T 577.1 C336
D 5512
F 5.7.99

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

CENTRO DE ESTUDIOS FOTOSINTÉTICOS Y BIOQUÍMICOS

CEFOBI

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
U.N.R.

ESTUDIOS SOBRE LA EXPRESIÓN Y ESTRUCTURA DE LA ENZIMA MÁLICA NADP DEPENDIENTE DE PLANTAS CON DISTINTOS METABOLISMOS FOTOSINTÉTICOS

PAULA CASATI

Tesis para optar al título de Doctor

Director: Dr. Carlos S. Andreo

Rosario **1998** **Argentina**

QC

A mi familia,

a Tato.

AGRADECIMIENTOS:

Quisiera agradecer al Prof. Dr. Carlos Santiago Andreo, el haberme dirigido en esta Tesis y por haber confiado en mi capacidad para llevar a cabo todo este trabajo.

También quisiera agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, gracias al cual pude desarrollar con dedicación exclusiva este trabajo de Tesis, a través del otorgamiento de dos Becas (Iniciación 1995-1997 y Perfeccionamiento 1997-1999), así como también al Dr. Rubén H. Vallejos, Director del Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos, lugar donde llevé a cabo mi trabajo de investigación.

Al Dr. Gerry Edwards, quien me permitió realizar en su laboratorio parte de los experimentos que se describen en esta Tesis y con quien analicé y discutí muchos de mis resultados.

A mis compañeros de laboratorio, que siempre estuvieron cuando los necesité y con los que compartí alegrías y tristezas desde que comencé mi Tesina y durante los años de mi doctorado.

Al la Dra. Fabiana Drincovich y a la Dra. Claudia Spampinato, con quienes realicé algunos de los experimentos descriptos en esta Tesis, y a la Dra. Verónica Maurino, con quien di mis primeros pasos en la investigación. A las Dras. Fabiana Drincovich y Verónica Maurino, por su revisión crítica y ayuda en la corrección del manuscrito de esta Tesis.

A mis amigas, especialmente a Ile y a Mariela, y a todos mis compañeros de la Licenciatura, que me acompañaron en buenos y no tan buenos momentos.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo Doctoral fueron dados a conocer en distintas Publicaciones y Presentaciones en Congresos Científicos Nacionales e Internacionales, como se detalla a continuación:

PUBLICACIONES:

- María F. Drincovich, Verónica.G. Maurino, Paula Casati, Carlos S. Andreo, Maurice S. B. Ku, Sanjay K. Gupta, Gerald E. Edwards, Nathan Tarlyin y Vincent R. Franceschi.

  "NADP-malic enzyme: Immunolocalization in different tissues of C_3 and C_4 plants".

  Photosynthesis: from Light to Biosphere (1995) vol. V, 325-328. (P. Mathis, ed.). Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

- Verónica G. Maurino, María F. Drincovich, Paula Casati, Carlos S. Andreo, Maurice S. B. Ku, Sanjay K. Gupta, Gerald E. Edwards, Vincent R. Franceschi.

  "NADP-Malic enzyme: Immunolocalization in different tissues of the C_4 plant maize and the C_3 plant wheat."

  J. Expt. Bot. (1997) 48, 799-811.

- Paula Casati, Claudia P. Spampinato y Carlos S. Andreo.

  "Characteristics and physiological function of NADP-malic enzyme from wheat".

Plant Cell Physiol. (1997) 38, 928-934.

- María F. Drincovich, Paula Casati, Carlos S. Andreo, Raymon Donahue y Gerald E. Edwards.

  "UV-B induction of NADP-malic enzyme in etiolated and green maize seedlings".

  Plant Cell Environ. (1997) 21, 63-70.

- Claudia P. Spampinato, Paula Casati y Carlos S. Andreo.

  "Factors affecting the oligomeric state of NADP-ME from wheat and maize tissues: A chemical crosslinking study".

  Biochem. Biophys. Acta (1998) 1383, 245-252.

- Maria F. Drincovich, Paula Casati, Carlos S. Andreo, Saul J. Chessin, Vincent R. Franceschi, Gerald E. Edwards, Maurice S. B. Ku.

  "Evolution of C_4 photosynthesis in *Flaveria*: NADP-malic enzyme as a molecular marker".

  Plant Physiol. (1998) 117, 733-744.

- Paula Casati, María F. Drincovich, Carlos S. Andreo, Raymon Donahue y Gerald E. Edwards.

  "UV-B, red and far red light regulate induction of the C_4 isoform of NADP-malic enzyme in etiolated maize seedlings".

  Aust. J. Plant Physiol. (1998) en prensa.

PRESENTACIONES A CONGRESOS:

- XXI Reunión de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal. Mendoza, 20-22 de marzo de 1996.

  Paula Casati, Claudia P. Spampinato, María L. Falcone y Carlos S. Andreo.

  "Propiedades cinéticas y estructurales de la enzima málica dependiente de NADP de trigo".

- VII Congreso de la Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB) . Pucón, Chile, 16-21 de Noviembre de 1996.

  Paula Casati, Claudia P. Spampinato y Carlos S. Andreo.

  "Possible physiological role of NADP-malic enzyme from wheat".

- Information Processing Systems in Plant: Their Evolution & Function. University of California Davis, 21-25 de Marzo, 1997.

  Raymon A. Donahue, Gerald E. Edwards, Paula Casati, María F. Drincovich y Carlos S. Andreo.

  "Light mediated induction of NADP-malic enzyme activity in maize seedlings by UV-B and white light".

- Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists. Vancouver, Canadá, 2-6 Agosto 1997.

  Carlos S. Andreo, Paula Casati, María F. Drincovich, Saul J. Chessin, Vincent Franceschi, Gerald E. Edwards y Maurice S. B. Ku.

  "Evolution of C_4 photosynthesis in *Flaveria*. NADP-malic enzyme as a molecular marker".

- XXXIIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. 11-14 de Noviembre de 1997.

  María F. Drincovich, Paula Casati, Carlos S. Andreo, Vincent Franceschi, Gerald E. Edwards y Maurice S. B. Ku.

  "La enzima málica NADP-dependiente como marcador evolutivo de la fotosíntesis C_4 en el género *Flaveria*".

- XXXIIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. 11-14 de Noviembre de 1997.

  Paula Casati, Analia G. Fresco, María F. Drincovich y Carlos S. Andreo.

  "Purificación y caracterización de la enzima málica NADP-dependiente de *Flaveria floridana*".

- XXXIIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. 11-14 de Noviembre de 1997.

  Claudia P. Spampinato, Paula Casati y Carlos S. Andreo.

  "Factores que afectan el estado oligomérico de la enzima málica dependiente de NADP de tejidos de maíz (C_4) y de trigo (C_3)".

- XI th International Photosynthesis Congress, Budapest, Hungría, 17-22 Agosto 1998

  Carlos S. Andreo, Paula Casati, Analia Fresco y María F. Drincovich.

  "NADP-malic enzyme from the C_3-C_4 intermediate specie *Flaveria floridana*".

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS....3
PUBLICACIONES....4
PRESENTACIONES A CONGRESOS....6
ÍNDICE....8
ÍNDICE DE FIGURAS....12
ÍNDICE DE TABLAS....14
ABREVIATURAS....15
1. INTRODUCCIÓN:....18
1.1. La fotosíntesis....18
1.1.1. Consideraciones generales....18
1.1.2. Fase luminosa....21
1.1.3. Fase sintética: Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato....24
1.1.4. Regulación del CRPP....27
1.1.5. La fotorespiración....28
1.1.6. Fijación del carbono por plantas C_4 y CAM....31
1.1.6.1. Consideraciones generales del metabolismo C_4....32
1.1.6.2. Anatomía Kranz....33
1.1.6.3. Variaciones del sistema C_4....34
1.1.6.4. Regulación del metabolismo C_4....38
1.1.6.5. Desarrollo de la fotosíntesis C_4. Regulación genética....39
1.1.7. Plantas C_3-C_4....43
1.1.8. Plantas CAM....45
1.1.9. Características diferenciales entre plantas C_3, C_4 y CAM....46
1.2. Enzima málica NADP dependiente (EM-NADP)....48
1.2.1. Aspectos generales....48
1.2.2. Distribución y localización....49
1.2.3. Funciones....50
1.2.4. Propiedades físicas....52
1.2.5. Propiedades cinéticas....53
1.2.6. Sitio activo....54
1.2.7. Mecanismo de catálisis....55
1.2.8. Estructura primaria y análisis de secuencias....56
1.2.9. Regulación....59
1.9. Objetivos de la presente tesis....60

2. MATERIALES Y MÉTODOS:.....61
2.1. Material vegetal.....61
2.2. Tratamiento de las plantas.....62
2.3. Preparación de extractos crudos.....63
2.4. Purificación de la EM-NADP.....64
2.4.1. A partir de hojas verdes de maíz.....64
2.4.2. A partir de tallos y raíces de trigo.....66
2.4.3. A partir de hojas de *Flaveria floridana*.....67
2.5. Ensayos de actividad enzimática.....67
2.6. Estudios cinéticos.....68
2.7. Determinación de proteínas.....69
2.8. Determinación de clorofila.....70
2.9. Preparación de anticuerpos.....70
2.9.1. Inmunización y obtención del suero.....70
2.9.2. Purificación de los anticuerpos a través del suero.....71
2.10. Electroforesis.....72
2.10.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.....72
2.10.2. Electroforesis en condiciones nativas.....73
2.10.3. Isoelectroenfoque en condiciones nativas.....73
2.10.4. Análisis por Western blot.....74
2.11. Centrifugación en gradiente de sacarosa.....75
2.12. Estudios de entrecruzamiento de la EM-NADP purificada de maíz y de trigo.....75
2.12.1. Asociación y disociación de las subunidades enzimáticas.....75
2.12.2. Entrecruzamiento químico.....76
2.12.3. Cuantificación de cada forma enzimática a partir de los geles de poliacrilamida.....77
2.12.4. Cálculo de las constantes de disociación.....78
2.13. Transformación de E. coli con ADN plasmídico.....78
2.14. Obtención de ADN plasmídico.....79
2.15. Purificación de los fragmentos de ADN.....80
2.16. Preparación de la sonda radioactiva.....81
2.17. Dot blot de ARN total.....82
2.17.1. Extracción de ARN total.....82
2.17.2. Dot blot de ARN total.....83
2.17.3. Hibridación de la membrana con la sonda radioactiva.....83

2.18. Localización in situ de la EM-NADP utilizando la técnica de detección inmuno-oro.....84
2.18.1. Preparación de las muestras para microscopía óptica y marcado con oro coloidal.....84
2.18.2. Preparación de las muestras para microscopía electrónica de transmisión y marcado con oro coloidal.....85
2.19. Localización de la EM-NADP en protoplastos de células mesofílicas y de la vaina vascular de Flaveria floridana......86
3. CARACTERÍSTICAS Y FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LA ENZIMA MÁLICA DEPENDIENTE DE NADP DE TRIGO.....88
3.1. Introducción.....88
3.2.Resultados.....89
3.2.1. Propiedades físicas de la EM-NADP de trigo.....89
3.2.2. Propiedades cinéticas de la enzima málica purificada de tallos de trigo.....93
3.2.2.1.Efecto del pH y la temperatura.....93
3.2.2.2. Cationes divalentes.....94
3.2.2.3. NADP y L-malato.....96
3.2.3. Función fisiológica.....99
3.3. Discusión.....102
4. FACTORES QUE AFECTAN EL ESTADO OLIGOMÉRICO DE LA ENZIMA MÁLICA DEPENDIENTE DE NADP DE TEJIDOS DE MAÍZ Y DE TRIGO.....107
4.1. Introducción.....107
4.2. Resultados.....109
4.2.1. Efecto del pH sobre el estado de agregación de la EM-NADP de maíz y de trigo.....109
4.2.2. Efecto de la temperatura sobre la disociación de la EM-NADP.....114
4.2.3. Efecto de la presencia de distintos metabolitos.....116
4.3.Discusión.....119
5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA MÁLICA DEPENDIENTE DE NADP DE PLÁNTULAS ETIOLADAS Y VERDES DE MAÍZ POR RADIACIÓN UV-B, LUZ ROJA Y ROJA LEJANA.....123
5.1. Introducción.....123
5.2. Resultados.....128
5.2.1. Inducción de la enzima málica dependiente de NADP de plántulas etioladas y verdes de maíz por UV-B.....128
5.2.2. Regulación de la expresión de la isoforma C_4 de la enzima málica dependiente de NADP en plántulas etioladas de maíz por radiación UV-B, roja y roja lejana.....141

5.3. Discusión 154
5.3.1. Inducción de la EM-NADP de maíz por radiación UV-B 154
5.3.2. Regulación de la expresión de la EM-NADP C_4 de maíz por radiación UV-B, roja y roja lejana 155
6. ISOFORMAS DE LA ENZIMA MÁLICA DEPENDIENTE DE NADP EN *Flaveria* 160
6.1. Introducción 160
6.2. Resultados 162
6.2.1. Isoformas de la EM-NADP en hojas de distintas especies de *Flaveria* 162
6.2.1.1. Actividad de EM-NADP en hojas de distintas especies de *Flaveria* 162
6.2.1.2. Separación de la EM-NADP por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa 163
6.2.1.3. Análisis por Western blot de la EM-NADP en diferentes especies de *Flaveria*. 166
6.2.1.4. Patrón de isoformas de la EM-NADP por isoelectroenfoque 171
6.2.1.5. Estudios de inmunolocalización 173
6.2.2. Purificación y caracterización de una EM-NADP de *Flaveria floridana*, una especie con metabolismo intermedio C_3-C_4 177
6.2.2.1. Localización de las isoformas de la EM-NADP en protoplastos de células mesofílicas y de la vaina vascular. 177
6.2.2.2. Purificación de la forma C_4 de la EM-NADP de hojas de *F. floridana* 180
6.3. Discusión 183
6.3.1. Isoformas de la EM-NADP en *Flaveria* e inmunolocalización 183
6.3.1.1. Especies C_4 y C_3 183
6.3.1.2. Especies C_3-C_4 186
6.3.1.1. Especies similares a C_4 187
6.3.2. Isoformas y familia génica de la EM-NADP en *Flaveria* 187
6.3.3. Purificación y caracterización de la EM-NADP en *F. floridana*, una especie intermedia C_3-C_4 189
7. RESUMEN 193
8. REFERENCIAS 198

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de la fotosíntesis 21

Figura 2: Transporte de electrones y transferencia de protones en la membrana tilacoidal 23

Figura 3: Representación esquemática del Ciclo Reductivo de la Pentosas Fosfato 26

Figura 4: Las reacciones catalizadas por la Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) 29

Figura 5: El Ciclo Fotosintético Oxidativo 31

Figura 6: Esquema simplificado de la separación espacial entre la etapa carboxilativa y decarboxilativa y el CRPP en las plantas C_4 33

Figura 7: Representación esquemática del metabolismo de fijación del CO_2 en los tres subgrupos de plantas C_4 37

Figura 8: Modelo para explicar el establecimiento del patrón de expresión de los genes C_4 42

Figura 9: Representación esquemática de la separación temporal entre la etapa carboxilativa y la etapa decarboxilativa y ciclo de Calvin en las plantas CAM 45

Figura 10: Mecanismo de reacción propuesto para la EM-NADP de maíz. 56

Figura 11: Isoelectroenfoque nativo en gel de poliacrilamida revelado para actividad de EM-NADP. 90

Figura 12: Gel de poliacrilamida desnaturalizante de la EM-NADP purificada de tallos y raíces de trigo y de hojas de maíz revelado con azul de Coomassie y por Western blot 91

Figura 13: Gel de poliacrilamida nativo revelado para actividad de EM-NADP con la enzima purificada de tallos de trigo y de hojas de maíz 92

Figura 14: Dependencia del pH sobre la actividad de la EM-NADP de trigo (A) y efecto de la temperatura (B) 94

Figura 15: Gráfico de Lineweaver-Burk de la actividad en función de la $[Mg^{2+}]$ (A) y $[Mn^{2+}]$ (B) 96

