

00562

4  
2ej



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO SOBRE LOS GRUPOS SULFHIDRILLO ESENCIALES  
DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO  
CARBOXILASA DE MAIZ

T E S I S

Que para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS  
(Bioquímica)

Presenta la Ingeniero Químico

JOSEFINA ADRIANA VERDEJO COSS Y LEON

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Bajo la Asesoría de la Doctora:  
ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES

México, D. F.

1992



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

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

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

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

## INDICE.

ABREVIATURAS.	1
RESUMEN	2
SUMMARY	4
1. ANTECEDENTES.	
1.1 FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA.	
1.1.1 GENERALIDADES.	6
1.1.2 REACCION CATALIZADA POR PEPC.	7
1.1.3 MECANISMO DE REACCION.	8
1.1.4 CINETICA DE LA REACCION.	9
1.1.5 ESTRUCTURA CUATERNARIA.	10
1.1.6 GRUPOS -SH Y PUENTES DISULFURO EN PEPC.	12
1.2 MODIFICACION QUIMICA DE PROTEINAS.	
1.2.1 GENERALIDADES.	16
1.2.2 MODIFICACION QUIMICA POR REACTIVOS ESPECIFICOS DE GRUPOS -SH Y PUENTES DISULFURO.	17
1.3 TEORIA DE LA CINETICA DE INACTIVACION DE ENZIMAS Y SU APLICACION A LA DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE ESTABILIDAD.	
1.3.1 ORDEN DE LA REACCION DE INACTIVACION.	23
1.3.2 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE DISOCIACION DE LIGANDOS MEDIANTE LA CINETICA DE INACTIVACION DE LA ENZIMA POR UN AGENTE QUIMICO.	26
2. HIPOTESIS.	32
3. OBJETIVOS.	32
4. MATERIAL Y METODOS.	
4.1 EQUIPO.	33
4.2 REACTIVOS.	34
4.3 MATERIAL BIOLÓGICO.	35
4.4 METODOS.	
4.4.1 CRECIMIENTO DE PLANTAS.	35
4.4.2 EXTRACCION DE LA ENZIMA PEPC.	35
4.4.3 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE PEPC.	36
4.4.4 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA	38
4.4.5 PURIFICACION PARCIAL DE PEPC POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO.	39

4.4.6 PURIFICACION DE PEPC POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.	40
4.4.7 ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLI-ACRILAMINA EN PRESENCIA DE SDS.	42
4.5 EXPERIMENTOS DE PREINCUBACION DE PEPC.	44
4.6 ANALISIS DE DATOS.	
4.6.1 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES APARENTES DE VELOCIDAD DE INACTIVACION.	45
4.6.2 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LAS ESPECIES LIBRE Y ACOMPLEJADA CON Mg DE PEP.	45
4.6.3 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE INACTIVACION DE SEGUNDO ORDEN PARA PEP LIBRE.	46
4.6.4 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE DISOCIACION PARA EL LIGANDO.	46
5. RESULTADOS.	
5.1 EFECTO DE AGENTES BLOQUEADORES DE GRUPOS -SH Y REDUCTORES DE PUENTES DISULFURO SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC.	
5.1.1 EFECTO DE PCMB SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC PARCIALMENTE PURIFICADA DE RAIZ.	48
5.1.2 EFECTO DE DTT Y $\beta$ -MERCAPTOETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC PARCIALMENTE PURIFICADA DE RAIZ.	50
5.1.3 EFECTO DE DTNB SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC PARCIALMENTE PURIFICADA DE HOJA.	50
5.1.4 EFECTO DE DTT SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC PARCIALMENTE PURIFICADA DE HOJA.	63
5.1.5 PURIFICACION DE PEPC DE HOJA DE MAIZ.	63
5.1.6 EFECTO DE DIPS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE PEPC PURIFICADA DE HOJA.	68
5.1.7 EFECTO DE FOSFOENOLPIRUVATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC PURA DE HOJA.	71
5.1.8 DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE DISOCIACION DE PEP LIBRE.	74
6. DISCUSION.	76
7. CONCLUSIONES.	86
BIBLIOGRAFIA.	87

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

TABLA I.- ANALISIS DE AMINOACIDOS REPORTADO PARA LA ENZIMA PEPC DE HOJA DE MAIZ.	14
TABLA II.- POSICION DE LAS CISTEINAS EN LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE PEPC DE DIFERENTES ORGANISMOS.	15
FIG. 1.- REACCION DE UNA PROTEINA CON GRUPOS TIOL CON DTNB.	21
FIG. 2.- RUPTURA DE PUENTES DISULFURO.	22
FIG. 3.- MODELO PARA LA ACTIVACION POR LUZ DE ENZIMAS DE CLOROPLASTO BASADO EN EL TRABAJO DE BUCHANANN.	19
FIG. 4.- EFECTO DE PCMB SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC EN EXTRACTOS DE RAIZ.	49
FIG. 5.- EFECTO DE DTT Y $\beta$ -MERCAPTOETANOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC EN EXTRACTOS DE RAIZ.	51
TABLA III.- CONSTANTES DE INACTIVACION DE PEPC POR REACCION ESPECIFICA DE GRUPOS SULFHIDRILLO Y PUENTES DISULFURO.	52
FIG. 6.- EFECTO DEL pH SOBRE LA INACTIVACION POR DTNB DE PEPC EN EXTRACTOS DE HOJAS.	53
TABLA IV.- EFECTO DEL pH SOBRE LAS CONSTANTES DE INACTIVACION DE PEPC.	54
FIG. 7.- CONSTANTE DE VELOCIDAD DE INACTIVACION DE PSEUDO PRIMER ORDEN EN FUNCION DEL pH.	55
FIG. 8.- EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA INACTIVACION POR DTNB DE EN EXTRACTOS DE HOJAS.	56
FIG. 9.- EFECTO DE LIGANDOS DE PEPC EN EXTRACTOS DE HOJA FRENTE A LA INACTIVACION POR DTNB.	58
FIG. 10.- PROTECCION POR LIGANDOS DE LA ACTIVIDAD DE PEPC EN EXTRACTOS DE HOJA FRENTE A LA INACTIVACION POR DTNB.	59
TABLA V.- EFECTO DE LIGANDOS DE PEPC FRENTE A LA INACTIVACION POR DTNB.	60

FIG. 11.- EFECTO DE LIGANDOS SOBRE LA INACTIVACION DE PEPC POR DTNB EN EXTRACTOS DE HOJA.	61
FIG. 12.- PROTECCION POR GLICEROL Y GLICINA DE LA ACTIVIDAD DE PEPC DE EXTRACTOS DE HOJA FRENTE A LA INACTIVACION POR DTNB.	62
FIG. 13.- EFECTO DE DTT Y FOSFOENOLPIRUVATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC EN EXTRACTOS DE HOJA.	64
TABLA VI.- PURIFICACION DE PEPC DE HOJA DE MAIZ.	65
FIG. 14.- PERFIL DE ELUCION DE PROTEINAS Y DE ACTIVIDAD DE PEPC TRAS CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL.	66
FIG. 15.- PERFIL DE ELUCION DE PROTEINAS Y DE ACTIVIDAD DE PEPC TRAS CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.	67
FIG. 16.- EFCTO DE DIPS SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC PURA DE HOJA.	69
FIG. 17.- EFECTO DE FOSFOENOLPIRUVATO SOBRE LA INACTIVACION POR DIPS DE PEPC PURA DE HOJA.	70
FIG. 18.- EFECTO DE FOSFOENOLPIRUVATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC PURA DE HOJA.	72
FIG. 19.- CONSTANTE DE SEGUNDO ORDEN DE FOSFOENOLPIRUVATO.	73
TABLA VII.- EFECTO DE FOSFOENOLPIRUVATO Y DIPS SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC PURA DE HOJA.	74
FIG. 20.- DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE DISOCIACION DE FOSFOENOLPIRUVATO LIBRE DEL LIGANDO.	75

## ABREVIATURAS.

A	- actividad
BSA	- albúmina de suero bovino.
C <sub>3</sub>	- plantas en las que la asimilación fotosintética del CO <sub>2</sub> se realiza exclusivamente por medio del ciclo de Calvin.
C <sub>4</sub>	- plantas que fijan el CO <sub>2</sub> atmosférico primariamente como un ácido de 4 carbonos. Existe separación espacial de las dos carboxilasas.
CAM	- plantas que fijan el CO <sub>2</sub> atmosférico por medio del metabolismo ácido crasuláceo. Hay separación temporal de las dos carboxilasas.
DEAE	celulosa - dietilaminoetil celulosa (resina de intercambio aniónico).
DIPS	- 2,2' ditiopiridina.
DTNB	- 5,5' ditiobis (2 nitrobenzoico).
DTT	- ditiotreitól.
EDTA	- etilendiaminotetracético.
G6P	- glucosa 6 fosfato.
HEPES	- ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacínil]-etano sulfónico.
MDH	- málico deshidrogenasa.
NADH	- nicotinamin adenin dinucleótido reducido.
NAD <sup>+</sup>	- nicotinamin adenin dinucleótido oxidado.
OAA	- oxaloacetato.
PCMB	- paracloromercuribenzoato.
PEG	- polietilenglicol.
PEP	- fosfoenolpiruvato.
PEPL	- fosfoenolpiruvato como especie libre.
PEPC	- fosfoenolpiruvato carboxilasa.
PVPP	- polivinilpolipirrolidona.
SDS	- dodecil sulfato de sodio.
TCA	- ácido tricloroacético.
TEA	- trietanolamina.
TEMED	- N,N,N',N'-tetrametiletildiamina.
Tris	- hidroximetilamino metano.

## RESUMEN

Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E.C.4.1.1.31) es una enzima clave en la ruta de asimilación fotosintética del CO<sub>2</sub> atmosférico en plantas C<sub>4</sub>, como es el caso del maíz, ya que cataliza la  $\beta$ -carboxilación del fosfoenolpiruvato dando como producto el oxalacetato. Esta es una reacción irreversible bajo las condiciones celulares y debido a ello y a su situación en una ramificación del metabolismo, la actividad de esta enzima está fuertemente regulada.

También se sabe, que, la enzima posee tanto grupos sulfhidrilo como puentes disulfuro en su estructura nativa, y se comprobó en este trabajo que reactivos específicos para cada uno de estos grupos producen inactivación de PEPC, en mayor o menor grado, lo que indica que ambos tipos de grupos son necesarios para la actividad y/o estabilidad de esta enzima. Las reacciones de inactivación observadas fueron siempre de pseudo-primer orden y bifásicas.

Los resultados obtenidos pueden explicarse al menos de dos formas:

1°) Los reactivos químicos usados están actuando sobre dos grupos con diferente reactividad.

2°) Los reactivos químicos utilizados están actuando solamente sobre un grupo, pero el proceso de inactivación de esta enzima, desencadenado por la modificación de este grupo, ocurre en dos pasos, cada uno de ellos con diferente constante de velocidad. La inactivación podría ser el resultado de la disociación del tetrámero activo, en dos dímeros parcial o totalmente inactivos, en un primer paso, y de estos últimos en monómeros inactivos en un siguiente paso.

Por otra parte, la reactividad de los grupos sulfhidrilo se ve notablemente afectada por la presencia del ligando fosfoenolpiruvato libre en el medio de reacción. Por ello, la



medida del grado de alteración de esta reactividad en función de la concentración de este ligando, resulta ser una excelente herramienta para medir la afinidad del sitio regulador de la enzima por fosfoenolpiruvato libre; esto en presencia del sustrato PEP-Mg. La observación anterior nos permite utilizar un método mucho más sencillo y conveniente que aquellos que consisten en cuantificar directamente la unión de un ligando a la proteína.

## SUMMARY.

Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, E.C.4.1.1.31) is a key enzyme in the pathway of photosynthetic assimilation of atmospheric CO<sub>2</sub> in C<sub>4</sub> plants.

This enzyme catalyzes the  $\beta$ -carboxylation of phosphoenolpyruvate, giving oxalacetate as product. This is an irreversible reaction under physiological conditions and besides its location on a metabolism ramification, makes its activity a strong regulated one.

The enzyme has SH groups and disulfide bridges on its native structure and in this work we probe that specific reactivities for each one of these groups inactive PEPC on different grade.

This result indicates that both types of groups are necessary for the activity and/or stability of this enzyme. The inactivation reactions were always of pseudo first order and bifasic.

The results obtained can be explained at least by two means:

- 1) The chemical reactivities used are reacting over two groups with different reactivity.
- 2) The chemical reactivities are reacting with one group only, but the inactivation process that is carried on, by the modification of this group, occurs in two steps; each one of them has different rate constants.

Inactivation could result when the active tetramer dissociates in two dimers, partially or totally inactive, in the first step, and from these dimers into inactive monomers in the next step.

When the enzyme is reacting with its substrate (PEP-Mg), the reactivity of the SH groups is affected by the presence of the ligand PEP on the reaction.

The change of this reactivity can be measure as a function of the ligand concentration, therefore this is an excellent tool to evaluate the affinity between magnesium-free PEP and the regulatory site of the enzyme.

This fact makes it possible to use a more convinient method than those wich make direct measurements of the ligand binding to the protein.

## 1. ANTECEDENTES.

### 1.1 FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA.

#### 1.1.1 GENERALIDADES.

Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E.C.4.1.1.31) es una enzima que se encuentra presente en plantas, algas y bacterias. Sus propiedades difieren dependiendo de la fuente donde se obtenga (25,47,63).

En plantas ha sido descrita como una enzima citoplasmática con una variedad de funciones que van desde la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub> hasta la asimilación de nitrógeno (3,34).

Para las plantas C<sub>4</sub> y CAM la función mas importante de esta enzima es la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub>.

En hoja de plantas C<sub>4</sub> la enzima esta localizada en las células del mesófilo y cataliza el primer paso de la ruta metabólica conocida como ruta C<sub>4</sub> de ácidos dicarboxílicos.

La existencia de este metabolismo minimiza la pérdida de energía que se produce al llevarse a cabo la fotorrespiración y explica la alta tasa de crecimiento observada en las plantas C<sub>4</sub>, que además pueden soportar altas temperaturas y niveles mayores de iluminación y O<sub>2</sub> comparados con los que soportan las plantas C<sub>3</sub> (44).

En hoja de plantas CAM la función de la fosfoenolpiruvato carboxilasa es similar a la de las plantas C<sub>4</sub> teniendo como función primordial la fijación de CO<sub>2</sub>, pero difiere en cuanto a que esta fijación ocurre durante la noche. Este mecanismo minimiza la pérdida de agua en plantas desérticas, ya que los estomas solamente permanecen abiertos

durante la noche.

Los procesos que se piensa está involucrada en forma directa esta enzima en plantas C<sub>3</sub> son (17):

- 1) Función anaplerótica de producción de intermediarios del ciclo de ácidos tricarbónicos en todos los tejidos.
- 2) Recaptura del CO<sub>2</sub> perdido durante la fotorrespiración en hojas.
- 3) Mantenimiento del pH.
- 4) Mantenimiento de la electroneutralidad.

En forma indirecta estaría involucrada en la asimilación de nitrógeno y síntesis de aminoácidos.

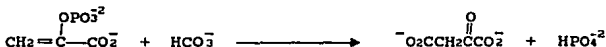
La función anaplerótica y de mantenimiento de pH también se presentan en las plantas C<sub>4</sub> y CAM, pero en este caso la forma enzimática involucrada es la no fotosintética que se encuentra en tejidos no verdes de estas mismas plantas.

La planta donde la mayoría de los estudios sobre la forma C<sub>4</sub> de PEPC se han realizado es en hoja de maíz (36) ya que se tiene un 15% de enzima con respecto a la proteína total soluble (8,10,36).

Se ha sugerido que existen 4 isoenzimas de PEPC en plantas: fotosintética C<sub>4</sub>, fotosintética C<sub>3</sub>, fotosintética CAM y una no autótrofa que estaría en tejidos no fotosintéticos como el de raíz (35).

### 1.1.2 REACCION CATALIZADA POR PEPC.

Fosfoenolpiruvato carboxilasa cataliza la siguiente reacción:



Esta reacción es extremadamente exergónica:

$$\Delta G = -6 \text{ a } -8 \text{ Kcal/mol} \quad (37)$$

y la reacción inversa no ha sido observada.

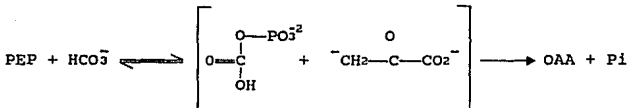
Para que se manifieste la actividad enzimática requiere de un ión metálico divalente preferentemente  $Mg^{+2}$  que es el cofactor fisiológico (3,19,34); aunque se han probado otros metales *in vitro* como es el  $Mn^{+2}$  que también funciona como cofactor (21,22,24,51).

Con el  $Co^{+2}$  se obtienen actividades enzimáticas menores y otros cationes como el  $Zn^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$  (24),  $Ca^{+2}$  (6),  $Cu^{+2}$  y  $Cd^{+2}$  (13) inhiben a la enzima.

### 1.1.3 MECANISMO DE REACCION.

El mecanismo de reacción que se encuentra más apoyado es el que se lleva a cabo en dos pasos.

Este mecanismo involucra una transferencia de fosfato en el primer paso para formar carboxifosfato y el enolato de piruvato. En un segundo paso el enolato ataca al anhídrido de carboxifosfato, formando los productos finales, oxalacetato y fósforo inorgánico.



Con este mecanismo se explica la utilización de energía contenida en el enlace de enolfosfato y también provee de significado a la activación del átomo de carbono del  $HCO_3^-$  hacia la formación del enlace carbono-carbono (25).

Consistente con este mecanismo por pasos es el hecho de

que la enzima muestra inhibición sinérgica por oxalacetato y carbamil fosfato, análogos del intermediario propuesto, el carboxifosfato-enolato (24).

#### 1.1.4 CINÉTICA DE LA REACCIÓN.

##### 1.1.4.1 SUSTRATOS.

La PEPC es la única enzima con función de carboxilasa que no utiliza biotina y requiere  $\text{HCO}_3^-$  en vez de  $\text{CO}_2$  como sustrato (12).

