y Leblová, 1980; Manetas *et al.*, 1986; Stiborová y Leblová, 1983; Walker *et al.*, 1986). El análisis de aminoácidos revela un contenido de al menos 8 cisteínas por subunidad, de las cuales cuatro forman puentes disulfuro en la enzima nativa y las cuatro restantes se encuentran como -SH libres (Stiborová y Leblová, 1983; Iglesias y Andreo, 1984; Walker *et al.*, 1986). También se ha purificado una PEPC de *Methanothermus sociabilis* con características diferentes a las ya descritas, es un homotetrámero con masa molecular de 240 kDa compuesta de subunidades de masa molecular aparente de 60 kDa (Sako *et al.*, 1996).

Resultados de modificación química en PEPCs de varias plantas han sugerido que Cys, His, Arg y Lys son esenciales para la actividad (Andreo *et al.*, 1987; Rajagopalan *et al.*, 1994; Stiborová, 1988). A la fecha, el residuo de Lys-606 ha sido identificado en la estructura primaria de PEPC de hoja de maíz como esencial para la catálisis (Jiao *et al.*, 1990) y en PEPC de hoja de *Flaveria trinerva*, otra planta  $C_4$ , las argininas 450 y 767 como esenciales para la actividad catalítica y la Lys 829 para la unión de PEP y  $Mg^{2+}$  (Gao y Woo, 1996).

Por secuenciación de proteínas y de sus genes se ha observado un alto grado de similitud, de más del 80 %, entre las enzimas PEPC de angiospermas  $C_3$ ,  $C_4$ , CAM y gimnospermas (Relle y Wild, 1996), pero éstos presentan grandes diferencias con respecto a la enzima proveniente de procariontes (Lepenec *et al.*, 1994).

#### II.1.4. Características cinéticas

##### II.1.4.1. Requerimiento de metales

El  $Mg^{2+}$  se requiere para la actividad de PEPC (Bandurski, 1955; Tchen y Vennesland, 1955, Murayama y Lane, 1962). Los valores de  $K_m(Mg^{2+})$  reportados varían de 0.1 mM hasta 1 mM, dependiendo de la especie de la que procede la enzima y de la concentración de PEP usada (Uedan y Sugiyama, 1976; Ting y Osmond, 1973; Coombs *et al.*, 1973; Miziorko *et al.*, 1974). Otros metales divalentes también activan a la PEPC. La  $K_m$  para  $Mn^{2+}$  es menor que para  $Mg^{2+}$  (Bonugli y Davies, 1977; Miziorko *et al.*, 1974; Mukerji, 1977), aunque en condiciones saturantes de  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  la actividad de la enzima de maíz es esencialmente la misma (O'Leary *et al.*, 1981). El  $Co^{2+}$  produce aproximadamente la mitad de la velocidad observada que con  $Mg^{2+}$  (Baysdofe y Bassham, 1984; Maruyama y Lane, 1962; Smith, 1968). Con  $Zn^{2+}$  y  $Hg^{2+}$  también se tiene una actividad baja (O'Leary, 1982). El  $Ca^{2+}$  es inhibidor de la enzima (Mukerji, 1977; Cavalas y Manetas, 1980).

Estudios sobre PEPC de hoja de maíz han llegado a la conclusión de que el complejo Mg-PEP es el sustrato verdadero de la enzima ya que la afinidad por este es mayor que por PEP o  $Mg^{2+}$  libres (Mukerji, 1977; Wedding, 1988; Meyer *et al.*, 1990; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Mendez *et al.*, 1998). En hojas de plantas  $C_3$  se desconoce cual es el verdadero sustrato de la reacción, pero se ha reportado que la  $K_m(PEP)$  es aproximadamente 5 veces menor en promedio para las enzimas de plantas  $C_3$  que para las plantas  $C_4$  (Ting y Osmond, 1973; Holaday y Black, 1981).

#### II.1.4.2. Saturación por bicarbonato

Los valores de  $K_m(\text{HCO}_3^-)$  reportados para la enzima de maíz son 20  $\mu\text{M}$  a pH 7 (Uedan y Sugiyama, 1976), 100  $\mu\text{M}$  a pH 8 y 160  $\mu\text{M}$  a pH 9.5. Las enzimas de las plantas  $\text{C}_3$  tienen una  $K_m(\text{HCO}_3^-)$  de 100-300  $\mu\text{M}$  (Maruyama *et al.*, 1966; Miziorko *et al.*, 1974; Smith, 1968; Hayakawa, 1981).

#### II.1.4.3. Efectos del pH

Diversos estudios indican que la enzima tiene una actividad máxima cercana a pH 8 (Bandurski, 1955; Maruyama, *et al.*, 1966; Relle y Wild, 1966; Huber y Edwards, 1975; Smith *et al.*, 1979; Coombs *et al.*, 1973). La afinidad de la enzima para PEP disminuye arriba de pH 9.5 y abajo de pH 7.5 (O'Leary *et al.*, 1981).

#### II.1.4.4. Regulación por Metabolitos

PEPC es una enzima sujeta a control alostérico por diversos metabolitos, especialmente a un pH aproximado al fisiológico. Sus principales reguladores son: 1) activadores como azúcares fosforilados, glucosa-6-fosfato y triosas fosfato (Coombs *et al.*, 1973; Wong y Davies, 1973) y aminoácidos neutros como glicina (Nishikido y Takashi, 1973; Bandarian *et al.*, 1992) o 2) inhibidores, como ácidos dicarboxílicos, principalmente malato y aspartato (Leegod y Osmond, 1990; Lepeniec *et al.*, 1996; Andreo *et al.*, 1987; Law y Plaxton, 1995; Schuller *et al.*, 1990; Stiborová, 1988; Duff *et al.*, 1995). La PEPC de plantas  $\text{C}_4$  es además activada homotrópicamente por su sustrato MgPEP (Uedan y Sugiyama, 1976; Hayakawa *et al.*, 1981) y heterotrópicamente por PEP libre, que se une al sitio alostérico de azúcares fosforilados (Podestá *et al.*, 1986; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez *et al.*, 1998).

Glucosa-6-fosfato es un activador de PEPC de plantas  $\text{C}_4$  (Ting y Osmond, 1973; Uedan y Sugiyama, 1976; Huber y Edwards, 1975; Coombs *et al.*, 1973; Mukerji, 1977; Ting y Osmond, 1973), CAM (Pays *et al.*, 1980) y  $\text{C}_3$  (Ting y Osmond, 1973). Sus efectos son

disminuir la  $K_m$ (PEP) (Ting y Osmond, 1973; Mukerji, 1977) con un pequeño incremento en la  $V_{max}$  (Coombs *et al.*, 1973) y la pérdida de la cooperatividad en la unión del sustrato (Huber y Edwards, 1975). Para la enzima de plantas CAM se han observado efectos similares (Pays *et al.*, 1980) y en menor medida para las enzimas de plantas  $C_3$  (Ting y Osmond, 1973).

La glicina también es un activador de PEPC de maíz y otras monocotiledóneas  $C_4$  (Uedan y Sugiyama, 1976; Bhagwat y Sane, 1976; Stiborová y Leblová, 1985). Aumenta la afinidad del sitio alostérico para azúcares fosforilados (Tovar-Méndez *et al.*, 2000), aumenta la  $V_{max}$ , disminuye la  $K_m$ (MgPEP) y elimina la cooperatividad de unión del sustrato. La glicina se une a un sitio distinto de la glucosa-6-fosfato y cuando los dos activadores están presentes sus efectos son sinérgicos (Stiborová y Leblová, 1985, Tovar-Méndez *et al.*, 2000). La activación por glicina es dependiente de pH (Stiborová y Leblová, 1985). No se ha observado algún efecto de este activador sobre la enzima de plantas  $C_4$  dicotiledóneas o de plantas  $C_3$  (Nishikido y Takanashi, 1973).

En hojas de plantas  $C_4$  la forma libre del sustrato PEP puede unirse a un sitio distinto del sitio activo de PEPC de maíz, probablemente al sitio para glucosa-6-fosfato (Podestá *et al.*, 1986), por ello se comporta como un activador alostérico (Rodríguez-Sotres y Muñoz Clares, 1990; Tovar-Méndez *et al.*, 1998).

El malato es un inhibidor de PEPC de plantas  $C_3$  y  $C_4$ , aunque las afecta en diferente medida, siendo las  $C_3$  las menos sensibles (Huber y Edwards, 1975). El efecto de malato sobre la velocidad de la reacción catalizada por PEPC es aumentar la  $K_m$  para MgPEP y puede afectar ligeramente la  $V_{max}$  según las condiciones del experimento. El efecto del malato es menor a pH alcalino que a pH cercano a 7 (Law y Plaxton 1995; Schuller *et al.*, 1990; Tarcynski y Outlaw, 1993, Huber y Edwards, 1975, Hill y Brown, 1978).

El oxaloacetato inhibe sustancialmente a PEPC de plantas  $C_4$  a una concentración de 1 mM (Bhagwat y Sane, 1976; Coombs *et al.*, 1973; Ting, 1968), aunque esta inhibición no parece tener algún significado fisiológico debido a que OAA se encuentra generalmete a

concentraciones intracelulares muy bajas (Ting, 1968). Aspartato inhibe a PEPC de plantas C<sub>4</sub> (Marés y Leblová, 1980; Huber y Edwards, 1975; Rathman, 1978).

La PEPC purificada de *Methanothermobacter sociabilis* una bacteria termófila, fue insensible a los metabolitos que son conocidos como efectores alostéricos de muchas bacterias y eucariontes (Sako *et al.*, 1996).

Una de las características de la cinética de PEPC de hoja de maíz es que, a concentraciones fisiológicas de PEP, la enzima se encuentra prácticamente inactiva si la concentración de activadores alostéricos es baja (Tovar-Méndez *et al.*, 1998), por lo que los cambios de H<sup>+</sup> en el citosol y de los niveles de metabolitos como glucosa-6-fosfato, glicina, alanina, malato y/o aspartato contribuyen a la regulación de la actividad de PEPC *in vivo* (Leegod y Osmond, 1990, Tovar-Méndez *et al.*, 1998).

#### II.1.4.5. Regulación por fosforilación

Las isoformas fotosintéticas de PEPC están sujetas a regulación *in vivo* por la fosforilación de una serina en el extremo amino terminal (Ser-8 en sorgo, Ser-15 en maíz y Ser-11 en *Mesembryanthemum crystallinum*; Jiao *et al.*, 1990; Jiao y Chollet, 1990). Al fosforilarse, la enzima aumenta su actividad y se modifica su sensibilidad a los efectores alostéricos. La fosforilación disminuye la sensibilidad para malato aumentando su *K<sub>i</sub>* y, por el contrario, haciéndola más sensible a la glucosa-6-fosfato, al disminuir su *K<sub>a</sub>* en condiciones de ensayo cercanos al pH fisiológico (Duff *et al.*, 1995).

También se ha reportado la fosforilación de las PEPC no fotosintéticas de plantas C<sub>3</sub>, como la de hoja de tabaco (Wang y Chollet, 1993), de nódulo de soya y la isoforma C<sub>3</sub> recombinante de sorgo (Pacquit *et al.*, 1993). En células guarda de hojas de *Vicia faba*, se ha observado que la actividad de PEPC en estomas cerrados se inhibe significativamente más por L-malato, que la enzima de hojas con los estomas abiertos, así se sugieren que los cambios *in vivo* de la actividad de la enzima se deben a cambios en su estado de fosforilación (Zhang *et al.*, 1994).

La fosforilación de PEPC de hoja de plantas  $C_3$  y  $C_4$  es llevada a cabo por una protein-cinasa, mientras que la defosforilación es realizada por una proteína-fosfatasa. Ambas son reguladas por mecanismos en los que interviene la luz (Wang y Chollet, 1993; Duff y Chollet, 1995). En las plantas CAM el ritmo circadiano de la planta controla la síntesis de la proteína-cinasa responsable de la fosforilación nocturna de la PEPC (Bauwe y Chollet, 1986).

## II.1.5. Otros tipos posibles de regulación

### II.1.5.1. Estado de agregación

Otro de los mecanismos que han sido propuestos para la regulación de la actividad de PEPC en plantas  $C_4$  y CAM es el estado de agregación. Wu y Wedding (1987) encontraron que la PEPC purificada de plantas CAM existía como oligómeros interconvertibles, cinéticamente distintos, dependiendo del periodo circadiano de la planta. La enzima de día se obtenía principalmente como un homodímero sensible a malato y la forma de noche como un homotetrámero insensible a malato, con una  $K_i$  más de dos veces mayor que en la forma de día (Meyer *et al.*, 1991). PEP, Glu6P,  $Mg^{2+}$  o altas concentraciones de PEPC favorecen la conversión de dímero a tetrámero, mientras que el malato favorece su forma dimerica (Wu y Wedding, 1987, Meyer *et al.*, 1991). Propiedades similares de asociación/disociación *in vitro* se han reportado para la isoenzima  $C_4$  de maíz (Wu *et al.*, 1990; Willeford y Wedding, 1992), aunque no hay evidencias que apoyen que cambios en el estado de agregación participen en la regulación de la enzima de hoja de plantas CAM y  $C_4$  *in vivo*.

### II.1.5.2. Presencia de cosolutos

En presencia de glicerol, polietilenglicol o metanol, la actividad de PEPC aumenta (Uedan y Sugiyama, 1976; Podestá y Andreo, 1989; Schuller *et al.*, 1990; Mújica-Jiménez *et al.*, 1998). Este efecto activador se debe probablemente a que la presencia de cosolutos

favorece la formación del estado tetramérico de la enzima (Podestá y Andreo, 1989). Sin embargo, se ha demostrado que el glicerol tiene efectos sobre la PEPC que se encuentra exclusivamente en su forma tetramérica (Tovar-Méndez *et al.*, 1997), lo que sugiere que dichos efectos pueden deberse a cambios conformacionales que no involucran necesariamente alteraciones en su estado de agregación.

#### II.1.5.3. Por síntesis *de novo*

La expresión de la actividad de PEPC de hoja de maíz está acompañada por un incremento en el ARNm y la proteína de PEPC de hoja de maíz. Durante el estrés por sal, la expresión de PEPC se incrementa entre 30-50 veces en la planta CAM *Mesembryanthemum crystallinum* y este aumento está mediado por el incremento de la síntesis de ARNm y proteína (Chu *et al.*, 1990).

Los reguladores de crecimiento de las plantas pueden ser parte de la cadena de transducción de señales, o su presencia podría estimular reacciones que son coincidentes con rutas de respuesta similar provocada bajo condiciones salinas. Así, la adición de ABA externo aumenta la actividad de la isoforma PEPC-CAM y hay una acumulación de la enzima (Chu *et al.*, 1990). Este efecto es dependiente de la temperatura e intensidad lumínica en *M. crystallinum*. Sin embargo, otros estudios en las mismas plantas concluyeron que las citocininas también inducen la acumulación de ARNm de PEPC y la acumulación de la proteína, en esos experimentos el aumento en la concentración del ABA no tuvo ningún efecto (Thomas *et al.*, 1992) indicando que el ABA no es la causa para el incremento de la expresión del gen *Ppc1*. Efectos similares han sido observados en maíz en las que PEPC y anhidrasa carbónica fueron inducidas cuando las hojas fueron tratadas con citocininas (Sugiharto *et al.*, 1992).

#### II.1.5.4. Inducción por luz

La regulación por luz de la expresión de genes de plantas C<sub>4</sub>, pueden deberse a una inducción de la expresión acoplada al desarrollo de la hoja (efecto indirecto) o ser el resultado de una activación inmediata de transcripción (efecto directo). Schafner y Sheen (1992) demostraron que la inducción del gen de PEPC de hoja de maíz por luz está acoplado al desarrollo de la hoja. Así, la expresión del gen de PEPC C<sub>4</sub> de hoja de maíz dependiente de luz durante el enverdecimiento de la hoja podría estar controlado más por un programa de desarrollo dependiente de luz a largo plazo, que por una activación inmediata de la transcripción provocada por el mismo factor.

#### II.2. Respuestas metabólicas de las plantas a deficiencia de agua

Mantener el nivel de agua ha sido uno de los primeros retos a los que se han enfrentado los vegetales para su sobrevivencia desde que empezaron a poblar la tierra, debido a esto han adoptado estrategias que les permiten sobrevivir a deficiencias de agua (Taylor, 1996). Las adaptaciones que han desarrollado son a niveles fenológico, morfológico, fisiológico y metabólico. Por ejemplo, el cubrimiento de cutículas cerosas en las hojas, el metabolismo C<sub>4</sub> y la disminución de la superficie de las hojas son adaptaciones que maximizan el uso eficiente de agua, mientras que respuestas fisiológicas inducidas minimizan el impacto inmediato o transitorio de condiciones de sequía (Taylor, 1996).

La deficiencia de agua ocurre en las plantas cuando la pérdida de agua por medio de la transpiración excede la aportada por el suelo (Bohnert *et al.*, 1995). Estas condiciones adversas interfieren con los patrones normales del crecimiento de la planta y su desarrollo. Las plantas presentan una serie de respuestas a diferentes niveles que pueden involucrar a los mecanismos regulatorios genéticos y metabólicos que mejoran el desempeño de la planta, como un todo, durante y después del estrés (Hanson y Hitz, 1982). La respuesta específica de la planta puede variar según la severidad y duración del déficit de agua, y también, depende del estado de desarrollo de la planta y de la especie. Algunas de las

respuestas comunes más rápidas, que tienen las plantas mesófitas a este tipo de estrés, son el cierre de estomas (que por consecuencia disminuye la pérdida de agua por la transpiración y la fotosíntesis), el ajuste osmótico y la inhibición del crecimiento (Hsiao, 1973). Además se produce un incremento en el contenido del ácido abscísico (ABA), regulador del crecimiento. Esta observación sugiere que ABA podría actuar como un efector *in vivo* de algunos eventos metabólicos durante la respuesta de la planta a déficit de agua (Hsiao, 1973; Walton *et al.*, 1980; Hartun y Davies, 1991).

### II.2.1. Metabolismo Involucrado en el Ajuste Osmótico Durante el Déficit de Agua

Una de las respuestas inducidas más comunes en todos los organismos que son sujetos a déficit de agua es la producción y/o acumulación de los llamados osmolitos compatibles. Estos son compuestos orgánicos neutros, osmóticamente activos, como algunos azúcares (polioles), ciertos aminoácidos y compuestos de amonio cuaternarios.