Figura 16: Efecto de la concentración de NADP sobre la actividad la enzima málica 97

Figura 17: Western Blot y densitometría de la EM-NADP de hojas de trigo luego de la inducción por distintos metabolitos 101

Figura 18: Distribución de los distintos estados oligoméricos de la EM-NADP de maíz a diferentes valores de pH 110

Figura 19: Variación de las constantes de equilibrio con el pH para la EM-NADP de maíz 112

Figura 20: Distribución de los distintos estados oligoméricos de la EM-NADP de trigo a diferentes valores de pH 114

Figura 21: Gráficos de van't Hoff para los equilibrios M-D y D-T de la EM-NADP de trigo 115

Figura 22: Gel de poliacrilamida desnaturalizante con la EM-NADP de maíz entrecruzada en la presencia de distintos metabolitos 117

Figura 23: Inducción por luz de la actividad de la EM-NADP en plántulas etioladas de maíz 131
Figura 24: Inducción lumínica del contenido de la EM-NADP en plántulas etioladas de maíz 133
Figura 25: Densitometría de las bandas de los Western blots de la figura 24. 135
Figura 26: Análisis por dot blot de ARN total luego del tratamiento bajo distintas condiciones lumínicas. 136
Figura 27: Efecto de la radiación UV-B y de la luz blanca en la actividad y contenido de la EM-NADP en hojas verdes de maíz. 138
Figura 28: Actividad de la EM-NADP de plántulas etioladas luego de la exposición bajo diferentes intensidades de UV-B durante 32 hs 140
Figura 29: Efecto de pulsos de UV-B en la inducción de la EM-NADP de 62 kDa en hojas etioladas de maíz. 145
Figura 30: Efecto de la dosis total de UV-B sobre el aumento en la actividad de la EM-NADP a tres intensidades de UV-B diferentes 148
Figura 31: Efecto de la exposición continua bajo radiación UV-B y luz roja sobre la inducción de la EM-NADP (A y B) y efecto de pulsos de luz roja lejana después de la exposición de las plantas bajo otros tratamientos lumínicos (C y D) 151
Figura 32: Resolución de las isoformas de la EM-NADP de especies representativas de los diferentes tipos fotosintéticos de *Flaveria* por centrifugación en gradiente de sacarosa 165
Figura 33: Western blot de las proteínas totales extraídas de distintas especies de *Flaveria* 168
Figura 34: Abundancia relativa de las tres isoformas monoméricas de la EM-NADP en los distintos tipos fotosintéticos de *Flaveria* 170
Figura 35: Isoelectroenfoque nativo revelado para actividad de EM-NADP de extractos de *F. pringlei* (C_3), *F. floridana* (C_3-C_4) y *F. trinervia* (C_4). 172
Figura 36: Microscopía óptica de la inmunolocalización in situ de la EM-NADP en hojas de *Flaveria* 175
Figura 37: Microscopía electrónica de la inmunolocalización in situ de la EM-NADP en hojas de *Flaveria* 176
Figura 38: Western blot de las fracciones obtenidas por digestión enzimática de la pared celular de hojas de *F. floridana* 179
Figura 39: Gel de poliacrilamida desnaturalizante de la EM-NADP purificada de hojas de F. floridana revelado con azul de Coomassie (A) y por Western blot (B) 181

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características diferenciales de los tres grupos mayoritarios de plantas 47

Tabla 2: Parámetros cinéticos de la EM-NADP de trigo utilizando Mg^{2+} o Mn^{2+} como cofactores 95

Tabla 3: Características de la EM-NADP de maíz (fotosintética y no fotosintética) y de trigo 98

Tabla 4: Efecto de distintos compuestos en la actividad de la EM-NADP de hojas de trigo 100

Tabla 5: Parámetros termodinámicos para los equilibrios T-D y D-M de la EM-NADP de maíz y de trigo a 25°C 116

Tabla 6: Efecto de la presencia de diferentes metabolitos sobre el estado oligomérico de la EM-NADP de maíz a pH 7,0 118

Tabla 7: Tratamientos lumínicos ensayados en las plántulas de maíz 129

Tabla 8: Características de las fuentes de luz utilizadas y calidad y cantidad de luz emitida 142

Tabla 9: Actividad específica de la EM-NADP de hojas etioladas de maíz luego de la exposición bajo pulsos de distinta duración de radiación UV-B 143

Tabla 10: Actividad específica de la EM-NADP luego de la exposición de plántulas etioladas de maíz bajo distintas dosis de radiación UV-B 147

Tabla 11: Actividad específica de la EM-NADP de hojas etioladas de maíz luego de la exposición bajo pulsos de luz UV-B, roja y roja lejana 150

Tabla 12: Actividad específica de la EM-NADP luego de la exposición de plántulas etioladas de maíz bajo diferentes tipos de radiación 153

Tabla 13: Actividad de EM-NADP, PEPC y MDH-NADP en las distintas fracciones 178

Tabla 14: Parámetros cinéticos de la EM-NADP de *F. floridana* utilizando Mg^{2+} o Mn^{2+} como cofactores 182

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina 5' trifosfato
BSA	Albúmina bovina sérica
CAM	Metabolismo Ácido de las Crassuláceas
CFO	Ciclo Fotosintético Oxidativo
Clf	Clorofila
CRPP	Ciclo reductivo de las pentosas fosfato
DEAE-celulosa	Dietil aminoetil celulosa
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EM-NADP	Enzima málica NADP dependiente (EC 1.1.1.40)
FAD	Flavina adenina dinucleótido
Fd	Ferredoxina
FPLC	Cromatografía rápida para proteínas en fase líquida
GSH	Glutatión reducido
K_D	Constante de disociación del dímero
K_m	Constante de Michaelis
K_T	Constante de disociación del tetrámero
LHC	Complejo colector de luz
MDH	Malato deshidrogenasa

MES	2-(N-morfolino) etano sulfónico
MOPS	3-(N-morfolino) propano sulfónico
NAD, NADH	Formas oxidada y reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido, respectivamente
NADP, NADPH	Formas oxidada y reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato, respectivamente
OAA	Oxaloacetato
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
PC	Plastocianina
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
Pfr, Pr	Formas del fitocromo
PM, PVV	Protoplastos mesofílicos y de la vaina vascular, respectivamente
Pi	Fosfato inorgánico
PPdK	Piruvato fosfato diquinasa
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
PQ	Plastoquinona
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RuBisCO	Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa
RuBP	Ribulosa 1,5-bisfosfato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	Tris buffer salino
Tricina	N-[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]glicina

Tris	N-tris-(hidroximetil)aminometano
UI	Unidad internacional
UV	Ultravioleta
$V_{máx}$	Velocidad máxima

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La fotosíntesis

1.1.1. Consideraciones generales

La tierra recibe en el orden de 3×10^{24} julios por año de energía radiante (1). La fotosíntesis que llevan a cabo ciertos organismos vivientes convierte parte de la energía solar en energía química, y ésta queda almacenada en compuestos orgánicos sintetizados a partir del dióxido de carbono. De esta forma, la fotosíntesis convierte un valor estimado de 120 Gton de carbono en compuestos orgánicos por año y constituye el paso inicial de la cadena trófica para la casi totalidad de los ecosistemas. Estas razones hacen a la fotosíntesis un tema de gran interés para su estudio (2).

La asimilación fotosintética del dióxido de carbono puede clasificarse, según se produzca o no oxígeno, en *fotosíntesis oxigénica*, característica de cianobacterias, algas y plantas superiores, y *fotosíntesis anoxigénica*, propia de ciertas bacterias (3). Los organismos del primer grupo presentan una vía común para la reducción del CO_2 a azúcares fosfato conocido como Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato (CRPP), mientras que el segundo grupo puede asimilar el CO_2 a

través del CRPP (4), mediante el ciclo reductivo de los ácidos tricarboxílicos (5), o a través de mecanismos aún no totalmente conocidos (3).

A pesar de estas diferencias, el proceso fotosintético global puede representarse por la ecuación propuesta por Van Niel (6):

$$2\,H_2A + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2\,A$$

donde H_2A representa el agente reductor.

La síntesis de carbohidratos se realiza utilizando energía solar a partir de dióxido de carbono y agua según la siguiente ecuación:

$$2\,H_2O + CO_2 \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + O_2$$

En plantas superiores, la fotosíntesis ocurre en los cloroplastos (Figura 1). Estas organelas presentan una envoltura de doble membrana: interna y externa (7). La membrana interna encierra una región acuosa denominada estroma, donde se localiza un sistema de membranas denominado membrana tilacoidal, la cual delimita un espacio interno conocido como lumen. Frecuentemente, la membrana tilacoidal está compuesta por vesículas apiladas en forma de sacos denominados grana.

La fotosíntesis se puede dividir en dos fases. Una *fase lumínica*, en la cual la energía electromagnética de la luz solar es captada por un sistema especializado de pigmentos en la membrana tilacoidal y convertida en ATP y NADPH, según la siguiente ecuación:

$$H_2O + NADP^+ + Pi + ADP \xrightarrow{h\nu} \frac{1}{2} O_2 + NADPH + H^+ + ATP$$

y una *fase de síntesis*, en la cual el ATP y NADPH generados en la fase anterior son utilizados en parte para la reducción biosintética del carbono en el estroma de los cloroplastos a través del CRPP. Esta fase se describe en forma global según la siguiente ecuación:

$$6\ CO_2 + 12\ NADPH + 12\ H_2O + 18\ ATP \longrightarrow 6\ (CH_2O) + 12\ NADP + 18\ ADP + 18\ P_i$$

En la mayoría de las plantas, los productos mayoritarios de la fotosíntesis son almidón y sacarosa (8). Estos productos, conocidos con el nombre genérico de fotosintatos, son formados a partir de triosas fosfato generadas fotosintéticamente, siguiendo una vía que presenta homologías con la vía gluconeogénica de las células animales. Para la síntesis del almidón, las triosas fosfato son convertidas a hexosas fosfato y luego a almidón dentro del cloroplasto, donde es almacenado. Para sintetizar sacarosa, las triosas fosfato son transportadas al citosol, donde tiene lugar la vía de síntesis de este compuesto. Este disacárido es el producto principal de exportación de carbono hacia los tejidos no fotosintéticos y por otra parte es uno de los azúcares de reserva más importante en las plantas (9, 10).

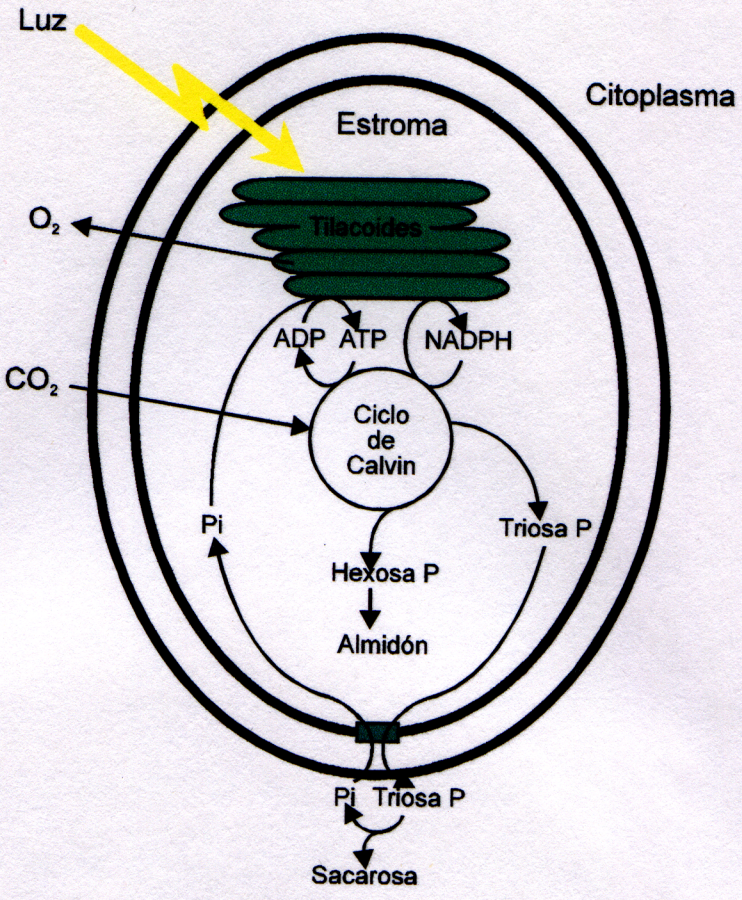


Figura 1. Representación esquemática de la fotosíntesis.

1.1.2. Fase Luminosa

El paso inicial de la fotosíntesis es la absorción de luz por los pigmentos fotosintéticos localizados en la membrana tilacoidal.

Existen tres clases generales de pigmentos fotosintéticos que incluyen las clorofilas (Clf), ficobilinas y carotenoides, los que se encuentran unidos a proteínas de la membrana tilacoidal. Se pueden reconocer tres tipos de complejos pigmentos-proteína: los centros de reacción del fotosistema I y fotosistema II y los complejos colectores de luz (LHC).

El centro de reacción del fotosistema I, llamado P700, es un complejo Clf a-proteína que absorbe a las longitudes de onda mayores (700 nm). El centro de reacción del fotosistema II, llamado P680, es también un complejo Clf *a*-proteína pero que absorbe a longitudes de onda menores (680 nm) (11). Los LHC contienen clorofilas accesorias (Clf *b* y Clf *c*), ficobilinas y carotenoides que absorben radiaciones de longitudes de onda distintas a las absorbidas por la Clf *a* y transfieren a ésta su energía. Cuando una molécula de Clf *a* del centro de reacción absorbe radiación, alcanza un estado excitado y se inicia la reacción fotoquímica por transferencia de un electrón a un aceptor primario (12). El centro de reacción retorna rápidamente a su estado original reduciéndose por un dador de electrones.

En el proceso global que involucra la transferencia de electrones desde el H_2O hasta el NADP, participan dos reacciones fotoquímicas conectadas en serie por una cadena de transportadores de electrones (11, 13, 14) (Figura 2). La absorción de un fotón de luz por el P680 resulta en la transferencia de un electrón a una molécula de feofitina. El P680 retorna a su estado basal por un dador primario de electrones, Z, que es una cadena lateral de tirosina de la proteína D1 del centro de reacción (11). Z^+ se reduce luego por un complejo enzimático (OEC) que facilita la oxidación de dos moléculas de agua y la liberación de O_2 y protones al espacio intratilacoidal.

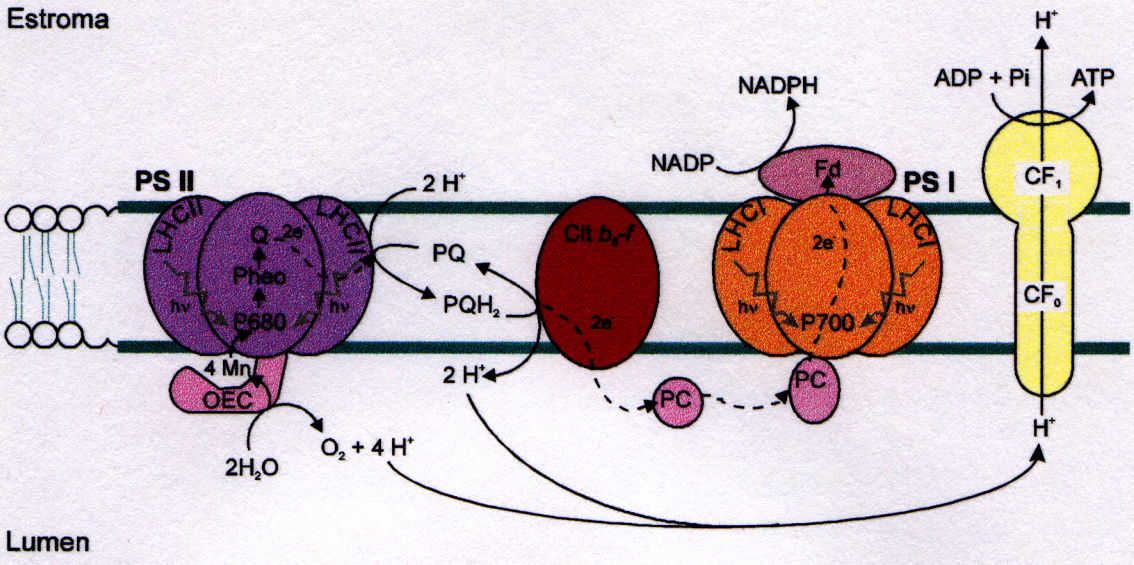


Figura 2. Transporte de electrones y transferencia de protones en la membrana tilacoidal. En el proceso participan cuatro complejos proteicos que actúan cooperativamente transportando electrones, desde el H_2O al NADP, y protones desde el lumen tilacoidal al estroma cloroplástico. La posterior difusión del gradiente protónico por la ATPasa genera un gradiente electroquímico favorable para la síntesis de ATP. Las líneas de puntos representan el transporte de electrones; las líneas sólidas representan el movimiento protónico.