Se ha probado que la afinidad del sitio activo de la enzima por el complejo PEP-Mg es mucho mayor que aquella para PEP o  $\text{Mg}^{+2}$  y por esto se considera que el sustrato preferencial de la reacción que cataliza la enzima es el complejo (43,28). Al parecer existe además un sitio específico regulatorio que fija a PEP libre y el cual no puede unir a  $\text{Mg}^{+2}$ . PEP libre a concentraciones saturantes de sustrato se comporta como un activador y a concentraciones no saturantes se comporta como un inhibidor (28).

##### 1.1.4.2 REGULACIÓN POR METABOLITOS.

Se ha encontrado que la PEPC de plantas es activada por glucosa 6-fosfato que es un producto final de la fijación de  $\text{CO}_2$  (4). Este compuesto produce un aumento en la  $V_m$  y en la afinidad por el PEP (7,4).

Otro metabolito,  $\alpha$ -malato, es un inhibidor de esta enzima (11) y parece que interactúa con PEPC en al menos dos sitios, produciendo inhibición competitiva o no competitiva dependiendo del pH y de la concentración (7). G6P produce una disminución en el efecto inhibitorio del malato

(7,11). El aspartato es otro producto importante de la carboxilación en algunas plantas C<sub>4</sub> y también inhibe a la enzima (11,14).

#### 1.1.4.3 REGULACION POR pH.

Variaciones del pH pueden ser también controles finos de la actividad de PEPC, ya que se ha visto que la afinidad de la enzima por PEP y Mg<sup>+2</sup> aumenta bruscamente entre el pH 7 y 8 (12,24). Los efectos de G6P y  $\alpha$ -malato son mas pronunciados a pH 7 y disminuyen cuando aumenta el pH (7).

El pH citoplasmático de raíces de maíz se ha medido encontrándose valores de 7.1-7.25 (27), pero no se sabe nada seguro del pH citoplasmático de hojas.

#### 1.1.5 ESTRUCTURA CUATERNARIA.

La enzima PEPC usualmente es descrita como un homotetrámero (25,36) con un peso molecular aproximado de 400,000 daltons, aunque algunos otros reportes muestran que puede existir en diferentes formas oligoméricas *in vivo* (32,38,41,46).

Se ha observado en plantas CAM que la forma tetramérica es la que se encuentra presente en hojas durante la noche, mientras que durante el día se encuentra la forma dimérica (46).

Ambas formas muestran una actividad similar, sin embargo la forma de día es sensible a la inhibición por  $\alpha$ -malato, mientras que la forma de noche no lo es. Estas dos formas se pueden interconvertir incubando a la enzima a diferente pH o en presencia de Mg<sup>+2</sup>, PEP o malato.

En plantas C<sub>4</sub> se pueden emplear otras condiciones para



observar disociación. Para la enzima de hoja de estas plantas se logra una gran disociación de los tetrámeros en las formas de dímeros y monómeros inactivos al llevarse a cabo una modificación química de grupos histidil y sulfhidrilos(42). Este proceso se puede prevenir por la presencia del PEP o del  $Mg^{+2}$ . Estos resultados indican que los residuos de cisteína e histidina se encuentran involucrados en el mantenimiento de la estructura tetramérica.

También se ha observado que la incubación con NaCl produce disociación de la PEPC de hoja de maíz de manera dependiente del tiempo y de la concentración de proteína. Se obtiene una mezcla de dímeros y monómeros a pH 8 o superiores y sólo dímeros a pH 7.

Las diferentes respuestas que se tienen para el NaCl a pH 7 y 8 sugieren que efectivamente las histidinas están involucradas en el proceso de disociación (33,38,39,40).

Para favorecer la permanencia en forma tetramérica se tienen que tener altas concentraciones de enzima (39), cosolutos (29), o glicerol (26), aunque este último agente no la protege de la dimerización inducida por el NaCl.

La fosforilación de la proteína puede también estar estrechamente relacionada con la interconversión oligomérica (5), ya que presenta una respuesta enzimática sumamente diferente a sus efectores metabólicos (23).

Por todo esto se piensa que la interacción entre las subunidades juega un importante papel en las propiedades regulatorias y cinéticas de PEPC.

El arreglo espacial de las subunidades en el tetrámero se ha determinado para la enzima de hoja de maíz midiendo el cambio de difusión rotacional con el eosin-isotiocianato (1) y se describe como un tetraedro en ausencia o presencia de todos los sustratos involucrados; mientras que si sólo se

tiene bicarbonato y  $Mg^{+2}$  o PEP y  $Mg^{+2}$  el arreglo espacial que se presenta es el triangular con un centro distorsionado.

Estos autores especulan que este cambio en su estructura espacial pueda representar una transición conformacional durante el ciclo catalítico.

#### 1.1.6 GRUPOS SH Y PUENTES DISULFURO EN FOSFOENOL PIRUVATO CARBOXILASA.

El análisis de aminoácidos para PEPC revela un contenido de al menos 8 cisteínas por subunidad (56), de los cuales 4 se hallan formando puentes disulfuro en la enzima activa nativa y las restantes 4 se hallan como -SH libres (31,56,57).

Este análisis ha sido recientemente confirmado a través de la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida de la secuencia de bases del gen de esta enzima clonado a partir del genoma de maíz (58,59), en el cual encuentran un contenido de 9 cisteínas. Genes clonados a partir de otras fuentes (64,64,66,67) revelan mayor contenido de cisteínas (Tablas 1 y 2).

La secuencia de las proteínas con actividad de PEPC obtenidas hasta la fecha revelan un considerable grado de homología, como se puede notar comparando la posición de los residuos de cisteína en la cadena (Tabla 2).

Evidencias de que grupos sulfhidrilo juegan un papel importante en la actividad de PEPC de diversas fuentes se conocen desde el pasado (3,19,30,34).

En cuanto a la enzima fotosintética de plantas C<sub>4</sub>, se sabe que al tratar la enzima obtenida de maíz con PCMB se obtiene una clara inactivación de ella. Esta pérdida de actividad puede ser disminuida si la reacción se lleva a cabo

en presencia de su sustrato (PEP) o de uno de sus activadores alostéricos (G6P), no así si se pone en presencia de sus inhibidores como son el malato y el aspartato (18).

Numerosos trabajos (57,69,70,71) confirman la existencia de cisteína así como de grupos -SH vecinales. Estos hallazgos hicieron sugerir que la enzima PEPC de maíz podría estar regulada *in vivo* por una reacción reversible de oxidación-reducción de sus grupos sulfhidrilo como se describió anteriormente.

La fotoactivación de la enzima, por reducción de equivalentes generados a través del flujo de electrones, se propuso como un mecanismo regulador. Sin embargo, trabajos más recientes demostraron que este tipo de regulación no es operante con PEPC de hoja de maíz (93,94,95).

Se han identificado varios grupos esenciales para la actividad de PEPC: cisteínas (69,57,70,18,30,31,71), grupos -SH vecinales (70). Sin embargo, los perfiles de  $\log(K_m/V_{max})$  vs pH reportados hasta la fecha han identificado solamente a un grupo (probablemente histidina) que participa en la unión de  $Mg^{+2}$  y PEP, pero no en la catálisis (69,77,24,25) y excepto Stiborová y Levlová que reportaron la presencia de un grupo con pKa de 8.5 (78), la mayoría de los autores no detectan grupos ionizables que participen en la catálisis cuyo pK se encuentre en el rango 6-9.5 (69,77,24,25). De aquí, que no se conozca aún con certeza si estos grupos -SH son o no esenciales para la actividad de la enzima.

Como se mencionó anteriormente a los grupos -SH también se les ha asignado la función de mantener la estructura cuaternaria de la molécula.

PEPC consta de 4 subunidades iguales en su forma de mayor actividad (tetrámero), pero esta forma al ponerse en contacto con PCMB a pH 6.8 y por periodos que van de 15 min a

Tabla I. Análisis de aminoácidos reportado para la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz. Para la enzima de otras fuentes se muestra solamente el contenido de cisteínas.

Aminoácido	Maíz <sup>a</sup>	Maíz <sup>b</sup>	Sorgo <sup>c</sup>	CAM <sup>d</sup>	CAM <sup>e</sup>
Asp	—	57			
Asn	—	26			
Asx	80.4	[83]			
Thr	40.7	51			
Ser	46.2	55			
Glu	—	79			
Gln	—	41			
Glx	78.8	[120]			
Pro	25.6	55			
Gly	71.6	66			
Ala	81.5	70			
Cys	8.3	9	11	10	11
Val	50.6	65			
Met	13.7	21			
Ile	33.2	48			
Leu	57.6	108			
Tyr	21.9	27			
Phe	19.7	38			
His	11.7	20			
Lys	45.3	52			
Arg	49.7	69			
Trp	—	13			
AA's totales	737	970	952		
Peso Molecular	95 Kd	109.5 Kd			

<sup>a</sup>Proteína purificada de hoja verde de maíz (32).

<sup>b</sup>Gen de la forma fotosintética de la enzima de maíz (59).

<sup>c</sup>Gen de la forma fotosintética de la enzima de sorgo (64).

<sup>d</sup>Gen de la forma fotosintética de la enzima de CAM (66).

<sup>e</sup>Gen de mantenimiento de la enzima de CAM (65).

Tabla II. Posición de las cisteínas en la secuencia de aminoácidos de fosfoenolpiruvato carboxilasa de diferentes organismos. La secuencia fue deducida del análisis de la secuencia de bases del gen correspondiente. La secuencia cercana a la posición 410 se muestra para fines comparativos, ya que en este fragmento de sólo 8 aminoácidos se encuentran 3 restos de cisteínas para las enzimas de plantas y 2 para la de bacterias.

Posición de los residuos de cisteína en la secuencia.			
Maíz <sup>a</sup>	Sorgo C <sup>b</sup>	CAM foto-sintética. <sup>c</sup>	CAM mantenimiento. <sup>d</sup>
51	55	10	53
183	173	192	185
	273		
	295	304	297
322	322	331	324
406	407	414	408
411	412	419	413
413	414	421	415
	490	548	517
	524	682	542
	674	898	676

Secuencia alrededor de las posiciones 406-419.

Fuente	Secuencia
Maíz <sup>a</sup> :	<sup>406</sup> Cys-Tyr-Lys-Ser-Leu-Cys-Glu-Cys.
Sorgo <sup>b</sup> :	<sup>407</sup> Cys-Tyr-Lys-Ser-Leu-Cys-Glu-Cys.
CAM fotosintética <sup>c</sup> :	<sup>414</sup> Cys-Tyr-Arg-Ser-Leu-Cys-Ala-Cys.
CAM mantenimiento <sup>d</sup> :	<sup>408</sup> Cys-Tyr-Gly-Ser-Leu-Cys-Ala-Cys.
<i>E. coli</i> <sup>e</sup> :	<sup>359</sup> Cys-Tyr-Gln-Ser-Leu-Gly-Ala-Cys.
<i>A. nidulans</i> <sup>f</sup> :	<sup>410</sup> Cys-Tyr-Glu-Leu-Glu-Lys-Leu-Ile-Cys.

<sup>a</sup>Gen de la forma fotosintética de la enzima de maíz (59).

<sup>b</sup>Gen de la forma fotosintética de la enzima de sorgo (64).

<sup>c</sup>Gen de la forma fotosintética de la enzima de CAM (66).

<sup>d</sup>Gen de mantenimiento de la enzima de una CAM (65).

<sup>e</sup>Gen de la enzima de *Escherichia coli* (58).

<sup>f</sup>Gen de la enzima de *Anacystis nidulans* (58).

Los #s entre paréntesis indican la referencia. Los #s pequeños arriba y a la izquierda de las secuencias indican la posición de la cisteína correspondiente en la secuencia total.

4 horas, se va disgregando; primero a una mezcla de dímeros con tetrámero y después de dímero-monómero (42). La descomposición a monómero unicamente es obtenida por tratamientos desnaturalizantes por calentamiento.

## 1.2 MODIFICACION QUIMICA DE PROTEINAS.

### 1.2.1 GENERALIDADES.

La función biológica de una proteína es una consecuencia directa de su estructura tridimensional y esto a su vez es determinado por su secuencia de aminoácidos, es decir su estructura primaria.

Para obtener información acerca de como las proteínas llevan a cabo sus funciones individuales es necesario analizarla a todos los niveles de su estructura.

Se debe preguntar cómo la cadena está enrollada, es decir que grupos están escondidos y cuales expuestos, cuales grupos de la proteína están involucrados en el mantenimiento de la estructura enrollada y en la asociación de las unidades en proteínas multiméricas y cuales grupos se encuentran involucrados en el reconocimiento y unión de moléculas pequeñas, como los antígenos para anticuerpos, sustratos para enzimas, hormonas por receptores (61).

La modificación química de proteínas es una técnica que se usa como arma para investigar el mecanismo de las enzimas.

Existen otros métodos para dilucidar estos mecanismos, pero en la mayoría de los casos la modificación química todavía provee la mejor evidencia accesible para definir la estructura de intermediarios esenciales o para identificar los restos de aminoácidos mas importantes involucrados en la catálisis.

Existen muchos tipos diferentes de experimentos de modificación química, el seleccionar algún tipo depende de la información que se quiera tener; algunos ejemplos serían el usar reactivos de grupos específicos, marcadores por afinidad, pseudosustratos, sustratos suicidas, una trampa para intermediarios, mutagénesis dirigida, detección de residuos de aminoácidos desde el carboxil o el amino terminal y la síntesis química de algún fragmento peptídico o proteínas completas en las cuales un aminoácido de interés es reemplazado por otro en una posición dada en su secuencia (62).

Quando se usa modificación química para elucidar los restos de aminoácidos que participan en catálisis hay que ser cautelosos a la hora de interpretar los resultados, dado que la pérdida de actividad biológica no es siempre debido a la alteración de un grupo vital catalítico. Puede ser también debida a una alteración de la conformación del sitio activo o a impedimentos estéricos por la introducción de sustituyentes voluminosos.

### 1.2.2 MODIFICACION QUIMICA POR REACTIVOS ESPECIFICOS DE GRUPOS SH Y PUENTES DISULFURO.

Los grupos -SH de las proteínas muestran una gran reactividad como formadores de enlace covalente, más que ningún otro grupo funcional que exista en sistemas bioquímicos.

Esta característica es atribuible a la gran facilidad que tienen para donar electrones aún a agentes electrofílicos débiles, como se atestigua por la gran variedad de grupos reactivos que reaccionan con el grupo -SH.

El grupo -S-S- es poco reactivo y una entidad más estable en comparación con el -SH. Esta estabilidad es la

base para su función más importante en el campo de la bioquímica, como es el mantenimiento de la estructura de las proteínas.

Al aislar las proteínas de sistemas biológicos se han encontrado que poseen una mezcla tanto de grupos -SH como de puentes disulfuro.

Se piensa que el intercambio de grupos -SH a grupos -S-S- puede tener un papel prominente en la interacción de las subunidades de las proteínas, como se observó en experimentos llevados a cabo en albúmina sérica (47), en donde se encontró que probablemente la formación de dímeros y polímeros de esta proteína se lleva a cabo por la reacción de dos grupos -SH de dos proteínas para formar un puente disulfuro y así sucesivamente con varias de las moléculas.

Otra función importante en la que se han implicado los grupos -SH, diferente de la que poseen participando como grupos catalíticos en muchas enzimas, es su participación en la regulación de la actividad de enzimas vegetales.

El proceso de oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo permite la regulación por luz de la actividad *in vivo* de un número considerable de enzimas tanto cloroplásticas como citoplasmáticas que sufren un cambio estructural reversible, ligado al cambio de sus características cinéticas, cuando ciertos puentes disulfuro específicos de la proteína son reducidos a sulfhidrilos (Fig. 3).

Se han aislado proteínas solubles llamadas tiorredoxinas de especies C<sub>3</sub> (84,85,91), presentes en cloroplasto y en citoplasma, que contienen grupos sulfhidrilo de potencial redox muy negativo siendo, por tanto, capaces de reducir *in vitro*, con cierta especificidad, los puentes disulfuro responsables del control de la actividad de varias enzimas que se conocen que están sujetas *in vivo* a este mecanismo



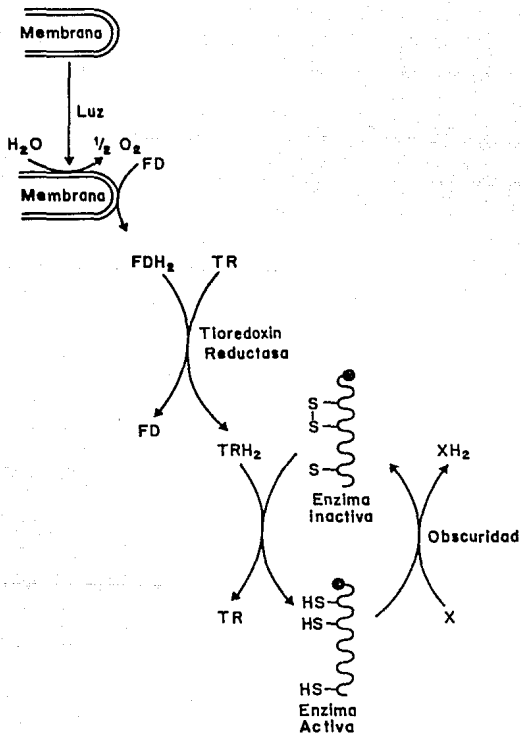


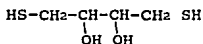
Fig. 3.- Modelo para la activación por luz de enzimas de cloroplasto basado en el trabajo de Buchanann. FD y TR son ferredoxina y tioredoxina respectivamente, donde X representa un oxidante generado en los cloroplastos durante la obscuridad.

regulatorio (84,85,86,87,88,89,90). Las tiorredoxinas pueden a su vez ser reducidas *in vitro* en presencia de luz, por preparaciones crudas de la enzima tiorredoxina-reductasa dependiente de ferredoxina obtenidas de organismos fotosintéticos (84,87).

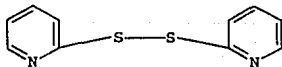
El grupo -SH puede ser oxidado por medio de agentes oxidantes e incluso por el oxígeno. La reacción con el O<sub>2</sub> es catalizada por cationes metálicos como Fe o Cu, y es conocido desde hace mucho tiempo que esta oxidación se puede prevenir con agentes como cianida y pirofosfato.