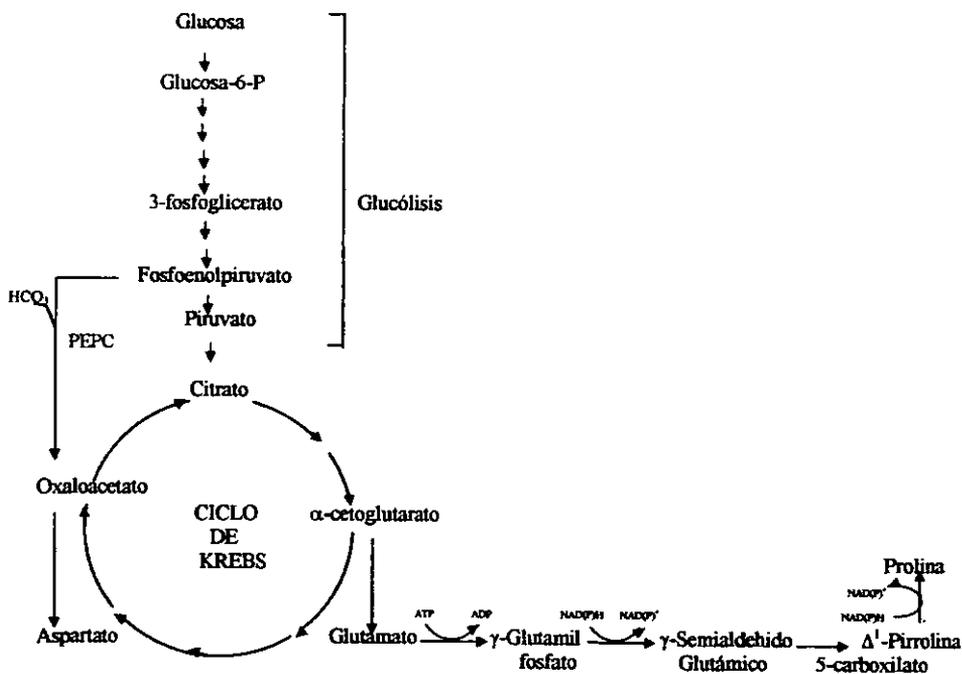
Por la disminución de potenciales de agua, la acumulación de osmolitos compatibles permite que agua adicional pueda ser tomada del medio ambiente y así amortiguar el efecto inmediato de la sequía dentro del organismo. Los osmolitos compatibles continúan acumulándose durante déficits prolongados de agua y, se ha propuesto, que podrían estabilizar la estructura terciaria de las proteínas cuando la célula se deshidrata (Low, 1985). Sin embargo, el significado de cada mecanismo de protección permanece sujeto a polémica (Munns, 1993).

### II.2.2. Acumulación de prolina

La prolina es quizás el osmolito compatible más ampliamente distribuido. Está presente en organismos como bacterias hasta en plantas superiores como el maíz. Se ha demostrado una fuerte correlación entre el aumento de los niveles de prolina celular y la capacidad de sobrevivir al déficit de agua o a los efectos de incrementos en la salinidad en el medio (Delauney y Verma, 1993).

En plantas, el papel de la prolina sintetizada durante el déficit de agua podría estar no sólo restringido a actuar como un osmolito compatible, sino que también podría servir como una reserva de nitrógeno orgánico, que podría ser utilizado durante la recuperación de la planta después del período de sequía. También, hay evidencia de que la degradación de la prolina en la mitocondria (que es donde se lleva a cabo a velocidades elevadas después del estrés hídrico) está directamente acoplada al sistema respiratorio de transporte de electrones y a la producción de ATP (Elthon y Stewart, 1981). La degradación de la prolina podría, por consecuencia, mejorar el estado energético durante la recuperación celular del déficit de agua.

El glutamato es un precursor del aminoácido prolina, que se sintetiza a través de la serie de reacciones mostradas en el Esquema 1. La prolina es el osmoprotector más importante de hoja de frijol y se acumula bajo condiciones de estrés osmótico (alta salinidad o sequía).



Esquema 1. Ruta de síntesis de prolina a partir de glutamato y su conexión con la reacción anaplerótica catalizada por PEPC.

La ruta principal para la síntesis de prolina en plantas se lleva a cabo en el citoplasma. Se inicia a partir de glutamato, pasando a la  $\gamma$ -glutamilfosfato y  $\gamma$ -semialdehído glutámico, mediante una reacción de dos pasos que es catalizada en plantas y animales por una sola enzima, la  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS). El  $\gamma$ -semialdehído glutámico es ciclizado espontáneamente a  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato, el cual se convierte a prolina por la  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR; Hanson y Hitz, 1982; Delauney y Verma, 1993).

La expresión del gen que codifica P5CS se induce fuertemente durante el déficit de agua en plantas (Yoshida *et al.*, 1995) y se cree que esta enzima cataliza el paso limitante en la biosíntesis de prolina (Delauney y Verma, 1993). Se ha observado que la sobreexpresión de P5CS lleva a un incremento en las concentraciones de prolina en plantas transgénicas de tabaco (Kishor *et al.*, 1995). Los altos niveles de prolina correlacionan con la producción mejorada (producción de materia seca) de plantas transgénicas en condiciones de déficit de agua (Kishor *et al.*, 1995).

Se sabe considerablemente menos acerca de los genes que controlan el catabolismo de prolina en plantas. El primer paso en la ruta, es la oxidación de prolina a  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato por la enzima prolina deshidrogenasa de la membrana interna mitocondrial. En plantas, esta enzima está unida al sistema respiratorio de transporte de electrones y así se acopla la degradación de prolina a la formación de ATP (Elthon y Stewart, 1981). La actividad de la prolina deshidrogenasa está disminuida en mitocondrias aisladas de plantas con déficit de agua, lo que sugiere que la ruta catabólica de la prolina podría ser reprimida en la mitocondria por las mismas condiciones que inducen la biosíntesis de prolina en el citoplasma.

### **II.3. Papel de PEPC en respuesta al estrés osmótico**

Algunas plantas  $C_3$  cambian su forma de asimilación de carbono a uno típico de plantas CAM cuando se someten a altas concentraciones de sales. Estas plantas exhiben bajo

condiciones de estrés osmótico aumentos en la cantidad de ARNm y en la expresión de proteína de PEPC (Holtum y Winter, 1982). Además, en esas plantas, el déficit de agua induce la aparición *de novo* de la isoforma específica PEPC-CAM (Rickers *et al.*, 1989; Chu *et al.*, 1990; Cushman *et al.*, 1990) que difiere de las formas preexistentes C<sub>3</sub> en sus propiedades cinéticas (Höfner *et al.*, 1989) y en su punto isoeléctrico (Slocombe, 1993).

Se ha reportado que la asimilación de carbono en las plantas mediante la fotosíntesis disminuye por déficit de agua (Boyer, 1976; Hanson y Tully, 1979), mientras que algunos de los procesos metabólicos específicos como los involucrados en la síntesis de solutos compatibles se incrementan. Es bien conocido que la prolina se acumula en hojas de muchas plantas cuando son sometidas a déficit de agua y, como la prolina es sintetizada a partir de glutamato, su formación podría requerir de una reacción anaplerótica, la cual en las plantas es catalizada por PEPC (Latzko y Kelly, 1983).

En maíz, una planta C<sub>4</sub>, se ha observado una correlación significativa entre la actividad de PEPC, los niveles de proteína PEPC y el contenido de prolina en las hojas sometidas a déficit de agua (Rodríguez-Penagos y Muñoz-Clares, 1999). Se desconoce si en plantas C<sub>3</sub> PEPC responde en forma similar al estrés hídrico.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se conoce que la prolina se acumula en hoja de frijol en respuesta al déficit de agua (Bogges *et al.*, 1976; Stewart y Bogges, 1976). Puesto que glutamato es un precursor de prolina, una síntesis incrementada de ésta requiere de la canalización de esqueletos carbonados hacia glutamato, lo que debe involucrar la actividad de PEPC, una enzima anaplerótica en plantas. En un esfuerzo para conocer más a fondo los mecanismos de respuesta de las plantas a sequía, concretamente las respuestas metabólicas de adaptación, entre las que se incluyen la síntesis incrementada de osmolitos compatibles, creemos interesante estudiar los efectos de esta condición ambiental adversa sobre la actividad de la enzima anaplerótica PEPC. Elegimos hoja de frijol para este estudio por ser este un tejido en el que PEPC desempeña una función anaplerótica y por el interés agronómico, económico y social de este cultivo en México. Presenta además el interés de que la enzima PEPC ha sido hasta la fecha muy poco estudiada en hoja de leguminosas.

#### IV. HIPÓTESIS

Con base a los antecedentes expuestos anteriormente la hipótesis de este trabajo es que "En hojas de frijol el déficit de agua provoca cambios en las propiedades y/o cantidad de la enzima PEPC.

#### V. OBJETIVOS

##### V.1. Objetivo general

Investigar si el tratamiento de hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) para provocarles déficit de agua produce un cambio en las propiedades y/o cantidad de la enzima PEPC.

##### V.2. Objetivos Particulares

1. Caracterizar cinéticamente a la enzima PEPC presente en hojas de frijol controles y con déficit de agua. Para ello, se determinará en extractos crudos:
  - a. La cinética de saturación por el sustrato PEP.
  - b. La respuesta de la actividad enzimática a los metabolitos principales reguladores de esta actividad en plantas, es decir, malato (inhibidor) y glucosa-6-fosfato (activador).
  - c. La respuesta de la actividad a la presencia de cosolutos en el medio de ensayo.
  - d. La dependencia de pH de la velocidad de reacción.
2. Investigar si el déficit de agua conlleva cambios en el patrón isoenzimático de la PEPC en hoja de frijol.
3. Purificar a la(s) enzima(s) PEPC de hoja de frijol con el fin de:
  - a. Obtener anticuerpos que permitan evaluar la cantidad relativa de proteína PEPC en hojas controles y con déficit hídrico.
  - b. Caracterizar cinética y fisicoquímicamente a la(s) proteína(s) purificada(s).

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1. Materiales

#### VI.1.1. Material biológico.

Para la obtención de PEPC se utilizaron hojas de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L., var. Valentine) de aproximadamente 35 días de edad crecidas en un invernadero a una temperatura de 28-30 °C, con fotoperiodo de 12 horas luz.

Para la obtención de anticuerpos se utilizaron 2 conejos machos Nueva Zelanda de 2.5 Kg de peso.

#### VI.1.2. Equipo

Se utilizó el siguiente equipo: Un espectrofotómetro Beckman DU-7500 con temperatura controlada y registrador integrado para medir la actividad enzimática; un potenciómetro Beckman modelo  $\Phi$  32 con precisión de  $\pm 0.001$  unidades de pH; una centrifuga Beckman modelo GS-6R o una microcentrifuga Survall modelo MC12V de Dupont; un refrigerador marca American RC270 (4°C), un congelador marca Nieto (-20°C) y un ultracongelador Forma Scientific (-70°C); un cromatógrafo de alta presión (HPLC) de Waters compuesto por el sistema de bombas modelo 626, detector modelo 996 y controlador modelo 600S; Parrillas de agitación magnética Corning modelo PC-351; un Vortex-2 Genie modelo 14-550-G; una licuadora Waring-Blendor para la homogenización de tejidos cuando se utilizaban grandes cantidades de material; una balanza analítica Ohaus con capacidad de 210 g con precisión de  $\pm 0.1$  mg; un equipo de Höefer Scientific Instruments para minigeles para las electroforesis; una cuba seca de Pharmacia LKB Nova-Blot para la transferencia de proteínas; microjeringas marca Hamilton de 10, 25 y 100  $\mu$ l; aditamentos de ultrafiltración centricones Amicon de 2 ml, con tamaño de poro de 100 kDa; celdas de cuarzo de 1 y 3 ml de capacidad y de un centímetro de paso de luz para los ensayos de actividad; una pantalla

amplificadora para el revelado de membranas por quimioluminiscencia de Amersham Life Science.

Las columnas utilizadas para las cromatografías fueron de Pharmacia y Bio-Rad de 50 y 100 ml; las resinas utilizadas fueron: Sephadex G-25 (de exclusión molecular); Phenyl-Sepharose (hidrofóbica) y Q-Sepharose de flujo rápido (intercambio iónico) todas ellas de Pharmacia; columnas preempacadas, Superdex 200 (16/60) HR de Pharmacia.

### VI.1.3. Reactivos

Todos los reactivos utilizados en los experimentos fueron de grado analítico, fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales:

De Merck: EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), bicarbonato de sodio, persulfato de amonio, arena de mar,  $\beta$ -mercaptoetanol, etanol absoluto y metanol.

De Sigma: Hepes (Acido N-[2-hidroxietyl]piperazina-N-[2-etanosulfónico]), polietilenglicol, NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducida), benzamidina, violeta rápido B, PEP (sal de monociclohexilamonio), quimostatina, albúmina sérica bovina, L-(-)-ácido málico, D-glucosa-6-fosfato, marcadores de peso molecular para SDS-PAGE, acrilamida, N,N'-metilén-bis-acrilamida, azul de Coomassie brillante R 250, glicina, L-prolina, etilenglicol, malato deshidrogenasa y Tritón X-100.

De Baker: Cloruro de potasio, cloruro de magnesio, glicerol, y ácido fosfórico.

De Aldrich: PMSF (floruro de metilen sulfonil fenilo).

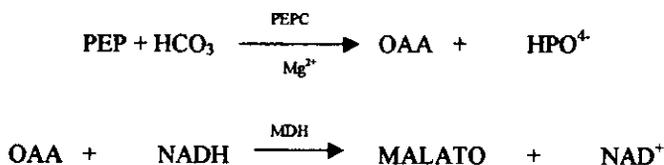
De Mallinckrodt: Ácido acético glacial, ácido clorhídrico, fosfato de potasio monobásico y dibásico, glicerol y sulfato de amonio.

De Amersham Life Science: Sistema de análisis de Western Blott ECL y membranas de nitrocelulosa para la transferencia de proteínas.

## VI.2. Métodos

### VI.2.1. Determinación de la actividad de la enzima

La actividad de la enzima se determinó empleando como reacción acoplada la catalizada por la enzima málico deshidrogenasa dependiente de NADH (MDH, E.C.1.1.1.37), según el método descrito por Uedan y Sugiyama (1976). En este sistema el oxaloacetato resultante de la carboxilación del fosfoenolpiruvato es reducido a malato por la actividad de la enzima málico deshidrogenasa que paralelamente oxida NADH a NAD<sup>+</sup> según el siguiente esquema de reacciones:



El oxaloacetato producido en la reacción de carboxilación puede medirse por tanto siguiendo el descenso de la densidad óptica por minuto a 340 nm, debido a la conversión de NADH a NAD<sup>+</sup>. El cambio de la densidad óptica por minuto se midió durante los primeros cuatro minutos de la reacción y se calculó la velocidad inicial. La reacción se realizó a 30° C. Se inició la reacción con la adición de 20 µl del extracto crudo desalado (100 µg de proteína total en un mililitro) al medio de ensayo de actividad.

Para el ensayo de actividad, el medio de reacción estándar contenía Hepes-KOH 100 mM, pH 7.0, EDTA 1 mM, NADH 0.2 mM, MDH 2 U/ml, PEP 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y NaHCO<sub>3</sub> 10 mM en un volumen final de 1 ml.

La actividad se expresó como unidades de actividad enzimática por ml. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de la enzima que carboxila 1  $\mu\text{mol}$  de PEP por minuto bajo nuestras condiciones de ensayo.

La actividad específica (unidades  $\text{mg}^{-1}$  proteína) se obtuvo dividiendo el valor de  $\text{U ml}^{-1}$  por los mg de proteína contenidos en 1 ml de la preparación enzimática utilizada.

### VI.2.2. Extracción de la enzima PEPC

Para pequeñas cantidades de enzima (extractos crudos desalados) se cortaron y pesaron aproximadamente 2 g de hojas, se lavaron y se cortaron en trocitos, se homogenizaron en un mortero con arena de mar en una proporción 1:1 (p/v) con una solución de extracción (amortiguador A: HEPES-KOH 100 mM a pH 7.0, EDTA 0.1 mM, glicerol 10 % (v/v), etilenglicol 20 % (v/v),  $\text{MgCl}_2$  5 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM y quimostatina 100  $\mu\text{g/ml}$ ). El homogenado se centrifugó en una microfuga a 10 000  $\times g$  durante 6 minutos y el sobrenadante se desaló en una columna de 20 ml que contenía Sephadex G-25. La columna previamente había sido equilibrada en el mismo amortiguador de extracción. La muestra aplicada estuvo comprendida entre el 8 y 10 % del volumen de la columna para así conseguir un completo desalado. El eluido de esta columna que contenía la actividad enzimática se usaba inmediatamente para realizar los ensayos de actividad.

Para la purificación de la enzima se utilizaron 50 g de tejido y se extrajeron en una proporción de 3:1 (p/v) con una solución que contenía HEPES-KOH 50 mM, pH 7.0, EDTA 0.1 mM, glicerol 10 % (v/v), etilenglicol 20 % (v/v),  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 2 mM y quimostatina 50  $\mu\text{g/ml}$  (amortiguador B). El tejido se homogenizó en una licuadora previamente enfriada a 4°C y, posteriormente, se filtró a través de 4 capas de gasa. El filtrado fue centrifugado 32 000  $\times g$  por 60 minutos, se colectó el sobrenadante para iniciar el proceso de purificación. Todos los pasos de purificación fueron realizados a 4°C.

### VI.2.3. Determinación de proteína

La cantidad de proteína fue determinada por el método descrito por Bradford (1976), que está basado en la formación de un complejo azul entre el reactivo azul de Coomassie (azul brillante G) y las proteínas. Se utilizó albúmina de suero bovino como estándar.

### VI.2.4. Estudios cinéticos

#### VI.2.4.1. Saturación por PEP

La saturación por PEP se hizo usando el ensayo de actividad estándar variando la concentración total de PEP y de  $Mg^{2+}$ , de manera que se mantuviera constante la concentración de  $Mg^{2+}$  libre a 0.4 mM y se variara la de PEP libre ( $PEP_L$ ) en un rango de 19  $\mu M$  a 54 mM. Para calcular las cantidades totales de PEP y  $Mg^{2+}$  se utilizaron las constantes de estabilidad descritas en Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares (1990). Los cálculos se llevaron a cabo utilizando un programa escrito por Rodríguez Sotres (1990) en Turbo PASCAL 3.0 llamado Metal-Complex siguiendo un algoritmo descrito por Storer y Cornish-Bowden (1976). En los casos en que la saturación por PEP se realizó en presencia de osmolitos (prolina o glicerol), activador (Glc6P) o inhibidor (malato) las concentraciones de estos compuestos fueron 600 mM, 10 mM y 5 mM, respectivamente.

Los parámetros cinéticos fueron calculados por el ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación de velocidad resultante de la suma de dos ecuaciones de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{Vmax_1 [S]}{Km_1 + [S]} + \frac{Vmax_2 [S]}{Km_2 + [S]} \quad \dots [1]$$

en donde,  $Vmax$  es la velocidad máxima de cada isoforma;  $[S]$  es la concentración del sustrato variable,  $PEP_L$  en este caso, y  $Km$  es la concentración del sustrato variable a la que se obtiene la mitad de la velocidad máxima.

#### VI.2.4.2. Inhibición por malato

La saturación por malato se realizó usando el ensayo de actividad estándar pero a concentraciones subsaturantes de sustratos. En este caso se mantuvo fija la concentración de PEP total en 2.5 mM y de  $Mg^{2+}$  total en 5 mM, lo que corresponde a una concentración de 1.92 mM de PEP libre, de 0.4 mM de  $Mg^{2+}$  libre y de 0.14 mM de Mg·PEP. La concentración de malato total en el ensayo varió de cero a 10 mM.