La feofitina reducida transfiere sus electrones a una quinona, Q, la cual pasa sus equivalentes de reducción a los aceptores de la plastoquinona (PQ) Q_A y Q_B. El siguiente componente de la cadena es el citocromo *b6-f* (Cit *b6/f*). El complejo Cit *b6/f* contiene un centro Fe-S, una molécula de Cit *f* y dos moléculas de Cit *b6*, y este complejo se reoxida por la plastocianina (PC), que actúa como dador primario de electrones al P700.

Los electrones del P700 se transfieren a una serie de tres centros Fe-S (F_X, F_B y F_A) y luego a la ferredoxina soluble (Fd). La Fd forma un complejo 1:1 con la flavoproteína ferredoxina-NADP oxidoreductasa (FNR) que cataliza finalmente la reducción del NADP a NADPH.

Asociado al transporte de electrones hay un pasaje de protones desde el estroma hacia el espacio intratilacoidal, creándose de este modo un gradiente electroquímico que impulsa la síntesis de ATP por el complejo ATPásico. La teoría quimiosmótica descripta por Mitchell en la década del 60 describe el mecanismo de fotofosforilación (15).

1.1.3. Fase sintética: Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato.

La fijación del CO_2 atmosférico ocurre por un mecanismo común en todas las especies vegetales, el Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato (CRPP), llamado también Ciclo de Calvin y Benson o C_3 (16). Las plantas que utilizan esta vía como única forma de fijar CO_2 se conocen como plantas C_3.

El CRPP, que comprende la participación de 13 enzimas solubles localizadas en el estroma cloroplástico (16), se puede dividir en tres etapas (Figura 3): carboxilación, reducción y regeneración.

Durante la fase de carboxilación, el CO_2 es fijado por el CRPP reaccionando con la ribulosa 1,5-bisfosfato para generar dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA), mediante la reacción catalizada por la proteína más abundante de la tierra, la enzima cloroplástica Ribulosa 1,5-Bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa (RuBisCO) (17). Esta enzima llega a representar hasta el 40% de la proteína soluble de muchas hojas verdes. La RuBisCO es una enzima compuesta por ocho subunidades mayores (56 kDa) y ocho

subunidades menores (14 kDa), presentando una masa molecular nativa de 560 kDa (17). Dos propiedades de la reacción de carboxilación son especialmente importantes: el cambio de energía libre es altamente negativo ($\Delta G' = -2.4$ kcal mol^{-1}), permitiendo que la reacción de carboxilación se complete aún a bajas concentraciones de CO_2; y la afinidad de la RuBisCO por el CO_2 es suficientemente alta para asegurar una rápida carboxilación a las bajas concentraciones de CO_2 encontradas en las células fotosintéticas.

En la etapa de reducción, el 3-fosfoglicerato es fosforilado a 1,3-bisfosfoglicerato por la enzima fosfoglicerato quinasa, y luego reducido a gliceraldehído 3-fosfato por la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP, utilizándose en estas etapas ATP y NADPH generados en las reacciones luminosas (16).

Finalmente, el ciclo se completa con una serie de reacciones de isomerización, condensación y rearreglos en la que participan azúcares-fosfato de 3 a 7 átomos de carbono que conducen a la regeneración del aceptor primario del CO_2, la ribulosa 1,5-bisfosfato.

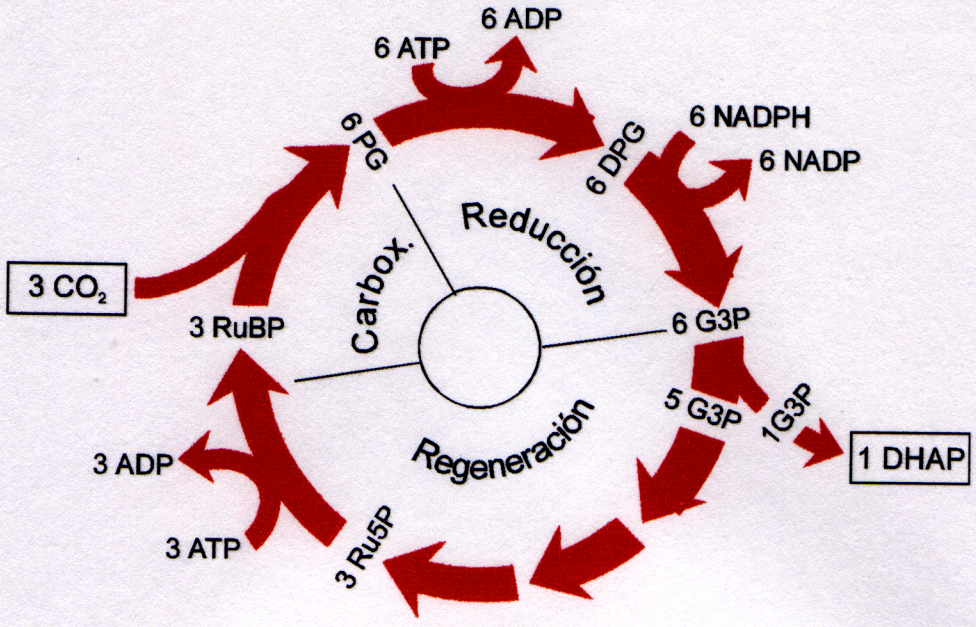


Figura 3. Representación esquemática del Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato. Las abreviaturas utilizadas son: RuBP, ribulosa 1,5-bisfosfato; PG, 3-fosfoglicerato; DPG, 1,3-bisfosfoglicerato; G3P, gliceraldehído-3-fosfato; Ru5P, ribulosa 5-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato.

Cada molécula de CO_2 asimilada por este ciclo requiere 3 ATP y 2 NADPH, por lo que se necesitarán 18 ATP y 12 NADPH a fin de obtener una hexosa a partir de seis moléculas de CO_2.

$$6\ CO_2 + 11\ H_2O + 12\ NADPH + 18\ ATP \longrightarrow \text{fructosa 6-P} + 12\ NADP + 6\ H^+ + 18\ ADP + 17\ P_i$$

Las hexosas-P generadas durante la operación del CRPP se almacenan en forma de almidón en el cloroplasto y sacarosa en el citosol (9, 10, 19). La partición de fotosintatos varía según la especie vegetal y está condicionado por los niveles de triosas-P de cada uno de los compartimientos (20).

1.1.4. Regulación del CRPP

La regulación del CRPP a corto plazo se logra por una variedad de mecanismos, entre los que se incluyen la activación de enzimas por cambios iónicos en el estroma dependiente de luz, la estimulación de la actividad enzimática mediante cambios en el estado de óxido reducción de algunos restos de aminoácidos y por procesos de transporte a través de la envoltura cloroplástica (16, 21-23)

En el primer caso y bajo condiciones de iluminación, se produce un bombeo de protones desde el estroma al lumen tilacoidal intercambiando Mg^{2+}. En consecuencia, la concentración de Mg^{2+} en el estroma aumenta y el pH se incrementa de 7,0 a 8,0. Enzimas como la RuBisCO, fructosa 1,6-bisfosfato fosfatasa y fosforibuloquinasa son más activas a pH 8,0.

Un ejemplo de regulación esta dado por la RuBisCO, en este caso la luz promueve la formación de una especie catalíticamente activa de la RuBisCO mediante la unión con CO_2 seguido de una rápida reacción con Mg^{2+}. Así, la enzima carbamilada une ribulosa 1,5-bisfosfato para la catálisis. En algunas especies, la unión de ribulosa 1,5-bisfosfato a la enzima no carbamilada y del análogo competitivo 2'-carboxiarabinitol 1-fosfato a la enzima carbamilada forma complejos inactivos (24). Se ha propuesto un modelo para la regulación de la RuBisCO, por la activasa (25). Esta enzima regulatoria, se uniría a las formas inactivas señaladas anteriormente y liberaría a la RuBisCO de la inhibición, forzando la liberación de los ligandos. La conformación de la activasa cambiaría en este proceso, causando la

separación de la RuBisCO. La activasa luego hidrolizaría ATP para retornar a la conformación inicial (25).

Por otra parte, algunas enzimas como la fructosa 1,6-bisfosfato fosfatasa y la fosforibuloquinasa, son activadas bajo iluminación por cambios en el estado de reducción de ciertos grupos sulfhidrilo, vía el sistema ferredoxina-tiorredoxina (22, 23).

Finalmente, la compartamentalización participa en la regulación del CRPP controlando la velocidad con la que las triosas-P son intercambiadas por fosfato vía el translocador de fosfato de la membrana cloroplástica (16). Para asegurar una operación continua del CRPP, al menos cinco sextos de las triosas-P deben ser recicladas. De esta manera, la disponibilidad de Pi dentro del cloroplasto limita la síntesis de triosas-P, constituyendo un punto importante de control del CRPP.

Por último, y como mecanismo de regulación a largo plazo, los niveles de cada enzima del CRPP se encuentran regulados a nivel genético a través de mecanismos que controlan la expresión de los genomas nucleares y cloroplásticos (26).

1.1.5. La fotorespiración

El Ciclo Fotosintético Oxidativo (CFO) o fotorespiración involucra la actividad coordinada de reacciones en tres tipos de organelas, el cloroplasto, el peroxisoma y la mitocondria (27).

Este ciclo se inicia en el cloroplasto por una reacción catalizada por la RuBisCO, ya que además de catalizar la carboxilación de la RuBP, es capaz de catalizar su oxigenación (28) (Figura 4). Esto se debe a que tanto el CO_2 como el O_2

son sustratos competitivos de la RuBisCO y la reacción que se lleve a cabo dependerá de las concentraciones de estos gases en el sitio activo y de las propiedades cinéticas de la enzima de diversas fuentes. Cuando el CO_2 es el sustrato, se producen dos moléculas de 3PG, mientras que cuando lo es el O_2 los productos de la reacción son una molécula de 3PG y una molécula de 2-fosfoglicolato.

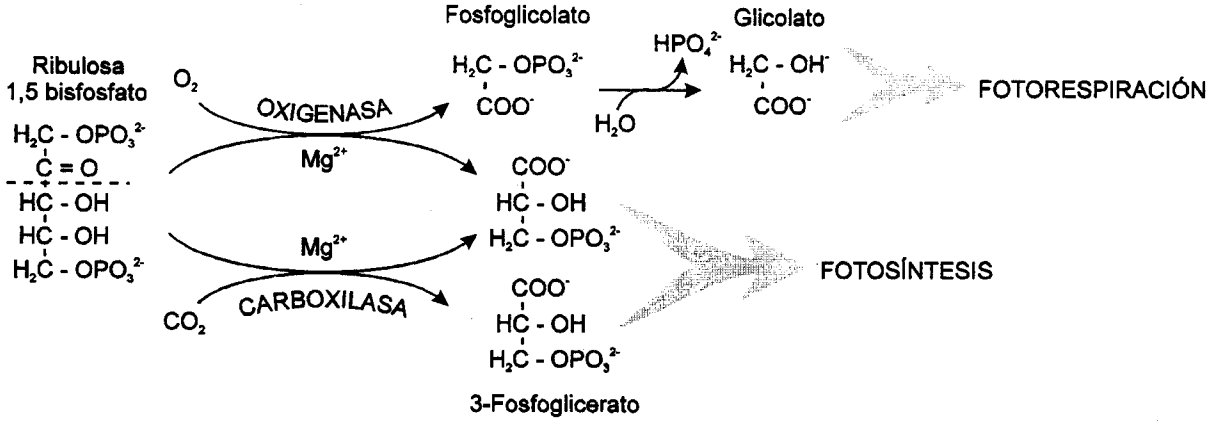


Figura 4. Las reacciones catalizadas por la Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO).

El proceso de la fotorespiración continúa con la participación de diferentes reacciones que tienen lugar en distintos compartimentos subcelulares (Figura 5). El fosfoglicolato, primer producto de la reacción de oxigenación de la RuBisCO, se hidroliza en el cloroplasto por una fosfatasa específica (29, 30). El glicolato formado ingresa al peroxisoma donde es oxidado por una flavoproteína, la glicolato oxidasa (31). El glioxilato producido se transamina luego por dos enzimas, la serina-glioxilato aminotransferasa y la glutamato-glioxilato aminotransferasa.

La glicina generada en el peroxisoma ingresa a la mitocondria, donde es metabolizada por dos enzimas, la glicina decarboxilasa y la serina hidroximetiltransferasa. La reacción final comprende la conversión de dos moléculas de glicina en una molécula de serina y una molécula de NADH, CO_2 y NH_3. El NH_3 debe ser reasimilado para la continuidad del CFO.

La serina producida ingresa al peroxisoma donde se remueve el grupo amino y se produce hidroxipiruvato. El hidroxipiruvato se reduce a glicerato usando NADH como dador de electrones por la hidroxipiruvato reductasa. El glicerato es transportado al cloroplasto donde es fosforilado a 3-PG, el cual ingresa al CRPP. Por cada dos moléculas de fosfoglicolato metabolizados en el CFO se libera un carbono como CO_2 y los otros tres carbonos retornan al CRPP. De este modo, se consumen dos moléculas de O_2 en la reacción de oxigenación por cada CO_2 liberado.

En conclusión, la relación entre la actividad carboxilasa/oxigenasa de la RuBisCO es aproximadamente 2,5:1 bajo las actuales condiciones atmosféricas (356 µbar CO_2 y 21 % O_2) (32). Este nivel de O_2 causa una inhibición del 30 % de la fotosíntesis en las plantas C_3 (33) y puede ser revertida aumentando la concentración de CO_2 (34, 35).

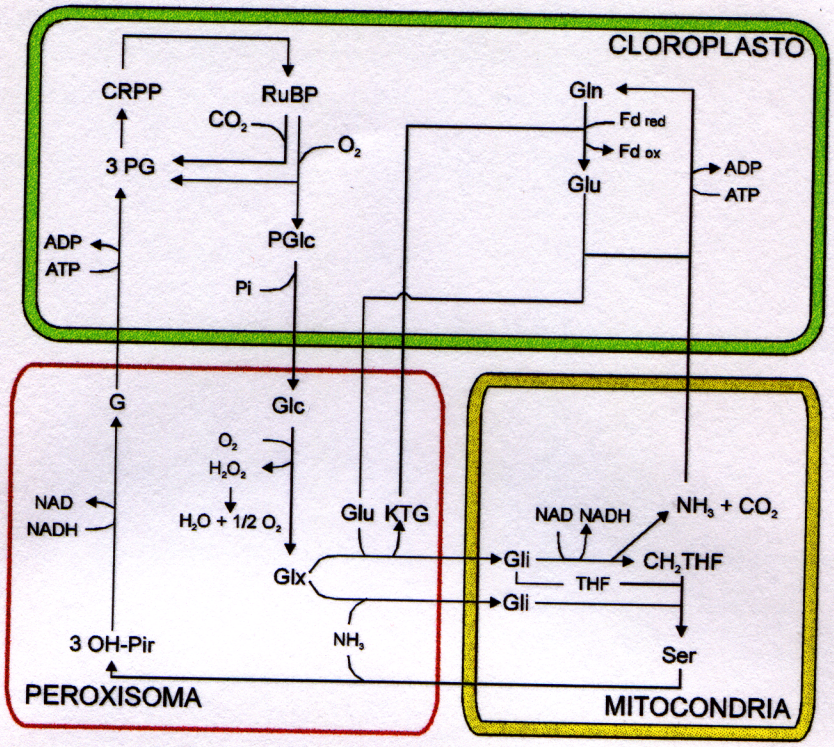


Figura 5. El Ciclo Fotosintético Oxidativo. Las abreviaturas utilizadas son: CRPP, Ciclo Reductivo de las Pentosas Fosfato, RuBP, ribulosa 1,5-bifosfato; PGlc, 2-fosfoglicolato; Glc, glicolato; Glx, glioxilato; KTG, α-cetoglutarato, OH-Pir, hidroxipiruvato; G, glicerato; PG, fosfoglicerato; THF, tetrahidrofolato; CH_2THF, metilentetrahidrofolato, Fd, ferredoxina, Glu, glutamato, Gln, glutamina.