Algunos agentes oxidantes que se usan para este grupo son: yodobenzoato, DTNB, PCMB, N-etilmaleimida, DIPS. La reacción de estos agentes se usa para medir grupos mercapto en muchas enzimas. De estos los usados en el trabajo que presentamos han sido los siguientes:

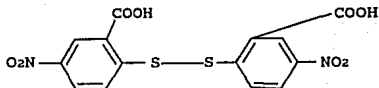
DTT - treo-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol.



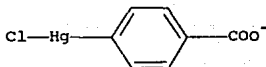
DIPS - Aldotriol - 2,2 ditiopiridina.



DTNB - 5,5 ditiobis (2 ac. nitrobenzico).



PCMB - 4-cloromercuribenzoato.



Como ejemplo de reacción entre grupos -SH y estos reactivos se esquematiza en la Fig. 1 la reacción con DTNB.

Las formas aniónicas de los grupos tiol de la proteína atacan al puente disulfuro del reactivo dando como producto un anión de nitrotiofenolato que es colorido y estabilizado por resonancia (61).

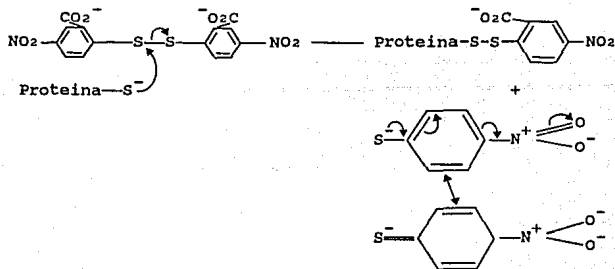


Fig. 1. Reacción de una proteína con grupos tiol con DTNB.

### REACCIONES DEL PUENTE DISULFURO.

Las reacciones de oxidación y por lo tanto de hidrólisis del grupo -S-S- son promovidas principalmente por metales pesados en condiciones alcalinas y temperaturas de 40°C o superiores y tiempos de reacción que van desde 15 min hasta horas, dependiendo de la proteína, con la consecuente formación de los tiolaldehidos (48).

También se ha visto que se puede oxidar al grupo -S-S- al incubar a la proteína con ácido per fórmico que convierte a los residuos de cisteína a dos residuos de ácido cistéico (49).

Los puentes disulfuro en las proteínas pueden ser rotos por reducción (Fig. 2a) mediante un tiol como el  $\beta$ -mercaptoetanol o el DTT y después ser estabilizados por carboximetilación, o por oxidación (Fig. 2b) con ácido per fórmico, lo que permitirá su localización en la cadena polipeptídica, ya que tanto el S-carboximetil cisteína o el ácido cistéico son estables para manejos posteriores

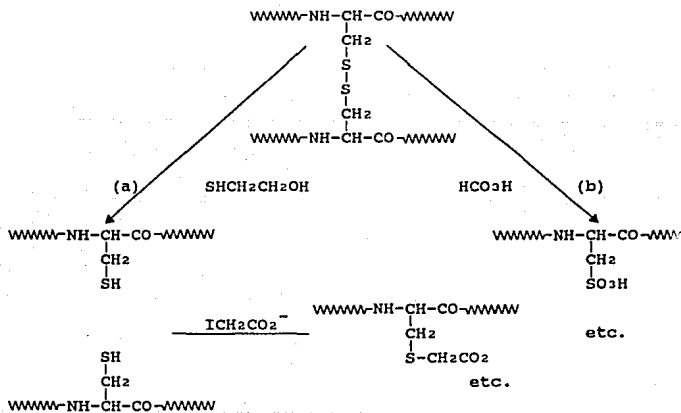


Fig. 2 Ruptura de puentes disulfuro  
a) por reducción.      b) por oxidación.

En ocasiones las reacciones de reducción sobre los grupos  $-\text{S}-\text{S}-$  sólo se dan al exponer a la proteína a condiciones de 8 M de urea o concentraciones altas de guanidina porque se encuentran escondidos en el interior de la proteína, se usan además agentes como la N-etilmaleimida o iodoacetato para bloquear los grupos  $-\text{SH}$  resultantes de la reducción y evitar que vuelvan a formar el puente disulfuro,

previniendo así la formación de agregados de alto peso molecular.

Estas condiciones y las mencionadas anteriormente pueden producir no sólo inactivación de las enzimas, sino desnaturalización completa de la proteína. La diferente respuesta que se encuentra para cada uno de los grupos -SH o -S-S- presentes en las enzimas es debido a la accesibilidad que tengan dichos agentes a ellos; además el entorno que tenga cada grupo, debido a la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína, lo que necesariamente afecta su reactividad.

### 1.3 TEORIA DE LA CINETICA DE INACTIVACION DE ENZIMAS Y SU APLICACION A LA DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE ESTABILIDAD.

#### 1.3.1 ORDEN DE LA REACCION DE INACTIVACION.

El orden de una reacción es una descripción de la cinética de la misma y define cuantos términos de concentración deben ser multiplicados juntos para obtener una expresión de la velocidad de la reacción.

La inactivación de una enzima por un reactivo específico de grupo generalmente ocurre de acuerdo al siguiente mecanismo:



Esta es una reacción de segundo orden, siendo su velocidad:

$$v = k [E \text{ activa}] [R]$$

$k$  = constante de velocidad de segundo orden.

Sin embargo esta reacción puede convertirse en una de pseudo primer orden si la concentración del reactivo utilizada es muy elevada con respecto a la concentración de enzima que puede considerarse que permanece constante durante el transcurso de la reacción y por tanto puede incluirse este término de concentración dentro de la constante de velocidad. Entonces se podría escribir:

$$v = k' [E \text{ activa}]$$

$k' = k [R]$  = constante de pseudo primer orden.

Bajo estas condiciones se puede aplicar al estudio de las reacciones de inactivación la teoría cinética de reacciones de primer orden que se describe a continuación:

Para una reacción de primer orden



la velocidad  $v$  puede ser expresada como:

$$v = \frac{dp}{dt} = \frac{-da}{dt} = ka = k(a_0 - p) \quad (1)$$

en donde:

$a$  = [A] en cualquier tiempo.

$a_0$  = [A] a  $t_0$

$p$  = [P] en cualquier tiempo.

$k$  = constante de velocidad de primer orden.

Al principio de la reacción  $t = 0$  y  $a = a_0$ .

Por la estequiometría de la reacción, cada molécula de A es consumida y convertida en una molécula de P, por lo que las concentraciones de A y P se encuentran relacionadas por la ecuación:

$$a + p = a_0.$$

Si integramos la ecuación (1) separando las dos variables p y t tenemos:

$$\int \frac{dp}{a_0 - p} = \int k dt$$

entonces:

$$-\ln(a_0 - p) = kt + c$$

donde c es la constante de integración que podemos evaluar tomando en cuenta que no existe producto al inicio de la reacción o sea  $p = 0$  cuando  $t = 0$ , de donde  $c = -\ln(a_0)$ .

Substituyendo:

$$\ln[(a_0 - p)/a_0] = -kt$$

Puesto que la actividad de la enzima es una medida de la concentración de enzima activa, en los estudios de inactivación se mide la actividad en el tiempo cero y la actividad que va quedando a medida que transcurre la inactivación, es decir, durante el periodo de incubación de la enzima con el reactivo.

La actividad en el tiempo cero será equivalente a  $a_0$ , p será la enzima inactivada al tiempo t por lo que la actividad al tiempo t será  $a_0 - p$ . La actividad residual la definimos como el cociente  $a_0 - p / a_0$ , es decir la actividad que tenemos permanece en el tiempo t con respecto al tiempo cero.

Por tanto, una gráfica del logaritmo natural de la actividad residual, medida a diferentes tiempos durante la preincubación de la enzima con el reactivo inactivante, frente al tiempo nos dará el valor de la k de inactivación como la pendiente de la recta que se obtiene, de acuerdo a la siguiente ecuación, que describe una cinética de pseudo-primer orden:

1.3.2 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE DISOCIACION  
DE LIGANDOS MEDIANTE LA CINETICA DE INACTIVACION DE LA  
ENZIMA POR UN AGENTE QUIMICO.

El grado de inactivación de una enzima debido a agentes químicos específicos para un cierto grupo funcional puede ser modulado por la presencia de uno o más ligandos de esta proteína durante la modificación química y esto se puede usar para obtener las constantes de disociación de estos ligandos con la enzima. La proposición en que esto se basa es que el cambio porcentual en el grado de inactivación es igual al porcentaje de la fracción de sitios de interés ocupados por el ligando en la enzima.

Existen tres resultados posibles si se incluye un ligando, ya sea sustrato, inhibidor o un activador, en la mezcla de reacción de inactivación. Estas posibilidades son: un aumento, una disminución o ningún cambio en el grado de inactivación.

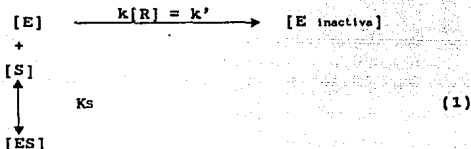
El grado de inactivación puede llegar a ser cero si se obtiene una protección completa o algún valor bajo si la protección obtenida es parcial; mientras que si se incrementa alcanzaría siempre un valor finito mayor que en ausencia del ligando.

Si suponemos el caso más simple en que la reacción de inactivación sea el resultado de una colisión del reactivo con el grupo funcional de interés en la enzima, esta inactivación se tratará de una reacción de segundo orden.

La protección por el ligando puede entonces ser descrita



en forma muy simple como una competencia entre este ligando y el reactivo por la enzima (60).



Donde,

- S es el ligando de la proteína.
- R es el reactivo específico del grupo de la proteína que se quiere modificar.
- k es la constante de velocidad de inactivación de segundo orden.
- k' es la constante de velocidad de inactivación de pseudo-primer orden.
- Ks es la constante de disociación para el complejo enzima-ligando [ES].

En el supuesto de equilibrio rápido, es decir suponiendo que la velocidad de inactivación es mucho menor que la velocidad de disociación del ligando y del reactivo y que por ello tanto el reactivo R, como el ligando S, están en equilibrio con sus complejos con la enzima, o lo que es lo mismo, que las diferentes especies de la enzima activa permanecen en equilibrio a través del periodo de modificación, podemos deducir la constante de disociación del ligando (Ks) como se describe a continuación.

La velocidad de inactivación (v) está dada por:

$$v = \frac{-d[E \text{ activa}]}{dt} = [E \text{ activa}] k [R]$$

en donde E activa representa la concentración total de sitios activos (proporcional a la actividad medida).

Puesto que:

$$[E \text{ activa}] = [E] + [ES]$$

Siguiendo el procedimiento clásico de deducción de la ecuación de velocidad (92).

$$\frac{v}{[E \text{ activa}]} = \frac{[E] k [R]}{[E] + [ES]}$$

Como:

$$[ES] = \frac{[E] [S]}{K_s}$$

En donde [S] es la concentración de ligando libre que se asume es igual a la concentración añadida, lo que es cierto si la concentración de sitios en la enzima es mayor que  $0.1k_{ap}$ .

Entonces:

$$\frac{v}{[E \text{ activa}]} = \frac{k[R]}{1 + \frac{[S]}{K_s}}$$

$$v = [E \text{ activa}] \frac{k[R]}{1 + \frac{[S]}{K_s}}$$

La constante de inactivación de pseudo primer orden aparente ( $k_{ap}$ ) para la reacción será:

$$\frac{k[R]}{1 + \frac{[S]}{K_s}} = k_{ap}$$

O bien:

$$K_{ap} = \frac{K_s k[R]}{K_s + [S]}$$

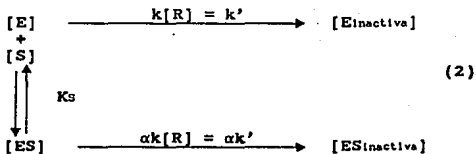
Esta es la ecuación de una hipérbola equilátera que pasa por el origen y que se puede reorganizar para dar:

$$\frac{k'}{K_{ap}} = \frac{k[R]}{K_{ap}} = 1 + \frac{[S]}{K_s}$$

Por lo que al graficar  $k'/K_{ap}$  contra  $[S]$  nos dará la constante de disociación  $K_s$  como el recíproco de la pendiente.

Los valores de  $k'$  y  $K_{ap}$  se obtienen como las pendientes de las rectas que resulta al graficar el  $\ln$  de la actividad residual de la enzima tratada con el reactivo contra el tiempo en ausencia y en presencia de ligandos, respectivamente.

Por otra parte, una protección parcial puede ser descrita como una inhibición parcial competitiva, ya que el complejo  $[ES]$  es todavía reactivo, aunque en un grado diferente frente al agente.



En este caso  $K_s$  sigue siendo la constante de disociación para  $[ES]$ ;  $\alpha k$  es la constante de velocidad de reacción de  $[ES]$  con  $[R]$  que difiere de  $k$  por un factor  $\alpha$ .  $\alpha$  puede ser mayor, menor o igual a 1 por lo que este segundo caso también

puede ser aplicado a un incremento en la velocidad de inactivación.

Siguiendo el mismo procedimiento que para el caso de protección total esquema (1), podemos deducir:

$$v = [E]k[R] + [ES]\alpha k[R]$$

Como se definió en el caso anterior:

$$[E \text{ activa}] = [E] + [ES]$$

Entonces tenemos:

$$\frac{v}{[E \text{ activa}]} = \frac{[E]k[R] + [ES]\alpha k[R]}{[E] + [ES]}$$

$$\frac{v}{[E \text{ activa}]} = \frac{[E]k[R] + \frac{[E][S]}{K_s} \alpha k[R]}{[E] + \frac{[E][S]}{K_s}}$$

$$\frac{v}{[E \text{ activa}]} = \frac{k[R] + [S]/K_s \alpha k[R]}{1 + [S]/K_s}$$

$$v = [E \text{ activa}] \frac{k[R] + [S]/K_s \alpha k[R]}{1 + [S]/K_s}$$

La constante de velocidad aparente de inactivación para este caso (2) será:

$$k_{ap} = \frac{k[R] + \alpha k[R] [S]/K_s}{1 + [S]/K_s}$$

$$k_{ap} = \frac{k[R]K_s + \alpha k[R][S]}{K_s + [S]}$$

Esta es la ecuación de una hipérbola que no pasa por el origen.

Si para simplificar llamamos a  $k[R] = k'$  entonces:

$$k_{ap} = \frac{k'(K_s + \alpha[S])}{[K_s] + [S]}$$

Luego:

$$\frac{k_{ap}}{k'} = \frac{K_s + \alpha[S]}{K_s + [S]}$$

Ajustando los datos obtenidos experimentalmente de  $k_{ap}/k'$  frente a  $[S]$  por regresión no lineal a cualquiera de estas dos últimas ecuaciones nos permitirá determinar el valor de  $K_s$ .

## 2. HIPOTESIS.

La reactividad de los grupos sulfhidrilo esenciales de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de maíz, puede ser un buen indicador de los cambios conformacionales que la enzima sufre al unir a sus ligandos o durante la catálisis.

## 3. OBJETIVOS.

### 3.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar como diferentes ligandos de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz afectan la reactividad de grupos sulfhidrilo esenciales para la actividad de esta enzima.

### 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

1°) Purificar parcial y/o totalmente la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de maíz.

2°) Caracterizar la reacción de inactivación de las isoenzimas no fotosintética y fotosintética de fosfoenolpiruvato carboxilasa de maíz por reactivos específicos de grupos sulfhidrilo.

3°) Determinar el efecto que sustratos, activadores e inhibidores de esta actividad enzimática tienen sobre el proceso de inactivación por modificación covalente de grupos sulfhidrilo.

#### 4. MATERIAL Y METODOS.

##### 4.1 EQUIPO.

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

La balanza analítica utilizada para pesar los reactivos químicos fue Mettler modelo H6 con capacidad de  $160 \pm 0.0001$  g.

La homogeneización de pequeñas cantidades de tejido se hizo en un politrón Jane and Kunkel Ultra-Turrax con pistilo 10 N . Para homogeneizar mayores cantidades de tejido se utilizó una licuadora marca Osterizer modelo Pulsomatic.

Para medir el pH se utilizó un potenciómetro Conductronic con precisión de  $\pm 0.01$  y un electrodo Beckman.

Para centrifugar se utilizó la centrifuga Beckman modelo J2-21 y una centrifuga de mesa marca Hawkley-England.

Las preparaciones químicas y las soluciones que necesitaban temperaturas bajas de almacenamiento fueron guardadas en un refrigerador marca Bendix a  $4^{\circ}\text{C}$  o en un congelador American a  $-20^{\circ}\text{C}$  o también en un refrigerador Kelvinator serie 100 a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Las microjeringas empleadas fueron marca Hamilton de 1,5,10,50 y 100  $\mu\text{l}$ .

Para el ensayo de actividad de PEPC se utilizaron celdas de cuarzo de 1 ml. de capacidad y 1 cm de paso de luz.

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

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

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

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, se hizo en un equipo para electroforesis en placa

vertical diseñado y elaborado en nuestro laboratorio.

#### 4.2 REACTIVOS.

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

##### De Merck:

Trietanolamina ; fosfato monobásico de potasio; fosfato dibásico de potasio; glicerol; sulfato de amonio; ácido clorhídrico; cloruro de potasio; etilendiamino tetra-acético; ácido tricloroacético; polietilenglicol 6000; cloruro de magnesio; cloruro de calcio; Tris(hidroximetilaminometano).

##### De Sigma Chemical Co.:

$\beta$ -mercaptoetanol; nicotinaminadeninucleótido reducido en sal disódica; fosfoenolpiruvato (sal de monociclohexilamonio); málico deshidrogenasa de corazón de cerdo; ditiotreitól; azul brillante G; albúmina sérica de bovino; tritón X-100; polivinilpolipirrolidona; DEAE Sephacel; acrilamida; bisacrilamida; dodecil sulfato de sodio; TEMED; persulfato de amonio; paracloromercuribenzoato; 2,2'ditiodipiridina; borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ); tioldsepharosa; marcadores de peso molecular (MW-SDS-200) ; ureasa, transferrina, mioglobina, albúmina bovina, albúmina de huevo, anhídrida carbónica.