Los valores de  $I_{50}$  fueron calculados por el ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación resultante de la suma de dos ecuaciones de  $I_{50}$ .

$$v = \frac{A_0_1 \cdot I_{0.51}}{I_{0.51} + [I]} + \frac{A_0_2 \cdot I_{0.52}}{I_{0.52} + [I]} \quad \dots [2]$$

en donde,  $A_0$  es la velocidad inicial de cada isoforma,  $I_{0.5}$  es la concentración del inhibidor que causa el 50 % de inhibición e  $[I]$  es la concentración del inhibidor.

#### VI.2.4.3. Dependencia de la velocidad de la reacción por el pH del medio de ensayo

Los ensayos de actividad de la enzima para determinar su dependencia del pH se llevaron a cabo mediante el ensayo estándar excepto que se usaron dos concentraciones de PEP total (2.5 y 50 mM) y el pH se varió en un rango 6.5 a 9.5.

Los parámetros fueron determinados de acuerdo a la siguiente ecuación para un sistema diprótico:

$$v = \frac{C}{(1 + 10^{(pH-pK_1)} + 10^{(pK_2-pH)})} \quad \dots [3]$$

en donde C es la actividad de la enzima independiente de pH,  $pK_1$  y  $pK_2$  son los valores de  $pK$  de los grupos que requieren tener su protón o haber perdido su protón, respectivamente para la actividad de la enzima.

### VI.2.5. Tratamiento para producir déficit de agua en las hojas de frijol

El déficit de agua se produjo al sumergir la tercera, cuarta o quinta hoja de la planta de frijol en una solución de polietilenglicol al 25 % (p/v; aproximadamente -1.2 MPa de presión) manteniendo las hojas en el invernadero. A consecuencia de este tratamiento las hojas llegaron a tener un contenido relativo de agua del 55 al 60 % en un periodo de 12 – 14 horas. Para las hojas control se siguió el mismo procedimiento, pero se sumergieron en agua destilada durante el mismo periodo.

### VI.2.6. Determinación del contenido relativo de agua en hojas

El contenido relativo de agua (CRA) se determinó usando el método de Vasey y Sharkey (1989). Para ello se determinaron el peso fresco de las hojas después del tratamiento, el peso de turgor después de la imbibición por 12 horas en agua destilada y desionizada y el peso seco, después de haber secado el tejido en un horno a 60 °C durante 12 horas. El CRA se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{CRA} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{Peso de turgor} - \text{peso seco}} \times 100 \quad \dots [ 4 ]$$

### VI.2.7. Electroforesis nativa y desnaturalizante

La electroforesis nativa se realizó usando un sistema discontinuo de acuerdo al método de Laemmli (1970) pero en ausencia de SDS. Para proteger la enzima de la inactivación durante la electroforesis se adicionaron 20 % (v/v) de glicerol y 10 % (v/v) de etilenglicol a las soluciones del gel apilador y separador.

La duración de la corrida fue de 16 horas aproximadamente a 16 mV hasta que el frente llegó al límite del gel. Las bandas de proteína con actividad de PEPC se visualizaron usando 10 ml de la siguiente solución: HEPES-KOH 100 mM, pH 8.0, conteniendo EDTA 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 30 mM, MgCl 20 mM, PEP 10 mM y 3 mg/ml de violeta rápido B.

La electroforesis desnaturalizante en presencia de SDS (SDS-PAGE) se realizó conforme al método descrito por Laemmli (1970), similar al mencionado anteriormente. Las bandas de proteína se revelaron con azul de Coomassie R-250 al 0.125 % (p/v), metanol 50 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v).

#### VI.2.8. Obtención de anticuerpos

Los anticuerpos fueron producidos en dos conejos con el siguiente protocolo inmunológico: La primera inyección fue de 300 µg de proteína en 0.5 ml de una solución de amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4, NaCl 0.15 M y 0.5 ml de adyuvante de Freund aplicados intramuscularmente. Inyecciones adicionales con 100 µg de proteína y sin el adyuvante fueron aplicadas a las 1<sup>ª</sup>, 2<sup>ª</sup>, 3<sup>ª</sup> y 6<sup>ª</sup> semanas. Las dos últimas inyecciones fueron intraperitoneales. A los conejos se les practicaron sangrías de prueba a la tercera, quinta y séptima semanas, resultando ésta última con el título suficiente para ser detectados los anticuerpos. El sangrado final se obtuvo por punción cardíaca a la octava semana de la inoculación inicial obteniendo 50 ml de sangre por conejo.

Como antígeno se usó la mezcla de proteínas contenida en la zona correspondiente a proteínas de masa molecular de 50 a 60 kDa de un gel de poliacrilamida, obtenida después de realizada una electroforesis preparativa en presencia de SDS de una preparación de PEPC parcialmente purificada de hojas de frijol. La banda fue cortada del gel, homogenizada en un mortero con nitrógeno líquido y dializada frente a un amortiguador fosfatos 10 mM, pH 7.4 conteniendo NaCl 0.85 % (p/v; Bouchán-Cálix *et al.*, 1994). La suspensión resultante se inoculó como se describió anteriormente en el protocolo inmunológico.

La especificidad de los anticuerpos fue ensayada mediante la prueba de "dot blot", fijando muestras de extractos crudos de hoja de frijol en una membrana de nitrocelulosa que se incubó con diferentes diluciones del suero hasta la cuantificación del título, la inmunodetección se realizó como se describe en el punto VI.2.10.

#### VI.2.9. Purificación parcial de anticuerpos

Se extrajeron 50 ml de sangre de los conejos por punción cardíaca y se separó el suero del coágulo. Se hizo una precipitación con sulfato de amonio al 55 % de saturación y se centrifugó a 32 000×g por 20 min. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en el 20 % del volumen inicial en Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 conteniendo NaCl 200 mM. Se centrifugó nuevamente a 32 000 ×g por 4 minutos y el sobrenadante se dializó en la misma solución amortiguadora por doce horas, tras lo cual se dividió en alicuotas que se conservaron a -70°C.

#### VI.2.10. Electrotransferencia e inmunodetección de PEPC (Western blot)

Para este estudio se realizó una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE con un 8 % de acrilamida en el gel separador y se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en una cuba de transferencia seca por 2 horas a 75 mA, de acuerdo al método de Towbin *et al.*, (1979). La membrana de nitrocelulosa se humedeció en una solución de transferencia que contenía Tris 20 mM, pH 7.4, glicina 150 mM, metanol 20 % (v/v) y SDS 0.1 % (p/v). Ya transferidas las proteínas a la membrana se preparó para la inmunodetección, ésta se incubó en la solución de saturación (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 0.05 % (v/v) y leche descremada 5 % (p/v)) por dos horas a temperatura ambiente con agitación constante. Después de dos lavados por 10 minutos con TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM) se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo (dilución 1:250) en la solución de saturación. Posterior a la incubación, se lavó la membrana 3 veces con TBS por 15 minutos y se incubó en la solución de saturación con inmunoglobulinas conjugadas a peroxidasa a una dilución de 1:1000 por dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó 5 veces la membrana con las proteínas

transferidas y se revelaron por quimioluminiscencia siguiendo el procedimiento recomendado por la casa comercial.

#### VI.2.11. Purificación parcial de la enzima

Consistió en los siguientes pasos:

##### V.2.11.1. Precipitación con sulfato de amonio

A la preparación de enzima obtenida después de la centrifugación de los extractos crudos se añadió  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  lentamente con agitación continua hasta alcanzar el 30 % de saturación. El pH se controló con KOH cuando fue necesario. Después de agregar toda la sal, la preparación se mantuvo en agitación lenta por 30 minutos y posteriormente se centrifugó a  $32\ 000 \times g$  por 60 minutos. El precipitado se desechó y el sobrenadante se llevó a un 60 % de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , siguiendo el procedimiento antes mencionado. Después de la segunda centrifugación el precipitado obtenido (30-60 %) contenía prácticamente la totalidad de la actividad de PEPC.

##### VI.2.11.2. Cromatografía hidrofóbica

La preparación enzimática obtenida después de resuspender el precipitado 30-60 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en el amortiguador de extracción se centrifugó a  $2\ 000 \times g$  por 15 minutos y se aplicó el sobrenadante a un flujo de 0.5 ml por minuto a una columna de 25/90 mm que contenía Fenil-Sefarosa CL-4B previamente equilibrada con 10 volúmenes de la columna con HEPES-KOH 10 mM, pH 7.0, EDTA 0.1 mM, glicerol 10 % (v/v), DTT 2 mM y sulfato de amonio 500 mM (Amortiguador C). Posterior a esto se aplicó un lavado de 5 volúmenes de columna con el mismo amortiguador, excepto que el sulfato de amonio tenía una concentración de 200 mM. Finalmente se aplicó un gradiente lineal de etilenglicol del 0 – 80 % (v/v) en el mismo amortiguador.

### V.2.11.3. Cromatografía de intercambio iónico

El eluato de la cromatografía hidrofóbica que contenía actividad de PEPC se aplicó a un flujo de 0.5 ml por minuto a una columna de 16 × 90 mm de Sefarosa-Q de flujo rápido, previamente equilibrada con una solución amortiguadora de Hepes-KOH 10 mM, pH 7.0, EDTA 0.1 mM, glicerol 10 % (v/v), β-mercaptoetanol 10 mM y etilenglicol 10 % (v/v) (amortiguador D). Después de lavar la columna con 5 volúmenes del amortiguador de equilibrio, se aplicó un gradiente lineal de 0 – 750 mM de NaCl preparado en el mismo amortiguador. Finalmente, se reunieron las fracciones con actividad de PEPC.

### V.2.11.4. Cromatografía de exclusión molecular

Las fracciones colectadas del paso cromatográfico anterior que contenían actividad de PEPC, se desalaron en una columna de Sephadex G-25 y se concentraron en centricones de amicon con tamaño del poro de 100 kDa, hasta alcanzar el volumen apropiado para ser aplicada a la columna de exclusión molecular; tras lo cual se aplicaron a una columna de Superdex 200 (1.6 × 60 cm) previamente equilibrada con Hepes-KOH 50 mM, pH 7.5, EDTA 0.1 mM, glicerol 10 % (v/v), etilenglicol 20 % (v/v), DTT 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM (Amortiguador E). La columna estaba acoplada a un sistema de HPLC.

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Caracterización cinética de PEPC en extractos crudos de hoja control y sometidas a déficit de agua

Como se mencionó en los Antecedentes, poco se conoce acerca de las propiedades cinéticas de la enzima PEPC de hoja de leguminosas, por lo que decidimos empezar este trabajo haciendo una caracterización cinética de la enzima en extractos crudos desalados de hoja de frijol. Esta caracterización nos servirá como referencia para comparar las propiedades cinéticas de la enzima extraída de hojas controles con las de la enzima extraída de hojas estresadas por déficit de agua y con las de la enzima una vez purificada.

El grado de déficit de agua impuesto a las hojas se estimó determinando el contenido relativo de agua (CRA), como se describió en Métodos. En las tablas se indica el CRA de las hojas usadas en los experimentos correspondientes.

La caracterización cinética consistió en estudiar: 1) La cinética de saturación por el sustrato PEP, a concentraciones fijas y fisiológicas del ión  $Mg^{2+}$  (0.4 mM; Yazaki *et al.*, 1988) y a pH 7.0, valor cercano al fisiológico (Rajagopalan *et al.*, 1993). 2) El efecto de conocidos efectores de PEPC como malato y Glc6P sobre la cinética de saturación por PEP. 3) La saturación de la enzima por malato a concentraciones fijas de los sustratos. 4) El efecto de solutos compatibles como prolina y glicerol sobre la cinética de saturación por PEP y la sensibilidad a malato. 5) El efecto del pH sobre la velocidad de la reacción a concentraciones bajas y altas de sustrato.

Los resultados de estos estudios se describen a continuación.

### VII.1.1. Cinética de saturación por PEP libre

La cinética de saturación por PEP libre observada tanto en extractos de hojas controles como en extractos de hojas estresadas fue compleja y los datos experimentales no pudieron ajustarse a la ecuación de Michaelis-Menten. Sin embargo, se logró en todos los casos un buen ajuste a la ecuación resultante de la suma de dos ecuaciones de Michaelis-Menten (Ecuación 1, en Materiales y Métodos). Tampoco se pudieron ajustar los datos a la ecuación resultante de un modelo en el que hubieran tres isoenzimas presentes en el ensayo. En este ajuste no se lograba llegar a convergencia y los errores estándares de las medias estimadas para los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$  eran muy superiores al valor (entre 4 y 6 veces) Esto es una indicación clara de que no existen más de dos formas de la enzima, que además no son interconvertibles, al menos bajo las condiciones de los ensayos enzimáticos. A partir de este momento, llamaremos PEPC-a a la forma con mayor afinidad para el sustrato PEP y PEPC-b a la de menor afinidad. Los parámetros cinéticos obtenidos con este ajuste para cada una de las formas, junto con una gráfica típica de saturación por PEP, se incluyen en la Tabla 1 y en la Figura 4, respectivamente. En el inserto de la Figura 4 se muestran las curvas de saturación teóricas de las dos formas.

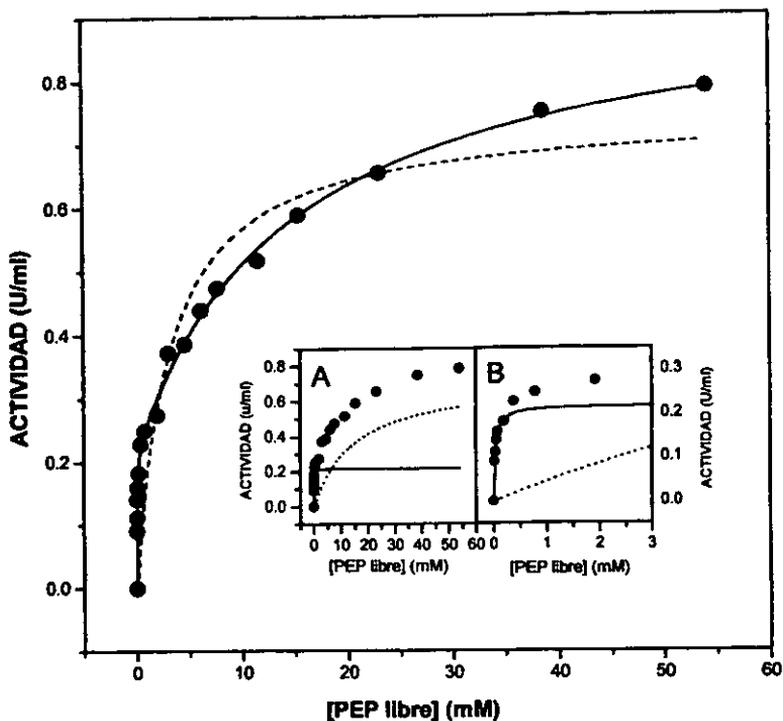
Las dos formas de PEPC poseen características cinéticas muy diferentes. PEPC-a tiene una alta afinidad por PEP, tanto en hojas controles como estresadas y representa sólo el 15 % de la actividad total de PEPC obtenida cuando las dos formas de la enzima están saturadas por el sustrato. El 85 % restante corresponde a la forma PEPC-b, que posee una muy baja afinidad por el sustrato PEP, como lo indica el que su  $K_m$  sea aproximadamente 500 veces más alta que la  $K_m$  de PEPC-a en el caso de hojas controles, y más de 100 veces más alta en el caso de hojas estresadas (Tabla 2). Como puede observarse en el inserto de la Figura 4, a concentración fisiológica de PEP (aproximadamente 0.1 mM) la forma PEPC-a es la que contribuye en forma mayoritaria a la actividad total de la enzima.

Es interesante el hallazgo de que la afinidad por el sustrato PEP es 6 veces superior en PEPC-a de extractos de hojas controles que de hojas estresadas, porque indica que el déficit de agua provoca cambios en la isoenzima PEPC-a que conllevan una alteración en sus

Tabla 1. Parámetros cinéticos<sup>1</sup> aparentes de PEPC en extractos crudos<sup>2</sup> desalados de hojas controles<sup>3</sup> y sometidas a déficit de agua<sup>3</sup>

Hojas	PEPC-a			PEPC-b		
	$V_{max}$ (Uml <sup>-1</sup> )	$K_m$ (PEP <sub>L</sub> ) ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ (PEP <sub>L</sub> ) (Uml <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$V_{max}$ (Uml <sup>-1</sup> )	$K_m$ (PEP <sub>L</sub> ) (mM)	$V_{max}/K_m$ (PEP <sub>L</sub> ) (Uml <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
Controles	0.20 ± 0.05 (15 %) <sup>4</sup>	33 ± 4	6.06	0.93 ± 0.42 (85 %) <sup>4</sup>	15.6 ± 3.9	0.06
Estresadas	0.19 ± 0.07 (19 %) <sup>4</sup>	195 ± 55	0.97	0.81 ± 0.38 (81 %) <sup>4</sup>	20.2 ± 5.4	0.04

<sup>1</sup>Los valores de los parámetros cinéticos son la media ± desviación estándar de 5 experimentos. Las condiciones de los ensayos se describen en Materiales y Métodos. En cada experimento, el valor de los parámetros cinéticos se estimó por medio de un ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación 1. <sup>2</sup>La extracción se realizó como se describe en Métodos. <sup>3</sup>El contenido relativo de agua fue del 90.8 ± 2.1 % en las hojas controles y 55.9 ± 6.9 % en las hojas estresadas. <sup>4</sup>Porcentaje de la actividad total de PEPC, determinada bajo condiciones de saturación por PEP, que corresponde a cada una de las formas.



**Figura 4.** Gráfica típica de una cinética de saturación por PEP de PEPC de un extracto crudo desalado de hojas de frijol. Las condiciones de extracción se describen en Materiales y Métodos. Las condiciones de ensayo fueron: HEPES-KOH 100 mM, EDTA 0.1 mM, MDH 2 U / ml,  $\text{NaHCO}_3$  1 mM, NADH 0.2 mM, extracto 20  $\mu\text{l/ml}$ , diferentes concentraciones de PEP y  $\text{Mg}^{++}$  libre 0.4 mM. El CRA de las hojas usadas en este experimento fue del 90 %. Los puntos son los datos experimentales, la línea continua es la teórica resultante del mejor ajuste de los datos a la ecuación 1. La línea discontinua es el mejor ajuste a una sola ecuación de Michaelis-Menten. Insertos: A. A baja concentración de PEP. B. A alta concentración de PEP. Líneas teóricas que muestran la saturación por PEP libre de PEPC-a (—) y de PEPC-b (-----)

Tabla 2. Razón entre los parámetros cinéticos<sup>1</sup> de las dos formas de PEPC de extractos crudos de hojas controles y sometidas a déficit de agua en ausencia y presencia de efectores

Hojas	PEPC-b / PEPC-a					
	<i>V<sub>max</sub></i>			<i>K<sub>m</sub>(PEP<sub>L</sub>)</i>		
	Sin efectores	(Uml <sup>-1</sup> ) Malato (5 mM)	Glc6P (10 mM)	Sin efectores	( mM ) Malato (5 mM)	Glc6P (10 mM)
Controles	4.65	0.14	2.81	473	451	946
Estresadas	4.26	0.10	1.21	104	3033	1540

<sup>1</sup>Los parámetros cinéticos usados para estos cálculos son los incluidos en la Tablas 1, 4 y 5.