1.1.6. Fijación de carbono por plantas C_4 y CAM

En las plantas C_3, el O_2 compite con el CO_2 en el sitio activo de la RuBisCO y el O_2 fijado resulta en una pérdida del CO_2 fijado debido al proceso de fotorespiración. Algunas plantas se han adaptado para disminuir o atenuar la actividad oxigenasa de la RuBisCO desarrollando vías auxiliares para la fijación del CO_2. Las plantas C_4 poseen una vía de fijación auxiliar no alternativa al CRPP denominado ciclo C_4 o ciclo de Hatch y Slack y poseen ciertas características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas que les permiten concentrar el CO_2 en el

compartimiento subcelular donde se encuentra la RuBisCO (36). Por estas razones, las plantas C_4 poseen en determinadas condiciones ambientales en las cuales la fotorespiración es máxima, una mayor tasa de crecimiento y de eficiencia fotosintética respecto a las plantas C_3 (37).

En otras plantas superiores, la vía auxiliar de fijación del CO_2 funciona temporalmente separada del ciclo de Calvin y Benson. Dado que esta característica bioquímica fue observada primariamente en plantas de la familia Crassuláceas, se denominó a esta ruta como metabolismo ácido de las plantas Crassuláceas (CAM) (38, 39).

1.1.6.1. Consideraciones generales del metabolismo C_4

El metabolismo C_4 es generalmente más eficiente que el metabolismo C_3 bajo condiciones de altas temperatura e intensidad lumínica. El sistema C_4 se encuentra normalmente asociado con la anatomía foliar Kranz, que consiste en un arreglo de las células fotosintéticas (de la vaina vascular y mesofílicas) formando capas sucesivas alrededor de los vasos (40). Esta anatomía también se encuentra asociada con una aumentada eficiencia en la utilización del agua, ventaja adicional en terrenos áridos (36).

En plantas con metabolismo C_4, el CO_2 es primeramente fijado por una carboxilasa insensible al O_2, la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) formándose un compuesto de 4 átomos de carbono, el oxaloacetato, en el citoplasma de las células mesofílicas. Luego de la conversión a malato o aspartato, el compuesto de cuatro átomos de carbono es rápidamente transportado a las células de la vaina vascular donde libera CO_2 para ser fijado por la RuBisCO. Un compuesto de tres átomos de carbono retorna a las células mesofílicas para cerrar el ciclo (Figura 6) (40).

QC

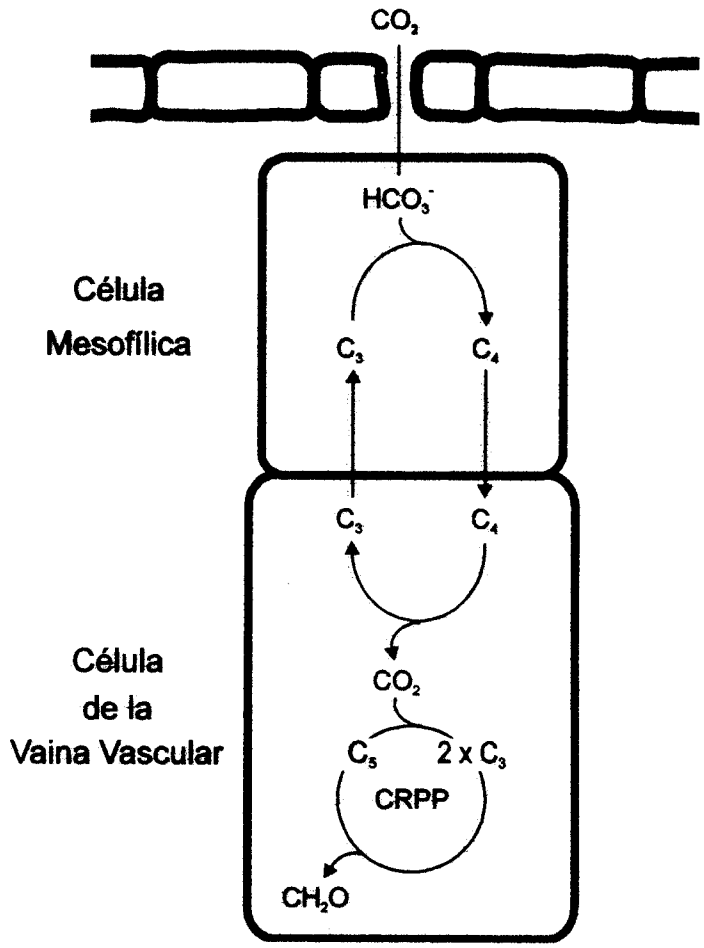


Figura 6. Esquema simplificado de la separación espacial entre la etapa carboxilativa y decarboxilativa y el CRPP en las plantas C_4.

1.1.6.2. Anatomía Kranz

En las monocotiledóneas y dicotiledóneas C_4, el sistema vascular es el marco alrededor del cual dos tipos de células fotosintéticas se distribuyen en un esquema denominado anatomía Kranz (42). Cada vaso conductor se encuentra rodeado por un haz de células fotosintéticas. El espacio restante se encuentra ocupado por células mesofílicas y espacios de aire. Las hojas de las plantas C_4 se encuentran altamente vascularizadas, con los vasos separados con hasta cuatro células fotosintéticas (43)

La vaina vascular en las plantas C_4 se distingue por la presencia de paredes celulares gruesas, numerosos cloroplastos (que en ciertos casos como el maíz son prácticamente sin grana), la acumulación de almidón y de ciertas enzimas fotosintéticas (44, 45).

Las células mesofílicas de las hojas C_4 son similares en apariencia al clorénquima de las plantas C_3, con numerosos plastidios con grana.

En maíz y caña de azúcar, los plastidios de las células de la vaina vascular y mesofilicas son morfológicamente similares en las etapas tempranas del desarrollo, y luego gradualmente se diferencian (46). Se supone que existiría una desdiferenciación de los cloroplastos de la vaina vascular con una reducción en la grana de estos cloroplastos. Los cloroplastos de ambos tipos celulares llevan a cabo desarrollos especializados.

En todos los tipos de plantas C_4, los plasmodesmos se hacen abundantes en las paredes celulares que separan ambos tipos de células, presumiblemente para lograr un correcto intercambio de metabolitos (47).

En general, el metabolismo C_4 se encuentra asociado con la anatomía Kranz, aunque se han descripto algunas plantas C_3 que también la poseen (48), y algunas plantas C_4 con variaciones considerables en dicha anatomía (49, 50).

1.1.6.3. Variaciones del sistema C_4

Existen tres variaciones del metabolismo C_4 que difieren entre sí, en la naturaleza del compuesto de cuatro carbonos que es transportado entre un tipo de célula a otra (malato o aspartato) y en la enzima descarboxilante de las células de la vaina vascular (enzima málica dependiente de NADP, [EM-NADP]; enzima málica

dependiente de NAD, [EM-NAD]; o fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, [PEP-CK]) (51). El esquema de la Figura 7 muestra los eventos bioquímicos actualmente aceptados para los tres mecanismos C_4.

En el subtipo EM-NADP, el oxalacetato (OAA) es reducido a malato en el interior de los cloroplastos de las células mesofílicas por una malato deshidrogenasa dependiente de NADP (MDH-NADP). El malato es transportado a los cloroplastos de las células de la vaina vascular, donde es decarboxilado por la EM-NADP produciendo piruvato, CO_2 y NADPH. El CO_2 es fijado en el CRPP vía la RuBisCO y el piruvato es transportado a los cloroplastos de las células mesofílicas y convertido en PEP por la enzima piruvato fosfato diquinasa (PPdK). Finalmente el PEP es transportado al citosol completando el ciclo. La mayoría de las especies de este subgrupo poseen reducida capacidad para fotoreducir el NADP en las células de la vaina vascular, por lo que parte de la reducción del 3PGA requerida para el CRPP ocurre en las células mesofílicas (51). En este subtipo, y en especies monocotiledóneas, los cloroplastos de las células de la vaina vascular se encuentran distribuídos en forma centrífuga, en oposición a lo que ocurre en especies C_4 dicotiledóneas, donde generalmente los cloroplastos de todos los subtipos se distribuyen en forma centrípeta (42).

En las especies tipo EM-NAD, el OAA es convertido en aspartato y transportado a las mitocondrias de la vaina vascular. En estas mitocondrias especializadas el aspartato es metabolizado a CO_2 por una serie de reacciones que involucran la transaminación a OAA, la reducción a malato por medio de la malato deshidrogenasa dependiente de NAD y la decarboxilación mediada por la EM-NAD. El piruvato es luego transportado al citosol y transaminado a alanina. La alanina es transferida a las células mesofílicas donde es nuevamente convertida en piruvato y éste

en PEP por la PPdK. Una vía alternativa en este subtipo es la producción de malato en las células mesofílicas y su transporte y decarboxilación en las mitocondrias de la vaina vascular. En este caso el NADH sería oxidado por el transporte de electrones. Esta vía representaría menos del 10% del flujo de carbono (51). Los cloroplastos de las células de la vaina vascular en este subtipo se encuentran en disposición centrípeta (42).

En las plantas tipo PEP-CK existen dos opciones metabólicas. Como resultado de la carboxilación del PEP se forman aspartato y malato, siendo el primero el responsable del flujo mayoritario de carbono a las células de la vaina vascular (51-55). El OAA derivado del aspartato puede ser decarboxilado por la PEP-CK en el citosol de las células de la vaina vascular o transportado a las mitocondrias y decarboxilado a través de las operaciones combinadas de la malato deshidrogenasa y la EM-NAD (54). Por otro lado, el malato puede ser directamente oxidado por la EM-NAD en las mitocondrias de la vaina vascular. El PEP, el piruvato y la alanina retornan a las células mesofílicas para balancear el ciclo. Contrariamente a lo que sucede en los otros subtipos, en especies monocotiledóneas los cloroplastos de las células de la vaina vascular se distribuyen por todo el citoplasma (42).

La mayoría de los genes C_4 han sido clonados (51, 56-59). Muchos de estos estudios han sugerido que los genes C_4 pertenecen a pequeñas famillias cuyos miembros individuales presentan distintos roles metabólicos y localizaciones.

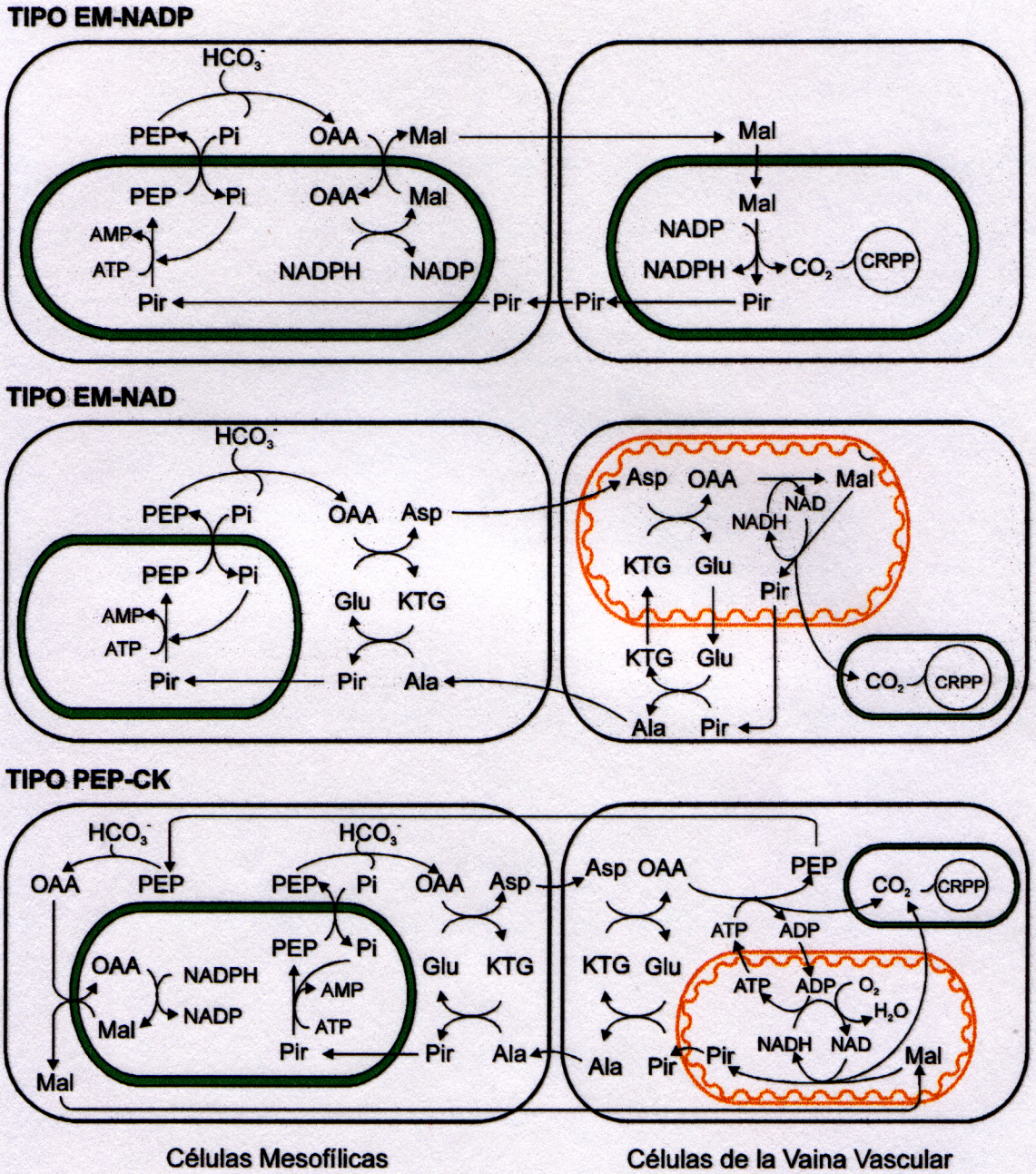


Figura 7. Representación esquemática del metabolismo de fijación del CO_2 en los tres subgrupos de plantas C_4.; PEP, fosfoenolpiruvato; OAA, oxalacetato; Mal, malato; Asp, aspartato; Ala, alanina; Glu, glutamato; KTG, α-cetoglutarato, Pir, piruvato.

1.1.6.4. Regulación del metabolismo C_4

La operatividad del ciclo de Hatch y Slack comprende distintos niveles de regulación metabólica. En primer lugar, es necesaria una coordinación de las velocidades de fijación del CO_2 entre el CRPP y el ciclo C_4 para que la fotosíntesis ocurra eficientemente en diferentes condiciones ambientales. Un incremento en la velocidad de la fotosíntesis debido a un aumento en el CO_2 atmosférico, provoca una disminución de la concentración de RuBP, pero un aumento en las cantidades de PEP y de los metabolitos del ciclo C_4, sugiriendo la existencia de una regulación coordinada entre el CRPP y el ciclo C_4 *in vivo* (60).

Además de la regulación por metabolitos y asociada a ésta existen mecanismos de modificación covalente de las enzimas. Las actividades enzimáticas se encuentran reguladas por varios factores, entre los más importantes se encuentran los niveles de Mg^{2+}, fosfato, adenilatos, el pH y otros metabolitos. Además, ciertas enzimas se encuentran reguladas por factores ambientales como pueden ser luz y temperatura.