##### De Técnica Química S.A.:

bicarbonato de sodio; fosfato dibásico de sodio; ácido fosfórico; metanol; etanol.

##### De Pharmacia Fine Chemicals:

Sephacryl S-300 superfino; Sephadex G25 medium.

##### De American Can. Co.: Parafilm oil.



#### 4.3 MATERIAL BIOLÓGICO.

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

#### 4.4 METODOS.

##### 4.4.1 CRECIMIENTO DE PLANTAS.

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

##### 4.4.2 EXTRACCION DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA.

De acuerdo al método desarrollado en nuestro laboratorio (100), las hojas de plantas de maíz de cuatro semanas de edad fueron desprovistas de nervadura central y fragmentadas en trozos pequeños, tras lo cual se adicionaron al amortiguador de extracción en una proporción de 4 ml de amortiguador por cada gramo de tejido. El amortiguador de extracción fue el siguiente:

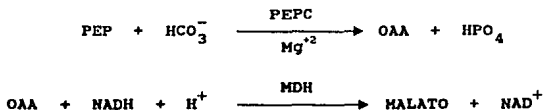
Tris-PO<sub>4</sub> 100 mM pH 7.2 , EDTA 1mM.  
glicerol 20% (v/v) , MgCl<sub>2</sub> 5 mM.  
PVPP 10% (p/v) ----- adicionados en el  
β-mercaptoetanol 10 mM ----- momento del uso  
del amortiguador.

Posteriormente el tejido se homogenizó utilizando un politrón a máxima velocidad durante 40 segundos. El homogenado obtenido se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugó a 18000 rpm durante 30 minutos en la centrifuga Beckman, utilizando el rotor JA-20; el precipitado se desechó y al sobrenadante se le determinó actividad de PEPC y concentración de proteínas. Todo este proceso se llevó a cabo a una temperatura de 0°C manteniendo los extractos y soluciones en un baño de hielo.

Para la extracción de la enzima de raíz se llevó a cabo el mismo procedimiento anterior, pero la proporción de amortiguador usada fue de 2 ml por gramo de tejido.

#### 4.4.3 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA.

Para determinar la actividad enzimática se empleó un sistema acoplado a la enzima málico deshidrogenasa (MDH) (E.C.1.1.1.37) dependiente de NADH, según el método descrito por Uedan y Sugiyama (36). En este sistema el oxalacetato resultante de la carboxilación del fosfoenolpiruvato es reducido a malato gracias a la actividad de la enzima málico deshidrogenasa que paralelamente oxida NADH a NAD según el siguiente esquema de reacciones:



La cantidad de oxalacetato producido durante el transcurso de la reacción puede así medirse siguiendo el descenso de la densidad óptica a 340 nm debido a la conversión de NADH a NAD<sup>+</sup>. La pendiente obtenida (cambio de densidad óptica/minuto) se midió durante los primeros minutos de la reacción donde se obtenía una adecuada linealidad de cambios de absorbancia frente a tiempo (velocidad inicial). La temperatura a la que se llevó a cabo la reacción fue de 30°C, y todos los reactivos se preincubaban en cubeta para alcanzar dicha temperatura. La reacción se inicia con la adición de la enzima.

La composición del medio de ensayo estándar es la siguiente:

REACTIVOS	VOLUMEN (ml)	CONCENTRACION FINAL EN EL MEDIO DE ENSAYO
Amortiguador pH7 (TEA-HCl 100mM, EDTA 1mM)	0.500	100 mM
NADH (20mM)	0.010	0.2 mM
DTT (200mM)	0.010	2.0 mM
NaHCO <sub>3</sub> (1 M)	0.010	10.0 mM
PEP (200 mM)	0.005	1.0 mM
MDH (300 unidades)	0.010	3 unidades
MgCl <sub>2</sub>	0.010	10.0 mM
H <sub>2</sub> O		
Extracto enzimatico		
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>1 ml.</b>	

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

$$A = \frac{(\Delta DO)v}{EVdc} = \mu\text{moles sustrato } \frac{\text{transformado/min}}{\text{mg proteína}}$$

en donde :

$\Delta DO$  = cambio de densidad óptica / minuto.

$v$  = volumen final de la mezcla de reacción.

$V$  = volumen de preparación enzimática utilizada.

$E$  = coeficiente de extinción molar de NADH a 340 nm  
( $6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ ).

$d$  = distancia del paso de luz en la celda del  
espectrofotómetro.

$C$  = concentración de proteína de la preparación  
enzimática utilizada en mg/ml.

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

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que carboxila un  $\mu\text{mol}$  de PEP por minuto en nuestras condiciones de ensayo.

#### 4.4.4 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA.

Basándonos en la modificación de Hartree (83) al método de Lowry, nosotros modificamos el método de azul de Coomassie de Bradford (44) para determinación de proteínas, con el objeto de eliminar las glicoproteínas de los extractos crudos de maíz que podrían producir una respuesta no lineal en el ensayo.

Suponiendo que un tratamiento en medio alcalino en presencia de desoxicolato podría mejorar la respuesta, hicimos lo siguiente:

Como estandar se empleó albúmina de suero de bovino (BSA) tipo I, libre de ácidos grasos, para lo cual fue tratada con carbón activado de acuerdo con Chen (82) y fue disuelta en agua a una concentración de 2.5 mg/ml. A partir

de esta solución se obtuvo la curva patrón, usando volúmenes apropiados que contenían 0,5,25,50,75 y 100  $\mu\text{g}$  de albúmina completándolo a 100  $\mu\text{l}$  con agua destilada. Posteriormente se le adicionaron 100  $\mu\text{l}$  del medio en el que se encuentra la enzima.

Las preparaciones enzimáticas, cuya concentración de proteína iba a determinarse, fueron completadas a 100  $\mu\text{l}$  con el mismo medio y llevadas a un volumen de 200  $\mu\text{l}$  con agua destilada. (Se hicieron diluciones de 10 en 10  $\mu\text{l}$  hasta llegar a 100  $\mu\text{l}$ .)

Después de esta preparación, 100  $\mu\text{l}$  de desoxicolato de sodio 0.15% y 100  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.1 N fueron añadidos a cada tubo, los cuales se agitaron vigorosamente e inmediatamente después se incubaron a 60°C durante 15 minutos, tras lo cual se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 5 ml de solución de azul de Coomassie G, preparada de acuerdo con Bradford (44).

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

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

En estas condiciones la cantidad de proteína de las preparaciones enzimáticas ensayadas mostraron una respuesta lineal entre 10 y 90  $\mu\text{g}$  de proteína total con respecto al desarrollo de color.

#### 4.4.5 PURIFICACION PARCIAL DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO.

Los extractos obtenidos de la homogenización de hojas y de raíces, tras ser centrifugados fueron precipitados agregando sulfato de amonio sólido, de manera lenta y con agitación constante hasta alcanzar un 30% de saturación (el

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

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

#### 4.4.6 PURIFICACION DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.

Se tomaron 260 unidades totales de fosfoenolpiruvato carboxilasa precipitadas con sulfato de amonio (30-60%), se resuspendieron en 2 ml del amortiguador Tris-PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.2, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y glicerol 15%.

La enzima resuspendida se sometió a un proceso de purificación de cromatografía en columna basado principalmente en el método descrito por Uedan y Sugiyama (36).

a) Inicialmente la preparación enzimática resuspendida se aplicó a una columna de filtración en gel de Sephacryl S-300 superfino de 1.6 x 60cm, equilibrada y eluida con el mismo amortiguador de resuspensión. Se colectaron fracciones de 2ml en las que se determinó actividad y concentración de proteínas.

b) Las fracciones correspondientes al pico de actividad de PEPC se reunieron y aplicaron a una columna de intercambio iónico de DEAE (celulosa) Sephacel de 5.4 x 11cm. La columna se equilibró con el mismo amortiguador utilizado para la

resuspensión y se lavó con cinco volúmenes de dicho amortiguador hasta que ya no registró absorbancia a 280nm en el eluato. Posteriormente la enzima se eluyó con un gradiente lineal de KCl de 0 a 200mM aplicado en el mismo amortiguador. Se colectaron 54 fracciones de 2ml y se les determinó actividad de PEPC y concentración de proteínas. Todo el proceso de purificación se llevó a cabo en un cuarto frío a una temperatura de 0 a 4°C.

c) Se intentó purificar a la enzima por medio del pegado a la resina tiolsefarosa por el método que a continuación se describe:

Se lavó y se equilibró resina tiolsefarosa mediante sucesivos lavados con amortiguador HEPES-KOH 100mM pH 7, EDTA 1mM, KCl 100mM y glicerol 20%. Se colocaron 0.2ml de esta resina en una serie de tubos Eppendorf.

Se resuspendieron 1 o 2 unidades de PEPC parcialmente purificada por precipitación con sulfato de amonio en 1ml del mismo amortiguador con que se equilibró la resina.

Este resuspendido se le agregó a la columna de tiolsefarosa y se agitó manualmente durante 20min; se centrifugó y se retiró el líquido sobrenadante al cual se le determinó actividad y proteínas para comprobar si PEPC se pegó a esta resina. En caso afirmativo se procedió a eluir la actividad enzimática. Para ello, una serie de tubos se lavaron con 2 volúmenes de 1ml consecutivos de una solución de  $\beta$ -mercaptoetanol 10mM, seguido de un lavado con un volumen de  $\beta$ -mercaptoetanol 50mM y por último un lavado con un volumen de DTT 10mM, agitando y centrifugando entre cada lavado para obtener el líquido sobrenadante de cada uno de ellos.

Una segunda serie se trató con dos lavados consecutivos del amortiguador y después se le agregó DTT 2mM en otro lavado. Se conservaron los sobrenadantes de cada uno de ellos.

Otra serie se trató con lavados consecutivos de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  cuyas concentraciones iban desde 0 hasta 0.4M conservando los sobrenadantes.

A cada uno de los sobrenadantes que se obtuvieron de los diferentes lavados se les determinó actividad enzimática, así como proteínas por absorbancia a 280nm.

#### 4.4.7 ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS.

Se llevó a cabo mediante una modificación al método de Laemli (56).

##### A) Preparación de los geles.

Los geles empleados fueron dos. Primero se usó un gel separador de 7.5% T (porcentaje total de monómeros de acrilamida + bisacrilamida) de 5 cm de longitud, conteniendo Tris-HCl 1.5M y SDS 0.1% a pH 8.8. El segundo fue un gel apilador de 4% T, colocado sobre el gel separador compuesto de Tris-HCl 0.5M a pH 6.8. Ambos geles fueron preparados mezclando las soluciones que se describen a continuación.

	GEL SEPARADOR 7.5%T, 2.7%C	GEL CONCENTRADOR 4%T, 2.7%C
1.- Acrilamida-bisacrilamida (30% T, 2.7% C)	5 ml	1.34 ml
2.- Amortiguador de separación	5 ml	—
3.- Amortiguador apilador	—	2.5 ml
4.- SDS 10%	—	100 $\mu$ l
5.- Agua	9.86 ml	6 ml
6.- Persulfato de amonio	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
7.- TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
VOLUMEN FINAL	20 ml	10 ml



Los dos últimos componentes se añadieron después de haber desgasado por un periodo de 10-15 min.

B).- Preparación de la muestra.

Todas las muestras antes de ser sometidas a electroforesis fueron mezcladas a volúmenes iguales con el amortiguador de carga (Tris-HCl 0.25M, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 4 mg/ml). Después se calentaron 10 min a 100°C.

C).- Amortiguador de electrodos.

Se preparó un amortiguador que contenía Tris-HCl 0.025M, glicina 0.192M y SDS 0.1% a pH 8.3.

D).- Condiciones de corrida.

Las muestras se aplicaron en un volumen de 30 µl en cada carril, para evitar en lo posible el ensanchamiento de las bandas de proteína durante la corrida electroforética. Esto se realizó a temperatura ambiente a 25 mA siendo su duración de 2.5 horas. La electroforesis se dió por terminada cuando el indicador del frente electroforético (azul de bromofenol llegaba a 0.5 cm del frente.

Las proteínas marcadoras usadas para determinar los pesos moleculares de las bandas de proteína obtenidas se prepararon de la misma manera que las muestras problema, pero atendiendo a las especificaciones de la casa comercial en tanto a la concentración a usar.

Los marcadores aplicados fueron los siguientes:

PROTEINA	PESO MOLECULAR
Fosforilasa b	97,400 daltons
Albúmina bovina	66,000 daltons
Albúmina de huevo	45,000 daltons
Pepsina	34,700 daltons

E).- Revelado de los geles.

Las bandas de proteína presentes en el gel fueron fijadas incubando al gel durante una hora en una solución de ácido acético-agua-metanol en una proporción de 5:1:5.

Posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie R (0.125% en metanol 50% y acético 10% en agua) por otra hora.

El desteñido se realizó lavando el gel frecuentemente, primero en la solución de fijación y finalmente en una solución de acético al 5% y metanol 10% en agua.

#### 4.5 EXPERIMENTOS DE PREINCUBACION DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA.

Las preparaciones de PEPC, tanto las parcialmente purificadas de raíz y de hoja como las puras de hoja, se preincubaron en ausencia y en presencia de diferentes reactivos específicos de grupos SH y de puentes disulfuro.

En el caso de las preparaciones de raíz parcialmente purificadas por precipitación con sulfato de amonio, se resuspendieron en amortiguador TEA-HCl 50mM pH 7, EDTA 1mM y glicerol 20%; estos resuspendidos se dividieron en dos partes. Una de ellas se desaló en el mismo amortiguador en que se encontraba resuspendida a pH 7 y la otra se desaló con un amortiguador TEA-HCl 50mM pH 8, EDTA 1mM, glicerol 20%.

El desalado se realizó en microcolumnas 0.5 x 5cm empacadas con Sephadex G 25 mediana para evitar que se diluyera la muestra resuspendida.

A las muestras desaladas se les dividió de nuevo en dos partes. Una de ellas se conservó como control tanto de pH 7 como de pH 8 y a la otra se le agregó el agente con que se iba a tratar. Todas se mantuvieron a 30°C a lo largo del

experimento.

Para las preparaciones de hoja parcialmente pura se siguió el mismo tratamiento que en el caso de raíz, para tener las muestras a diferentes pH's y luego fueron tratadas con el agente. También se llevó a cabo el ensayo a dos temperaturas de incubación que fueron 0 y 20°C en presencia del agente y adicionando diferentes ligandos.

Se tomaron lecturas de la actividad tanto a las muestras resuspendidas como a los desalados controles y tratados, tomando alícuotas a diferentes tiempos para ir siguiendo el efecto de cada tratamiento.

#### 4.6 ANALISIS DE DATOS.

##### 4.6.1 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES APARENTES DE VELOCIDAD DE INACTIVACION.

El logaritmo natural de las actividad residual medida a diferentes tiempos durante la preincubación de la enzima con el reactivo inactivante frente al tiempo nos dará el valor de la  $k_{ap}$  de inactivación como la pendiente de la recta que se obtiene, de acuerdo a la ecuación que describe una cinética de pseudo-primer orden (ver Antecedentes 1.3.2).

##### 4.6.2 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LAS ESPECIES LIBRE Y ACOMPLEJADA CON $Mg^{+2}$ DE FOSFOENOLPIRUVATO.

Para ello se usó un programa de computación desarrollado en nuestro laboratorio (96). La constante de disociación del complejo PEP-Mg usada fue de 0.180 mM (97).

#### 4.6.3 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE INACTIVACION DE SEGUNDO ORDEN PARA FOSFOENOLPIRUVATO LIBRE.

Se determinó el valor de las constantes de segundo orden graficando las constantes de pseudo-primer orden obtenidas para cada una de las concentraciones del ligando contra estas concentraciones. La pendiente de la recta obtenida nos da el valor de la constante de segundo orden, ya que  $k_1[S]$  es igual a la constante de pseudo-primer orden, determinada experimentalmente.

$k_1$  = constante de segundo orden.

$[S]$  = concentración de ligando.

#### 4.6.4 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE DISOCIACION PARA EL LIGANDO.

Se determinaron por ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a la siguiente ecuación (ver antecedentes 1.3.2).

$$k_{ap} = \frac{k'(K_s + \alpha[S])}{K_s + [S]}$$

En donde:

$k_{ap}$  = constante de inactivación aparente determinada experimentalmente en presencia del ligando.

$k'$  = constante de inactivación en ausencia del ligando.

$\alpha$  = factor con que el ligando modifica la constante de inactivación por el reactivo.

$K_s$  = constante de disociación del ligando.

Para el ajuste se usó el programa Enzfitter de 1987  
hecho por Robin J. Leatherbarrow versión 1.05 y distribuido  
por Elsevier Biosoft.

## 5. RESULTADOS.

### 5.1 EFECTO DE AGENTES BLOQUEADORES DE GRUPOS -SH Y REDUCTORES DE PUENTES DISULFURO SOBRE LA ACTIVIDAD DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA.

#### 5.1.1 EFECTO DE PCMB SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC PARCIALMENTE PURIFICADA DE RAIZ.

Cuando el extracto enzimático parcialmente purificado obtenido de raíces se preincuba con un reactivo específico de grupos sulfhidrilo como el PCMB, siguiendo el procedimiento descrito en 4.5, se observa que la enzima sufre una inactivación a pH 7.

Este efecto inactivante no es causado por el pH, ya que el control a pH 7 permanece estable durante el tiempo que dura la preincubación.

Estos resultados se encuentran graficados en la fig. 4 ; en la que se puede apreciar que esta inactivación sigue una cinética de pseudo primer orden en todos los casos y es un proceso bifásico. La primera fase se presenta a tiempos cortos ( 0 a 10 min ) y la segunda a tiempos más largos. La constante de velocidad asociada a la primera fase siempre es mayor que la asociada a la segunda fase de cada uno de los tratamientos.

Los valores de las constantes de velocidad de pseudo primer orden determinadas para las dos fases se encuentran registradas en cada figura como  $k_1$  (fase rápida) y  $k_2$  (fase lenta).