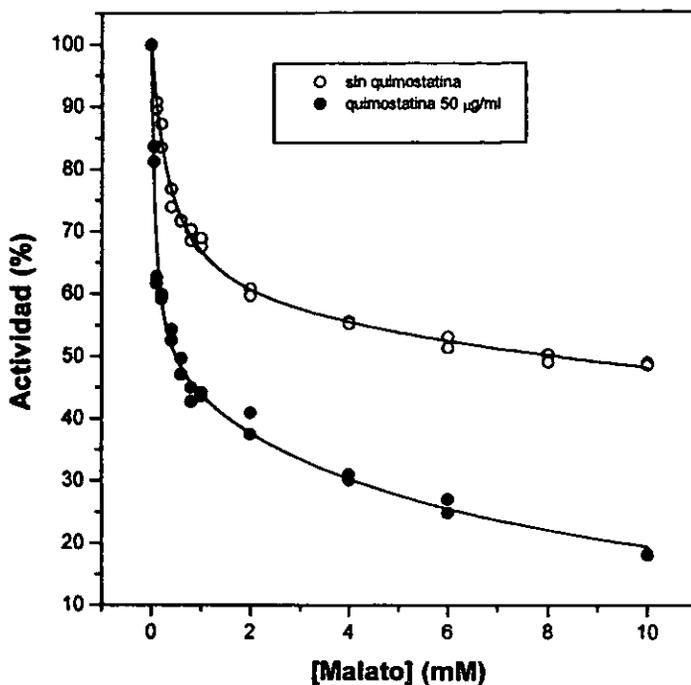
propiedades cinéticas. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros cinéticos de PEPC-b entre los dos tipos de extractos.

#### VII.1.2. Efecto de malato sobre la cinética de saturación por PEP

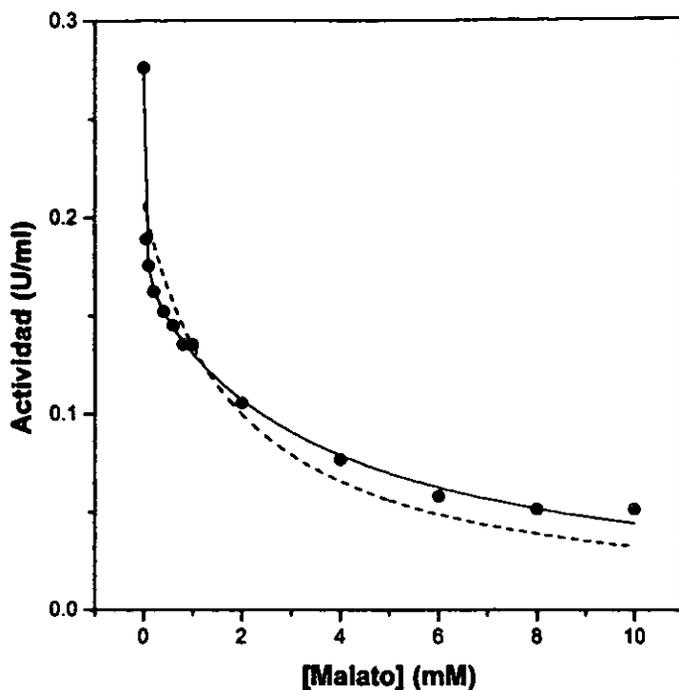
Investigamos en primer lugar si en el caso de hoja de frijol, como muchos otros tejidos vegetales, existe una proteasa inhibible por quimostatina, que al truncar a la PEPC por su amino terminal reduce notablemente la sensibilidad a malato. La sensibilidad al inhibidor se estimó determinando la concentración de inhibidor que produce el 50 % de inhibición, ( $I_{0.5}$ ) a una concentración subsaturante de  $Mg^{2+}$  y de PEP. La  $I_{0.5}$  es por tanto un parámetro cinético aparente que nos permite evaluar la afinidad de la enzima por el inhibidor. Como en los casos de las saturaciones por sustrato mencionados anteriormente, los datos experimentales sólo se pudieron ajustar cuando se consideró que existen dos formas de la enzima con diferente sensibilidad al inhibidor (ecuación 2). Los valores de  $I_{0.5}$  estimados para este ajuste fueron: 0.38 y 50.05 mM para la enzima extraída en ausencia de quimostatina y 0.07 y 7.12 mM para la extraída en presencia del inhibidor de proteasas.

Efectivamente, se comprobó que PEPC en extractos obtenidos en ausencia de quimostatina presentaba valores de  $I_{0.5}$  para malato 5 -7 veces superiores a los de la enzima en extractos que se obtuvieron en presencia del inhibidor de proteasas (Figura 5). Por ello, las extracciones siempre se realizaron en presencia de quimostatina.

La Figura 6 muestra un resultado típico del efecto del malato sobre la enzima PEPC tanto en extractos de hojas controles como estresadas. Los valores de  $I_{0.5}$  estimados mediante el ajuste de los datos a la ecuación 2 se dan en la Tabla 3. A pesar de que el error estándar es alto en todos los casos, es claro que existen también a este respecto notables diferencias, superiores a 100 veces, entre la forma PEPC-a y la forma PEPC-b de la enzima. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de  $I_{0.5}$  para malato entre las formas de PEPC de los extractos de hojas control y de hojas estresadas. Tampoco hubo diferencias en los valores de  $A_0$  (actividad a concentración cero del inhibidor).



**Figura 5. Efecto del uso de quimostatina durante la extracción de PEPc de hoja de frijol en la sensibilidad a malato de esta enzima.** Las condiciones de extracción se describen en Métodos, excepto que quimostatina se omitió para el estudio en ausencia de este inhibidor. Las condiciones del ensayo fueron: HEPES-KOH 100 mM, pH 7.3, EDTA 0.1 mM, MDH 2 U/ml,  $\text{NaHCO}_3$  1 mM, NADH 0.2 mM, extracto 20 µl/ml, PEP total 2.5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y diferentes concentraciones de malato. El CRA de las hojas usadas en este experimento fue del 92 %. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del mejor ajuste de los datos de la ecuación 2.



**Figura 6. Gráfica típica de la sensibilidad a malato de PEPC de un extracto crudo desalado de hojas de frijol sometidas a déficit de agua. Las condiciones de extracción y de ensayo de actividad enzimática se describen en Métodos. El CRA de las hojas usadas en este experimento fue del 56.7 %. Los puntos son los datos experimentales, la línea continua es la teórica resultante del mejor ajuste de los datos a la ecuación 2. La línea discontinua es el ajuste a la ecuación de una sola  $I_{0.5}$ .**

Tabla 3. Sensibilidad a malato<sup>1</sup> de PEPC en extractos crudos desalados<sup>2</sup> de hojas controles<sup>3</sup> y sometidas a déficit de agua<sup>3</sup>

Hojas	PEPC-a		PEPC-b		PEPC-b/PEPC-a
	$I_{0.5}$ ( $\mu\text{M}$ )	$A_0$ ( $\text{Uml}^{-1}$ )	$I_{0.5}$ (mM)	$A_0$ ( $\text{Uml}^{-1}$ )	$I_{0.5}$
Controles	50 ± 23	0.085 ± 0.031	7.1 ± 5.8	0.134 ± 0.014	142.0
Estresadas	48 ± 21	0.118 ± 0.023	5.7 ± 2.3	0.189 ± 0.052	118.8

<sup>1</sup>Los valores de los parámetros cinéticos son la media ± desviación estándar de 5 experimentos. Las condiciones de los ensayos se describen en Métodos. En cada experimento el valor se estimó mediante un ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación 2. <sup>2</sup>La extracción se realizó como se describe en Métodos.

<sup>3</sup>El contenido relativo de agua fue del 90.3 ± 1.9 % en las hojas controles y 56.6 ± 7.7 % en las hojas estresadas.

Cuando la saturación por PEP libre ( $PEP_L$ ) se realizó en presencia de malato 5 mM, se obtuvieron los parámetros cinéticos aparentes incluidos en la Tabla 4. La Figura 7 muestra el resultado de un experimento típico, como puede observarse, el malato tiene sólo un efecto ligero sobre ambas formas de PEPC de extractos de hojas controles, cuyas  $V_{max}$  varían entre 1.5 y 2.8 veces con respecto a los valores estimados en ausencia de malato, mientras que las  $K_m(PEP_L)$  no se afectaban. En cambio las dos formas de la enzima presentes en los extractos de hojas estresadas responden en una forma no usual a malato, ya que la  $K_m(PEP_L)$  se reduce en ambas en forma drástica, mientras que la  $V_{max}$  no se afecta significativamente. Este hallazgo sugiere que bajo condiciones de déficit de agua el malato no solo no es inhibitorio, y de hecho se comporta como un activador ( el valor de  $PEPC\text{-}a$   $V_{max}/K_m$  es 20 veces superior en presencia de malato que en su ausencia)

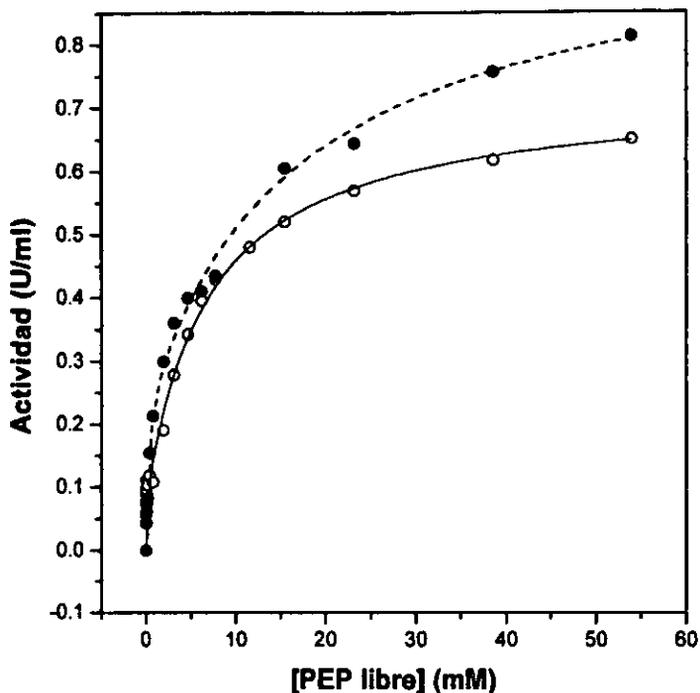
### VII.1.3. Efecto de Glc6P sobre la cinética de saturación por PEP

También con este efector se encontraron diferencias en la respuesta de la enzima presente en extractos de hojas controles y estresadas (Tabla 5 y Figura 8). Mientras que el efecto de Glc6P sobre la cinética de saturación por PEP de las primeras es pequeño, disminuyendo a aproximadamente la mitad la  $K_m(PEP)$  de la forma PEPC-a, en el caso de esta forma en extractos de hojas estresadas la  $K_m(PEP)$  es reducida casi 9 veces. Además, mientras que la  $V_{max}$  de la forma PEPC-a de hojas controles no se afecta por Glc6P, las de hojas estresadas se aumenta dos veces. Todo ello tiene como resultado que la  $V_{max}/K_m(PEP)$  de la PEPC-a que es 6 veces menor en las hojas estresadas que en las controles en ausencia de Glc6P, en presencia del activador es 1.5 veces mayor en la enzima de hojas estresadas. Los efectos de Glc6P sobre la PEPC-b de extractos de hojas controles y estresadas son mucho menos importantes.

Tabla 4. Efecto de malato sobre los parámetros cinéticos<sup>1</sup> aparentes de PEPC en extractos crudos<sup>2</sup> desalados de hojas controles<sup>3</sup> y sometidas a déficit de agua<sup>3</sup>

Hojas	PEPC-a			PEPC-b		
	$V_{max}$ (Uml <sup>-1</sup> )	$Km$ (PEP <sub>L</sub> ) μM	$V_{max}/Km$ (PEP <sub>L</sub> ) (Uml <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$V_{max}$ (Uml <sup>-1</sup> )	$Km$ (PEP <sub>L</sub> ) mM	$V_{max}/Km$ (PEP <sub>L</sub> ) (Uml <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
<b>Controles</b>						
Sin malato	0.12 ± 0.03 (10 %) <sup>4</sup>	62 ± 13	1.9	1.11 ± 0.29 (90) <sup>4</sup>	44.0 ± 2.3	0.03
Con malato	0.08 ± 0.03 (12 %) <sup>4</sup>	37 ± 3	2.2	0.57 ± 0.25 (88 %) <sup>4</sup>	16.7 ± 1.9	0.03
<b>Estresadas</b>						
Sin malato	0.24 ± 0.01 (23 %)	169 ± 70	1.4	0.84 ± 0.11	13.1 ± 4.8	0.04
Con malato	0.07 ± 0.02 (9 %) <sup>4</sup>	3 ± 1	23	0.72 ± 0.09 (91 %) <sup>4</sup>	9.1 ± 2.3	0.08

<sup>1</sup>Los valores de los parámetros cinéticos son la media ± desviación estándar de 4 experimentos. Los ensayos se realizaron en presencia de 5 mM de malato bajo las condiciones descritas en Métodos. En cada experimento el valor de los parámetros cinéticos se estimó por medio de un ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación 1. <sup>2</sup>La extracción se realizó como se describe en Métodos. <sup>3</sup>El contenido relativo de agua fue del 88.3 ± 2.1 % en las hojas controles y 51.6 ± 6.5 % en las hojas estresadas. <sup>4</sup>Porcentaje de la actividad total de PEPC que corresponde a cada una de las formas.



**Figura 7. Gráfica típica de una cinética de saturación por PEP de PEPC de un extracto crudo desalado de hojas de frijol, en presencia de malato.** Las condiciones de extracción se describen en Métodos. Las condiciones de ensayo fueron: Hepes-KOH 100 mM, EDTA 0.1 mM, MDH 2 U/ml, NaHCO<sub>3</sub> 1 mM, NADH 0.2 mM, extracto 20 μl/ml, PEP diferentes concentraciones, Mg<sup>++</sup> libre 0.4 mM y malato 5 mM. El CRA de las hojas usadas en este experimento fue del 48.0 %. Los puntos son los datos experimentales, la línea es la teórica resultante del mejor ajuste de los datos a la ecuación 1. (●) sin malato, (○) con malato.

Tabla 5. Efecto de Glc6P sobre los parámetros cinéticos<sup>1</sup> aparentes de PEPC en extractos crudos<sup>2</sup> desalados de hojas controles<sup>3</sup> y sometidas a déficit de agua<sup>3</sup>

Hojas	PEPC-a			PEPC-b		
	$V_{max}$ (U/ml)	$K_m(PEP_a)$ $\mu M$	$V_{max}/K_m$	$V_{max}$ (U/ml)	$K_m(PEP_b)$ mM	$V_{max}/K_m$
<b>Controles</b>						
Sin Glc6P	0.19 ± 0.06 (22 %)	12 ± 5	16	0.67 ± 0.21 (78 %)	17.1 ± 5.2	0.039
Con Glc6P	0.21 ± 0.05 (26 %) <sup>4</sup>	15 ± 5	14	0.59 ± 0.12 (74 %) <sup>4</sup>	14.2 ± 3.4	0.042
<b>Estresadas</b>						
Sin Glc6P	0.25 ± 0.01	168 ± 74	1.5	0.84 ± 0.11 (77 %)	13.1 ± 4.8	0.064
Con Glc6P	0.47 ± 0.07 (45 %) <sup>4</sup>	22 ± 3	21	0.57 ± 0.09 (55 %) <sup>4</sup>	33.9 ± 2.2	0.017

<sup>1</sup>Los valores de los parámetros cinéticos son la media ± desviación estándar de 4 experimentos independientes. Los ensayos se realizaron en presencia de Glc6P 10 mM bajo las condiciones de los ensayos descritas Métodos. En cada experimento el valor se estimó mediante un ajuste de los datos experimentales a la ecuación 1. <sup>2</sup>La extracción se realizó como se describe en Métodos. <sup>3</sup>El contenido relativo de agua fue del 86 ± 3.9% en las hojas controles y 51.6 ± 6.5 % en las hojas estresadas. <sup>4</sup>Entre paréntesis se da el porcentaje de la actividad total de PEPC que corresponde a cada una de las formas.

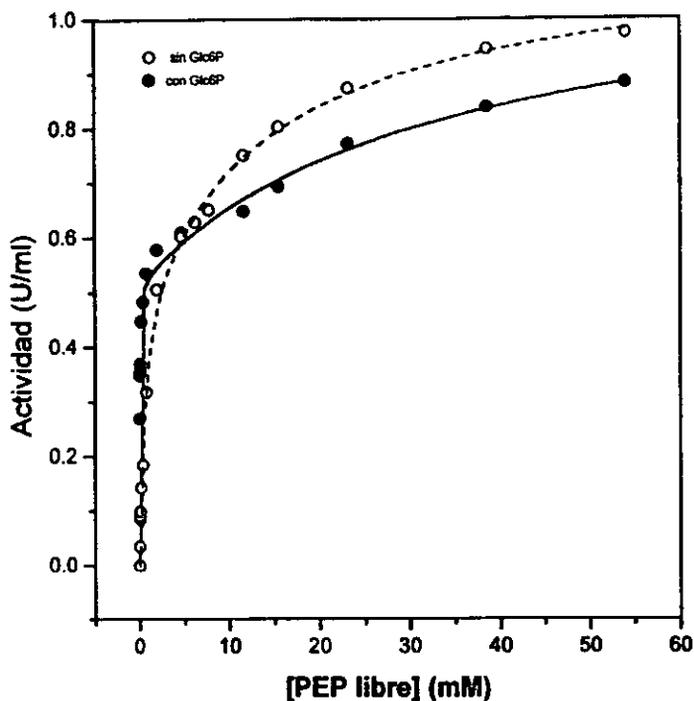


Figura 8. Gráfica típica de una cinética de saturación por PEP de PEPC de un extracto crudo desalado de hojas de frijol, en presencia de Glc6P. Las condiciones de extracción se describen en Métodos. Las condiciones de ensayo fueron: HEPES-KOH 100 mM, EDTA 0.1 mM, MDH 2 U/ml,  $\text{NaHCO}_3$  1 mM, NADH 0.2 mM, extracto 20  $\mu\text{l/ml}$ , PEP diferentes concentraciones,  $\text{Mg}^{++}$  libre 0.4 mM y Glc6P 10 mM. El CRA de las hojas usadas en este experimento fue del 62.0 %. Los puntos son los datos experimentales, la línea es la teórica resultante del mejor ajuste de los datos a la ecuación 1.