La PEPC es activada por glucosa 6-P e inhibida por L-malato y aspartato (61). Además, es activada por luz por la fosforilación de un residuo de serina (62, 63) y podría estar regulada mediante cambios en el estado redox de grupos sulfhidrilos (64). Es de destacar que la forma de la enzima en oscuridad es más sensible a la inactivación por malato y menos sensible a la activación por glucosa-6P.

La MDH-NADP es regulada por luz a través de un proceso que involucra la interconversión entre una forma reducida (activa) y otra oxidada (inactiva) de la enzima. Este proceso es mediado por el sistema ferredoxina-tiorredoxina (65).

La actividad de la PPdK está regulada por distintos mecanismos. La reacción catalizada por la enzima podría ser el paso limitante del proceso de asimilación de carbono en plantas C_4. La activación mediada por luz ocurre por fosforólisis de un residuo de fosfotreonina de la enzima, catalizada por una proteína reguladora (66). La enzima es extremadamente sensible a bajas temperatura, siendo inactivada en estas condiciones (67). Esta inactivación parece ser una de las razones primarias para la rápida disminución de la capacidad fotosintética de las plantas C_4 entre 10-15ºC.

Aunque los procesos involucrados en la regulación no son únicos de las plantas C_4, las actividades de las enzimas que participan en el ciclo C_4 y sus propiedades regulatorias son marcadamente diferentes a las de estas enzimas en plantas C_3. La separación espacial entre la carboxilación y decarboxilación conduce a una obligada coordinación entre el ciclo C_4 y el CRPP para que la fijación del CO_2 proceda eficientemente.

1.1.6.5. Desarrollo de la fotosíntesis C_4. Regulación genética

El sistema C_4 y la anatomía Kranz se desarrollan coordinadamente durante el crecimiento de la hoja (68). Durante el desarrollo completo de una hoja se observa que los niveles de proteínas C_4 aumentan hacia la punta de la hoja (59, 69), mientras que sus correspondientes ARNm aumentan en el sentido contrario (70). Se han utilizado métodos de inmunolocalización para visualizar la distribución celular de las enzimas C_4 en secciones de hojas de diferente edad (71). Estos estudios han demostrado que la acumulación de las proteínas C_4 está siempre asociada a un vaso conductor maduro y se observa la presencia de células de la vaina vascular aún en regiones relativamente jóvenes (basales) de una hoja de maíz en desarrollo.

QC

La expresión de genes C_4 depende de señales posicionales. Estudios realizados sobre hojas en distintos estadíos de desarrollo de plantas de maíz, permitieron observar que el desarrollo C_4 ocurre adyacente a los vasos en todos los tipos de hojas bajo las mismas condiciones de iluminación, pero que a partir de un cierto radio, las células mesofílicas se desarrollan como un clorénquima C_3 convencional (72). Las células mesofílicas más distantes expresan los genes para RuBisCO y el LHC (como lo hacen células C_3 normales), mientras que las células mesofílicas próximas a los vasos expresan PEPC, PPdK, y MDH-NADP (como lo hacen las células mesofílicas C_4). Estos experimentos sugieren un control posicional del desarrollo de las células mesofílicas que actúa localmente en un pequeño radio alrededor de cada vaso (72).

La regulación posicional del metabolismo C_4 también es dependiente de luz. Si se iluminan plantas crecidas en oscuridad, el estado estacionario de las enzimas C_4 y sus ARNm aumentan varias veces (57, 58). Sheen y Bogorad (58) observaron que los bajos niveles de RuBisCO encontrados en plantas de maíz crecidas en oscuridad representan la acumulación de esta enzima en ambos tipos de células. Si estas plantas son iluminadas, la acumulación de la RuBisCO se restringe a las células de la vaina vascular y la enzima desaparece en las células mesofílicas. Esto sugiere que la iluminación es un componente esencial del sistema de posicionamiento que reprime la presencia de la RuBisCO en las células mesofílicas de plantas C_4. En maíz, experimentos que evalúan la velocidad de la transcripción utilizando núcleos de células mesofílicas y de la vaina vascular separadas sugieren que la represión ocurre a nivel postranscripcional, porque los transcriptos para la subunidad menor de RuBisCO parecen ser iniciados en ambos tipos de células (73).

La expresión de genes específicos en las células de la vaina vascular y mesofílicas ha sido examinada *in situ* (72). Niveles bajos de iluminación favorecen

solamente la acumulación de la enzima RuBisCO, mientras que altos niveles de luz producen una alta expresión tanto de la RuBisCO y como de la enzima C_4 PEPC. En la dicotiledónea C_4 *Amaranthus*, la supresión de la RuBisCO en las células mesofílicas parecería ocurrir a nivel de la traducción, más que a nivel transcripcional o postranscripcional como ocurre en maíz. Estos estudios sugieren que la luz participa en la estimulación de los niveles de transcriptos y proteínas C_4 y suprimiendo la transcripción y traducción (al menos de RuBisCO) en el tipo de célula incorrecto.

En el caso de la PPdK (74) y luego de la exposición a altos niveles de luz la expresión ocurre predominantemente en células mesofílicas.

La evidencia disponible hasta el momento sugiere que el control posicional de la expresión célula específica de genes es en parte un control negativo. En la oscuridad, la RuBisCO se acumula en las células mesofílicas y de la vaina vascular. Luego de la exposición bajo altos niveles de luz, la expresión es suprimida en las células mesofílicas. La distribución espacial de las células expresando la RuBisCO en el primordio foliar sugiere que una señal se centra en cada vaina vascular en desarrollo. La señal podría ser la misma que establece la localización inicial del vaso conductor. Otras enzimas C_4, incluyendo PEPC, MDH-NADP, EM-NADP, son expresadas abundantemente sólo a altos niveles de iluminación y en forma célula específica.

El patrón de expresión de genes C_4 probablemente representa complejas interacciones moleculares que involucran numerosos genes. En una forma simple, los datos disponibles sugieren que la luz induce una sustancia difusible (factor A), posiblemente vía algún fotoreceptor que presumiblemente interactúa con factores secundarios célula-específicos (75). En oscuridad, el factor A no se acumula y la RuBisCO es expresada en todos los tipos de células fotosintéticas (Figura 8). Luego de la inducción lumínica el factor A es transportado a las células de la vaina vascular y

mesofílicas a través del sistema vascular. En las células de la vaina vascular, A interactúa con un factor vaina vascular-específico (B) para mantener la expresión de la RuBisCO y para inducir la expresión de la EM-NADP (Figura 8). En las células mesofílicas, A interactúa con un factor mesófilo-específico (C) para reprimir la expresión de RuBisCO e inducir la expresión de la PEPC, PPdK y MDH (Figura 8). El factor A no alcanzaría las células que se encuentran a un radio mayor a dos células, lo cual resulta en la expresión de la RuBisCO en este tipo de células, aún en presencia de luz. Una vez que el patrón C_4 es inducido, otros mecanismos actuarían para estabilizar el patrón de expresión génica durante el desarrollo (75, 76).

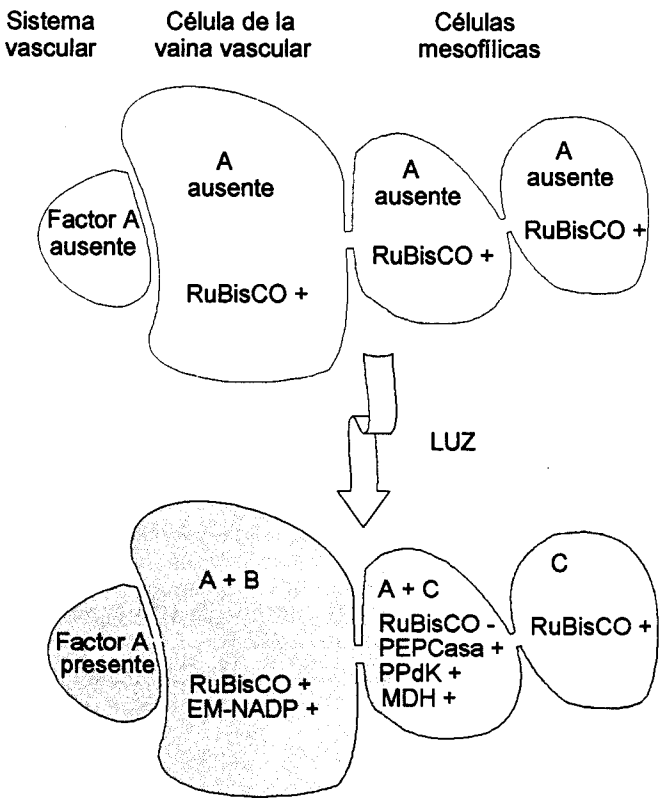


Figura 8. Modelo para explicar el establecimiento del patrón de expresión de los genes C_4.

1.1.7. Plantas C_3-C_4

Existen varias especies vegetales que presentan características intermedias entre las plantas C_3 y C_4. La mayoría de estas especies con metabolismo intermedio tienen suprimida parcialmente la fotorespiración como lo indica la reducida sensibilidad de fotosíntesis neta al O_2.(77). De esta forma, existen 22 especies, incluyendo tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, pertenecientes a 4 géneros de 5 familias que han sido identificadas como especies con metabolismo intermedio C_3-C_4. La mayoría de estas especies pertenecen a un género que contiene tanto especies C_3 como C_4 (*Mollugo*, *Alternanthera*, *Flaveria*, *Neurachne* y *Panicum*).

Las hojas de las especies C_3-C_4 presentan una anatomía de hoja intermedia entre la de las plantas C_3 y C_4. Una característica de estas especies es la presencia de células de la vaina vascular cargadas de cloroplastos con grana y que acumulan almidón. El grado de desarrollo de la anatomía foliar varía entre las especies, y pueden ser divididos en tres grupos (78) : con anatomía tipo Kranz (*Neurachne minor*), similar a anatomía tipo Kranz (*Panicum milioides*) y con muy poco desarrollo de anatomía Kranz (*Mollugo verticillata*).

El nivel de fotorespiración aparente de las especies C_3-C_4 se encuentra más reducido que en las plantas C_3. Se han propuesto 2 mecanismos para explicar estos niveles de fotorespiración (79, 80). En todas las especies con metabolismo intermedio, la RuBisCO se encuentra presente tanto en las células mesofílicas como en las células de la vaina vascular. En las células mesofílicas funciona, al igual que en las plantas C_3, fijando el CO_2 vía la reacción de carboxilación, y también como oxigenasa, que es el primer paso en la producción de compuestos de 2 átomos de

carbono del ciclo de fotorespiración. En uno de los mecanismos para reducir la fotorespiración que podría ser común en todos los intermediarios, los metabolitos generados como consecuencia de la reacción de oxigenación en las células mesofílicas, el glicolato y el glioxilato, son transportados a las células de la vaina vascular y son metabolizados por la glicina decarboxilasa, la cual se expresa sólo en mitocondrias de las células de la vaina vascular (51). El CO_2 liberado es finalmente refijado por la RuBisCO en los cloroplastos de las células de la vaina vascular. En algunas especies, la presencia de un ciclo C_4 reducido contribuye a una mayor reducción de la fotorespiración. Estas plantas exhiben elevadas actividades y una parcial compartamentalización de las enzimas claves del ciclo C_4 (81).

La alta frecuencia de especies con metabolismo intermedio C_3-C_4 en el género *Flaveria* es bastante inusual, ya que al menos 10 de las 21 especies en este género han sido clasificadas como con metabolismo intermedio (48). Una hipótesis propone que algunas especies del género *Flaveria* estarían en un proceso activo de evolución desde un metabolismo fotosintético C_3 a uno C_4. El género *Flaveria* contiene tanto especies C_3 como C_4 y especies intermedias (C_3-C_4, similares a C_3 y similares a C_4) con diferentes capacidades para reducir la fotorespiración (82). Contrariamente a lo que ocurre con otras especies intermedias pertenecientes a otros géneros, éstas poseen considerables actividades de enzimas C_4 (81) y son capaces de asimilar el CO_2 tanto por las vías C_3 como por las vías C_4 . Las especies C_4 de *Flaveria* han sido clasificadas dentro del subtipo EM-NADP ya que ésta es la enzima que se encuentra en mayor concentración en tejidos fotosintéticos en comparación con las otras enzimas decarboxilantes (81).

1.1.8. Plantas CAM

Las plantas CAM se caracterizan por la fijación nocturna del CO_2 por la PEPC produciendo malato que es almacenado en la vacuola. Durante el día, cuando la demanda evaporativa es alta, los estomas se cierran y el ácido málico producido durante la noche se decarboxila para producir CO_2. De este modo, el CO_2 se concentra disminuyendo o anulando la reacción oxigenasa de la RuBisCO y consecuentemente la fotorespiración. Al igual que en las plantas C_4, es posible diferenciar tres tipos de especies CAM en base a la enzima decarboxilante que participe (EM-NADP, EM-NAD o PEP-CK). El CO_2 así liberado es fijado posteriormente por el CRPP (83-86). El PEP regenerado, a diferencia de las plantas C_4, es metabolizado a través de la ruta gluconeogénica (87). La ruta del carbono en el metabolismo CAM se esquematiza en la Figura 9.

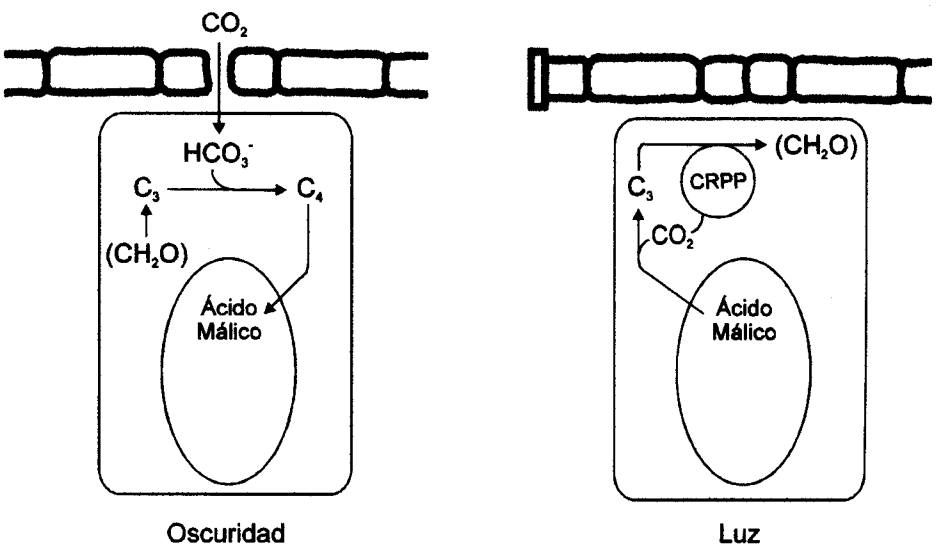


Figura 9. Representación esquemática de la separación temporal entre la etapa carboxilativa y la etapa decarboxilativa y ciclo de Calvin en las plantas CAM.

1.1.9. Características diferenciales entre plantas C_3, C_4 y CAM

Las características que tipifican a las plantas C_4 están resumidas en la Tabla 1 donde se comparan con aquellas de las plantas C_3 y CAM.

Una característica distintiva entre plantas que tienen uno u otro metabolismo es la relación de discriminación al isótopo del carbono de número de masa 13 (^{13}C). En la reacción de carboxilación, la RuBisCO discrimina la fijación del $^{13}CO_2$, mientras que PEPC no lo hace (88).

Además, otra característica importante que funciona como una medida cualitativa de la fotorespiración es el punto de compensación del CO_2 (Γ). El término Γ se define como la concentración del CO_2 atmosférico que se alcanza cuando se igualan las velocidades aparente de liberación y fijación de CO_2, y así, Γ es una buena medida de la pérdida de CO_2 por fotorespiración. Típicamente, a 25°C y 21% de O_2, las plantas C_3 y C_4 presentan valores aproximados de Γ de 50 µl/l y 0 µl/l, respectivamente, mientras que las especies intermedias C_3-C_4 exhiben valores entre 7-28 µl/l.