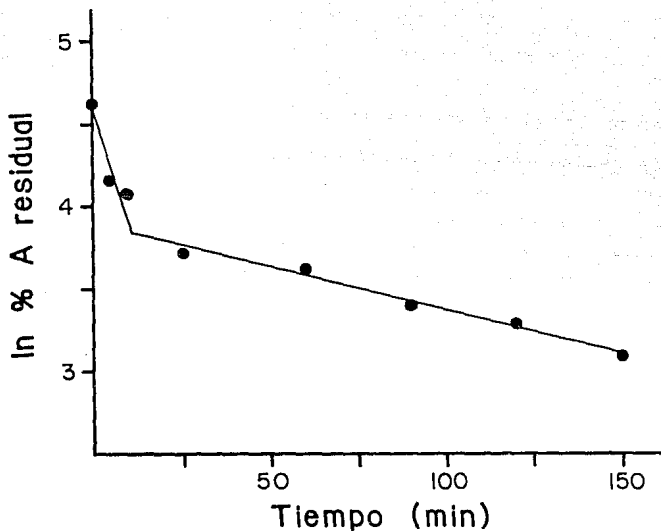


Fig. 4.- Efecto de PCMB sobre la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa en extractos parcialmente purificados de raíz tras incubación a 25°C y pH 7 (●). La concentración de reactivo usada fue de 100μM. Las condiciones de medida de la actividad fueron descritas en Métodos. La actividad inicial fue de 3 u/ml. El control en ausencia del reactivo se mantuvo constante a lo largo de la incubación.

$$k_1 \text{ (fase rápida)} = 4 \times 10^{-2} \text{ [min}^{-1}\text{]};$$

$$k_2 \text{ (fase lenta)} = 5.2 \times 10^{-3} \text{ [min}^{-1}\text{]}.$$

### 5.1.2 EFECTO DE DTT Y $\beta$ mercaptoetanol SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC PARCIALMENTE PURIFICADA DE RAIZ.

Sorprendentemente la inactivación producida por el PCMB al reaccionar con los grupos SH presentes en la enzima no pudo ser revertida al agregar  $\beta$ -mercaptoetanol o DTT a la mezcla de reacción como era de esperarse, dado que estos agentes rompen el puente disulfuro formado entre el reactivo y el grupo SH de la proteína, liberando a este.

Los anteriores resultados nos llevaron a pensar que quizás estos agentes protectores de grupos SH tuvieran por sí mismos algún efecto delétereo sobre la actividad enzimática.

Por ello se incubó la enzima en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y DTT 50 mM como se describe en 4.5.

Los resultados se muestran en la fig. 5, y como puede observarse si existe un efecto inactivante de estos compuestos sobre la enzima, manifiesto sobre todo a pH 8. La cinética bifásica de inactivación es muy semejante a la observada con PCMB. Las constantes de velocidad de pseudo primer orden determinadas a partir de los datos experimentales se incluyen en la tabla III.

### 5.1.3 EFECTO DE DTNB SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC PARCIALMENTE PURIFICADA DE HOJA.

Como se indicó en Antecedentes la isoenzima de hoja difiere de la de raíz en varias de sus propiedades moleculares y cinéticas. Quisimos investigar si también había diferencias a nivel de sensibilidad a reactivos específicos de grupos sulfhidrilo.

Para ello se preincubaron con DTNB 100  $\mu$ M extractos enzimáticos de PEPC de hoja parcialmente purificados siguiendo el método general descrito en 4.5.



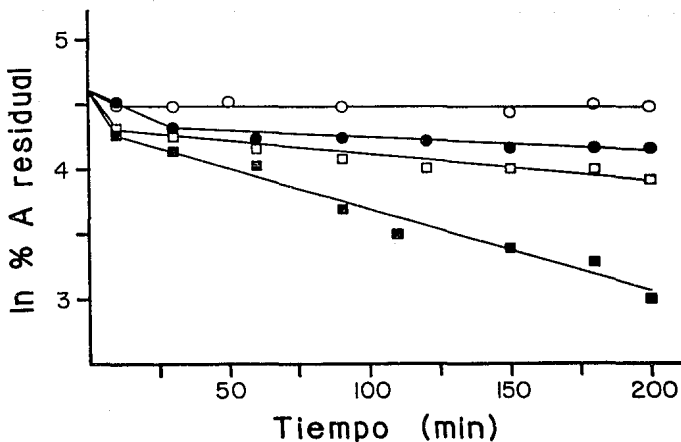


Fig. 5.- Efecto de DTT y  $\beta$ -mercaptoetanol sobre la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa de extractos parcialmente purificados de raíz tras incubación a 25°C a pH 7 (□, ○) y a pH 8 (■, ●). Las concentraciones de reactivos usadas fueron  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM (○, ●) y DTT 50 mM (□, ■). La actividad inicial fue de 3 u/ml. La actividad del control se mantuvo constante a lo largo de la incubación.

Tabla III.- Constantes de inactivación de fosfoenolpiruvato carboxilasa por reacción específica de grupos sulfhidrilo y puentes disulfuro.

Reactivo	pH incubación	Fase rápida $k_1(\text{min}^{-1})$	Fase lenta $k_2(\text{min}^{-1})$
PCMB (100 $\mu\text{M}$ )	7	0.04	0.0052
DTT (50mM)	7	0.028	0.0024
	8	0.056	0.0064
$\beta$ -mercaptoetanol (10mM)	7	0.01	0.0002
	8	0.008	0.0012

Bajo todas las condiciones probadas que se describen a continuación se observó también una inactivación que sigue una cinética muy similar a la que presentan los extractos de raíz.

5.1.3 a) EFECTO DEL pH SOBRE LA INACTIVACION DE PEPC POR DTNB.

Al llevar a cabo la preincubación con DTNB a diferentes pH's ( 7, 7.5 y 8 ) se observa nuevamente la cinética de pseudo primer orden en dos pasos. La dependencia del pH de la inactivación se encuentra graficada en la fig. 6 y las constantes de inactivación se encuentran en la tabla IV.

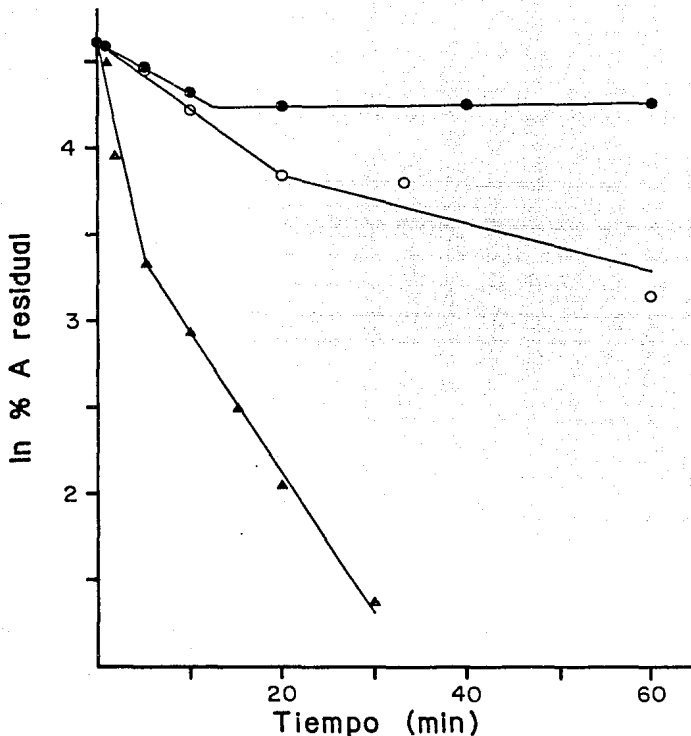


Fig. 6.- Efecto del pH sobre la inactivación por DTNB de fosfoenolpiruvato carboxilasa en extractos parcialmente purificados de hoja. Las incubaciones fueron realizadas a 30°C y a pH 7 (●), pH 7.5 (○) y pH 8 (▲). La concentración del reactivo usado fue de 100  $\mu$ M y la actividad enzimática inicial fue de 1 u/ml. La medida de la actividad se realizó como fue descrito en 4.4.3, en ausencia de DTT.

Tabla IV.- Efecto del pH sobre las constantes de inactivación de fosfoenolpiruvato carboxilasa por DTNB 100 $\mu$ M.

pH incubación	Fase rápida $k_1(\text{min}^{-1})$	Fase lenta $k_2(\text{min}^{-1})$
7	0.0288	0
7.5	0.0388	0.0135
8.5	0.25	0.083

Las actividades enzimáticas determinadas para los controles de pH se tomaron como el 100% para cada tiempo y se calculó el porcentaje de actividad residual de la muestra tratada con DTNB de acuerdo a estos controles.

Como puede observarse el comportamiento de las dos fases es similar, incrementándose la constante de inactivación con el pH del medio (fig. 7).

5.1.3 b) EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA INACTIVACION DE PEPC DE HOJA DE MAIZ POR DTNB.

Por otra parte se investigó la dependencia de la temperatura del proceso de inactivación por reactivos bloqueantes de grupos -SH. Para ello se hicieron preincubaciones con el mismo agente, es decir DTNB 5 mM, a dos temperaturas diferentes: 0 y 20°C.

Los resultados (fig. 8) mostraron que la inactivación fue mayor en la muestra mantenida a 0°C, aunque ambas siguen presentando la misma cinética bifásica.

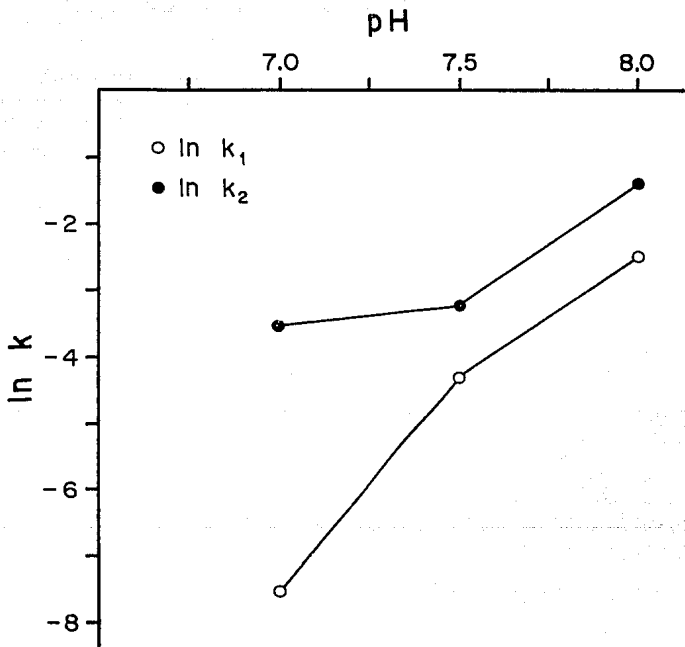


Fig 7.- Constante de velocidad de inactivación de pseudo primer orden en función del pH.

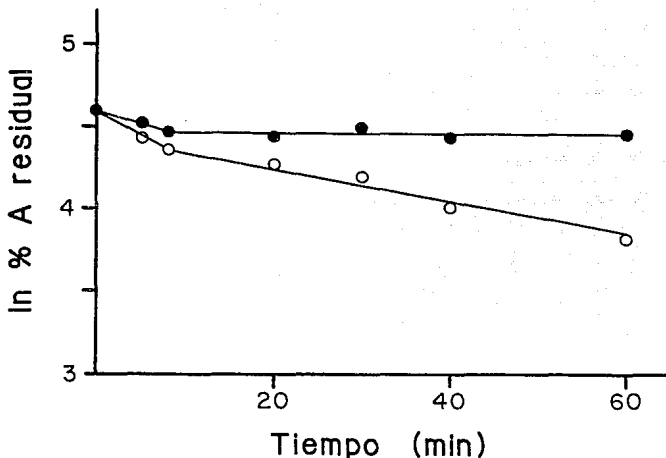


Fig. 8.- Efecto de la temperatura sobre la inactivación por DTNB de fosfoenolpiruvato carboxilasa en extractos parcialmente purificados de hoja tras incubación a pH 7, 20°C (●) y 0°C (○). La concentración de reactivo usada fue de 100  $\mu$ M. La actividad inicial fue de 1.55 u/ml. Las actividades enzimáticas determinadas para los controles de temperatura se tomaron como el 100% para cada tiempo y se calculó el % de la actividad residual de la muestra tratada con DTNB de acuerdo a su control.

(○)  $k_1 = 3.25 \times 10^{-2}$  ;  $k_2 = 9.5 \times 10^{-3}$  [min<sup>-1</sup>]

(●)  $k_1 = 1.75 \times 10^{-2}$  ;  $k_2 = 0$  [min<sup>-1</sup>]

### 5.1.3 c) EFECTO DE LIGANDOS SOBRE LA INACTIVACIÓN DE PEPC DE HOJA DE MAIZ POR DTNB.

Como se ha mostrado anteriormente el tratamiento de la enzima con DTNB conlleva pérdida de actividad. Es por ello lógico pensar que el grupo o los grupos -SH modificado(s) por este reactivo puede(n) estar en el sitio activo, involucrado(s) de alguna manera en el mecanismo de la reacción.

Si este fuera el caso es de esperar que la presencia de sustratos o de efectores de la reacción en el medio de incubación con este reactivo altere el proceso de modificación covalente.

Se probaron PEP y  $Mg^{+2}$  como sustratos de la reacción; malato y aspartato como inhibidores; glucosa 6 fosfato, glicina y glicerol como activadores. Todos ellos a las concentraciones que se indican en el pie de las figs. 9, 10, 11 y 12, donde se muestran los resultados de estos experimentos.

Se probó asimismo el efecto de  $Ca^{+2}$ , metal que inhibe la reacción por competencia con  $Mg^{+2}$  en el sitio activo (6), tanto aislado como en presencia del sustrato PEP.

Cuando se incluyó en el medio de incubación  $Ca^{+2}$  1mM (fig. 9) no se observó protección alguna y se sigue observando una cinética bifásica de inactivación de pseudo primer orden como la discutida anteriormente. Sin embargo en las incubaciones con PEP 5mM, aparece sólo una fase de inactivación después de una ligera reactivación durante los primeros minutos. PEP +  $Ca^{+2}$  ofrecen una protección total.

$Mg^{+2}$  5mM presentó un comportamiento similar a  $Ca^{+2}$  1mM al no ofrecer protección. Malato 5mM tampoco protegió. Malato y  $Mg^{+2}$  juntos si protegieron parcialmente después de ligera reactivación como se vió en el caso de PEP 5mM.

Cuando se incluyó en el medio de incubación G6P 5mM se observó una ligera reactivación inicial seguida de protección parcial. G6P +  $Mg^{+2}$  presenta un comportamiento similar que

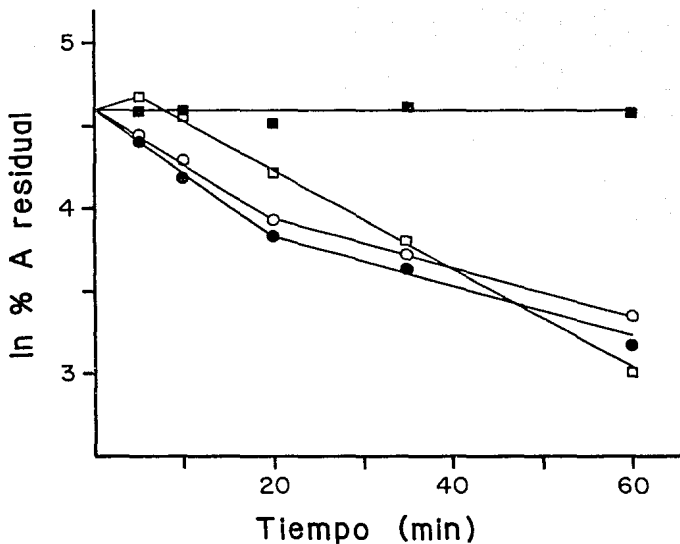


Fig 9.- Efecto de ligandos de fosfoenolpiruvato carboxilasa en extractos parcialmente purificados de hoja frente a la inactivación por DTNB a 30°C y pH 7. Los ligandos usados fueron los siguientes: [Ca<sup>2+</sup>] 1mM (○); [PEP] 5mM (□); [PEP] 5mM + [Ca<sup>2+</sup>] 1mM (■). Estos ligandos se agregaron a las incubaciones al mismo tiempo que el DTNB 100μM y se mantuvo una muestra control sólo con DTNB (●). La actividad inicial fue de 1 u/ml. Se midió la actividad como en 4.4.3, en ausencia de DTT.



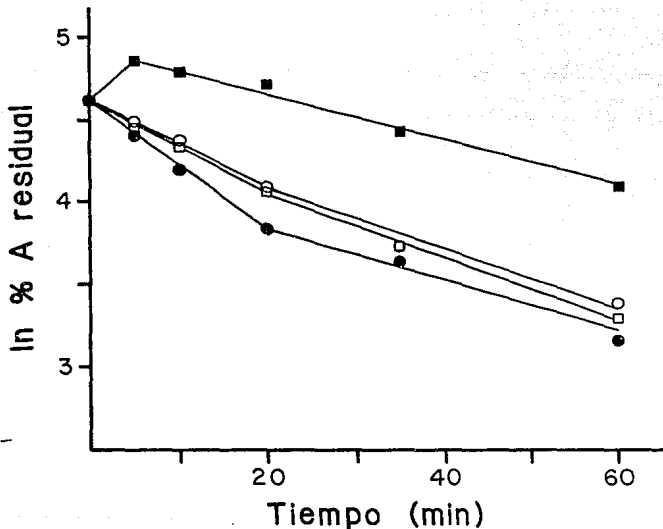


Fig. 10 .- Protección por ligandos de la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa de extractos parcialmente purificados de hoja frente a la inactivación por DTNB a 30°C y pH 7. Los ligandos usados fueron: [Mg<sup>2+</sup>] 5mM (○); [Malato] 5mM (□); [Malato + Mg<sup>2+</sup>] 5mM (■). Estos ligandos se agregaron a las incubaciones al mismo tiempo que el DTNB 100μM y se mantuvo una muestra control con DTNB (●). La actividad inicial fue de 1 u/ml. Se midió la actividad como en 4.4.3 en ausencia de DTT.

G6P, aunque la protección se incrementa ligeramente.

En todos los casos  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Mg}^{+2}$  incrementan la protección que ofrecen los ligandos, siendo la mayor la obtenida con PEP y  $\text{Ca}^{+2}$  juntos.