#### VII.1.4. Efecto de cosolutos sobre la cinética de saturación por PEP

Para investigar si las condiciones prevalientes en la hoja durante el déficit de agua favorecen la actividad de PEPC, estudiamos el efecto de una alta concentración de prolina (600 mM) sobre: 1) la cinética de saturación de la enzima por PEP y 2) la inhibición por el malato en extractos crudos desalados provenientes de hojas controles o estresadas. Así mismo, con fines comparativos, se estudiaron los efectos de glicerol (600 mM), ya que se sabe que este cosoluto afecta notablemente las propiedades cinéticas de la mayoría de las PEPC estudiadas hasta la fecha.

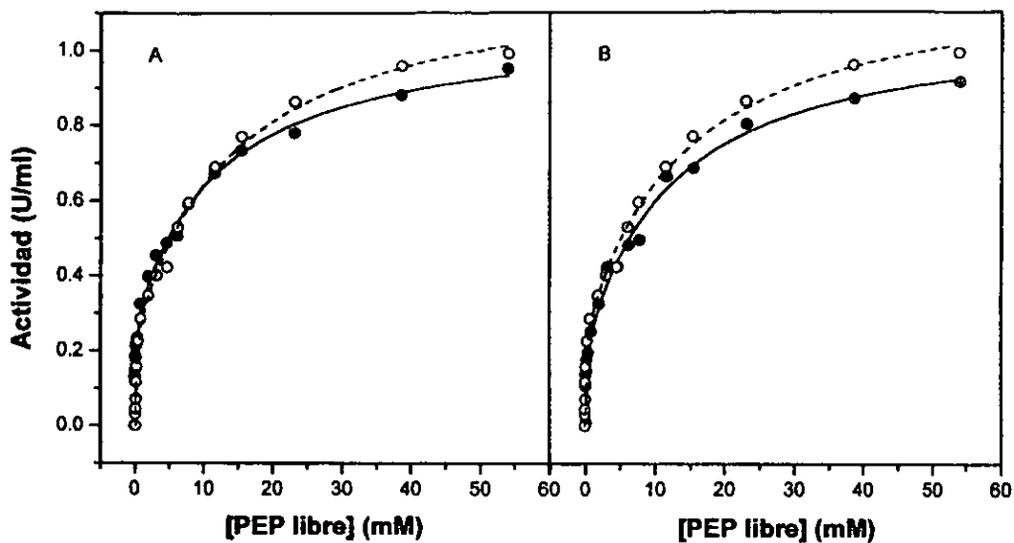
Como se muestra en la Tabla 6, la inclusión de prolina 600 mM o de glicerol 600 mM en el medio de ensayo no cambió significativamente ni la proporción de PEPC-a y PEPC-b ni la actividad total de la enzima en los extractos de hojas controles, aunque la prolina tuvo un efecto claro sobre la  $K_m(\text{PEP})$  de la forma PEPC-a, cuyo valor se redujo a la mitad, mientras que el glicerol no tuvo ningún efecto. En el caso de los extractos de hojas estresadas, ambos cosolutos afectaron en forma significativa la  $K_m(\text{PEP})$  de la PEPC-a, que se redujo casi 7 veces en presencia de prolina y 3 veces en presencia de glicerol, como se muestra en la Tabla 6. La cinética de saturación de la forma PEPC-b no se afectó por la presencia de los cosolutos. Los efectos de la prolina y glicerol se muestran gráficamente en la Figura 9.

Con respecto a la respuesta al malato, la inclusión de prolina en el medio de ensayo no alteró la sensibilidad a este inhibidor de ninguna de las dos formas de la enzima ni en extractos de hojas controles ni de estresadas, como se muestra en la Tabla 7. Teniendo en cuenta las altas desviaciones estándares asociadas a los valores de  $I_{0.5}$ , no se puede concluir que existan diferencias entre ambos tipos de extractos a este respecto.

Tabla 6. Efecto de cosolutos sobre los parámetros cinéticos<sup>1</sup> aparentes de PEPC en extractos crudos desalados<sup>2</sup> de hojas controles<sup>3</sup> y sometidas a déficit de agua<sup>3</sup>

Adición	PEPC-a			PEPC-b		
	$V_{max}$ (Uml <sup>-1</sup> )	$K_m(PEPC)$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ (Uml <sup>-1</sup> $\mu$ M <sup>-1</sup> )	$V_{max}$ (Uml <sup>-1</sup> )	$K_m(PEPC)$ (mM)	$V_{max}/K_m$ (Uml <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
<b>Hojas controles</b>						
Ninguna	0.18 ± 0.03 (14 %) <sup>4</sup>	33 ± 4	4.24	1.08 ± 0.31 (86 %) <sup>4</sup>	14.1 ± 3.0	0.08
Prolina 600 mM	0.21 ± 0.08 (20 %) <sup>4</sup>	18 ± 5	11.67	0.85 ± 0.09 (80 %) <sup>4</sup>	11.5 ± 0.4	0.07
Glicerol 600 mM	0.21 ± 0.04 (17 %) <sup>4</sup>	38 ± 19	5.52	1.03 ± 0.15 (83 %) <sup>4</sup>	12.5 ± 2.3	0.08
<b>Hojas estresadas</b>						
Ninguna	0.24 ± 0.06 (19 %) <sup>4</sup>	169 ± 61	1.42	0.99 ± 0.31 (81 %) <sup>4</sup>	14.2 ± 4.6	0.07
Prolina 600 mM	0.18 ± 0.04 (17 %) <sup>4</sup>	25 ± 7	7.20	0.91 ± 0.28 (83 %) <sup>4</sup>	11.6 ± 1.6	0.08
Glicerol 600 mM	0.30 ± 0.09 (25 %) <sup>4</sup>	52 ± 21	5.76	0.89 ± 0.26 (75 %) <sup>4</sup>	14.1 ± 3.0	0.06

<sup>1</sup>Los valores de los parámetros cinéticos son la media ± desviación estándar de 4 experimentos para las hojas controles y de 5 para las estresadas. Las condiciones de los ensayos se describen en Métodos, en cada experimento el valor se estimó un ajuste de los datos experimentales a la ecuación 1. <sup>2</sup>La extracción se realizó como se describe en Métodos. <sup>3</sup>El contenido relativo de agua en las hojas fue del 90.8 ± 2.1 % en las hojas controles y 51.8 ± 9 % en las hojas estresadas. <sup>4</sup>Porcentaje de la actividad total de PEPC que corresponde a cada una de las formas.



**Figura 9.** Gráfica típica de una cinética de saturación por PEP libre de PEPC en un extracto crudo desalado, de hojas de frijol en presencia de cosolutos. A) Glicerol 600 mM. B) Prolina 600 mM. (o) sin el osmolito. Las condiciones de extracción y de ensayo se describen en Métodos, excepto la adición del cosoluto. El CRA de las hojas usadas en este experimento fue del 50.0 %.

Tabla 7. Efecto de prolina 600 mM sobre la sensibilidad a malato<sup>1</sup> de PEPC en extractos crudos<sup>2</sup> desalados de hojas controles y sometidas a déficit de agua.

Adición	PEPC-a		PEPC-b		PEPC-b/PEPC-a
	$I_{0.5}$ ( $\mu\text{M}$ )	$A_0$ ( $\text{Uml}^{-1}$ )	$I_{0.5}$ (mM)	$A_0$ ( $\text{Uml}^{-1}$ )	$I_{0.5}$
<u>Hojas controles<sup>3</sup></u>					
Ninguna	70 $\pm$ 15	0.243 $\pm$ 0.019	9.1 $\pm$ 0.9	0.282 $\pm$ 0.057	130
Prolina	70 $\pm$ 39	0.203 $\pm$ 0.021	7.7 $\pm$ 1.1	0.279 $\pm$ 0.052	110
<u>Hojas estresadas<sup>3</sup></u>					
Ninguna	18 $\pm$ 8	0.076 $\pm$ 0.034	3.7 $\pm$ 0.05	0.148 $\pm$ 0.023	205
Prolina	35 $\pm$ 17	0.062 $\pm$ 0.020	5.9 $\pm$ 1.05	0.149 $\pm$ 0.030	169

<sup>1</sup> Los valores de los parámetros de inhibición son la media  $\pm$  desviación estándar de 4 experimentos. Las condiciones de los ensayos se describen en Métodos En cada experimento el valor se estimó un ajuste de los datos experimentales a la ecuación 2. <sup>2</sup> La extracción se realizó como se describe en Métodos. <sup>3</sup> El contenido relativo de agua en las hojas controles fue del 88.0  $\pm$  2.8 % y en las hojas sometidas a déficit de agua fue del 52.9  $\pm$  2.7 %.

### VII.1.5. Efecto del pH sobre la actividad PEPC

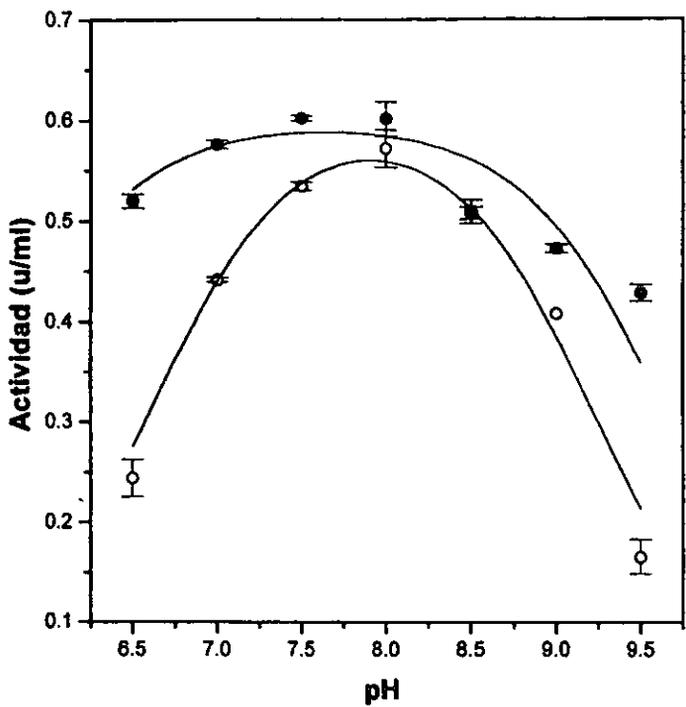
Con el fin de investigar si el tratamiento de déficit de agua alteraba las propiedades del sitio activo de la enzima, se investigó la dependencia del pH de la velocidad de la reacción catalizada por PEPC en ambos tipos de extractos. Estos estudios se hicieron a baja concentración de PEP libre (saturante para PEPC-a, pero no para PEPC-b) y a alta concentración de PEP libre (saturante para ambas formas). Los perfiles de velocidad obtenidos (Figura 10) muestran la existencia de dos grupos ionizables, uno que se protona a valores ácidos de pH y otro a valores básicos con valores de  $pK_1$  y  $pK_2$  respectivamente. Los datos experimentales se ajustaron por regresión no lineal a la ecuación de un sistema diprótico (ecuación 3, en Materiales y Métodos) y en la Tabla 8 se incluyen los valores de  $pK$  estimados con estos ajustes. Como puede observarse el valor de  $pK_1$  se reduce 1 o 1.5 unidades de pH al incrementar la concentración de PEP en el medio de ensayo de 2.5 mM a 50 mM, mientras que el valor de  $pK_2$  se incrementa 0.8 unidades de pH. No se encontraron diferencias significativas entre hojas controles y estresadas en la respuesta al pH.

### VII.2. Patrón isoenzimático de PEPC en hoja de frijol

La electroforesis de extractos crudos de hoja de frijol en geles de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturizantes y el posterior revelado de las bandas con actividad PEPC, muestra que existen dos formas de la enzima que migran a diferente distancia en el campo electroforético (Figura 11). La banda de migración más rápida no está tan bien definida como la más lenta y en numerosas ocasiones presentó un barrido.

El contenido relativo de ambas formas en los extractos crudos se estimó por densitometría de las dos bandas, asumiendo que la proteína PEPC en ellas tiene la misma actividad específica. La proporción obtenida en ambas bandas correlaciona con la estimada por los estudios de saturación por PEP (17 y 83 % de actividad respectivamente).

Para conocer si las dos formas de PEPC estaban formadas por subunidades de igual o diferente peso molecular se sometieron los extractos crudos a SDS-PAGE seguida por



**Figura 10.** Dependencia del pH de la velocidad de la reacción catalizada por PEPC de un extracto crudo desalado de hojas de frijol. Las condiciones de extracción y de ensayo se describen en Métodos, excepto la concentración de PEP en el ensayo. PEP 2.5 (○) y 50 mM (●). El CRA de las hojas utilizadas en este experimento fue del 91.0 %.

Tabla 8. Valores de  $pK^1$  estimados para la enzima PEPC de extractos crudos desalados<sup>2</sup> de hojas controles y sometidas a déficit<sup>3</sup> de agua

Hojas	PEP 2.5 mM		PEP 50 mM	
	$pK_1$	$pK_2$	$pK_1$	$pK_2$
Controles	$6.7 \pm 0.1$	$9.1 \pm 0.1$	$4.4 \pm 0.5$	$9.9 \pm 0.0$
Estresadas	$6.5 \pm 0.0$	$9.1 \pm 0.0$	$5.5 \pm 0.1$	$9.9 \pm 0.0$

<sup>1</sup>Las condiciones de los ensayos se describen en Métodos. Los valores de  $pK$  se estimaron por medio de un ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación 3. <sup>2</sup>La extracción se realizó como se describe en Métodos. <sup>3</sup>El contenido relativo de agua fue del  $90.3 \pm 1.9\%$  en las hojas controles y  $56.6 \pm 7.7\%$  en las hojas estresadas.

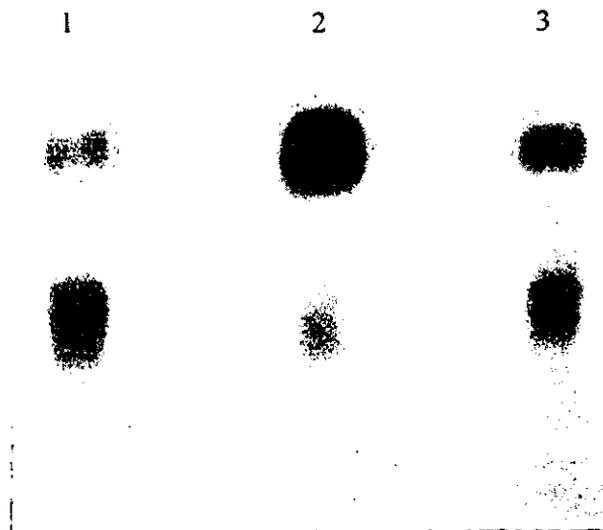


Figura 11. Electroforesis nativa de PEPC de extractos crudos desalados de hojas de frijol controles (carriles 1 y 3) y hojas estresadas (carril 2). 1. Las hojas se sumergieron en agua destilada. 2. Las hojas se sumergieron en una solución de PEG al 25 % (p/v) 3. Se utilizaron hojas recién cortadas de plantas bien irrigadas. Las proteínas fueron separadas por un gel de poliacrilamida al 8 % como se describe en Métodos. Se aplicaron 0.02 unidades totales de actividad de PEPC en cada carril.

electrotransferencia e inmunodetección por anticuerpos antiPEPC de hoja de maíz. A pesar de numerosos intentos en los que se cambiaron las condiciones del experimento no encontramos las bandas esperadas de una masa molecular de alrededor de 100 kD, que es aproximadamente el de las subunidades de todas las PEPC de plantas descritas hasta la fecha. Se detectó por el contrario una banda de masa molecular de 52.5 kDa (Fig. 12, carriles 6 y 7). Sin embargo, se ha reportado una PEPC de peso de 60 kDa por cada subunidad en *Methanothermus sociabilis*, una bacteria termófila (Sako *et al.* 1996).

El suero preinmune no reveló ninguna banda de proteína. El bajo peso molecular de la banda que se revela con el anticuerpo heterólogo nos hizo pensar que de tratarse de PEPC debería ser un producto de degradación proteolítica de la enzima. Se hicieron entonces inmunotransferencias de la enzima parcialmente purificada usando fracciones del pico de actividad obtenido de la columna de filtración en gel (vease Sección VII.3.) y de esta forma se pudo detectar una banda del peso molecular esperado de 102 kDa, además de la de bajo peso molecular detectada en los extractos crudos, que ahora se manifestaba como muy abundante (Fig. 12). El peso molecular de esta última está cercano al esperado para Rubisco. Dada la gran cantidad de Rubisco en hojas de frijol y el hecho conocido para otra planta  $C_3$  de que copurifica con PEPC (Miziorko *et al.*, 1974), pensamos que nuestro anticuerpo pudiera haber reconocido a algún epítipo de esta enzima.

Con el fin de investigar esta posibilidad se inoculó un conejo con proteína procedente de la región de masa molecular de 50 a 60 kDa de un gel preparativo de poliacrilamida en presencia de SDS. Una vez obtenidos los anticuerpos, se usaron para el revelado de una membrana a la que se había transferido PEPC de hoja de maíz, PEPC de hoja de frijol parcialmente purificada y albúmina sérica bovina. Como puede observarse en la Figura 13. ni el anticuerpo antiPEPC, ni el antiproteínas 50-60 kDa cruzaron con la albúmina a pesar de que se aplicó igual cantidad de esta proteína que la de proteína total en los otros carriles. Sorprendentemente, el anticuerpo antiproteína 50 - 60 kDa reconoció no sólo a la banda de 50-60 kDa sino también a la de 102 kDa, aunque no dió ninguna señal con la PEPC de hoja de maíz que había dado una muy fuerte señal con su anticuerpo homólogo. El barrido observado en este carril se debe a que la preparación de PEPC usada era parcialmente pura

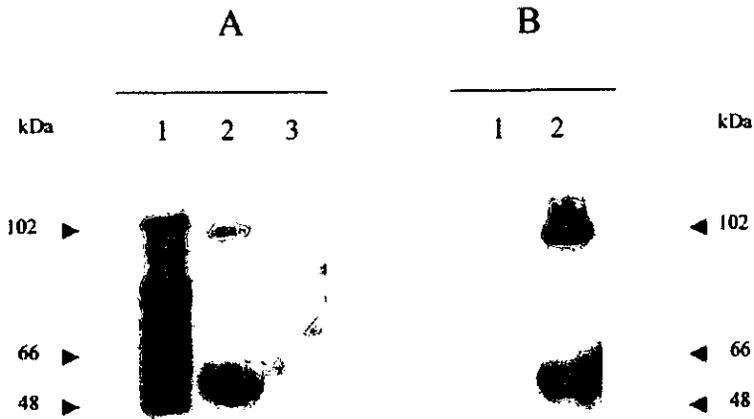


Figura 13. Western blot de PEPC. La electrotransferencia fue realizada de una electroforesis SDS - PAGE al 8 % de acrilamida. A) Fueron aplicados 40  $\mu$ g de PEPC parcialmente purificada de hoja de maiz (carril 1), 20  $\mu$ g de PEPC parcialmente purificada de hoja de frijol (carril 2) y 40  $\mu$ g de albúmina de suero bovino (carril 3). La inmunodetección se hizo con anticuerpos antiPEPC de hoja de maíz. B) Se aplicaron iguales cantidades y condiciones de proteína que en los carriles 1 y 2 de A, pero fueron inmunodetectados con anticuerpos antiproteínas de 50 - 60 kDa obtenidos como se describieron en Métodos.

y había sido almacenada por varios meses, por lo que seguramente estaba parcialmente degradada.