Otras características importantes son la temperatura óptima para la fotosíntesis (Tabla 1), siendo menores para las plantas C_3 en comparación a las C_4 y a las CAM ; y distintas características bioquímicas y anatómicas (Tabla 1) que existen entre los distintos tipos de metabolismos fotosintéticos.

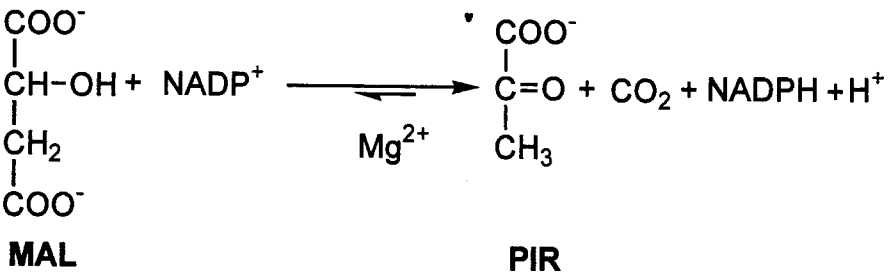
Tabla 1. Características diferenciales de los tres grupos mayoritarios de plantas.

Características	C_3	C_4	CAM
Generales			
Ubicación	Plantas de clima templado (espinaca, trigo, papa)	Plantas de clima semitropical (caña de azúcar, maíz, Amaranthus)	Plantas suculentas (cactus)
Producción (ton/Has.año)	22 ± 0,3	39 ± 17	Bajo y muy variable
Temperatura óptima para la fotosíntesis	15 - 25 °C	30 - 47 °C	≈ 35 °C
Anatómicas			
Anatomía Foliar	No se distinguen células fotosintéticas de la vaina vascular	Células de la vaina vascular diferenciadas, ricas en organelas	Células mesofílicas con vacuolas grandes
Bioquímicas			
Enzima carboxilante	RuBisCO	Inicialmente, PEPC	PEPC (en oscuridad); RuBisCO (en luz)
Aceptor 1° del CO_2	Ribulosa 1,5 bisfosfato (RuBP)	Fosfoenolpiruvato (PEP)	PEP (en oscuridad); RuBP (en luz)
Primer producto formado	Fosfoglicerato	Oxaloacetato	Oxaloacetato
Discriminación $^{13}CO_2$	Sí	Menor que en C_3	Menor que en C_3
Requerimiento energético teórico (CO_2:ATP:NADPH)	1:3:2	1:5:2	1:6,5:2
Fisiológicas			
Punto de compensación del CO_2 (µl/l)	30 - 70	0 - 10	0 - 5 (en oscuridad)
Inhibición de la fotosíntesis por 21%O_2	Sí	No	Sí
Fotorespiración	Sí	No	A veces reprimida

1.2. Enzima málica NADP-dependiente (EM-NADP)

1.2.1. Aspectos generales

La enzima málica dependiente de NADP (EM-NADP, EC 1.1.1.40) cataliza la decarboxilación oxidativa del L-malato según la siguiente ecuación:



MAL **PIR**

La reacción posee un requerimiento absoluto de cationes divalentes que puede ser provisto *in vivo* por Mg^{2+} o Mn^{2+} dependiendo de la fuente enzimática.

La reacción catalizada por esta enzima es reversible, aunque fisiológicamente se encuentra desplazada en el sentido de la decarboxilación. Esta enzima es capaz de catalizar otras reacciones (decarboxilación de OAA, reducción de piruvato), pero en condiciones bastante diferentes a las fisiológicas (89, 90).

La EM-NADP está ampliamente distribuida, encontrándose tanto en tejidos animales y vegetales como en organismos procariotas y eucariotas (91-94). La enzima cumple un rol particularmente importante en plantas C_4 y en plantas CAM (42), donde es responsable de proporcionar CO_2 a la RuBisCO en los cloroplastos de las células de la vaina vascular, provocando de esta manera una disminución o anulación de la fotorespiración y una mayor eficiencia fotosintética.

1.2.2. Distribución y localización

La EM-NADP ha sido estudiada en diferentes tejidos vegetales incluyendo hojas, tejido etiolado, semillas, raíces y frutos, tanto de plantas C_4 como de C_3 y CAM. En las hojas de ciertas plantas C_4 (denominadas especies C_4 tipo EM-NADP) se encuentran altas actividades de la EM-NADP. En maíz, esta enzima se encuentra específicamente localizada en los cloroplastos de las células de la vaina vascular (95, 96). La expresión de la enzima está regulada por luz, existiendo un incremento simultáneo de ARNm y proteína durante el verdeo de plantas etioladas de maíz; y se observó que la proteína se localiza sólo en las células de la vaina vascular, (58, 96-98). Por otra parte, la EM-NADP también se encuentra presente en los etioplastos de hojas etioladas y en los plastidios de raíces de maíz, donde predomina una isoforma aparentemente constitutiva de la enzima de mayor masa molecular y cuyo rol es hasta el momento desconocido (96).

En hojas de plantas CAM la enzima es predominantemente citosólica (99, 100). En cuanto a la enzima proveniente de plantas C_3, se ha sugerido una localización citoplasmática para ciertas enzimas de algunas plantas C_3, por ejemplo *Lupinus luteus* (101, 102), poroto (103), álamo (104), fruto de tomate (105), frambuesa (106) y tubérculos de papa (107). Por otra parte, trabajos recientes informan sobre la localización plastídica de la enzima en tejidos C_3 fotosintéticos, como en hojas de trigo (96), cotiledones en desarrollo de zapallo (108), embriones en desarrollo de *Brassica napus* (109) y en *Flaveria pringlei* (una especie de *Flaveria* C_3) (110) y en tejidos no fotosintéticos, como suspensiones de células de soja (108).

1.2.3. Funciones

El rol más claro que cumple la EM-NADP en plantas C_4 es de funcionar como dadora de CO_2 en el CRPP. En algunas especies C_4 como maíz, caña de azúcar y sorgo, el malato, a través de la EM-NADP, es el dador de CO_2 para la fijación mediada por la RuBisCO en los cloroplastos de la vaina vascular. Como se mencionó oportunamente, este mecanismo provee una alta concentración de CO_2 para la catálisis por la RuBisCO, favoreciendo la carboxilación y de esta manera reduciendo la fotorespiración (42). En las plantas CAM, subtipo EM-NADP, el malato también sirve como dador de CO_2 para la RuBisCO al igual a lo que sucede en plantas C_4 tipo EM-NADP (84, 85).

La enzima desempeñaría diferentes roles en otros tejidos, estos podrían ser catabólicos, con la concomitante respiración de NADPH y piruvato, o anabólicos, donde el NADPH y piruvato serían utilizados en reacciones biosintéticas (por ejemplo en la síntesis de lípidos y carbohidratos). El-Shora y ap Rees (108) sugieren que la EM-NADP presente en los plastidios de células no fotosintéticas y fotosintéticas de tejidos C_3, proveería el piruvato para la síntesis plastídica de aminoácidos y ácidos grasos. Por otro lado, estudios sobre la síntesis de ácidos grasos en endosperma de ricino en desarrollo y embriones de *Brassica napus* demostraron que el malato es un sustrato muy efectivo para la síntesis de ácidos grasos (109, 111). De este modo, se ha propuesto un modelo para la utilización de malato citosólico como fuente de carbono para la biosíntesis de ácidos grasos y poder reductor, a través de la EM-NADP plastídica. Por otra parte, a la EM-NADP presente en células de poroto se le ha atribuido una función relacionada con las respuestas de defensa contra patógenos y estrés oxidativo (112-114). Se demostró que el gen que codifica esta enzima presenta características regulatorias particulares, como es la respuesta a elicitores

QC

producidos por hongos patógenos (103). Además, esta enzima se expresa altamente en el tejido vascular y en el parénquima medular del tallo de poroto, donde proveería de NADPH para la biosíntesis de lignina (103, 114, 115). Al respecto, se ha demostrado que plantas transgénicas de tabaco que expresan el ARN antisentido de la EM-NADP, presentan una disminución en la deposición de lignina (116) y que callos indiferenciados de poroto que llevan a cabo lignificación presentan inducción del ARNm de la EM-NADP (117).

También se ha sugerido un rol alternativo para la EM-NADP presente en raíces (118). En ciertas condiciones, la absorción de NO_3^- por las raíces depende de la disponibilidad del L-malato producido en los tallos y de su translocación vía floema a las raíces, donde es decarboxilado por la EM-NADP rindiendo piruvato y HCO_3^- (119). De esta manera, la EM-NADP presente en raíces podría estar involucrada en la absorción de NO_3^- (120).

La EM-NADP parece tener un rol en la maduración de algunos frutos. El desarrollo de los frutos está normalmente caracterizado por una acumulación inicial de ácidos (ácido málico), seguido por una liberación de éstos desde la vacuola y una alcalinización durante la maduración. Los frutos climatéricos presentan una explosión de la respiración durante la maduración, asociada en algunos frutos con un aumento en los niveles de EM-NADP (105). El malato podría servir como fuente de carbono y poder reductor para la gluconeogénesis y, alternativamente, como sustrato para la respiración. En este caso, el piruvato y NADPH generados podrían ser respirados por la mitocondria (94).

Otro rol sugerido para la EM-NADP es de servir de regulador de pH en el citosol, en combinación con la PEPC (121).

1.2.4. Propiedades físicas

La EM-NADP es una enzima oligomérica compuesta por subunidades idénticas. Se estima que la masa molecular del monómero de la isoforma no fotosintética de maíz es 72 kDa (98), mientras que la correspondiente al del monómero de las isoenzimas involucradas en el metabolismo C_4 se estima entre 62-68 kDa, basados en resultados de electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) de enzimas purificadas de distintas fuentes (122-126). Para enzimas cloroplásticas, y en el caso de la enzima fotosintética de maíz, se calculó una masa molecular de 61,3 kDa (98, 127) en base al análisis de la secuencia del ADNc y de la secuencia del extremo amino terminal de la proteína madura ; mientras que para la EM-NADP de *Flaveria trinervia* se estimó una masa molecular de 61,7 kDa (128) basado en el análisis de la secuencia del ADNc y sitios propuestos para el procesamiento del péptido de tránsito responsable del importe de la proteína al cloroplasto.

La enzima purificada a partir de hojas de maíz (129) y de caña de azúcar (130) pueden existir en distintos estados oligoméricos. El pH, la presencia de distintos ligandos y la concentración proteica cambian el estado de agregación de la enzima de caña de azúcar (131). Las tres formas oligoméricas, monómero, dímero y tetrámero, descriptas para la EM-NADP de caña de azúcar son catalíticamente activas, siendo el tetrámero a pH 8,0 el de mayor actividad específica (130). A pH 8,0, la enzima es predominantemente un tetrámero y es más activa, mientras que a pH 7,0 es un dímero y es menos activa.

1.2.5. Propiedades cinéticas

Los sustratos de la reacción catalizada por la EM-NADP son las formas libres (formas no complejadas con los metales iónicos) del L-malato y NADP y la forma libre del metal divalente es el cofactor (130). Dependiendo de la fuente enzimática, tanto Mg^{2+} como Mn^{2+} pueden servir como cofactores de la enzima. También, Co^{2+}, Cd^{2+} y Ca^{2+} son cofactores activos pero menos eficientes que Mg^{2+} o Mn^{2+} (132). Por el contrario, otros cationes inhiben a la enzima, probablemente por presentar inadecuados tamaños o geometrías de coordinación (133, 134).

La enzima purificada de caña de azúcar presenta comportamiento histerético, cambiando sus propiedades cinéticas después de la preincubación con diferentes ligandos (131). La preincubación con Mg^{2+} elimina la histéresis, mientras que la presencia de malato la aumenta. Este comportamiento podría deberse a cambios en el estado de agregación de la proteína, los cuales pueden ser acelerados o inhibidos por la unión de ciertos metabolitos (131).

La velocidad de reacción enzimática medida a concentraciones variables de NADP presenta una cinética hiperbólica, no existiendo diferencias en los parámetros cinéticos de las distintas isoformas de la enzima málica de diferentes orígenes (94).

Por el contrario, las cinéticas observadas con respecto a malato varían según la fuente enzimática y el pH usado en el ensayo. Las enzimas de menor pH óptimo presentan respuesta sigmoidea al malato (101, 102, 105, 135-138) y en algunos casos propiedades alostéricas que modifican dicho comportamiento (135, 136, 138-141). La enzima málica mayoritaria de plantas C_4 responde de manera hiperbólica al malato, aunque también se han descripto cinéticas sigmoideas a ciertos valores de pH (142, 143). En este caso, el comportamiento frente al L-malato,

se caracteriza por una disminución en la afinidad con el incremento de pH, y la desaparición de la inhibición ejercida por L-malato a altos pH. Estas características pueden asociarse con el incremento en el pH óptimo que se observa con el aumento de la concentración de malato, con enzimas de varias fuentes. La actividad de la EM-NADP purificada de hojas C_3 y CAM presentan un pH óptimo aproximado de 7,2 comparado con un valor de 8,3 para la enzima de hojas C_4, siendo la K_m para malato mayor a un dado pH para la enzima de hojas C_3 y CAM (94).

Con respecto a los cationes divalentes utilizados como cofactores, se han realizado numerosos estudios que muestran cinéticas de saturación hiperbólicas para Mg^{2+} y Mn^{2+} (125, 136, 144-146). Sin embargo, se ha encontrado cooperatividad negativa en la unión de estos cofactores a la enzima cloroplástica de maíz y caña de azúcar (130, 132, 134).

1.2.6. Sitio activo

La modificación química de la EM-NADP de plantas sugiere la presencia de residuos esenciales de histidina, arginina y cisteína para la catálisis enzimática. El dietilpirocarbonato, reactivo con alta especificidad para residuos de histidina, inactiva a la enzima málica de maíz. Se ha correlacionado la pérdida de actividad enzimática con la modificación de un residuo de histidina por monómero (147).

La modificación química de la enzima con fenilglioxal y 2,3-butanodiona, reactivos selectivos para arginina, resultan en una inactivación total de la enzima, que se correlaciona con la modificación de dos residuos de arginina, uno de los cuales estaría protegido por NADP (148).

El bromopiruvato, análogo del producto, inactiva la EM-NADP de maíz (149). Los estudios sugieren la presencia de residuos esenciales de cisteína implicados en

la unión del NADP. La enzima málica de maíz posee siete residuos de cisteína por monómero (127), de los cuales cuatro son modificados por bromopiruvato, pero sólo dos son protegidos por NADP (149). Por otro lado, se han realizado estudios con maleimidas bifuncionales que permiten sugerir que los residuos de cisteína implicados en la modificación de la enzima se localizan en un dominio hidrofóbico y ambos en la misma subunidad enzimática (150). El empleo de eosin maleimida permitió confirmar la presencia de dos residuos de cisteína implicados en la unión del NADP (151, 152).

1.2.7. Mecanismo de catálisis

El mecanismo de reacción propuesto para la EM-NADP de maíz sería del tipo secuencial ordenado (89). De acuerdo a este mecanismo, el NADP se une primero a la enzima, seguido por L-malato. Para que la reacción se lleve a cabo, habría una transferencia de hidruro originando un intermediario OAA-NADPH que permanecería unido a la enzima y sería decarboxilado. Posteriormente se liberarían el CO_2, piruvato y NADPH producidos (Figura 10).

Estudios con análogos de sustrato muestran que la molécula de NADP posee dos regiones importantes para la actividad enzimática (153). El grupo carbonilo de la carboxiamida del anillo de nicotinamida es fundamental para la actividad coenzimática, mientras que el grupo 2'-fosfato es importante para la unión del nucleótido a la enzima (154). Con respecto a L-malato, la presencia en la molécula de un grupo carboxilo en la posición 1 junto con el grupo hidroxilo de la posición 2 son necesarios para obtener una unión significativa del ácido a la enzima (154).