Se usó  $\text{Ca}^{+2}$  con PEP en lugar de  $\text{Mg}^{+2}$ , puesto que la enzima es inactiva con  $\text{Ca}^{+2}$  como ligando metálico; por tanto no hay consumo de PEP y la concentración de este ligando permanece constante durante el experimento.

Glicerol 15% y glicina 5mM ofrecen protección parcial, mayor en el caso de glicerol.

Las constantes de velocidad de inactivación para los ligandos usados se encuentran resumidas en la tabla V.

En todos los experimentos de inactivación por DTNB las reacciones se dejaron transcurrir 60 min y después se trataron las muestras con DTT 10mM para ver si se podía revertir el efecto del DTNB, pero esto no se logró en ningún caso y la enzima se siguió inactivando a la misma velocidad.

Tabla V.- Efecto de ligandos de fosfoenolpiruvato carboxilasa frente a la inactivación por DTNB .

Reactivo	Fase rápida $k_1(\text{min}^{-1})$	Fase lenta $k_2(\text{min}^{-1})$
DTNB 100 $\mu\text{M}$ (control)	0.04	0.015
$\text{Ca}^{+2}$ 1mM	0.035	0.0145
PEP 5mM	—	0.0288
PEP 5mM + $\text{Ca}^{+2}$ 5mM	0	0
$\text{Mg}^{+2}$ 5mM	0.026	0.0185
Malato 5mM	0.029	0.018
Malato 5mM + $\text{Mg}^{+2}$ 5mM	—	0.0135
G6P 5mM	—	0.0145
G6P 5mM + $\text{Mg}^{+2}$ 5mM	—	0.0035
Glicina	0.025	0.013
Glicerol 15%	0	0.019

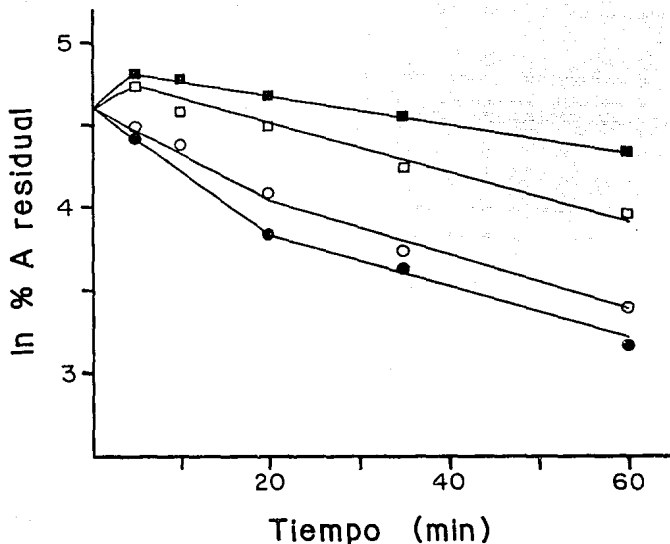


Fig. 11.- Efecto de ligandos sobre la inactivación de fosfoenolpiruvato carboxilasa por DTNB a 30°C y pH 7. Los ligandos usados fueron: [Mg<sup>2+</sup>] 5mM (○); [G6P] 5mM (□); [G6P + Mg<sup>2+</sup>] 5mM (■). Estos ligandos se agregaron a las incubaciones al mismo tiempo que el DTNB 100μM y se mantuvo una muestra control sólo con DTNB (●). La actividad inicial fue de 1 u/ml. La actividad se midió como en 4.4.3 en ausencia de DTT.

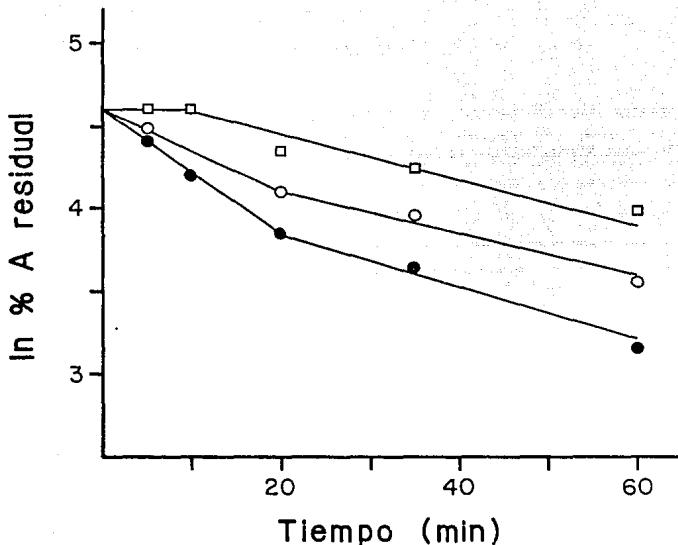


Fig. 12.- Protección por glicerol y glicina de la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa de extractos parcialmente purificados de hoja frente a la inactivación por DTNB a 30°C y pH 7. Las concentraciones usadas fueron [Glicina] 5mM (○); [Glicerol] 15% v/v (□). Estos reactivos se agregaron al mismo tiempo que el DTNB 100 $\mu$ M y se mantuvo una muestra control sólo con DTNB (●). La actividad inicial fue de 1 u/ml. La actividad se midió como en 4.4.3 en ausencia de DTT.

El reactivo DTNB y alguno de los ligandos se agregaron al medio de incubación al mismo tiempo. Se mantuvo como control al medio de incubación que sólo se le había agregado DTNB.

#### 5.1.4 EFECTO DE DTT SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC PARCIALMENTE PURIFICADA DE HOJA.

En vista de los resultados mencionados anteriormente se decidió hacer incubaciones con DTT para probar si también existía un proceso de inactivación de la enzima al modificar los puentes disulfuro existentes en la forma nativa.

Se pudo observar una inactivación ligera si se compara con la obtenida incubando con DTNB. Además la cinética que presenta es de pseudo primer orden pero en una sola fase.

Al agregar a la preincubación el sustrato PEP junto con el DTT, la inactivación observada es mayor que con el DTT solo y ahora si se observan las dos fases que se habían encontrado en los anteriores experimentos con este mismo extracto enzimático (fig. 13).

Se calcularon las constantes de velocidad de la inactivación para los tratamientos, las cuales se presentan en el pie de la figura.

#### 5.1.5 PURIFICACION DE PEPC DE HOJA DE MAIZ.

Se decidió purificar la enzima de hoja, con el fin de poder estudiar de manera más clara el efecto que el sustrato PEP parecía tener sobre la enzima.

El método de purificación se encuentra descrito en 4.4.6

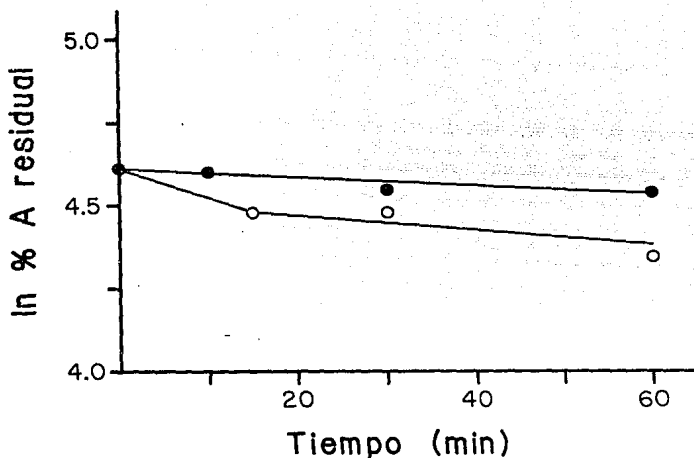


Fig. 13.- Efecto de DTT y PEP sobre la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa de extractos parcialmente purificados de hoja tras incubación a 25°C y pH 7. Las concentraciones de reactivo utilizadas fueron [DTT] 10mM (●); [DTT + PEP] 10mM (○). La actividad inicial fue de 2.1 u/ml. El método usado para medir la actividad enzimática fue descrito en 4.4.3.

(●)  $k = 1.25 \times 10^{-3} \cdot [\text{min}^{-1}]$

(○)  $k_1 = 8.5 \times 10^{-3}$ ;  $k_2 = 2.25 \times 10^{-3} \cdot [\text{min}^{-1}]$

y algunos de los perfiles de elución obtenidos de las cromatografías de intercambio iónico y filtración en gel se presentan en las figuras 14 y 15.

La tabla VI resume el proceso de purificación de la enzima.

La preparación enzimática obtenida tenía una actividad específica de 10-13  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  medida a pH 8 y 25°C por el método descrito en 4.4.3 y una pureza superior al 95% con el criterio de electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol y SDS) y tinción por azul de Coomassie.

Por otra parte al tratar de purificar a PEPC por medio de pegado a una columna de tior sefarosa, no se logró obtener a la enzima activa después de que se pegó y se despegó de la columna por medio del lavado con DTT 2 mM. Por ello, este tratamiento no dió el resultado deseado de una purificación más rápida de nuestra proteína.

Tabla VI.- PURIFICACION DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE HOJA DE MAIZ.

Paso	Actividad total (unidades) <sup>1</sup>	Proteína (mg)	Actividad específica (u/mg)	Rendimiento (%)
Extracto crudo.	370	142.3	2.6	100
Precipitación con sulfato de amonio	260	92.49	2.8	70.2
Sephacryl S-300	241	16.74	14.39	65
DEAE Sephacel	207	11.39	18.18	56

(1) = unidad =  $\mu\text{mol}$  de sustrato transformado/min bajo condiciones estándares de ensayo.

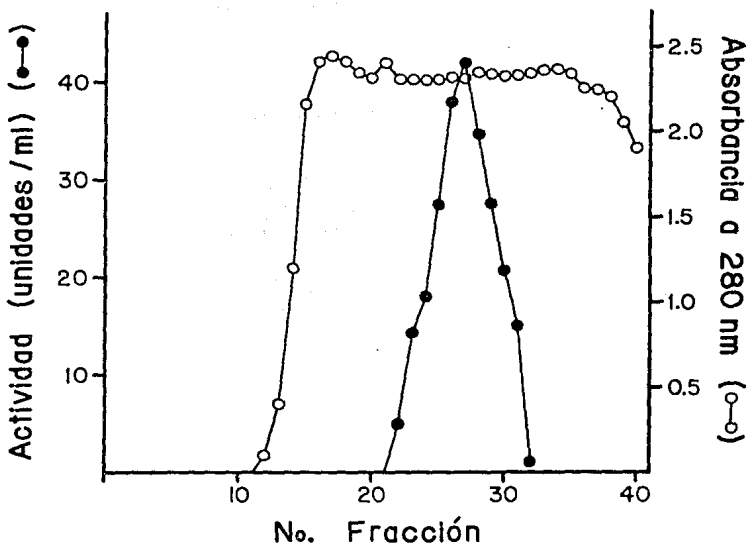


Fig. 14.- Perfil de elución de proteínas y de actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa tras cromatografía de filtración en gel (Sephacryl S 300). Las condiciones de corrida se describen en Métodos 4.4.6 (a).



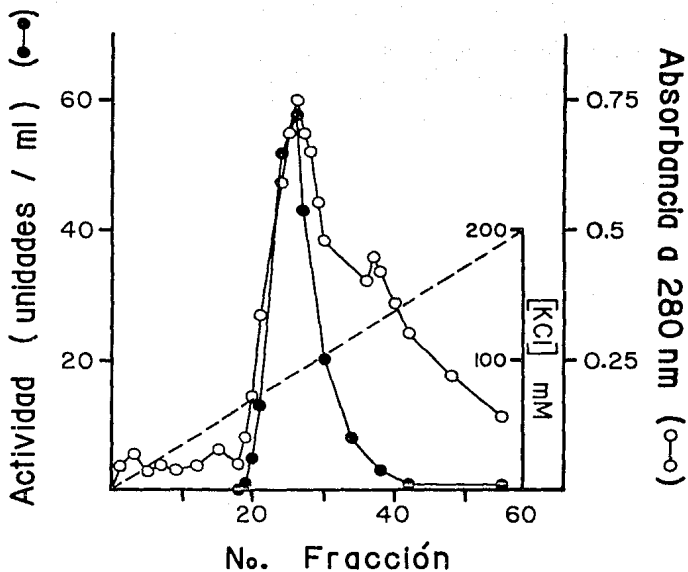


Fig. 15.- Perfil de elución de proteínas y de actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa tras cromatografía de intercambio iónico (DEAE Sephacel). Las condiciones de corrida se describen en Métodos 4.4.6 (b).

#### 5.1.6 EFECTO DE DIPS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE PEPC PURIFICADA DE HOJA.

La enzima pura se preincubó con otro reactivo específico de grupos -SH, DIPS, siguiendo el método anteriormente descrito en 4.5.

La figura 16 muestra la cinética de inactivación para este compuesto. Como se puede observar nuevamente encontramos una cinética de pseudo primer orden bifásica; siendo la reactividad de este compuesto a pH 7 muy superior a la del DTNB probado con los extractos parcialmente purificados. Por ello decidimos continuar usando este reactivo en los siguientes estudios.

#### 5.1.6 a) EFECTO DE PEP SOBRE LA INACTIVACIÓN POR DIPS DE LA ENZIMA PURA.

La presencia de PEP en el medio de inactivación con DIPS a diferentes concentraciones (9 y 3 mM) incrementa la inactivación causada por este reactivo de grupos SH (fig. 17).

Así se sigue observando una cinética bifásica igual que la del tratamiento con DIPS sólo, pero las constantes de velocidad de la inactivación para la primera fase aumentan a medida que lo hace la concentración de PEP en el medio de preincubación, mientras que la concentración menor de PEP no afecta la segunda fase de inactivación y la concentración más alta protege durante esta segunda fase de inactivación.

Las constantes de velocidad se encuentran registradas en la Tabla VII.

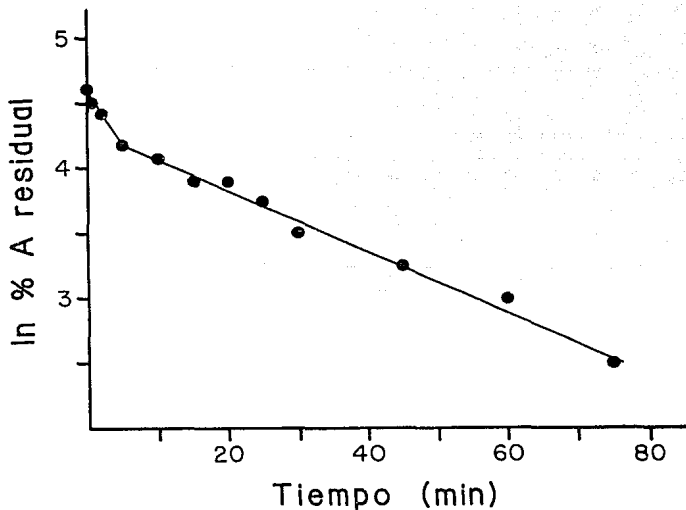


Fig. 16.- Efecto de DIPS sobre la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa pura de hoja. La incubación se llevó a cabo a 30°C y pH 7. La concentración de DIPS fue de 25 $\mu$ M. Las condiciones de medida de la actividad fueron descritas en Métodos, al medio de ensayo no se le agregó DTT. La actividad inicial fue de 2 u/ml. El control en ausencia del reactivo se mantuvo constante a lo largo de la incubación.

$$k_1 = 9 \times 10^{-2} ; k_2 = 2.3 \times 10^{-2} \text{ [min}^{-1}\text{]}.$$

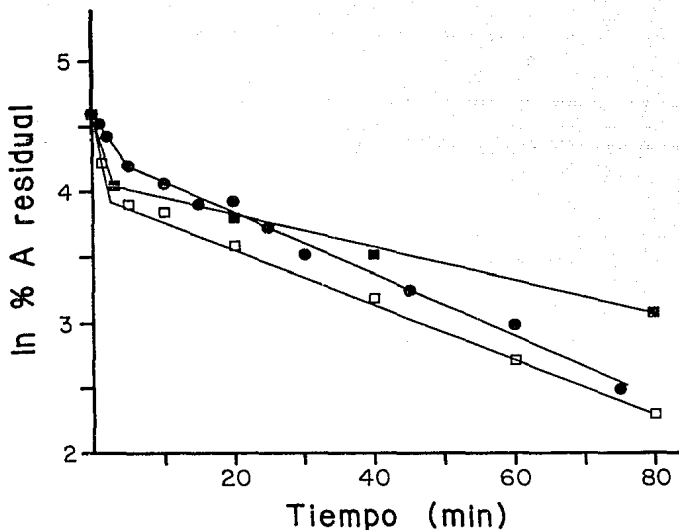


Fig. 17.- Efecto de fosfoenolpiruvato sobre la inactivación por DIPS de fosfoenolpiruvato carboxilasa pura de hoja. La incubación se llevó a cabo a 30°C y pH 7. Las concentraciones de reactivos utilizadas fueron PEP 9mM + DIPS 25µM (□) y PEP 3mM + DIPS 25 µM (■). La actividad enzimática se midió como en 4.4.3 en ausencia de DTT. La actividad inicial fue de 2u/ml. Se siguió la actividad del control con DIPS 25µM (●).

(□)  $k_1 = 2.9 \times 10^{-1}$  ;  $k_2 = 2.3 \times 10^{-2}$  [ $\text{min}^{-1}$ ].

(■)  $k_1 = 1.8 \times 10^{-1}$  ;  $k_2 = 1 \times 10^{-2}$  [ $\text{min}^{-1}$ ].

(●)  $k_1 = 9 \times 10^{-2}$  ;  $k_2 = 2.3 \times 10^{-2}$  [ $\text{min}^{-1}$ ].

5.1.7 EFECTO DE PEP SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEPC PURA DE HOJA.

Se hicieron incubaciones de la enzima con PEP (3 y 9 mM) bajo las mismas condiciones discutidas anteriormente, es decir en presencia de 2.5 mM  $Mg^{+2}$  con el fin de definir si el efecto observado con DIPS era causado por el ligando o por el ligando en presencia del agente bloqueante del grupo -SH. Se encontró que PEP por si mismo ejerce un efecto inactivante. De nuevo aparece una cinética bifásica, siendo las velocidades de inactivación mayores a medida que se incrementa la concentración de PEP en el medio de incubación. Las velocidades de la segunda fase son notoriamente inferiores a las obtenidas en presencia de DIPS (fig. 18).