Investigamos si el tratamiento de las hojas con PEG producía alguna alteración en el patrón electroforético bajo condiciones no desnaturalizantes. Como puede observarse en la figura 11, si hubo diferencias notables entre los extractos de hojas controles y estresadas con respecto a la intensidad relativa de las bandas, aún cuando se aplicaron las mismas unidades de actividad PEPC en los dos casos. La actividad asociada con la banda que migra más lentamente es claramente mayor en los extractos de hojas estresadas que en los extractos de hojas controles. Este resultado fue totalmente reproducible.

### **VII.3. Purificación parcial de PEPC de hoja de frijol**

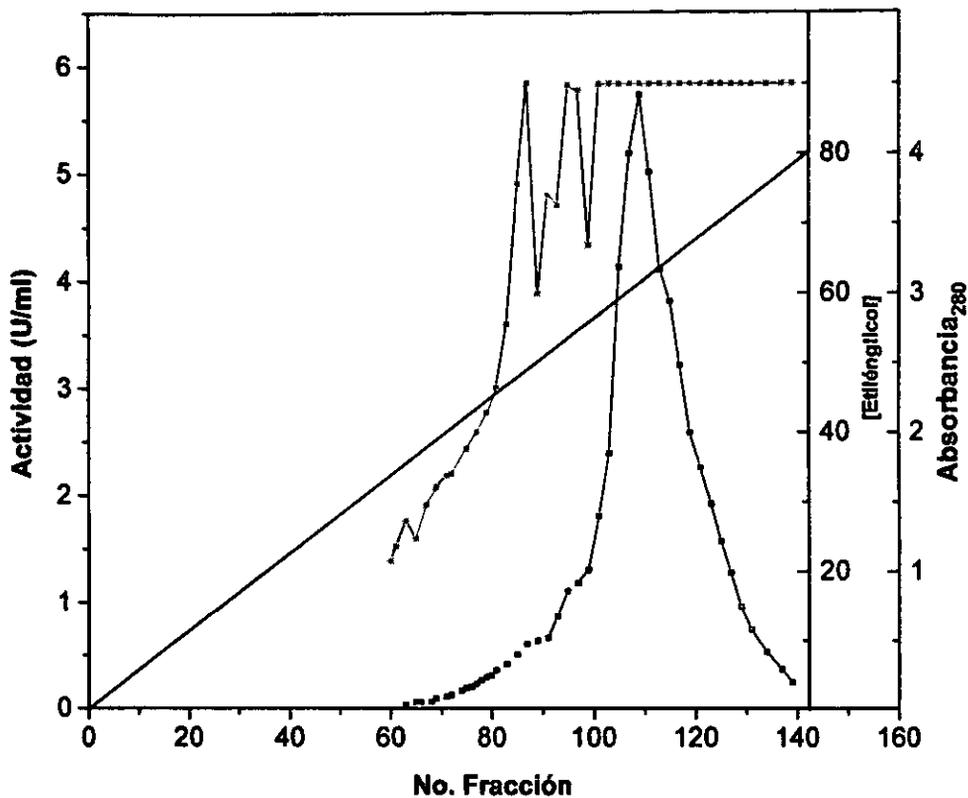
En un intento de obtener enzima pura para la obtención de anticuerpos policlonales monoespecíficos y para lograr la separación de ambas formas de la enzima y así, poderlas caracterizar cinética y fisicoquímicamente en forma aislada, se abordó la purificación. Se probaron diferentes estrategias de purificación usando las cromatografías descritas en los Materiales y Métodos. Uno de los principales problemas al que nos enfrentamos en el proceso de purificación fue la alta inestabilidad de la enzima en los medios de extracción y a la utilización de sales para el gradiente en la cromatografía de intercambio iónico. Esto nos llevo a investigar las condiciones en las que se la enzima fuera mas estable. La inclusión de glicerol y etilenglicol en las soluciones amortiguadoras permitieron que la actividad de la enzima se mantuviera, y la utilización de NaCl para el gradiente de la cromatografía de intercambio iónico no la inactivó, a pesar de que esta sal inactiva a las PEPC de otras especies (Manetas *et al.*, 1985). En la Tabla 9 se resumen los resultados obtenidos. Los perfiles de elución de las cromatografías hidrofóbicas, de intercambio iónico y de exclusión molecular se muestran en las Figuras 14, 15 y 16, respectivamente.

Tabla 9. Resultados de los pasos de purificación de PEPC de hoja de frijol

Paso de Purificación	Proteína Total (mg)	Actividad Total (unidades)	Actividad específica (unidades/mg)	Veces de Purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	620	50	0.08	1.0	100
Sulfato de Amonio	203	46	0.23	2.9	92
Fenilsefariosa	58.5	30	0.51	6.4	60
Q-Separiosa flujo rápido	21.3	15.5	0.73	9.0	31
Superdex 200	6.4	8.9	1.39	17.4	18

En la cromatografía de exclusión molecular encontramos dos picos de actividad, como se muestra en la figura 16. La máxima actividad del primer pico que es el mayoritario se obtuvo tras un tiempo de retención de 98 minutos, mientras que el del segundo fue de 116 minutos. Al sumar la actividad de cada una de las fracciones obtuvimos 8.9 unidades totales, por lo que el rendimiento de esta columna fue del 18 %. Cada fracción se mantuvo separada determinándole a cada una su actividad específica. La que tuvo la mayor actividad fue la del tiempo de retención de 98 minutos con 1.96 U/mg de proteína.

La purificación resultó sumamente laboriosa a consecuencia fundamentalmente de la alta inestabilidad de la enzima y de la abundancia de Rubisco en este tejido. Debido a ello, no nos fue posible lograr una purificación total como era nuestro objetivo original, por lo que no se pudieron obtener anticuerpos antiPEPC de hoja de frijol.



**Figura 14. Perfil de elución de la actividad PEPC de hoja de frijol de una columna hidrofóbica de Fenil-sefariosa CL-4B HR. Los amortiguadores de equilibrio y elución se describen en Métodos. (■) Perfil de actividad, (\*) perfil de proteína. La línea recta indica el gradiente de concentración de etilénglicol usado en la elución.**

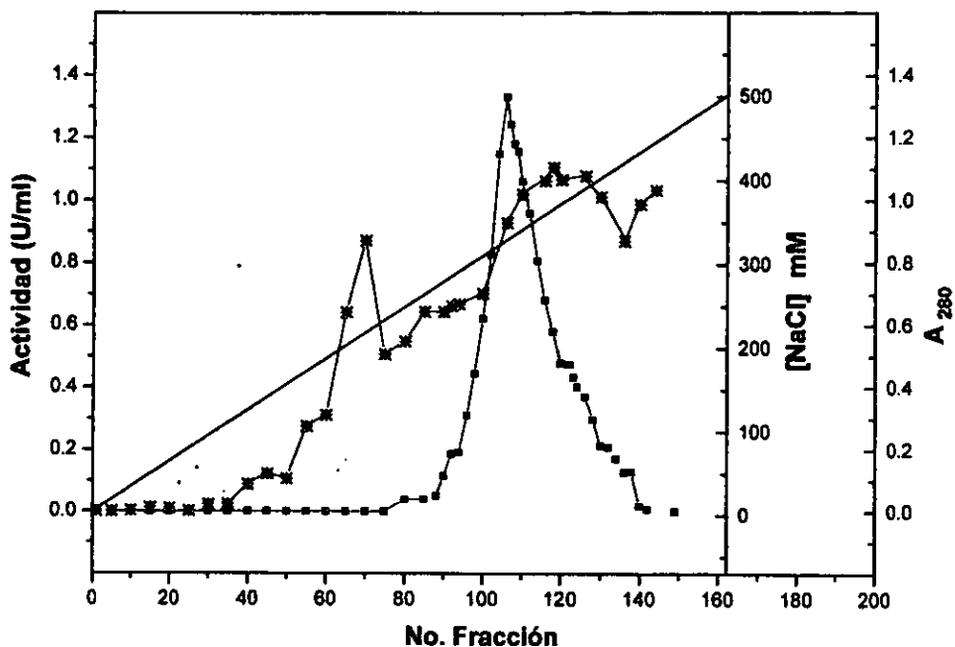
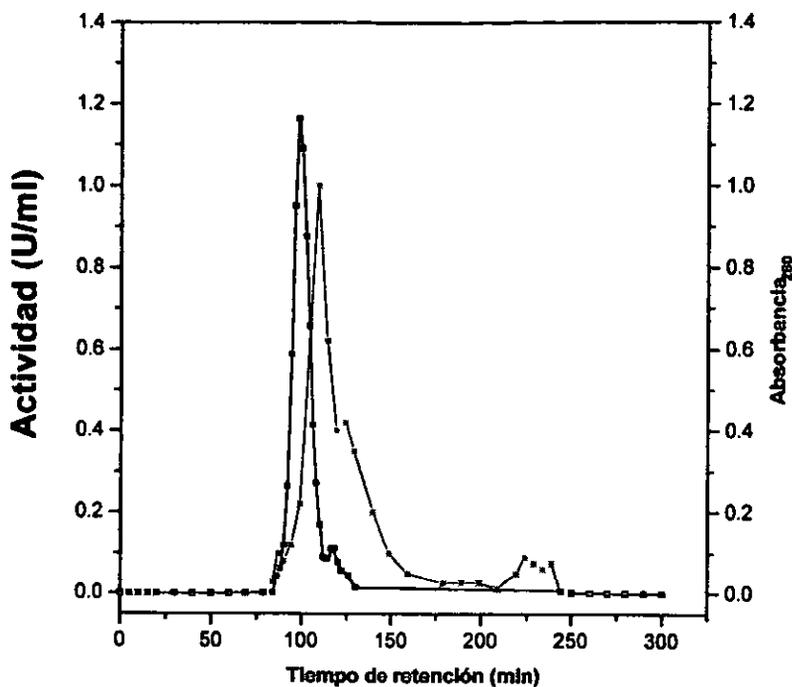


Figura 15. Perfil de elución de la actividad PEPC de hoja de frijol de una columna de Intercambio Iónico de Q-sefarosa de flujo rápido. Los amortiguadores de equilibrio y elución se describen en Métodos. (■) Perfil de actividad, (\*) perfil de proteína. La línea recta indica la pendiente de concentración de NaCl usado en elución.



**Figura 16.** Perfil de elución de la actividad PEPC de hoja de frijol de una columna de exclusión molecular de Superdex 200. Los amortiguadores de equilibrio y de elución se describen en Métodos. (■) Perfil de actividad, (\*) Perfil de proteína.

## VIII. DISCUSIÓN

### VIII.1. Propiedades de la enzima PEPC de hoja de frijol

La actividad PEPC encontrada en extractos crudos de hoja de frijol es baja si se le compara con las altas actividades encontradas en hojas de plantas  $C_4$  como maíz; sin embargo, esta actividad concuerda con las actividades de PEPC encontradas en otras plantas  $C_3$  (Miziorco *et al.*, 1974).

La enzima muestra una compleja cinética de saturación por el sustrato PEP indicativa de la presencia en el medio de ensayo de dos formas no interconvertibles, al menos durante el tiempo que dura el ensayo, ambas con actividad enzimática pero con propiedades cinéticas diferentes. Estas dos formas, a las que hemos llamado PEPC-a y PEPC-b, pudieran ser diferentes estados de agregación de la misma isoenzima o dos isoenzimas diferentes. En el primer caso, podrían ser un artefacto resultado de la alta dilución de la enzima en el ensayo. Teniendo en cuenta que la mayoría de las PEPC de plantas estudiadas hasta la fecha son tetrámeros en su forma nativa (O'Leary, 1982; Maruyama *et al.*, 1962; Mares y Leblová, 1980; Walker *et al.*, 1986) y que las isoenzimas de hoja de plantas CAM como de plantas  $C_4$  se disocian a dímeros bajo un buen número de condiciones (Wu y Wedding, 1987; Meyer *et al.*, 1991; Uedan y Sugiyama, 1976; Podestá y Andreo, 1989), podría pensarse que en el medio de ensayo existe una mezcla de tetrámeros y dímeros en equilibrio. Sin embargo, se sabe que el sustrato PEP y el cofactor  $Mg^{2+}$  favorecen a la forma tetramérica. Sería de esperar, entonces, que a medida que se aumenta la concentración de PEP en el medio de ensayo el equilibrio  $\text{dímero} \rightleftharpoons \text{tetrámero}$  se desplazara hacia la derecha. De ser así, la saturación por PEP de la forma tetramérica sería la correspondiente al segundo componente de la cinética observada, que es el que muestra una  $K_m(\text{PEP})$  elevadísima y por tanto una afinidad muy baja por este sustrato. Resulta contradictorio que el sustrato promueva la aparición de la forma por la que posee una menor afinidad, ya sea ésta tetrámero o dímero. Es por esto que pensamos que las dos formas no se interconvierten en el ensayo al aumentar la concentración del sustrato, por lo que es posible que se trate de dos verdaderas isoenzimas.

En apoyo de esta conclusión preliminar están los resultados obtenidos cuando la saturación por PEP se lleva a cabo en presencia de glicerol. Se sabe que este cosoluto favorece el estado tetramérico de la enzima de plantas  $C_4$  y CAM y evita su disociación por dilución (Podestá y Andreo, 1989; Wu y Wedding, 1987.). Pero en el caso de la enzima de hoja de frijol objeto de este estudio la presencia de glicerol en el medio de ensayo no altera ni la  $V_{max}$  ni la  $K_m$ (PEP) de las dos actividades detectadas. En otras palabras, glicerol no afectaría el grado de disociación de la enzima, contrario a lo que se ha observado hasta la fecha. Sin embargo, pudiese ser que el paso de dímero a tetramero sea lento y no se alcance a observar durante el tiempo del ensayo de actividad. Por ello, para concluir que no se trata de dos estados de agregación, en base solamente a estudios de velocidad inicial con extractos crudos, se requerirían experimentos adicionales que determinen si la preincubación de la enzima diluida por tiempos largos con diferentes concentraciones de sustrato o efectores afecta la proporción relativa de los dos componentes observados en la cinética de saturación y si esta cinética depende de la concentración de la enzima en el ensayo.

La prueba definitiva de la existencia de al menos dos isoenzimas se lograría al separar y caracterizar en forma independiente a ambas y/o al clonar sus genes. Nosotros en este trabajo intentamos el primero de estos dos enfoques experimentales y encontramos evidencia adicional de que se trata de dos isoenzimas.

En primer lugar, los zimogramas de los extractos crudos mostraron también dos formas predominantes de PEPC con diferente movilidad electroforética. Puesto que se trata de una electroforesis bajo condiciones no desnaturalizantes en geles de una sola concentración de poliacrilamida, las diferencias de movilidad de las dos formas pueden deberse a diferencias en su masa molecular, en su carga neta o en ambas propiedades. Las dos bandas están lo suficientemente bien definidas como para descartar que sean el resultado de una disociación de la enzima durante el proceso electroforético, ya que en este caso se observaría un barrido entre ellas. Ello indica que las dos formas están presentes en el extracto crudo, en el que existe una considerable concentración de proteína y que contiene cosolutos estabilizadores

como glicerol y etilén glicol en una alta concentración. De hecho, la electroforesis de un extracto crudo en ausencia de estos cosolutos hace que se pierda la actividad de ambas formas y no se pueda observar ninguna banda con actividad de PEPC, lo que sugiere que ambas formas son susceptibles de disociación durante el proceso electroforético. Por el momento, no sabemos cuál de las dos bandas, si alguna, corresponde a PEPC-a y cuál a PEPC-b.

En segundo lugar, se obtuvieron dos picos de actividad PEPC en la cromatografía de filtración en gel. Uno de los picos corresponde a una masa molecular cercana a los 500 kDa y el otro a una masa molecular cercana a los 250 kDa, lo que sugiere que una de las formas es un tetrámero y la otra un dímero, de ser la masa molecular de la subunidad cercana a 100 kDa, como es el caso de todas las PEPC estudiadas hasta la fecha. Tratamos de comprobar este último punto por medio de SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección usando anticuerpos heterólogos (anti-PEPC de hoja de maíz) y sorprendentemente encontramos que estos anticuerpos cruzan con dos proteínas de peso molecular 102 kDa y 52.5 kDa. Si estas dos proteínas reactivas son PEPC podríamos pensar que ambas formas de la enzima son tetrámeros, pero formados por subunidades de masa molecular diferente.

En un intento de comprobar si la banda de bajo peso molecular era PEPC, o un producto de degradación proteolítica de ésta, obtuvimos anticuerpos frente a las proteínas de frijol con subunidades de peso molecular comprendida entre 50 y 60 kDa. Estos anticuerpos cruzaron no sólo con las bandas de masa molecular frente a las que se obtuvieron, sino también con una(s) proteína(s) de masa molecular de 102 kDa. Este resultado sugiere que si existe relación inmunológica entre proteínas de masas tan diferentes, aunque no es una prueba concluyente de que se trate de PEPC en ambos casos.

Desgraciadamente, la gran inestabilidad de la enzima, que logramos en parte contrarrestar evitando el uso de sales de fosfato e incluyendo los cosolutos mencionados y malato en los amortiguadores usados durante el proceso de purificación, aunado a la abundancia de Rubisco en hoja de frijol, nos impidieron lograr su purificación a homogeneidad en el tiempo disponible para el desarrollo de esta tesis.

Cualquiera que sea la naturaleza de las dos formas de PEPC detectadas en hoja de frijol, cabe hacerse la pregunta: ¿de qué le sirve a la planta una enzima tan ineficiente como la que nosotros hemos llamado PEPC-b?

Esta forma, que o es la más abundante o la que posee mayor  $k_{cat}$  de las dos, tiene una afinidad tan baja por PEP que su grado de saturación *in vivo* debe ser prácticamente cero dado que las concentraciones intracelulares de este metabolito en hoja de plantas  $C_3$  no deben exceder 0.1 mM. Por otra parte, su afinidad por PEP no se incrementa en presencia de Glc6P, ni de glicerol, que son los dos compuestos que producen disminuciones importantes en las  $K_m(PEP)$  de las PEPC estudiadas hasta la fecha. Por tanto, a no ser que exista algún metabolito activador desconocido a la fecha que produzca una drástica reducción de la  $K_m(PEP)$ , esta forma de la enzima estaría prácticamente inactiva *in vivo*.

Dado que los estudios cinéticos se han realizado con extractos crudos, existe un gran error experimental asociado a la determinación de  $V_{max}$ , que refleja no solo la  $k_{cat}$  de la enzima sino la cantidad de enzima extraída en cada experimento. Por esto, los ligeros efectos de los metabolitos o del glicerol sobre este parámetro cinético son difíciles de evaluar y, en todo caso, parecen ser también no significativos. Todo ello parece indicar que la actividad PEPC-b no es regulable. La posibilidad de que sea un artefacto de la extracción, por ejemplo, la consecuencia de proteólisis parcial de la forma fisiológica o de una disociación de una forma tetramérica, no puede ser descartada por el momento.