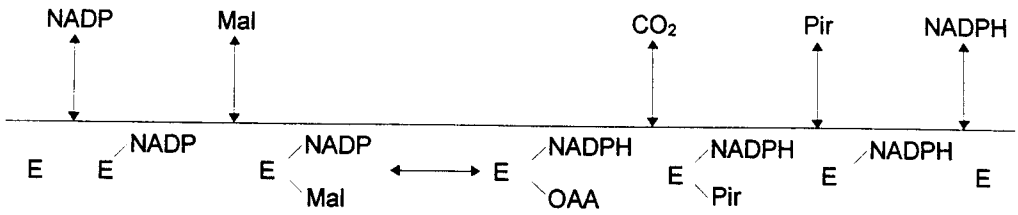


Figura 10. Mecanismo de reacción propuesto para la EM-NADP de maíz. E, EM-NADP; Mal, malato; OAA, oxalacetato; Pir, piruvato.

1.2.8. Estructura primaria y análisis de secuencias

Existe un considerable interés en el origen de la forma de la EM-NADP presente en los cloroplastos de ciertas especies C_4 para estudiar la evolución de este tipo de plantas a partir de las C_3. Se ha propuesto que la enzima de tejido C_4 derivaría de una forma citosólica, ya sea por duplicación génica o por productos alternativos de un único gen (127). Si esto fuera así, el gen debería haber sido modificado para incluir un exón que codifique para el péptido de tránsito, contener la información regulatoria en el promotor para ser expresada de una manera dependiente de luz en los cloroplastos de la vaina vascular, y además sufrir cambios estructurales que le permitieran cumplir las funciones específicas en el interior de los cloroplastos.

Hasta el momento, los ADNc de EM-NADP cloroplásticas han sido aislados de plantas C_4 como maíz (127) y *Flaveria trinervia* (128) y de plantas C_3 como *Flaveria pringlei* (110) y arroz (155), mientras que formas citosólicas han sido identificadas en plantas C_3 como poroto (113), álamo (104) y frambuesa (156). También se ha caracterizado un ADNc aislado de una biblioteca de *Mesembryanthemum crystallinum*, una planta perteneciente al grupo CAM de tipo facultativo (157).

La secuencia del ADNc de la EM-NADP de maíz involucrada en el metabolismo fotosintético, codifica para una proteína precursora de 69,8 kDa (127). La extensión amino terminal codifica para el péptido de tránsito que es eliminado durante el transporte de la proteína al cloroplasto. La secuencia contiene un sitio de procesamiento entre las posiciones 62-64 determinado mediante la secuenciación del extremo amino terminal de la proteína madura (98). Este péptido presenta el potencial de formar la configuración anfipática de hoja plegada β, como se encontró en el extremo amino terminal de otros péptidos de tránsito de proteínas cloroplásticas estromáticas (158).

La comparación de secuencias de péptidos de tránsito cloroplásticos conocidos, indican que no existen regiones altamente conservadas (159), aunque los péptidos de tránsito de proteínas relacionadas muestran ciertas zonas conservadas entre las distintas especies (160). Como ejemplo, las secuencias de tránsito putativas requeridas para el importe al cloroplasto de la EM-NADP de maíz (monocotiledónea C_4) y *Flaveria trinervia* (dicotiledónea C_4) prácticamente no comparten similitudes en secuencia. A pesar de esto las proteínas maduras de ambas especies comparten un 75% de similitud en su secuencia de aminoácidos (128). Ésto indicaría que la secuencia de tránsito habría aparecido independientemente en monocotiledóneas y dicotiledóneas durante la evolución de la EM-NADP que participa en el ciclo C_4 (EM-NADP C_4) (128).

La secuencia de aminoácidos de los sitios de unión a NADP se encuentran conservados entre las EM-NADP de distintas especies. En la enzima de maíz involucrada en el proceso fotosintético, estos sitios se localizarían entre las posiciones 183-191 y 239-246. Este último es homólogo a la secuencia consenso de unión a NAD propuesta por Wierenga y colaboradores (161).

Basados en la secuencia de aminoácidos, la EM-NADP C_4 de maíz se encuentra más relacionada con formas citosólicas eucariotas que con isoformas procariotas (49% de similitud con las formas citosólicas de ratón y rata y 20% de similitud con la bacteriana) (127).

La secuencia de nucleótidos del ADNc de la EM-NADP de álamo y de poroto muestran que el producto génico es, en ambos casos, 73% homólogo con la enzima cloroplástica de maíz (104, 113), mientras que la secuencia de aminoácidos de la enzima de frambuesa (64,3 kDa) presenta una similitud del 85,4% (156).

Por otra parte se aisló un ADNc de arroz que presenta una homología del 80% con respecto al correspondiente a la EM-NADP de maíz (155). La secuencia de aminoácidos deducida muestra un 81% de homología, incluyendo un péptido de tránsito altamente hidrofóbico en el extremo amino terminal, por lo que se sugiere que la EM-NADP de arroz sería cloroplástica. Estudios de Northern blot indican que la expresión del gen estaría regulada por estrés anaeróbico (155).

En *M. cristallynum* el ADNc codificaría una forma citosólica de la EM-NADP, debido a que no se ha detectado una secuencia para el péptido de tránsito. Esta proteína es 85,8% homóloga a la EM-NADP secuenciada de maíz y se expresa tanto en hojas como en raíces. Durante la transición de metabolismo C_3 a CAM, se observa un incremento en el estado estacionario de los transcriptos de la EM-NADP sólo en hoja, que se debe en parte a activación a nivel transcripcional (157).

Los estudios de Southern blot realizados en distintas especies muestran que en poroto existiría una única copia del gen para la EM-NADP y una serie de genes relacionados (103). En *Flaveria* existen resultados dispares, Rajeevan y colaboradores (162) observaron tres genes para la EM-NADP, mientras que Lipka y colaboradores (110) demuestran la existencia de un único gen. En *M. crystallinum*

se observaron dos o tres copias y copias adicionales de genes relacionados (157). Esto sugiere la existencia de una familia multigénica para la EM-NADP en ciertas especies.

1.2.9. Regulación

La mayor información sobre las propiedades cinéticas y el estado de oligomerización de la enzima málica se ha obtenido con la EM-NADP C_4. Al igual que otras enzimas del ciclo C_4, la EM-NADP está regulada por luz (57). Bajo condiciones de iluminación, se alcaliniza el estroma cloroplástico (163, 164) y se produce un aumento en la concentración de Mg^{2+} (42). Estas condiciones, pH 8,0 y elevada concentración de Mg^{2+}, favorecen la agregación oligomérica de la enzima a la forma tetramérica, que sería la forma más activa. De este modo, se puede sugerir que la EM-NADP estaría regulada *in vivo* a través de cambios en el estroma cloroplástico (165-167).

La EM-NADP no involucrada con el metabolismo C_4, a diferencia de la otra isoforma, presenta un menor pH óptimo y propiedades alostéricas. En este caso, succinato y fumarato disminuyen la cooperatividad y aumentan la actividad enzimática a bajas concentraciones de malato (101, 102, 105, 135-139).

1.3. Objetivos de la presente Tesis.

Los objetivos de la presente se pueden resumir en los siguientes puntos :

1. Purificar y estudiar las propiedades físicas y cinéticas de la EM-NADP dependiente de trigo (una planta C_3) e intentar dilucidar su posible rol fisiológico.

2. Estudiar los factores que afectan los equilibrios de asociación/disociación de la EM-NADP purificada de maíz (una planta C_4) y de trigo (una planta C_3). Para tal fin, se desarrolló una técnica de entrecruzamiento de las subunidades bajo las distintas condiciones (cambios en el pH, fuerza iónica, presencia de sustratos y efecto de la temperatura), identificándose los productos por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

3. Estudiar el efecto de la radiación UV-A y UV-B sobre la expresión de la EM-NADP de plántulas de maíz en función de la intensidad y duración de los tratamientos, y la manera por la cual tratamientos con luz roja y roja lejana influyen en esta respuesta.

4. Estudiar la expresión de las distintas formas de la enzima málica dependiente de NADP en los diferentes tipos fotosintéticos del género *Flaveria*, y su localización subcelular. Particularmente, estudiar la población de isoformas de la EM-NADP presentes en una especie con metabolismo intermedio C_3-C_4, y su localización en los distintos tipos celulares; y purificar y caracterizar una isoforma de la EM-NADP presente en hojas de esta especie.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Las plantas de maíz (*Zea mays*) y trigo (*Triticum aestivum*) se crecieron durante 15 días germinando las semillas en bandejas con vermiculita como soporte sólido o, alternativamente, en macetas con tierra.

Las plantas de las distintas especies de *Flaveria* (*Flaveria pringlei*, *F. robusta*, *F. cronquistii* (C_3); *F. sonorensis*, *F. oppositifolia*, *F. angustifolia*, *F. linearis*, *F. floridana*, *F. ramossisima* (C_3-C_4); *F. brownii*, *F. vaginata* (similar a C_4); *F. bidentis*, *F. trinervia* (C_4)) se crecieron en invernadero a 25°C durante el día y a 18°C durante la noche, con un fotoperíodo de entre 13 y 16 horas. Las especies fueron propagadas vegetativamente por estacas o germinadas a partir de semillas y crecidas en una mezcla de arena, perlita y tierra (2:1:1).

Para el estudio de inducción de la EM-NADP por luz UV y roja descripto en el capítulo 5, las plántulas etioladas de maíz se crecieron en rigurosas condiciones de oscuridad durante 10-15 días a 25°C en germinadores. Para ello, las semillas se colocaron entre dos hojas de papel absorbente, se envolvieron en papel aluminio y se colocaron en forma vertical en frascos con agua destilada.

2.2. Tratamiento de las plantas

Para el estudio de inducción de la EM-NADP de trigo por distintos compuestos que se describe en el capítulo 3, se cortaron hojas de trigo de 15 días y se colocaron verticalmente en frascos conteniendo agua destilada en ausencia (control) y presencia de los distintos compuestos. Las hojas se incubaron a 20°C bajo un fotoperíodo de 14 hs. En todos los casos, los datos obtenidos en estos experimentos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa INSTAT de Sigma Chemicals Co, USA.

Para el trabajo de inducción de la EM-NADP de maíz por distintas calidades de luz que se describe en el capítulo 5, las plántulas de maíz crecidas durante 15 días bajo condiciones de luz u oscuridad se expusieron bajo diferentes condiciones lumínicas. En todos los casos, la tercer hoja de cada planta utilizada fue colocada en forma horizontal a la fuente de luz y las intensidades lumínicas de luz fotosintéticamente activa (PAR = 400-700 nm), ultravioleta A (UV-A = 320-400 nm) y ultravioleta B (UV-B = 280-320 nm) que incidían sobre la superficie de la hoja se midieron al comienzo y final de cada experimento. Para los experimentos de inducción con altos niveles de luz blanca (PAR = 300 μmol m^{-2} s^{-1}) se utilizó una lámpara de metal halógeno (400 W, HPI-T, Phillips Inc., Bélgica). La baja intensidad de luz blanca se obtuvo a partir de lámparas fluorescentes frías (40W Phillips). La radiación ultravioleta se obtuvo a partir de lámparas de UV (UVB-313, Q-Panel, Cleveland, OH, EEUU). Para remover longitudes de onda menores a 280 nm se utilizaron hojas de 0,076 mm de acetato de celulosa y hojas de 0,127 mm de poliéster para eliminar las longitudes de onda menores a 320 nm. La radiación de

luz roja se obtuvo a partir de un diodo de luz roja con un $\lambda_{máx}$ de emisión a 680 nm (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, Inglaterra). Las intensidades luminosas fotosintéticamente activas se midieron utilizando un sensor de fotones (Li-189, Licor Inc., Lincoln, NB, EEUU) y las intensidades de UV con sensores de UV-A y UV-B (UVA y SUV, Ultraviolet Meter Model 3D, Solar light Co., Philadelfia, PA, EEUU) y éstos se calibraron para las diferentes fuentes de luz con un espectroradiómetro (Optronics 754, Optronics Inc., Orlando, FL, EEUU)

2.3. Preparación de extractos crudos

Los extractos crudos se prepararon homogeneizando en un mortero 0,2 g del tejido correspondiente en presencia de N_2 líquido, y se resuspendieron en 0,5 ml de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM Na_2HPO_4, 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol, 20% (v/v) glicerol, 1 mM PMSF) adicionado de 5% (p/v) de PVPP. El homogenado se clarificó por centrifugación a 15.800 x *g* durante 10 minutos y se separó el sobrenadante.

Para la preparación de extractos para Western blot descriptos en los capítulos 5 y 6 se realizó una precipitación con fenol según el protocolo descripto por Van Etten y colaboradores (168). Se utilizó un buffer de extracción conteniendo 0,7 M sacarosa, 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,1 M KCl, 2% (v/v) PVPP, 2 mM PMSF y 10 μM leupeptina. Luego de macerar totalmente el tejido, se agregó un volumen igual de fenol saturado en agua y se mezclo por agitación. La proteína que se particionó en la fase fenólica se separó de la fase acuosa por centrifugación y se precipitó con metanol. Finalmente, la proteína se disolvió en 0,25 M Tris-HCl

pH 7,5; 2% (p/v) SDS; 0,5% (v/v) 2-mercaptoetanol y las muestras se hirvieron durante 2 minutos antes de sembrarlas en los geles.

Para realizar las medidas de actividad enzimática a partir de extractos crudos que se describen en el capítulo 5, los extractos fueron deslados por el método de Penefsky (169), filtrando a través de columnas *Sephadex G-25* pre-equilibradas con buffer Tris-HCl pH 8,0.

2.4. Purificación de la EM-NADP

2.4.1. A partir de hojas verdes de maíz

La EM-NADP fue purificada a partir de hojas verdes de maíz siguiendo el procedimiento descripto por Iglesias y Andreo (170).

Las hojas lavadas y cortadas en trozos finos se homogenizaron en una licuadora a máxima velocidad durante 2 minutos con una solución de extracción que contenía 100 mM Tris-HCl pH 7,3, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 20% (v/v) glicerol, 10 mM 2-mercaptoetanol, 0,5% (p/v) ácido ascórbico y 1 mM PMSF (buffer A). El extracto obtenido se filtró a través de dos capas de tela de perlón y se centrifugó a 10.800 x *g* durante 15 minutos.

El sobrenadante se llevó a 40% de saturación con $(NH_4)_2SO_4$ sólido y se agitó durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 10.800 x *g* durante 20 minutos. El sobrenadante se llevó a 70% de saturación con $(NH_4)_2SO_4$ sólido y se procedió como en el paso anterior.

Luego de la centrifugación, el precipitado resultante se resuspendió en 50 mM Tris-HCl pH 7,3, 5 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA, 10% glicerol (v/v) y 10 mM 2-mercaptoetanol (buffer B) y se sembró en una columna de exclusión molecular

Sephadex G-50, previamente equilibrada con buffer B. La columna se eluyó con el mismo buffer y las fracciones con actividad EM-NADP se sembraron en una columna de intercambio aniónico, *DEAE-celulosa*, previamente equilibrada con buffer B y conectada al sistema de FPLC (Pharmacia). La columna se lavó con 2 volúmenes de columna de buffer B y se eluyó con un gradiente lineal de 0-400 mM NaCl. Las fracciones con mayor actividad se llevaron al 70% de saturación con $(NH_4)_2SO_4$ sólido.

Luego de centrifugar, el precipitado se resuspendió en un mínimo volumen de 25 mM NaH_2PO_4 pH 7,0, 5 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA, 10% (v/v) glicerol y 10 mM 2-mercaptoetanol (buffer C). La solución obtenida se dializó contra 100 volúmenes de buffer C durante toda la noche. La muestra dializada se sembró en una columna de adsorción, hidroxilapatita, previamente equilibrada con buffer C. Luego de lavar con 2 volúmenes del mismo buffer, la columna se eluyó con una serie de soluciones de concentraciones crecientes de NaH_2PO_4 (40, 50, 60 y 90 mM) en buffer C. La EM-NADP de maíz fue recuperada en el eluído de 50 mM NaH_2PO_4 y precipitada con $(NH_4)_2SO_4$ al 70% de saturación.