Sus constantes de velocidad se encuentran registrados en la tabla VII.

Puesto que el medio de incubación contenía  $Mg^{+2}$ , las incubaciones se hicieron en presencia de PEP<sub>i</sub> y PEP- $Mg^{+2}$ . Por ello se determinaron las constantes de velocidad de segundo orden con respecto a estos ligandos PEP<sub>i</sub> y al complejo PEP- $Mg^{+2}$ , ya que  $Mg^{+2}$  libre no se une a PEPC como se comprobó con la enzima parcialmente purificada (fig 19).

Independientemente de cual sea el ligando considerado, se obtuvo una línea recta que pasa por el origen, indicativo de que uno de estos ligandos es responsable de la inactivación observada, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la enzima parcialmente purificada, creemos que es PEP<sub>i</sub> el agente inactivante.

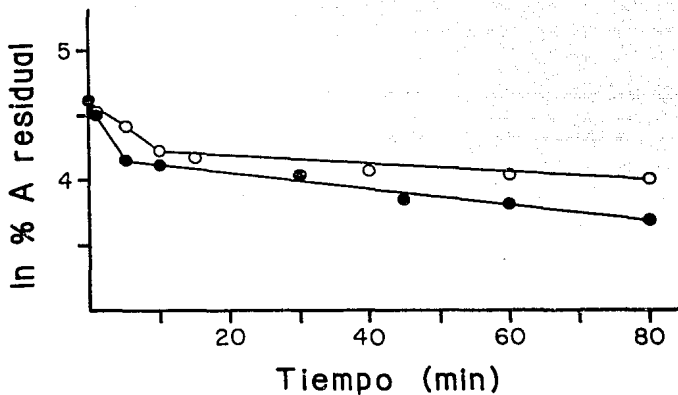


Fig. 18.- Efecto de fosfoenolpiruvato sobre la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa pura de hoja. La incubación se llevó a cabo a 30°C y pH 7. Las concentraciones usadas fueron 9mM (●); 3mM (○). El método para medir la actividad enzimática se describió en 4.4.3, se midió en ausencia de DTT. La actividad inicial fue de 2 u/ml.

(●)  $k_1 = 1.06 \times 10^{-1}$  ;  $k_2 = 6.8 \times 10^{-3}$  [ $\text{min}^{-1}$ ].

(○)  $k_1 = 3.8 \times 10^{-2}$  ;  $k_2 = 2.5 \times 10^{-3}$  [ $\text{min}^{-1}$ ].

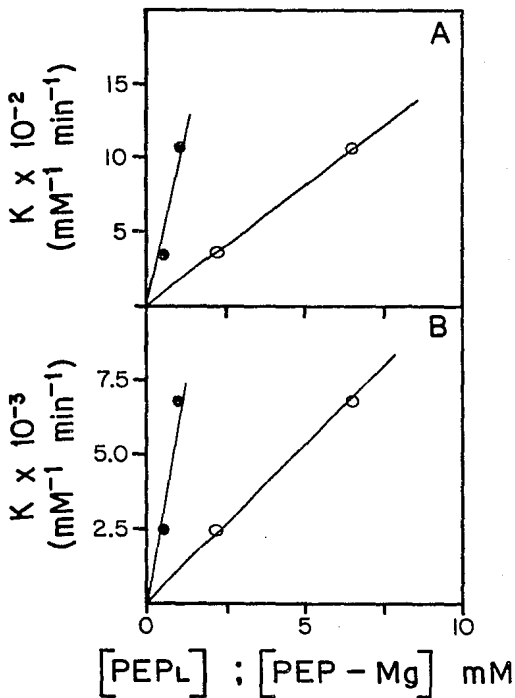


Fig.19.- Constante de segundo orden de fosfoenolpiruvato como especie libre [PEPL] (O) y ligado a  $\text{Mg}^{+2}$  [PEP-Mg<sup>+2</sup>] (●).

A - fase rápida de inactivación.

B - fase lenta de inactivación.

Tabla VII.- Efecto de fosfoenolpiruvato y DIPS sobre la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa pura de hoja.

Reactivo	Fase rápida $k_1(\text{min}^{-1})$	Fase lenta $k_2(\text{min}^{-1})$
DIPS 25 $\mu\text{M}$	0.09	0.023
PEP <sub>libre</sub> 6.5mM	0.106	0.0068
PEP <sub>libre</sub> 2mM	0.038	0.0025
PEP <sub>l</sub> 6.5mM + DIPS 25 $\mu\text{M}$	0.29	0.023
PEP <sub>l</sub> 2Mm + DIPS 25 $\mu\text{M}$	0.18	0.01

5.1.8 DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE DISOCIACION DE PEP<sub>LIBRE</sub>.

Los valores de la constante de inactivación aparente que se determinaron en presencia de PEP<sub>l</sub> fueron graficadas frente a la concentración de este ligando como se muestra en la Fig. 20. La curva en esta figura es la obtenida por ajuste por regresión no lineal a la ecuación pertinente descrita en Métodos 4.6.4. Como puede observarse se logró un buen ajuste a los datos experimentales. La constante de disociación de PEP<sub>l</sub> con su sitio de unión a la enzima estimada por este ajuste fue de  $5.97 \pm 0.01$  mM.



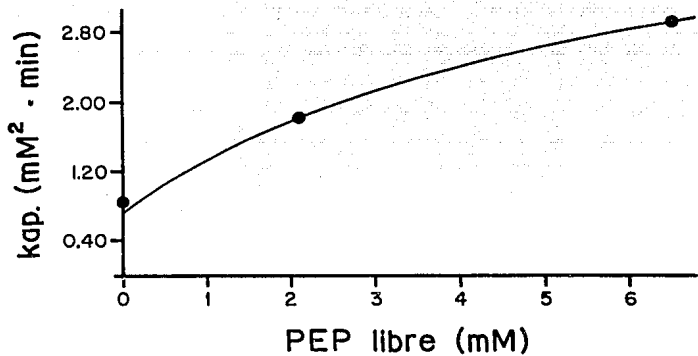


Fig. 20.- Determinación de la constante de disociación de fosfoenolpiruvato libre del ligando.

## 6 DISCUSION.

Tanto la isoenzima de PEPC presente en raíz (anaplerótica) como la presente en hoja (fotosintética) son inactivadas al incubarlas en presencia de reactivos específicos de grupos sulfhidrilo. Ello concuerda con los datos de la literatura que muestran la esencialidad de estos grupos para PEPC (57,69,70,71).

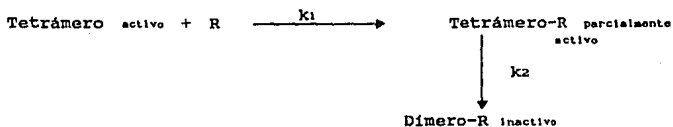
En ambos casos la cinética de inactivación fue de pseudo-primer orden y bifásica, lo que claramente indica que ambas isoenzimas poseen grupos sulfhidrilo en un ambiente muy similar y por tanto con reactividad semejante. Dado que ambas enzimas difieren notablemente no sólo en sus características moleculares sino también en sus propiedades cinéticas y regulatorias, este interesante resultado abre un camino para explorar a que nivel dentro de la molécula se encuentran las diferencias. Es muy probable que estas se encuentren en los sitios alostéricos más que en el sitio activo de la enzima.

El proceso de inactivación estudiado en este trabajo es bastante complejo como lo demuestra por un lado la existencia de dos fases y por otro el que no pueda ser revertido por agentes reductores de puentes disulfuro como son DTT o  $\beta$ -mercaptoetanol. Hay que tener en cuenta que la enzima en su configuración nativa es un tetrámero, pero asumimos que la modificación de una subunidad no tiene efecto sobre la velocidad de modificación de otra subunidad y por tanto para los efectos de esta discusión podemos considerar el o los grupos de cada subunidad en forma independiente.

La cinética bifásica observada puede deberse a:

1º) Los reactivos están actuando sobre dos grupos o tipos de grupos con diferente ambiente y por consiguiente con diferente reactividad.

2°) Los reactivos están actuando sobre un solo grupo, o tipo de grupo pero el proceso de inactivación de la enzima ocurre en dos pasos, cuyas constantes de velocidad difieren lo suficiente para permitir el que sean observadas. A este respecto, una posibilidad que no parece muy lejana dados los reportes existentes en la bibliografía (42) es que la modificación del o de los grupos sulfhidrilos accesibles al reactivo conlleve una disociación de la proteína tetramérica en dímeros parcial o totalmente inactivos. Así el proceso de inactivación consistiría en los pasos esquematizados a continuación:



El paso de disociación tendría una constante de velocidad ( $k_1$ ) menor a la del paso de unión al reactivo específico de grupo ( $k_2$ ), constituyendo así la fase lenta observada en el proceso de inactivación.

Es claro, sin embargo, que nuestros resultados no nos permiten descartar la primera posibilidad y que se necesitan realizar nuevos experimentos para poder concluir con certeza cual de los dos casos es el operante.

Es de destacar que aún cuando la modificación del o los grupo(s) sulfhidrilo conlleva pérdida de actividad esta no es total, lo que concuerda con los resultados obtenidos en estudios del efecto de pH sobre la actividad enzimática. Se ha encontrado que existe un grupo de pK próximo a 8.0 que participa en la unión de los sustratos Mg y PEP (31,98) pero que no es esencial para la unión de estos ligandos. Es decir, la pérdida del H<sup>+</sup> por este grupo incrementa la unión de ambos, o mejor dicho del complejo PEP-Mg, pero esta unión

puede llevarse a cabo aún a valores de pH en que el grupo está totalmente protonizado.

El hecho de que la reactividad del grupo sea mucho mayor a medida que el pH del medio de incubación se incrementa de 7.0 a 8.0 era totalmente de esperarse, dado que la especie reactiva es la que ha perdido el protón ( $R-S^-$ ) y que como acabamos de discutir su pH debe ser un valor cercano a 8.0.

Se sabe que el pK de un grupo depende en gran medida del campo eléctrico en que se encuentre, lo que a su vez está determinado por los restos de aminoácidos en la vecindad de este grupo. Así el pK de grupos sulfhidrilo en las proteínas puede estar en un rango de 7.2 a 8.5 si se encuentra cercano a un grupo cargado positivamente; en un rango de 8.5 a 9.2 si su ambiente es eléctricamente neutro, o en un rango de 9.2 a 10.2 si se encuentra próximo a un grupo cargado negativamente.

El efecto de la temperatura sobre este proceso de inactivación resulta muy interesante, ya que su velocidad no disminuye al disminuir la temperatura, como ocurre con la mayoría de las reacciones químicas, sino que, por el contrario, se incrementa. Ello indica que la temperatura tiene un efecto adicional sobre la reactividad del grupo sulfhidrilo, lo que sólo puede llevarse a cabo mediante cambios, inducidos por la exposición a bajas temperaturas, del medio ambiente en que se encuentre ese grupo de manera que se afecta su pK.

Es pues lógico pensar que si las bajas temperaturas producen cambios en la estructura de la proteína por ruptura de enlaces hidrofóbicos, estos cambios pueden afectar la conformación del centro activo y por ello el pK de los grupos ionizables (5). De hecho, se conoce que PEPC es sensible a bajas temperaturas, las cuales producen la disociación de la enzima (96).

Todo esto sugiere que la disociación lleva aparejada una notable alteración del sitio activo, que conduce a la inactivación y al incremento de reactividad de al menos algunos de los grupos situados en este centro activo.

Un resultado sorprendente de este trabajo fue que los agentes reductores ditiotreitól y  $\beta$ -mercaptoetanol no pudiesen revertir la inactivación causada por los agentes bloqueantes del grupo sulfhidrilo que actúan formando un puente disulfuro con la enzima. A este respecto caben al menos tres explicaciones:

a) Los cambios conformacionales causados por el bloqueo de este grupo -SH son irreversibles, aún cuando se libere de nuevo el grupo reducido.

b) Estos cambios conformacionales exponen un puente disulfuro, que ahora resultaría accesible a la acción de los agentes reductores y cuya ruptura conlleva inactivación de la enzima.

c) Los agentes reductores de puentes disulfuro inactivan a la enzima al romper un puente disulfuro que es fácilmente accesible a estos reactivos incluso en la conformación nativa.

A pesar de que esta última posibilidad parece remota, dado que la mayoría de los puentes disulfuro en las proteínas tienen como función proporcionarles estabilidad y no son fácilmente atacables a no ser que se desnaturalize la proteína, decidimos probar estas posibilidades y para ello se llevaron a cabo incubaciones de la preparación enzimática con estos reactivos sin haber expuesto previamente a la enzima a los agentes específicos de grupos sulfhidrilo. Se encontró que efectivamente los agentes reductores de grupos disulfuro se comportaban como inactivantes, aún cuando en menor proporción que los agentes bloqueantes de grupos sulfhidrilo.

En vista de estos resultados, parecería que la tercera de estas posibilidades apuntadas puede ser cierta. Sin embargo, nosotros pensamos que la segunda es probablemente la

correcta, dado que en nuestro laboratorio, bajo otras circunstancias que protegen la integridad de la estructura cuaternaria no habíamos observado este efecto inactivante.

Es muy probable que nuestras preparaciones enzimáticas consistieran en una mezcla de conforméromos de la enzima, uno(s) de ellos con el puente disulfuro expuesto y susceptible por tanto a su ruptura. Esta conclusión además tiene el apoyo adicional de:

1°) Nosotros y otros autores hemos probado que la enzima presenta histéresis (97,98), es decir que sufre reactivación durante el ensayo, lo que es motivado por la existencia de dos conforméromos interconvertibles con diferente actividad. Al parecer se trata de dímeros y tetrámeros, en diferente proporción dependiendo entre otros factores de las condiciones a las que la enzima haya sido expuesta. Así, frío produce dímeros, como se mencionó anteriormente, e igual efecto tiene el diluir la enzima.

Puesto que nuestra preparación enzimática había estado sometida a congelación, es muy probable que existiese una cierta proporción de dímeros, los cuales serían mucho más susceptibles a inactivación por ruptura del puente disulfuro que los tetrámeros.

2°) En gran parte de los tratamientos realizados para protección por ligandos frente a la inactivación por agentes bloqueantes del grupo -SH, se observó una reactivación de la enzima durante los minutos iniciales de la incubación. Esta reactivación es típica de un proceso de atemperamiento, resultante del cambio que sufre la enzima al pasar de temperaturas inferiores de cero a 20°C.

A nivel molecular este "atemperamiento" consiste en la reasociación parcial o total de los dímeros producidos por la congelación en tetrámeros activos. Por ello, en los experimentos que se hicieron a continuación con la enzima purificada, antes de empezar las incubaciones con el reactivo

se dejó atemperar la enzima por una hora, con el fin de obtener una preparación homogénea de tetrámeros.

3°) Es por tanto posible revertir el paso de dímero a tetrámero, por lo que la primera de las posibilidades apuntadas no parece muy probable. La capacidad de los ligandos para producir reactivación inicial está relacionada con su capacidad para unirse al sitio activo. Así sólo los complejos G6P-Mg, malato-Mg y PEP-Ca producen este fenómeno.

Ello estaría indicando de nuevo que el sitio activo completo, con capacidad de unir a sustratos o análogos de sustratos o productos, se encuentra únicamente en la forma tetramérica de la enzima, es decir la forma dimérica no podría unirla. Por ello la unión de estos ligandos desplaza el equilibrio preexistente Tetrámero  $\longrightarrow$  2 Dímeros hacia los tetrámeros reactivando a la enzima.

Las condiciones anteriores son pertinentes para explicar por qué no pudimos obtener enzima activa en el pegado a una columna de tiolsefarosa que funciona uniendo a la proteína por sus grupos -SH libres. El despegado de esta columna forzosamente ha de hacerse rompiendo el puente disulfuro que se formó entre la resina y la proteína, puente disulfuro que al formarse probablemente indujo a disociación y por tanto a exposición de los propios de la proteína, que ahora serían atacados por el agente reductor usado para eluir a la enzima.

Con respecto a la protección por ligandos nuestros resultados indican que el efecto que los diferentes ligandos probados en este estudio tienen sobre el proceso de inactivación está claramente relacionado con su capacidad de unirse al sitio activo de la enzima. Si bien el efecto protector de un ligando puede ser debido al cambio conformacional que produzca al unirse a un sitio alostérico, no parece ser este el caso de los estudiados aquí, con la excepción quizás de glicina.

Glicina un activador alostérico de PEPC, no afecta la inactivación por modificación de los grupos sulfhidrilo, ni induce reactivación de la enzima lo que sugiere que, al igual que con los otros ligandos ya discutidos, su unión al sitio alostérico y el cambio conformacional aparejado no altera los grupos sulfhidrilos del sitio activo. Hay que mencionar que este ligando no posee la capacidad de unirse al sitio activo (36,99).

Glicerol no es ni un efector alostérico, ni se une al sitio activo de la enzima. Su presencia en el medio de incubación produce, sin embargo, protección frente a la inactivación, lo que muy probablemente ocurra debido a su conocido efecto de facilitar la reasociación o evitar la disociación de proteínas oligoméricas (36).

Los metales divalentes  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$  por sí solos no protegen a la enzima, lo que puede deberse a su baja afinidad por la enzima libre o a que su lugar de unión en el sitio activo de la molécula esté alejado del o los grupo(s) sulfhidrilo.

El activador G6P no modifica la inactivación por sí mismo cuando se está uniendo al sitio alostérico, unión que se sabe no requiere de un ión metálico ( $Mg^{+2}$ ). En cambio este ligando sí protege significativamente cuando se usa conjuntamente con  $Mg^{+2}$ , lo que está indicando que bajo estas condiciones puede unirse al sitio activo, en un lugar muy cercano al grupo sulfhidrilo o incluso a este mismo grupo.

Igual puede decirse del inhibidor malato, quien por sí mismo no tiene ningún efecto mientras que unido a  $Mg^{+2}$  protege notablemente. De nuevo, la unión al sitio alostérico no afecta al grupo, mientras que la unión al sitio activo sí lo hace.