La otra forma de PEPC observada (PEPC-a) posee una afinidad muy alta por PEP, con un valor de  $K_m$  que es cercano a las concentraciones fisiológicas de este metabolito. La actividad de esta forma, por tanto sí parece ser fisiológicamente relevante.

Sorprendentemente, a diferencia de las PEPC de hojas de plantas  $C_4$  y CAM cuya regulación por malato se hace fundamentalmente modulando su afinidad por el sustrato PEP por medio de una inhibición fundamentalmente competitiva, en el caso de hoja de frijol este inhibidor disminuye la  $V_{max}$  y la  $K_m(PEP)$ , indicando un mecanismo de

inhibición diferente. El activador Glc6P disminuye ligeramente la  $K_m(\text{PEP})$ , dos veces, y no afecta la  $V_{max}$ . Esta enzima parece ser mucho menos sensible a la activación por azúcares fosforilados que las enzimas de hojas de plantas  $C_4$  y CAM. La prolina produjo un efecto similar al de Glc6P, mientras que el glicerol no tuvo ningún efecto.

La cinética de saturación de la PEPC por malato también presentó dos componentes, consistente con la presencia de dos formas de la enzima, una con una alta afinidad por el inhibidor y otra con muy baja afinidad. A pesar de que las desviaciones estándares asociadas al parámetro  $I_{0.5}$  son muy altas, podemos afirmar que la diferencia en el valor de  $I_{0.5}$  entre ambas formas (PEPC-a y PEPC-b) es de dos órdenes de magnitud. Ello hace a PEPC-b prácticamente insensible a la regulación por retroalimentación de este inhibidor, es decir, la actividad de la PEPC-b no estaría *in vivo* regulada por el malato. Estos resultados apoyan la conclusión de que PEPC-a es la forma que existe *in vivo*, mientras que la PEPC-b pudiera ser un artefacto experimental.

También existen diferencias significativas entre las PEPC-a y PEPC-b en relación con los valores de  $pK$  de los grupos ionizables del sitio activo. A PEP 5 mM estaríamos observando fundamentalmente el efecto del pH sobre la  $k_{cat}$  de la forma PEPC-a, mientras que a 50 mM estaríamos observando el efecto sobre la  $k_{cat}$  de la forma PEPC-b. De ser esto cierto, uno de los dos grupos ionizables involucrados es significativamente más ácido en PEPC-b. Estos resultados merecen ser confirmados y ampliados, en caso de que estudios posteriores demuestren que PEPC-b no es un artefacto.

## **VII.2. Efectos del déficit de agua sobre la enzima PEPC de hoja de frijol**

Encontramos dos diferencias importantes entre la enzima presente en extractos de hojas controles y la enzima presente en extractos de hojas sometidas a déficit de agua. La primera es la elevada  $K_m(\text{PEP})$  de la forma que pensamos es la fisiológicamente relevante (PEPC-a) de los extractos de hojas sometidas a déficit hídrico. La afinidad por PEP de PEPC-a es aproximadamente 6 veces menor que la afinidad de la misma forma en extractos de hojas controles. Puesto que la  $V_{max}$  no se altera, la eficiencia catalítica medida como  $V_{max}/K_m$

es 6 veces menor, este resultado estaría indicando una actividad de PEPC disminuida, contrario a lo esperado, bajo condiciones de sequía si las concentraciones intracelulares de PEP no se incrementan en forma compensatoria. Sin embargo, estas diferencias entre la actividad de PEPC en hojas controles y estresadas se invierten en presencia de malato, de Glc6P, del osmolito prolina o del cosoluto glicerol. Parece, por tanto, que bajo las condiciones intracelulares que posiblemente existen durante el déficit hídrico (altos niveles de prolina) la actividad de PEPC no se vería afectada negativamente por esta condición ambiental adversa.

Otra diferencia interesante entre la PEPC de ambos tipos de extractos fue la encontrada en los zimogramas. A pesar de que se aplicaban las mismas unidades de actividad PEPC, la enzima proveniente de hojas estresadas producía tras la electroforesis bandas de actividad mucho más intensas que la enzima procedente de hojas controles. Esto podría ser el resultado de una mayor estabilidad de la enzima de plantas estresadas, lo que constituiría una importante adaptación dado que las condiciones que acompañan al estrés osmótico favorecen la inactivación y desnaturalización de las proteínas. Por esto, las posibles diferencias en estabilidad entre PEPC de hojas controles y estresadas es un importante aspecto que amerita ser investigado en el futuro.

Por el momento, no sabemos qué modificación o modificaciones sufre la proteína PEPC-a a consecuencia del déficit hídrico, modificación(es) que se refleja(n) en un incremento en la  $K_m$ (PEP) y en la estabilidad de la enzima frente a las condiciones de electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta(s) modificación(es) es(son) lo suficientemente estable(s) como para que sus efectos sean observados en extractos después de ser desalados. Esto descarta que los cambios observados se deban a la presencia de compuestos de bajo peso molecular que se acumulan en respuesta al estrés osmótico (iones y solutos compatibles) y sugiere que probablemente se trate de una modificación covalente. Es tentador especular que esta modificación le confiere a la enzima mayor estabilidad en detrimento de su eficiencia catalítica, pero que el efecto adverso sobre la catálisis es eliminado, e incluso convertido en un efecto positivo, en presencia de prolina, glc6P o malato. Es de destacar que malato se conoce como el inhibidor fisiológicamente más importante de las PEPC de plantas

estudiado hasta la fecha, la eficiencia de la enzima PEPC-a de hojas estresadas es 10 veces superior a la de la enzima PEPC-a de hojas controles. El malato se está comportando, por tanto, como un activador muy eficiente bajo condiciones de déficit de agua, equiparable a Glc6P que produce un valor  $V_{max}/K_m(\text{PEP})$  similar al que se obtiene en presencia de malato. Sin embargo, una evaluación más certera del efecto que estos compuestos tengan in vivo sobre la actividad PEPC requiere del conocimiento de sus concentraciones intracelulares bajo diferentes condiciones, lo que hasta el momento no se tiene.

## IX. CONCLUSIONES

El trabajo presentado en esta tesis ha establecido las bases para futuras investigaciones que permitan la caracterización completa de la enzima PEPC de hojas de frijol y su respuesta al déficit de agua. Podemos afirmar por ello que ha abierto una línea de investigación. Las conclusiones preliminares más importantes son:

- 1) En extractos crudos de hojas de frijol existen dos formas de PEPC que difieren en sus propiedades cinéticas (afinidad por PEP y por malato,  $V_{max}$ , respuesta a Glc6P, a malato y a prolina, dependencia del pH de la  $V_{max}$ ) y en su movilidad electroforética.
- 2) El déficit de agua provoca un incremento significativo en la  $K_m(\text{PEP})$  de la forma de PEPC-a que parece ser la fisiológicamente relevante (que se traduce en una reducción de la eficiencia catalítica de 6 veces con respecto a la enzima de hojas controles), Estas diferencias son revertidas por los efectores de PEPC, malato y Glc6P y por el osmolito prolina. Ello permite suponer una actividad significativa de PEPC bajo estas condiciones ambientales adversas.
- 3) La enzima PEPC presente en extractos de hojas estresadas es más estable que la enzima presente en extractos de hojas no estresadas frente a las condiciones inestabilizantes de la electroforesis en geles de poliacrilamida.

## IX. REFERENCIAS

- Adams, P., Thomas, J. C., Vernon, D. M., Bohnert, H. J., Jensen, R. G. (1992). Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiol.* **33**: 1215-1223.
- Amânancio, S., Diogo, E., Santos, H. (1993). Effects of the inorganic nitrogen source on C and N. Interaction in maize callus tissue: phosphoenolpyruvate carboxylase activity, cytosolic pH and <sup>15</sup>N aminoacids. *Physiol. Plant.* **89**: 618-625.
- Andreo, C. S., González, D. H., Iglesias, A. A. (1987). Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase: Structure and regulation. *FEBS Lett.* **213**: 1-8.
- Bandarian, V., Phoener, J., Grover, S. D. (1992). Metabolite activation of crassulacean acid metabolism and C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **100**: 1411-1416
- Bandurski, R. S. (1955). Further studies on the enzymatic synthesis of oxaloacetate from phosphoenolpyruvate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* **217**: 137-150.
- Bandurski, R. S., Greiner, C. M. (1953). Enzymic-synthesis of oxaloacetate from phosphoenolpyruvate and CO<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **204**: 781-786.
- Barnett, N. M., Naylor, A. W. (1996). Aminoacid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiol.* **41**: 1222-12130.
- Bates, L. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil.* **39**: 205-207.
- Bauwe, H., Chollet, R. (1986). Kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species of *Flaveria*. *Plant Physiol.* **82**: 695-699.
- Baysdofer, C., Bassham, J. A. (1984). Spinach pyruvate kinase isoforms. Partial purification and regulatory properties. *Plant Physiol.* **74**: 374-379.
- Beaudry, R. M., Severson, R. F., Black, C. C., Kays, S. J. (1989). Banana ripening: Implications of changes in glycolytic eintermediate concentrations, glycolytic and gluconegenic carbon flux and fructose2,6-biphosphate concentration. *Plant Physiol.* **91**: 1436-1444.
- Bhagwat, A. S., Sane, P. V. (1976). Studies on enzymes of C<sub>4</sub> Pathway: Partial purification and kinetic properties of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. *Indian J. Exp. Biol.* **14**: 155-158.

- Bohnert, H. J., Nelson, D. E., Jensen, R., G. (1995). Adaptations to environmental stress. *Plant Cell* 7: 1099-1111
- Bonugli, K. J., Davies, D. D. (1977). The regulation of potato phosphoenolpyruvate carboxylase in relation to a metabolic pH-stat. *Planta* 133: 281-287.
- Bouchán-Calix, A. L., Mújica-Jimenez, C., Molina-Galan, J. D., Muñoz-Clares, R. A. (1994). Phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme in leaves of two populations of maize differing in grain yield. *J. Plant Physiol.* 143: 15-20.
- Boyer, J. S. (1976). Water deficits and photosynthesis. In *Water deficits and plant growth*. Vol. 4., (T. T. Kozlowski, ed), pp.153-190. Academic Press, New York. ISBNo-12-424154-9.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brulfert, J. J., Glüclüs, S. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase: A control point for photoperiodism in Crassulacean acid metabolism. *Physiol. Veg.* 21: 987-995
- Cavalas, N. A., Manetas, Y. (1980) Calcium inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase: Possible physiological consequences for C<sub>4</sub>-photosynthesis. *Z. Pflanzenphysiol.* 100: 179-184.
- Chollet, R., Vidal, J., O' Leary , M. H. (1996). Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 273-298.
- Chu, C., Dai, Z., Ku, M.S.B., Edwards, G.E. (1990). Induction of crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* by abscisic acid. *Plant Physiol.* 93: 1253-1260.
- Cooper, T. G., Wood, A. G. (1971). The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate. The active species of CO<sub>2</sub> utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 246: 5488-5490.
- Coombs, J. (1979). Enzymes of C<sub>4</sub> metabolism. *En: Encyclopaedia of Plant Physiology*. New Series. Ed. M. Gibbs & Latzko. 6: 251-262. Springer. New York.
- Coombs, J., Baldry, C. W., Bucke, C. (1973). The C<sub>4</sub> pathway in *Pennisetum purpureum*. The allosteric nature of PEP carboxylase. *Planta* 110: 95-107.
- Cushman, J. C., Michalowski, C. B., Bohnert, J. C. (1990). Developmental control of Crassulacean acid metabolism inducibility of salt stress in the common ice plant. *Plant Physiol.* 94: 1137-1142.

- Dai, Z., Ku, M.S.B., Edwards, G. E. (1993). C<sub>4</sub> photosynthesis. The CO<sub>2</sub> concentrating mechanism and photorespiration. *Plant Physiol.* **103**: 83-90.
- Day, D. A., Hatch, M. D. (1981). Transport of 3-phosphoglyceric acid, phosphoenolpyruvate, and inorganic phosphate in maize mesophyll chloroplast and the effect of 3-phosphoglyceric acid on malate and phosphoenolpyruvate production. *Arch. Biochem. Biophys.* **21**: 743-749.
- Delauney, A. J., Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* **4**: 215-223.
- Deroche, M. E., Carrayol, E. (1988). Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: a review. *Physiol. Plant.* **74**: 775-782.
- Diaz, A., Lacuesta, M., Muñoz-Rueda, A. (1996). Comparative effects of phosphinotricin on nitrate and ammonium assimilation and on anaplerotic CO<sub>2</sub> fixation in N-deprived barley plants. *J. Plant Physiol.* **149**: 9-13.
- Donkin, M. E., Taffs, J., Martin, E. S. (1982). A study of the *in vitro* regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the epidermis of *Commelina communis* by malate and glucose-6-phosphate. *Planta* **155**:416-422.
- Duff, S. M. G., Andreo, C. S., Pacquit, V., Lepiniec, L., Sarath, G., Condon, S. A., Vidal, J., Gadal, P., Chollet, R. (1995). Kinetic analysis of the non-phosphorylated, *in vitro* phosphorylated, and phosphorylation-site mutant (Asp8) forms of intact recombinant C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum. *Eur. J. Biochem.* **228**: 92-95.
- Duff, S. M., Chollet, R. (1995). *In vivo* regulation of wheat-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. *Plant Physiol.* **107**: 775-782.
- Edwards, G. E., Huber, S. C. (1981). The C<sub>4</sub> pathway. En: *The biochemistry of plants*. Hatch, M. D. y Boardman, N. K. Eds. Academic Press, N. Y. **8**: 237-281.
- Elthon, T. E., Stewart, C. R. (1981) Submitochondrial location and electron transport characteristics of enzymes involved in proline oxidation. *Plant Physiol.* **67**: 780-784.
- Furbank, R. T., Taylor, W. C. (1995). Regulation of photosynthesis in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants: a molecular approach. *Plant Cell* **7**: 797-807.
- Gao, Y., Woo, W. C. (1996) Site-directed mutagenesis of *Flaveria trinervia* phosphoenolpyruvate carboxylase: Arg(450) and Arg(767) are essential for catalytic activity and Lys(829) affects substrate binding. *FEBS lett.* **392**: 285-288.
- Geirgenberger, P., Stitt, M. (1991). Regulation of carbon partitioning between sucrose and nitrogen assimilation in cotyledons of germinating *Ricinus communis* L. seedlings. *Planta* **185**: 563-568.

Gerwick, B. C. Ku, M.S.B., Black, C. C. (1980). Initiation of sulfate activation: a variation in C<sub>4</sub> photosynthesis plants. *Science* **209**: 513-515.

González, M. C., Osuna, L., Echevarria, C., Vidal, J., Cejudo, F. (1998). Expression and localization of phosphoenolpyruvate carboxylase in developing and germinating wheat grains. *Plant Physiol.* **116**: 1249-1258.

Good, M. E., 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.

Guern, J., Matthiew, Y., Kurdjian. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and the regulation of intracellular pH in plant cells. *Physiol. Veg.* **21**: 855-866

Hanson, A. D., Hitz, W. D. (1982). Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**: 163-203.

Hanson, D. D., Tully, R. E. (1979). Light stimulation of proline synthesis in water-stressed barley leaves. *Planta* **145**: 45-51.

Harris, M. J., Outlaw Jr., W. H. (1991). Rapid adjustment of guard cells abscisic acid and levels to current leaf water status. *Plant Physiol.* **97**: 171-173

Haschke, H. P., Luttge, J. (1975) Stoichiometric correlation of malate accumulation with auxin-dependent K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange and growth in *Avena* coleoptile segments. *Plant Physiol.* **56**: 696-698.

Hatch, M. D. (1978). Regulation of enzymes of C<sub>4</sub> metabolism. En: Current topics in cellular regulation. **14**: 1-27. Academic Press. U.S.A.

Hatch, M. D. (1987). C<sub>4</sub> photosynthesis: a unique blend modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochem. Biophys. Acta* **895**: 81-106.

Hatch, M. D. (1987). C<sub>4</sub> photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochem. Biophys Acta* **895**: 380-383

Hatch, M. D., Osmond, C. B. (1976). Compartmentation and transport in C<sub>4</sub> photosynthesis. En: Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series, ed. M. Gibbs & E. Latzko. **3**: 144-184. Springer, New Yor.

Hayakawa, S., Matsunaga, K., Sugiyama, T. (1981). Light induction of phosphoenolpyruvate carboxylase in etiolated maize leaf tissue. *Plant Physiol.* **67**: 133-138.

Hill, B. C., Brown, A. W. (1978). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity from *Avena* coleoptile tissue. Regulation by H<sup>+</sup> and malate. *Can. J. Bot.* **56**: 404-407.

- Höfner, R., Vázquez-Moreno, L., Winter, Bohnert, H. J., Schmitt, J. M. (1989). Two isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol. Biochem.* **27**: 803-810.
- Holaday, A. S., Black, C. C. (1981). Comparative characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate *Panicum* species. *Plant Physiol.* **67**: 330-334.
- Holtum, J. A. M., Winter, K. (1982). Activity of enzymes of carbon metabolism during the induction of Crassulacean Acid Metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* **155**: 8-16.
- Huber, S. C., Edwards, G. E. (1975). Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from C<sub>4</sub> plants by malate and aspartate. *Can. J. Bot.* **53**: 1925-1933.
- Hsiao, T. C. (1973) Plant response to water stress. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **24**: 519-570.
- Iglesias, A. A., Andreo, C. S. (1984). Involvement of the thiol groups in the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase activation by thiol compounds. *Plant Physiol.* **75**: 983-987.
- Jansen, M. A. K., Sessa, G., Malkin, S., Fluhr, R. (1992). PEPC-mediated carbon fixation in transmitting tract cells reflects style-pollen tube interactions. *Plant J.* **2**: 507-515.
- Jiao, J. A., Chollet, R. (1990). Regulatory phosphorylation of serine-15 in maize phosphoenolpyruvate carboxylase by a C<sub>4</sub>-leaf protein-serine kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**: 300-305.
- Jiao, J. A., Chollet, R. (1991). Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>4</sub> and crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* **95**: 981-985.
- Jiao, J. A., Podestá, F. E., Chollet, R., O'Leary, M.H., Andreo, C. S. (1990). Isolation and sequence of an active-site peptide from maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase inactivated by pyridoxal 5'-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **1041**:291-295.
- Khayat, E., Dumbroff, E. B., Glick, B. R. (1991). The synthesis of phosphoenolpyruvate carboxylase in imbibing sorghum seeds. *Biochem. Cell Biol.* **69**: 141-145.
- King, B. J., Layzell, D. B., Calvin, D. T. (1986). The role of dark CO<sub>2</sub> fixation in root nodules of soybeans. *Plant Physiol.* **81**: 200-205.
- Kishor K., P. B., Hong, Z., Miao, G-H., Hu, C. A. A. Verma, D. P. S. (1995). Overexpression of  $\Delta^2$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* **108**: 1387-1394.
- Kludge, M. (1983). The role of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>4</sub>-photosynthesis and Crassulacean acid metabolism. *Physiol. Veg.* **21**: 817-825.