Curiosamente en presencia de estos dos ligandos y  $Mg^{+2}$ .



no se puede apreciar más que una fase de inactivación. Una explicación a este hecho puede ser que su unión a la enzima permite o favorece la reasociación de los dímeros en tetrameros (como puede comprobarse por la aparición de una corta fase de reactivación) enmascarando así la primera fase lo que contraresta e incluso supera las pérdidas de actividad iniciales.

El efecto del sustrato PEP resultó sumamente interesante. En ausencia del metal, este ligando no sólo no protege sino que incluso acelera la inactivación mientras que en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  ofrece una protección casi total. En este caso se usó  $\text{Ca}^{+2}$  en lugar de  $\text{Mg}^{+2}$  para evitar el consumo de PEP durante la incubación, ya que la afinidad de la enzima PEP por  $\text{HCO}_3^-$  es tan grande que puede realizar catálisis a velocidades no despreciables a la concentración de este ión que se encuentra normalmente disuelto en el agua por difusión del  $\text{CO}_2$  atmosférico. Se sabe que  $\text{Ca}^{+2}$  se une al sitio activo compitiendo con  $\text{Mg}^{+2}$  (94) y es por ello que el complejo PEP-Ca es reconocido por la enzima como sustrato, aun cuando no se pueda llevar a cabo la catálisis.

Por tanto, se obtuvo evidencia adicional de que el grupo -SH o bien se encuentra muy próximo al lugar de unión del sustrato o bien está involucrado en la unión de este, lo que concuerda con los estudios de dependencia de pH de la unión del sustrato mencionadas anteriormente.

El hallazgo de que PEP acelera la inactivación no sólo cuando se usa como agente inactivante un reactivo específico de grupos sulfhidrilo, sino también cuando se usa como tal un agente reductor de puentes disulfuro, parece indicar que la unión de este ligando a su sitio alostérico, que no requiere de  $\text{Mg}^{+2}$  (28,95), o su unión al sitio activo, que a las concentraciones usadas podría ocurrir incluso en ausencia de  $\text{Mg}^{+2}$ , de alguna manera desprotege al grupo sulfhidrilo o al puente disulfuro.

Quisimos profundizar en este efecto de PEP libre y para ello se hicieron estudios con la enzima purificada, tomando ahora la precaución de atemperar la enzima con el fin de poder detectar las dos fases de inactivación incluso en presencia del ligando.

Quedaba por determinar en forma concluyente si el sitio de unión de PEP libre que estábamos detectando era el sitio alostérico o el sitio activo de la enzima.

La respuesta a esta pregunta puede arrojar bastante luz sobre el mecanismo de la reacción catalizada por PEPC, ya que se sabe que PEP libre incrementa la constante catalítica de la reacción (28) y este efecto podría estarlo llevando a cabo precisamente mediante la reordenación de grupos catalíticos en el sitio activo que estamos detectando en este estudio.

Si por el contrario, PEP libre se estuviera uniendo al sitio activo, es probable que este efecto sobre la enzima no tenga implicaciones, dado que bajo condiciones de catálisis, es decir en presencia del complejo PEP-Mg la unión de PEP libre al sitio activo debe ser prácticamente despreciable. Por ello, los experimentos siguientes se hicieron en presencia de bajas concentraciones de  $Mg^{+2}$  y altas de PEP libre, de manera que el consumo de este ligando durante el transcurso de la incubación no afecte en forma notable su concentración, y que tuviésemos una concentración del complejo PEP-Mg suficiente para evitar la unión de PEP libre al sitio activo de la enzima.

Los resultados confirmaron aquellos obtenidos con la enzima parcialmente purificada: PEP libre acelera el proceso de inactivación o lo que es lo mismo, incrementa la reactividad de los grupos sulfhidrilo en forma dependiente de su concentración.

El mecanismo por el cual produce este incremento de reactividad es desconocido hasta el momento; será interesante investigar en estudios posteriores, que escapen al alcance de

este trabajo, si la unión de PEP libre al sitio alostérico provoca la disociación de la enzima y sea ese el mecanismo por el que incrementa la reactividad de estos grupos, al igual que parecen hacer otros agentes disociantes, como discutíamos anteriormente.

Otra pregunta que surge de este trabajo es si PEP libre es un efector alostérico de la enzima de raíz o averiguar como responde la enzima de raíz frente a PEP libre. Es tentador hipotetizar que quizás a este nivel haya considerables y significativas diferencias entre la isoenzima anaplerótica y la fotosintética.

Aún cuando estamos concientes de que disponemos de pocos datos para obtener una respuesta inequívoca, quisimos aprovechar este efecto de PEP para determinar la constante de disociación de este ligando con su sitio de unión a la enzima. La  $K_s$  estimada está muy próxima al valor obtenido por otros métodos en nuestro laboratorio y en otros laboratorios (12) lo que nos hace confiar en su validez.

Finalmente es de destacar que la incubación de la enzima sólo con PEP libre (en ausencia de ningún agente específico de grupos sulfhidrilo o puentes disulfuro), produjo una notable inactivación, proceso que, de nuevo, fue bifásico. Resulta lógico pensar que si PEP libre incrementa la reactividad de los grupos sulfhidrilo, facilite la oxidación de estos por el  $O_2$  del aire, provocando así un proceso de inactivación similar al observado en presencia de reactivos específicos de estos grupos. De nuevo esta inactivación se incrementa al aumentar la concentración de PEP libre en el medio de incubación.

## 7. CONCLUSIONES.

1).- Tanto la isoenzima fotosintética de fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja como la isoenzima anaplerótica de raíz poseen en su forma nativa grupos sulfhidrilo y puentes disulfuro esenciales para su actividad y/o su estabilidad.

2).- La modificación de estos grupos parece llevar aparejada la disociación de la molécula tetramérica en dímeros y monómeros.

3).- La reactividad de estos grupos con los reactivos específicos de ellos se incrementa bajo condiciones que provocan la disociación de la enzima lo que sugiere que la disociación conlleva una alteración de la estructura del sitio activo que conduce a una mayor exposición al medio de estos grupos.

4).- La explicación más sencilla a nuestros resultados, sería que, los grupos -SH se encuentran muy cerca del sitio activo o en el sitio activo, ya que ligandos que se puedan unir al sitio activo protegen de las reacciones de inactivación por reactivos específicos de grupos sulfhidrilo.

5).- Se refuerza la hipótesis de que el sitio catalítico reconoce a ligandos que están acomplejados con un metal divalente, teniendo la mayor afinidad por los complejos de fosfoenolpiruvato. El metal libre no parece unirse a la enzima.

6).- Fosfoenolpiruvato libre al unirse al sitio alostérico de la enzima induce un cambio conformacional que incrementa la reactividad de los grupos sulfhidrilo por un mecanismo aún desconocido.

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Andreo, C.S., Iglesias, A.A., Podestá, F.E. and Wagner, R. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 870: 292-301.
- 2.- Bandurski, R.S. and Greiner, C.M. (1953) *J. Biol. Chem.* 204:781-786.
- 3.- Bandurski, R.S. (1955) *J. Biol. Chem.* 217:137-150.
- 4.- Coombs, J., Baldry, C.W. and Bucke, C. (1973) *Planta* 110: 95-107.
- 5.- Frieden, C. (1989) *Trends Biochem Sc.* 14:283-286.
- 6.- Gavalas, N.A. and Manetas, Y. (1980) *Z. Pflanzenphysiol.* 100:179-184.
- 7.- González, D.H., Iglesias, A.A. and Andreo, C.S. (1984) *J. Plant Physiol.* 116:425-434.
- 8.- Hague, D.R., Sims, T.L. (1980) *Plant Physiol.* 66:505-509.
- 9.- Hatch, M.D., Oliver, I.R. (1978) *Aust. J. Plant Physiol.* 5:571-580.
- 10.- Hayakawa, S., Matsunaga, K., Sugiyama, T. (1981) *Plant Physiol.* 67:133-138.
- 11.- Huber, S.C. y Edwards, G.E. (1975) *Can. J. Bot.* 53:1925-1933.
- 12.- Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. (1983) *Biochem. Biophys. Acta* 749:9-17.
- 13.- Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. (1984) *Photosynthetica* 18:134-138.
- 14.- Igesias, A.A., González, D.H. y Andreo, C.S. (1986) *Planta* 168:239-244.
- 15.- Jiao, J.A. y Chollet, R. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 261:409-417.
- 16.- Jones, R., Wilkins, M.B., Coggins, J.R., Fewson, C.A. y Malcom, A.D.B. (1978) *Biochem. J.* 175:391-406.
- 17.- Latzko, E. y Kelly, G.J. (1983) *Physiol. Vég.* 21:805-815.
- 18.- Manetas, Y. y Gavalas, N.A. (1982) *Photosynthetica* 16(1):59-66.
- 19.- Maruyama, H., Lane, M.D. (1962) *Biochim. Biophys. Acta*

65:207-218.

20.- Mc. Naughton, G.A.L., Fewson, C.A., Wilkins, M.B. y Nimmo, H.G. (1989) *Biochem. J.* 261:349-355.

21.- Miller, R.S., Mildvan, A.S., Chang, H.C., Easterday, R.L., Maruyama, H., Lane, M.D. (1968) *J. Biol. Chem.* 243:6030-6040.

22.- Miziorko, H.M., Nowark, T., Mildvan, A.S. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 163:378-389.

23.- Nimmo, G.A., Mc. Naughton, G.A.L., Fewson, I.D., Wilkins, M.B. y Nimmo, H.G. (1987) *FEBS Lett.* 213:18-22.

24.- O'Leary, M.H., Rife, J.E. y Slater, J.D. (1981) *Biochemistry* 20:7308-7314.

25.- O'Leary, M.H. (1982) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33:297-315.

26.- Podestá, F.E. y Andreo, C.S. (1989) *Plant Physiol.* 90:427-433.

27.- Roberts, J.K.M., Ray, P.M., Wade-Jardetzky, N. y Jardetzky, O. (1980) *Nature* 283:870-872.

28.- Rodríguez-Sotres, R. y Muñoz Clares, R.A. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 276:180-190.

29.- Selinoti, E., Nikolopoulos, D., y Manetas, Y. (1987) *Aust. J. Plant Physiol.* 14:203-210.

30.- Smith, T.E. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 125:178-188.

31.- Stiborová, M., Leblová, S. (1983) *Physiol. Vég.* 21(5):935-942.

32.- Stiborová, M. y Leblová, S. (1986) *FEBS Lett.* 205:32-34.

33.- Stiborová, M. y Leblová, S. (1987) *Biochem. Physiol. Pflanz.* 182:417-424.

34.- Tchen, T.T., Vennesland, B. (1955) *J. Biol. Chem.* 213:533-546.

35.- Ting, I.P., Osmond, C.B. (1973) *Plant Physiol.* 51:448-453.

36.- Uedan, K. y Sugiyama, T. (1976) *Plant Physiol.* 59:906-910.

37.- Vennesland, B., Tchen, T.T., Loewus, F.A. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* 76:3358-3359.

- 38.- Wagner, R., González, D.H., Podestá, F.E. y Andreo, C.S. (1986) Proc. VII Int. Congr. Photosynth.
- 39.- Wagner, R., González, D.H., Podestá, F.E. y Andreo, C.S. (1987) Eur. J. Biochem, 164:661-666.
- 40.- Wagner, R., González, D.H., Podestá, F.E. y Andreo, C.S. (1988) Eur. J. Biochem. 173:561-568.
- 41.- Walker, G.H., Ku, M.S.B. y Edwards, G.E. (1986-a) J. Liq. Chromatogr. 9:861-874.
- 42.-Walker, G.H., Ku, M.S.B. y Edwards, G.E. (1986-b) plant Physiol. 80:848-855.
- 43.- Wedding, R.T., Rustin, P., Meyer, C.R. y Black, M. (1988) Plant Physiol. 88:976-979.
- 44.- Edwards, G.E., Ku, M.S.B. y Monson, R.K. (1985) en Topics in photosynthesis, photosynthetic mechanisms and the enviroment (Barber, J. y Baker, N.R. eds.) pp. 287-327. Elsevier, Amsterdam, New York.
- 45.- Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254.
- 46.- Wu, M.X., y Wedding, R.T. (1985) Arch. Biochem. Biophys. 240:655-662.
- 47.- Podestá, F.E., Iglesias, A.A., Andreo, C.S. (1990) Photosynthesis Research 26:161-170.
- 48.- Huggins, C.B., Tupley, D.F. y Jensen, E.V. (1951) Nature 167:592.
- 49.- Klotz, I.M., Urquhart, J.M., Klotz, T.A. y Ayers, J. (1955) Am. Chem. Soc. 77:1919.
- 50.- Sanger, F. (1949) Biochem. J. 44:126.
- 51.- Mujerki, S.K. (1977) Biochem. Biophys. 182:352-359.
- 52.- Koshland, D.E., Jr. y Nett, K.E. (1968) Ann. Rev. Biochem. 37:359.
- 53.- Eigen, M. y Hammes, G.G. (1963) Advan. Enzymol. 25:1.
- 54.- Hammes, G.G. (1968) Accounts Chem. Res. 1:321.
- 55.- Ivanov, V.I. y Karpeisky M. Ya (1969) Advan. Enzymol. 32:21.
- 56.- Laemmlli, U.K. (1970) Nature 227:680.
- 57.- Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. (1984) Plant Physiol. 75:983-987.

- 58.- Izui, K., Sugiyama, T. y Katzuki, H. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14(4):1615-1629.
- 59.- Yanagisawa, S. Izui, K., Yamaguchi, Y., Shegisada, K. y Katsuki, H. (1988) *FEBS Lett.* 229(1):107-110.
- 60.- Kiick, D.M., Allen, B.L., J.G.S., Harris, B.G. y Cook, P.F. (1984) *Biochem.* 23:5454-5459.
- 61.- Creighton, E.T. (1984) *Protein structures and molecular principles.* Cap. I. pp.1-60.
- 62.- Sigman, D. S. y Mooser, G. (1975) *Ann. Rev. Biochem.* 44:889-931.
- 63.- Stiborová, M. (1988) *Photosyntetica* 22:240-263.
- 64.- Cretin, C., Keyer, E., Tagu, D., Lepiniec, I., Vidal, J. y Gadal, P. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18(3):658.
- 65.- Cushman, J.C. y Bonhert, H.J. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17(16):6743-6744.
- 66.- Cushman, J.C. y Bonhert, H.J. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17(16):6745-6746.
- 67.- Kawamura, T., Shigisada, K., Yanagisawa, S. y Izui, K. (1990) *J. Biochem.* 107:165-168.
- 68.- Andreo, C.S., González, D.H. e Iglesias, A.A. (1987) *FEBS Lett.* 213(1):1-8.
- 69.- González, D.H., Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 245(1):179-186.
- 70.- Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. (1984) *Photosyn. Res.* 5:215-226.
- 71.- Wedding, R.T., Black, M.K. y Meyer, C.R. (1989) *Plant Physiol.* 90:648-652.
- 72.- Iglesias, A.A., González, D.H. y Andreo, C.S. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 788:41-47.
- 73.- Meyer, C.R., Rustin, P. y Wedding, R.T. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 271(1):84-97.
- 74.- Rustin, P., Meyer, C.R. y Wedding, R.T. (1988) *Biol. Chem.* 263(33):17611-17614.
- 75.- Wu, M.X., Zha, J.J. y Shi, J.N. (1981) *Acta Phytophysiol. Sin.* 7(1):33-41.
- 76.- Podestá, E., Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. (1986) *Arch.*



- Biochem. Biophys. 246:546-553.
- 77.- Maruyama, H., Easterday, R.L., Chang, H.C. y Lane, M.D. (1966) J. Biol. Chem. 241(10):2405-2412.
- 78.- Stiborová, M. y Leblová, S. (1985) Photosynthetica 19(2):177-182.
- 79.- Wedding, R.T., Black, M.K. y Meyer, C.R. (1990) Plant Physiol. 92:456-461.
- 80.- Cornish-Bowden A. (1979) Fundamental of Enzyme Kinetics (Butterworth, eds.) pp 94-96.
- 81.- Cornish-Bowden A. (1979) Fundamental of Enzyme Kinetics (Butterworth, eds.) pp 1-9.
- 82.- Chen, R.F. (1967) Journal Biochemistry 242:173-181.
- 83.- Hartree, E.F. (1972) Analytical Biochemistry 48:422-527.
- 84.- Buchanann, B.B. (1980) Ann. Rev. Plant Physiol. 31:341-374.
- 85.- Buchanann, B.B., Wolosiuk, R.A. y Schurmann, P. (1979) Trends Biochem. Sci. 4:93-96.
- 86.- Wolosiuk, R.A. y Buchanann, B.B. (1978) Plant Physiol 61:669-671.
- 87.- Wolosiuk, R.A., Buchanann, B.B. y Crawford, N.A. (1971) FEBS Lett. 81(2): 253-258.
- 88.- Edwards, G.E., Nakamoto, H., Burnell, J.N. y Hatch, M.D. (1985) Ann. Rev. Plant Physiol. 36:255-286.
- 89.- Leegood, R.C. y Walker, P.A. (1982) Planta 156:449-456.
- 90.- Nishizawa, A.N. y Buchanann, B.B. (1981) J. Biol. Chem. 256(12): 6119-6126.
- 91.- Kagawa, T. y Hatch, M.D. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 184:290-297.
- 92.- Segel, I.H. (1975) Enzyme Kinetics. pp.18-99.
- 93.- Rodríguez-Sotres, R. (1990) Tesis doctoral. UNAM.
- 94.- Manchester, K.L. (1980) Biochim. Biophys. Acta 630:225-231.
- 95.- Rodríguez-Sotres R., Rodríguez, P.M. y Muñoz-Clares R.A. J. Plant Physiol. Sometido a publicación.
- 96.- Selinioti, E., Manetas, Y. y Gavalas, N.A. (1986) Plant Physiol. 82:518-522.

- 97.- López-Pozos, R. (1987) Tesis de licenciatura. UNAM.
- 98.- Jawali, N. (1990) Arch. Biochem. Biophys. 277(1): 69-73.
- 99.- Nishikido, T. y Takonashi, H. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 53: 126-133.
- 100.- Vazqu ez-Tineo, M. (1988) Tesis de maestría. UNAM.