- Kurdjian, A., Guern, J. (1989). Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 271-303.
- Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Laetsch, W. M. (1974). The C<sub>4</sub> Syndrome: A structural analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**: 27-52.
- Latzko, E., Kelly, G. J. (1983). The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub> plants. *Physiol. Veg.* **21**: 805-815.
- Law, R. O., Plaxton, W. C. (1995). Purification and characterization of a novel phosphoenolpyruvate carboxylase from banana fruit. *Biochem. J.* **307**: 807-816.
- Law, R. D., Plaxton, W. C. (1997). Regulatory phosphorylation of banana fruit phosphoenolpyruvate carboxylase by a copurifying phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase. *Eur. J. Biochem.* **247**: 642-651.
- Leblová, S., Stakosova, A. A., Vojteckova, M. (1991). Regulation of the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from germinating maize (*Zea mays* L.) seeds by some metabolites. *Biol. Plant.* **33**: 66-74.
- Leegod, R. C., Osmond, C. B. (1990). The flux of metabolites in C<sub>4</sub> and CAM plants. *En: Plant Physiology. Biochemistry and Molecular Biology.* Ed. DT. Dennis, D. H. Turpin, pp. 274-98. Essex: Longman, Sci. Tech.
- Lepeniec, L., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P., Cretin, C. (1994). Phosphoenolpyruvate carboxylase: Structure, regulation and evolution. *Plant Sci.* **99**: 111-24
- Lin, M., Turpin, D. H., Plaxton, W. C. (1989). Pyruvate kinase isoenzymes from the green alga *Selenastrum minutum*. II. Kinetic and regulatory properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **269**: 228-238.
- Low, P. S. (1985). Molecular basis of the biological compatibility of nature's osmolytes. In transport processes, ionic and osmoregulation. R. Gillies and M. Gillies-Baillien, eds (Berlin: Springer Verlag) pp. 469-477.
- Macnicol, P. K., Jacobsen, J. V. (1992). Endosperm acidification and related metabolic changes in the developing barley grain. *Plant Physiol.* **98**: 1098-1104.
- Manetas, Y., Petropoulou, Y., Karabourniotis, G. (1986). Compatible solutes and their effects on phosphoenolpyruvate carboxylase from C<sub>4</sub>-halophytes. *Plant Cell Env.* **9**: 145-151.
- Marés, J., Leblová, S. (1980). Phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of maize, sorghum and millet. *Photosynthetica* **14**: 25-31.

- Market, C. L., Moller, F. (1959). Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. **45**: 753-763.
- Martinoia, E., Rentsch, D. (1994). Malate compartmentalization: Responses to a complex metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**:447-467.
- Maruyama, H., Lane, M. D. (1962). Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from the germinating peanut cotyledon. *Biochim. Biophys. Acta* **65**: 207-218.
- Maruyama, H., Easterday, R. L., Chang, H. C., Lane, M. D. (1966). The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **241**: 2405-2412.
- Maxwell, C. A. Vance, C. P., Heichel, G. H., Stadel, S. (1984). CO<sub>2</sub> fixation in alfalfa and birdsfoot trefoil root nodules and partitioning of <sup>14</sup>C to the plant. *Crop Sci.* **24**: 257-264.
- Meyer, C. R. Rustin, P., Black, M. K., Wedding, R. (1990). The influence of pH on substrate form specificity of phosphoenolpyruvate carboxylase purified from *Crassula argentea*. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**: 365-372.
- Meyer, C. R., Willeford, K. D. Wedding, R. T. (1991). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*, effect of incubation with ligands and dilution on oligomeric state, activity and allosteric properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**: 343-349.
- McCue, K. F., Hanson, A. D. (1990). Drought and salt tolerance: Towards understanding and application. *Trends Biotech.* **8**: 358-362.
- Meltzer E., O' Leary, M. H. (1987). Anaplerotic CO<sub>2</sub> fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub> plants. *Plant Physiol.* **84**: 58-60.
- Miller, S. S., Boylan, K. L. M., Vance, C. P. (1989). Alfalfa root nodule CO<sub>2</sub> fixation. III. Immunological studies of nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **84**: 501-508
- Miziorko, H. M., Nowak, T., Mildvan, A. S. (1974). Spinach leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Purification properties, and kinetic studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**: 378-389.
- Moore, R., Black, C. C. (1979). Nitrogen assimilation pathways in leaf mesophyll and Bundle sheath cells of C<sub>4</sub> photosynthesis plants (L.) Scop. *Plant Physiol.* **64**: 309-313.
- Mújica-Jiménez, C., Castellanos-Martínez, A., Muñoz-Clares, R. A. (1998). Studies of the allosteric properties of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase with the phosphoenolpyruvate analog phosphomycin as activator. *Biochim. Biophys. Acta.* **1386**: 132-144.

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

Mukerji, S. K., Ting, I. P. (1971) Phosphoenolpyruvate carboxylase isoenzymes separation and properties of three forms from cotton leaf tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* **143**: 297-317.

Munns, R. (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypothesis. *Plant Cell Environ.* **16**: 15-24.

Muñoz-Clares, R. A. (1986). Función de las isoenzimas en la regulación metabólica. En: Cuadernos de Posgrado-Bioquímica Vegetal II. CONACyT-UNAM. Facultad de Química. Departamento de Bioquímica Vegetal, México, 19:53-81.

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

Mukerji, S. K. (1977). Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. Inhibition of CO<sub>2</sub> fixation by SO<sub>2</sub><sup>3</sup> and activation by glucose-6-phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **182**: 360-365.

Nakamura, T., Yoshioka, I., Takahashi, M., Toh, H., Izui, K.(1995). Cloning and sequence analysis of the gene for phosphoenolpyruvate carboxylase from an extreme thermophile, *Thermus sp.* *J. Biochem.* **118**:319-324.

N'guyen, T. T., Ngam-EK, Jenkins J., Grover, S. D. (1988). Metal ions interactions with phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea* and *Zea mays*. *Plant Physiol.* **86**: 104-107.

Nishikido, T., Takanashi, H. (1973). Glycine activation of PEP carboxylase from monocotyledonous C<sub>4</sub> plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **53**:126-133.

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

O'Leary, M. H., Rife, J. E., Slater, J. D. (1981). Kinetic and isotope effect studies of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochemistry* **20**: 7308-7314.

Oshugi, R., Murata, T. (1980). Leaf anatomy post-illumination CO<sub>2</sub> burst and NADP-malic enzyme activity of *Panicum dichotomiflorum*. *Plant Cell Physiol.* **21**: 1329-1333.

Osmond, C. B. (1978). Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 379-414

Osmond, C. B., Haltum, J. A. M. (1981). Crassulacean acid metabolism. En: The Biochemistry of plants. Ed. P. F. Stumps & E. E. Conn. **8**: 283-328. Academic Press, New York.

Osuna, L., González, M. C., Cejudo, F. J., Vidal, J., Echavarria, C. (1996). *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase from wheat seeds during germination. *Plant Physiol.* **111**: 551-558.

Pacquit, V., Santi, S., Cretin, C., Bui, V. L., Vidal, J., Gadal, P. (1993). Production and properties of recombinant C<sub>3</sub>-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum vulgare*: *in vitro* phosphorylation by leaf and root. Pyr Pc. Protein serine kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**: 1415-1423

Pays, A. G. G., Jones, R., Wilkins, M. B., Fewson, C. A., Malcom, A. D. B. (1980). Kinetic analysis of effectors of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Bryophyllum fedtschenkoi*. *Biochim. Biophys. Acta* **614**: 151-162.

Podestá, F. E., Andreo, C. S. (1989). Maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Oligomeric state and activity in the presence of glycerol. *Plant Physiol.* **90**: 427-433.

Podestá, F. E., Iglesias, A. A., Andreo, C. S. (1986). Modification of an essential amino group of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by piridoxal phosphate and by piridoxal phosphate-sensitized photooxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**: 546-553.

Podestá, F. E., Plaxton, W. C. (1994a). Regulation of carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. I. Developmental profiles for the activity, concentration and molecular structure of the pyrophosphate and ATP-dependent phosphofructokinase, phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *Planta* **194**: 374-380.

Podestá, F. E., Plaxton, W. C. (1994b). Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. II. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate kinase associated with the regulation of glycolysis and nitrogen assimilation. *Planta* **194**: 381-387.

Rajagopalan, A. V., Devi, M. T., Raghavendra, A. S. (1994). Molecular biology of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase: Structure, regulation and genetic engineering. *Photosynth. Res.* **39**: 115-135.

Rajagopalan, A. V., Devi, M. T., Raghavendra, A. S. (1993) Patterns of phosphoenolpyruvate carboxylase activity and cytosolic pH during light activation and dark deactivation in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Photosynth. Res.* **38**: 51-60

Rathman, C. K. M. (1978) C<sub>4</sub> - photosynthesis: The pathways of carbon in bundle sheath cells. *Sci. Prog. Oxf.* **65**: 409-435.

Ray, T. B., Black, C. C. (1979). The C<sub>4</sub> pathway and its regulation. *En: Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series.* Ed. M. Gibbs & Latzko. **6**: 77-99. Springer. New York.

- Relle, M., Wild, A. (1996). Molecular characterization of a phosphoenolpyruvate carboxylase in the gymnosperm *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Mol. Biol.* **32**: 923-936.
- Rickers, J., Cushman, J. C., Michalowski, C. B., Schmitt, J. M., Bohnert, H. J. (1989). Expression of the CAM-form of phospho(enol)pyruvate carboxylase and nucleotide sequence of a full length cDNA from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Mol. Gen. Genet.* **215**: 447-454.
- Rodriguez-Penagos, M., Muñoz-Clares, R. A. (1999). Response of Phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves to moderate water deficit. *J. Plant Physiol.* **155**: 631-638.
- Rodriguez Sotres, R. (1991). Tesis Doctoral. Facultad de Química. UNAM. México, D. F.
- Rodriguez-Sotres, R., Muñoz-Clares, R. A., (1990). Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* **276**: 180-190.
- Rosendahl, L., Vance, C. P., Pederson, W. B. (1990). Products of dark CO<sub>2</sub> fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiol.* **93**: 12-19.
- Rubio, V. (1986). Enzymatic HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> fixation: A common mechanism for all enzymes involved?. *Biosci. Rep.* **6**: 335-347.
- Sangwan, R. S., Singh, N., Plaxton, W. C. (1992). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and concentration in the endosperm of developing and germinating castor oil seeds. *Plant Physiol.* **99**: 445-449.
- Sako, Y., Takai, K., Uchida A., Ishida, Y. (1996). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus sociabilis*. *Febs Let.* **392**: 148-152.
- Schubert, K. R. (1986). Products of biological N<sub>2</sub> fixation in the higher plants: Synthesis, transport and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**: 537-574.
- Schuller, K. A., Plaxton, W. C., Turpin, D. H. (1990). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the green alga *Selenastrum minutum*. Properties associated with the replenishment of tricarboxylic acid cycle intermediates during ammonium assimilation. *Plant Physiol.* **93**: 1303-1311.
- Segel, I. H. (1975) *An Enzyme kinetics*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 170-192.
- Shafner, A. R., Sheen, J. (1992). Maize C<sub>4</sub> photosynthesis involves differential regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase genes. *Plant J.* **2**: 221-232.

Sivaramakrishnan, S., Patell, V. Z., Flower, P. J., Peacock, J. M. (1988). Proline accumulation and nitrate reductase activity in contrasting sorghum lines during midseason drought stress. *Physiol. Plant.* 74: 418-426.

Smith, T. E. (1968). Partial purification and characteristics of potato phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 178-188.

Smith, C., Doo, A., Bown, A. W. (1979). The influence of pH on kinetic parameters of coleoptile phosphoenolpyruvate carboxylase. Relationship to auxin-stimulated dark fixation. *Can. J. Bot.* 57: 543-547.

Slocombe, S. P., Whitlam, G. C., Cockburn, W. (1993). Investigation of phosphoenolpyruvate (PEPcase) in *Mesembryanthemum crystallinum* L. in C<sub>3</sub> and CAM photosynthesis states. *Plant Cell Environ.* 16: 403-411.

Stiborová, M. (1988). Phosphoenolpyruvate carboxylase: The key enzyme of C<sub>4</sub>-photosynthesis. *Photosynthetica* 22: 240-263.

Stiborová, M., Leblová, S. (1983). Isolation and partial characterization of two phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Photosynthetica* 17: 379-385.

Stiborová, M., Leblová, S. (1983). The role of cystein SH groups in the phosphoenolpyruvate carboxylase molecule of maize. *Physiol. Veg.* 21: 935-942.

Stiborová, M., Leblová, S. (1985). Activation of maize (*Zea mays* L.) phosphoenolpyruvate carboxylase by glucose-6-phosphate and glycine: Effects of pH and Mg<sup>2+</sup>. *Photosynthetica* 19: 177-182.

Sugiharto, B., Burnell, J. N., Sugiyama, T. (1992). Cytokininis required to induce the nitrogen-dependent accumulation of mRNAs for phosphoenolpyruvate carboxylase and carbonic anhydrase in detached maize leaves. *Plant physiol.* 100: 153-156.

Tarczynski, M. C., Outlaw, W. H. Jr. (1993). The interactive effects of pH, L-malate and glucose-6-phosphate on guard cell phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 103: 1189-1194.

Taylor, C. B. (1996) Proline and water deficit: Ups, downs, ins and outs. *The plant cell.* 8: 1221-1224.

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

Thomas, J. C., De Armond, R. L., Bohnert, H. J. (1992). Influence of NaCl on growth, proline and phosphoenolpyruvate carboxylase levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. *Plant Physiol.* 98: 626-631.

Ting, I. P. (1968) CO<sub>2</sub> Metabolism in corn roots. Inhibition of P-enolpyruvate carboxylase by L-malate. *Plant Physiol.* **43**: 1919-1924.

Ting, I. P. (1985). Crassulacean acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 595-622.

Ting, I. P., Osmond, C. B. (1973). Photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylases. Characteristics of alloenzymes from leaves of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Plant Physiol.* **51**: 439-447.

Ting, I. P., Osmond, C. B. (1973). Activation of plant P-enolpyruvate carboxylases by glucose-6-phosphate: A particular role in crassulacean acid metabolism. *Plant Sci. Lett.* **1**: 123-128.

Tovar-Méndez, A., Mújica-Jiménez, C., Muñoz-Clares R. A. (1997). Desensitization to glucose-6-phosphate of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by pyridoxal 5'-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **1337**: 207-216.

Tovar-Méndez, A., Mújica-Jiménez, C., Muñoz-Clares R. A. (2000). Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. Sometido a publicación y aceptado.

Tovar-Méndez, A., Rodríguez-Sotres, R., López-Valentin, D. M., Muñoz-Clares R. A. (1998). Re-examination of the roles of PEP and Mg<sup>2+</sup> in the reaction catalysed by the phosphorylated and non-phosphorylated forms of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of *Zea mays*. *Biochem. J.* **332**: 633-642.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electroforetic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4350-4354.

Treichel, S., Brinckman, E., Sheitler, B., Willert, D. J. (1984). Occurrence and changes of proline content in plants in the Southern Namib Desert in relation to increasing and decreasing drought. *Planta* **162**: 236-242.

Uedan, K., Sugiyama, T. (1976). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiol.* **57**: 906-910.

Van Quy, L., Foyer, C., Champigny, M-L. (1991). Effect of light and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *Plant Physiol.* **97**: 1476-1482.

Vance, C. P. (1990). Symbiotic nitrogen fixation: Recent genetic advances, in: P. K. Stumpf and E. E. (Eds). *The Biochemistry of Plants: An Advanced Treatise*, Vol. 16, Academic Press pp. 43-88.

Vance, C. P. Gantt, J. S. (1992). Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. *Physiol. Plant.* **85**: 266-274.

- Vance, C. P., Gregerson, R. G., Robinson, D. L., Miller, S. S., Gantt, J. S. (1994). Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved. *Plant Sci.* **101**: 51-64.
- Vanlerberghe, G. C., Schuller, K. A., Smith, R. G., Feil, R., Plaxton, W. C., Turpin, D. H. (1990). Relationship between  $\text{NH}_4^+$  assimilation rate and in vivo phosphoenolpyruvate carboxylase activity regulation of anaplerotic carbon flow in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* **94**: 284-290.
- Vasey, T., Sharkey, T. (1989). Mild water stress of *Phaseolus vulgaris* plants to reduced starch synthesis and extractable sucrose phosphate synthase activity. *Plant. Physiol.* **89**: 1066-1070.
- Vernon, D. M., Ostrem, J. A., Bohnert, H. J. (1993). Stress perception and response in a facultative halophyte: The regulation of salinity induced genes in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Environ.* **16**: 437-444.
- Vidal, J., Cavalie, G., Gadal, P. (1976). Etude de la phosphoenol-pyruvate carboxylase du haricot et du sorgho par electrophorese sur gel de polyacrylamide. *Plant Sci. Let.* **7**: 265-270.
- Wang, Y. H., Chollet, R. (1993). In vitro phosphorylation of purified tobacco leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *FEBS lett.* **328**: 215-218.
- Walker, G. F., Ku, M. S. B., Edwards, G. E. (1986). Catalytic activity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase in relation to oligomerization. *Plant Physiol.* **80**: 848-855.
- Wedding, R. T., Rustin, P., Meyer, C. R., Black, M. K. (1988). Kinetic studies of the form of substrate bound by phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **88**: 976-979.
- Welkie, G. W., Coldwell, M. (1970). Leaf anatomy of species in some dicotyledonean families as related to the  $\text{C}_3$  or  $\text{C}_4$  pathways on carbon fixation. *Can. J. Bot.* **48**: 2135-2146.
- Willeford, K. O., Wedding, R. T. (1992). Oligomerization and regulation of higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **99**: 755-758.
- Willmer, C. M. (1983). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and stomatal operation. *Physiol. Veg.* **21**: 943-953.
- Wu, M. X., Meyer, C. R., Willeford, K. O., Wedding, R. T. (1990). Regulation of the aggregation state of phosphoenolpyruvate carboxylase: evidence from dynamic light scattering measurements. *Arch. Biochem. Biophys.* **281**: 324-329.
- Wu, M. X., Wedding, R. T. (1987). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*: Further evidence on the dimer-tetramer interconversion. *Plant Physiol.* **84**: 1080-1083.

Yazaki, Y.; Asukawa, N. Ishikawa, Y.; Ohta, E.; Sakata, M. (1988). Estimation of cytoplasmic free  $Mg^{2+}$  levels and phosphorylation potentials in mung bean root tips by *in vivo*  $^{31}P$  NMR spectroscopy. *Plant Cell Physiol.* 29: 919-924.

Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Katagin, T., Vedao, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Harada, Y., Shinozaki, K. (1995). Correlation between the induction of a gene for  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.* 7: 751-760.

Zhang, S. Q., Outlaw, W. H. Jr., Chollet, R. (1994). Lessened malate inhibition of guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase velocity during stomatal opening. *FEBS Lett.* 352: 45-48.