Luego de centrifugar, el precipitado se resuspendió en un mínimo volumen de buffer B y se dializó contra 100 volúmenes del mismo. La muestra dializada se sembró en una columna de afinidad, *Affi-Gel Blue*, conectada al sistema de FPLC y previamente equilibrada con buffer B. Luego de lavar con 2 volúmenes de columna con el buffer citado, la proteína fue eluída con un gradiente lineal de 0-400 mM de NaCl. La EM-NADP se recuperó a una concentración de 170 mM NaCl. Las fracciones con mayor actividad fueron recogidas y mantenidas a -80°C. En estas condiciones la actividad específica de la enzima permaneció constante durante varios meses. La pureza de la preparación final se analizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

2.4.2. A partir de tallos y raíces de trigo

Se optimizaron dos protocolos para la purificación de la EM-NADP a partir de tallos y raíces de trigo:

Purificación de EM-NADP a partir de tallos: Los tallos de trigo (250 g) se lavaron y homogeneizaron en 300 ml de buffer de extracción (buffer A). El homogenado se filtró a través de dos capas de tela de perlón y se centrifugó a 9000 x *g* durante 15 minutos. El sobrenadante se llevó a 30% de saturación con $(NH_4)_2SO_4$ sólido y se agitó durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 9.000 x *g* durante 30 minutos. El sobrenadante se llevó a 60% de saturación con $(NH_4)_2SO_4$ sólido y se procedió como en el paso anterior. Luego de la centrifugación, el precipitado resultante se resuspendió en buffer B y se sembró en una columna de exclusión molecular *Sephadex G-75*, previamente equilibrada con este buffer. La columna se eluyó con buffer B y las fracciones con actividad EM-NADP se sembraron en una columna de *DEAE-celulosa*, previamente equilibrada con buffer B. La columna se lavó con 2 volúmenes de columna de buffer B y se eluyó con un gradiente lineal de 0-300 mM NaCl . Las fracciones con mayor actividad se llevaron al 60% de saturación con $(NH_4)_2SO_4$ sólido. El precipitado se colectó por centrifugación y se resuspendió en 5 ml de buffer conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 7,3, 5 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA, 5% glicerol (v/v) y 10 mM 2-mercaptoetanol (buffer D) y se pasó por una columna de *Sephadex G-75* (2 x 20 cm). Las fracciones con actividad se sembraron en una columna de afinidad, *Affi-Gel Blue*, conectada al sistema de FPLC y previamente equilibrada con buffer D. Luego de lavar con 2 volúmenes de columna con el buffer citado, la proteína fue eluída con un gradiente lineal de 0-300 mM de NaCl. La EM-NADP se recuperó a una concentración entre 220-240 mM NaCl. Finalmente, las fracciones con mayor

actividad fueron sembradas en una columna de exclusión molecular *Superosa 12 HR 12/30* en FPLC pre-equilibrada con buffer D . La enzima purificada fue mantenida a -20ºC hasta su uso. La pureza de la preparación final se analizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Purificación a partir de raíces: Las raíces de trigo se obtuvieron a partir de plantas crecidas 15 días en vermiculita. El procedimiento de purificación fue similar al descripto para tallos siguiendo las siguientes modificaciones: (*i*) el extracto crudo se precipitó con sulfato de amonio entre un 30-70 % de saturación, (*ii*) la columna de *Sephadex G-75* se equilibró y eluyó con buffer D; (*iii*) se eliminó la columna de *DEAE-celulosa*.

2.4.3. A partir de hojas de *Flaveria floridana*

El protocolo de purificación de la EM-NADP de 62 kDa de *F. floridana* fue similar al descripto para la enzima de 62 kDa de hojas de maíz, con las siguientes modificaciones: (*i*) el extracto crudo se precipitó con sulfato de amonio entre un 30-70 % de saturación, (*ii*) se eliminó la columna de *Affi-Gel Blue*. (*iii*) las fracciones con mayor actividad eluídas de la columna de hidroxilapatita fueron sembradas en una columna de exclusión molecular *Superosa 12 HR 12/30* en FPLC.

2.5. Ensayos de actividad enzimática

Enzima málica dependiente de NADP (EM-NADP): La actividad EM-NADP se determinó espectrofotométricamente a 30ºC, siguiendo la producción de NADPH a 340 nm, en un espectrofotómetro Hitachi 150-20 (170). El medio de ensayo estándar contenía 50 mM Tris-HCl (ajustado a pH 7,5 o pH 8,0), 10 mM $MgCl_2$, 0,5 mM NADP

y 4 o 10 mM L-malato en un volumen final de 1 ml. La reacción se inició con el agregado de L-malato. Se define una unidad (UI) como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de NADPH x min^{-1} en las condiciones especificadas.

Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC): La actividad PEPC se determinó espectrofotométricamente a 30°C, siguiendo el consumo de NADPH a 340 nm, en una reacción acoplada con la catalizada por la malato deshidrogenasa dependiente de NAD (MDH-NAD) (170). El medio de ensayo estándar contenía 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM $KHCO_3$, 4 mM fosfoenolpiruvato, 0,15 mM NADH y 10 UI de MDH en un volumen final de 1 ml. La reacción se inició con el agregado del fosfoenolpiruvato.

Malato deshidrogenasa dependiente de NADP (MDH-NADP): Previamente a la medida de actividad enzimática, se preincubaron las muestras a temperatura ambiente durante 2 hs en presencia de 100 mM DTT. La actividad MDH se determinó espectrofotométricamente a 30°C, siguiendo el consumo de NADPH a 340 nm (171). El medio de ensayo estándar contenía 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,25 mM NADPH y 1 mM oxaloacetato en un volumen final de 1 ml. La reacción se inició con el agregado del oxaloacetato.

2.6. Estudios cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos se realizó variando la concentración de uno de los sustratos cercano al valor de K_m, y manteniendo las concentraciones de los otros sustratos y cofactores saturantes. En estas condiciones, las velocidades iniciales observadas dependen de la concentración del sustrato variable de acuerdo a la ecuación:

$$v = V_{max} \frac{A}{K_m + A}$$

donde v representa la velocidad inicial, A la concentración del sustrato variable, V_{max} la velocidad máxima de la reacción y K_m la constante de Michaelis para A.

Las concentraciones libres de cada sustrato y cofactor fueron calculadas de acuerdo al algoritmo presentado por Grover y colaboradores (107), utilizándose las siguientes constantes de disociación para la corrección: Mg-malato: 28,2 mM; Mg-NADP: 19,1 mM; Mn-malato: 5,75 mM; Mn-NADP: 1,1 mM. Los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten por regresión no lineal por mínimos cuadrados (172). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

El estudio de pH óptimo se realizó utilizando diferentes sistemas buffers para los rangos de pH estudiados: 50 mM MES (pH 5,5-6,5), 50 mM Tricina-MOPS (pH 7,0-7,5) y 50 mM Tris-HCl (pH 7,5-8,5).

El estudio de temperatura se realizó midiendo actividad a distintas temperaturas en las condiciones anteriormente descriptas.

Previamente a los estudios cinéticos, la EM-NADP fue desalada por el método de Penefsky (169), filtrando a través de columnas de *Sephadex G-50* previamente equilibradas con los buffers correspondientes.

2.7. Determinación de proteínas

La concentración de proteína soluble fue determinada por el método de Sedmak y Grossberg (173), o por el método de Lowry y colaboradores (174). En todos los casos se utilizó albúmina sérica bovina disuelta en 100 mM NaCl como

testigo, cuya concentración se determinó espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción $\varepsilon_{279mm}^{(1\%)} = 6,67$ (175).

2.8. Determinación de clorofila

La concentración de clorofila se determinó por el método de Whatley y Arnon (176). Para ello se agregaron 5 µl de la muestra a analizar a 1 ml de una solución de 80% (v/v) acetona. Se agitó enérgicamente y se midió absorbancia a 652 nm y a 740 nm contra blanco de 80% (v/v) acetona. La concentración de clorofila se obtuvo aplicando la ecuación:

$$\text{Clorofila (mg/ml)} = 5,6\ (A_{652} - A_{740})$$

2.9. Preparación de anticuerpos

2.9.1. Inmunización y obtención del suero

Para la producción de anticuerpos policlonales se inmunizaron conejos con 250 µg de EM-NADP purificada de tallos de trigo mediante inyecciones subcutáneas (200 µg) e intramusculares (50 µg) con adyuvante de Freund completo en relación 1:1. Después de 2 y 4 semanas se inyectaron 100 µg de EM-NADP en forma subcutánea con adyuvante de Freund incompleto (1:1). Previo a la inmunización se extrajo sangre para chequear la ausencia de reacciones inespecíficas con el antígeno. A partir de la segunda inyección, se extrajo sangre cada 15 días para monitorear la producción de anticuerpos específicos. Cuando se alcanzaron títulos adecuados contra el antígeno de interés, se anestesiaron los conejos y se extrajo sangre por punción cardíaca. La sangre se dejó coagular a 37°C durante una hora,

se dejó enfriar, y se separó el suero con una pipeta Pasteur. Finalmente, el suero se centrifugó a 1.000 x *g* durante 10 minutos, para separar cualquier material insoluble remanente.

Los anticuerpos contra la EM-NADP mayoritaria de hojas verdes de maíz fueron gentilmente provistos por la Dra. Verónica Maurino (CEFOBI, UNR), los anticuerpos contra la subunidad mayor de la RuBisCO de espinaca por el Dr. Alejandro Viale (PROMUBIE, UNR) y los anticuerpos contra la enzima malato deshidrogenasa dependiente de NAD de ananá por la Lic. Ileana Cuevas (CEFOBI, UNR).

2.9.2. Purificación de los anticuerpos a partir del suero

Los anticuerpos policlonales obtenidos de los conejos se purificaron por afinidad a partir del suero, mediante una modificación de la técnica descripta por Plaxton (177). Para ello, 50 µg de la EM-NADP purificada de tallos de trigo se sembraron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de 10% con pocillo único. Luego de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa a 40 mA durante toda la noche. La membrana, cortada en los extremos, fue bloqueada con 5% (p/v) leche descremada en TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl). Por su parte, los extremos fueron teñidos con 0,1% (p/v) Negro Amido. Una vez localizada la proteína de interés, ambos extremos se alinearon con la membrana previamente bloqueada cortándose de ésta el área conteniendo la enzima. Esta membrana fue entonces fraccionada en trozos de 1 cm y éstos se lavaron con TBS. Posteriormente, se incubaron con 500 µl del suero a purificar durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados con TBS y se liberaron los anticuerpos específicos con 500 µl de una solución conteniendo 100 mM glicina

(pH 3,0), 100 mM NaCl, 3 veces de 1 minuto cada vez. Se recogieron las alícuotas conteniendo los anticuerpos purificados y se neutralizaron con 1/10 (v/v) de 1 M Tris-HCl pH 8,0. Las membranas se lavaron con TBS y se repitió el ciclo 6 veces. Finalmente, los anticuerpos purificados se concentraron por liofilización y se ensayaron por análisis de Western blot.

2.10. Electroforesis

2.10.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

Las electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se llevaron a cabo utilizando la celda Mini-PROTEAN II Cell de Bio-Rad y el sistema discontinuo de Laemmli (178). Las concentraciones finales de acrilamida de los geles de separación y de concentración utilizadas fueron 10% y 5%, respectivamente. Las muestras diluídas 1:5 en buffer de desnaturalización (60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 25% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 0,5% (v/v) 2-mercaptoetanol y 0,1% (p/v) azul de Bromofenol) fueron hervidas durante 2 minutos antes de ser sembradas en el gel.

Los geles desnaturalizantes fueron analizados para proteínas totales por tinción con azul de Coomassie (179) o transferidos a membranas de nitrocelulosa para el análisis por Western blot.

Para el estudio de los cambios en el estado oligomérico de las EM-NADP de maíz y de trigo descripto en el capítulo 4, la concentración final de acrilamida en los geles de separación fue de 6% para los experimentos realizados con la enzima de maíz y de 5 % para los experimentos realizados utilizando la enzima de trigo. Se utilizaron los siguientes marcadores de masa molecular: miosina (205 kDa),

QC

β-galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa) y albúmina sérica bovina (66 kDa). Los geles fueron revelados por tinción con azul de Coomassie.

Para los experimentos de inducción de la EM-NADP de maíz por UV-B y para el estudio de las isoformas de la EM-NADP en *Flaveria* descriptos en los capítulos 5 y 6 se realizaron geles en gradiente entre 7,5-15% (p/v) de poliacrilamida para los geles de separación.

2.10.2. Electroforesis en condiciones nativas

La electroforesis en condiciones nativas se realizó de acuerdo al procedimiento descripto por Davis (180), empleando para el gel de separación y de concentración, una concentración de acrilamida de 6% y 3%, respectivamente. Los geles se precorrieron a 40 V durante 2 horas a 10°C. La electroforesis se corrió a 150 V a 10°C. Las muestras se prepararon por dilución 1:5 en buffer de muestra que consistía en 300 mM Tris-HCl pH 6,8, 50% (v/v) glicerol y 0,05% (p/v) azul de Bromofenol.

Los geles nativos fueron revelados para actividad EM-NADP. En este caso, el gel se incubó en una solución que contenía Tris-HCl pH 7,5, 200 mM L-malato, 20 mM $MgCl_2$, 10 mM NADP, 0,1 mg/ml azul de tetrazolio y 5 µg/ml metasulfato de fenazina. El gel se incubó en la oscuridad hasta el desarrollo de bandas color púrpura (181).

2.10.3. Isoelectroenfoque en condiciones nativas

El isoelectroenfoque de proteínas se llevó a cabo utilizando un aparato LKB, para geles horizontales. El gel estaba constituído por 5% acrilamida, 10% (v/v)

glicerol, y una mezcla de anfolitos (rango 3-10 y 5-8). Como buffer de electrodo se utilizaron soluciones de H_3PO_4 0,01 M y NaOH 1M. Para la generación del gradiente de pH se precorrió el gel durante 30 min a 600 V. El gel se corrió a 1000 V durante 3 horas. Posteriormente, fue revelado para la actividad EM-NADP como se describió anteriormente. La determinación del pI se realizó graficando el pH medido a partir de distintos segmentos del gel en función de la distancia de corrida.

2.10.4. Análisis por Western Blot

La electrotransferencia de proteínas se llevó a cabo utilizando la celda Mini-Trans-Blot transfer (Bio-Rad) y siguiendo la técnica descripta por Burnette (182).

Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en buffer de transferencia (15,6 mM Tris, 120 mM glicina, 20% (v/v) metanol, pH 8,8) al menos por 2 horas a 100 mA a 10°C. Las membranas se bloquearon con 5% (p/v) leche descremada en TBS durante 30 minutos. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente por 1 hora. Luego, la membrana se lavó 10 minutos con TBS 2 veces, y se incubó 1 hora con anti-IgG conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Promega). Finalmente, la membrana se lavó con TBS y se reveló incubando con 20 µl de azul de nitrotetrazolio (NBT, 50 mg/ml) y 10 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indoilfosfato (BCIP, 50 mg/ml) en 10 ml de buffer sustrato (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$). La reacción se desarrolló en oscuridad hasta aparición de bandas color púrpura y se detuvo por lavados sucesivos con agua destilada.

2.11. Centrifugación por gradiente de sacarosa

Para realizar los experimentos de centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa se realizaron extractos proteicos de *F. cronquistii* (9 g), *F. ramossisima* y *F. trinervia* (2 g) como se describió anteriormente. Se obtuvieron extractos clarificados por centrifugación a 15.000 x *g* durante 1 h. La fracción sobrenadante se llevó a 80% de saturación con sulfato de amonio a 4°C, se agitó durante 1 h y se re-centrifugó durante 15 minutos. El pellet se resuspendió con 2 ml de buffer de extracción (buffer A) y se centrifugó 15.000 x *g* durante 10 minutos. El sobrenadante fue diluído con un volumen igual de buffer de extracción, y se sembraron 2 ml de la muestra sobre 35 ml de un gradiente lineal de sacarosa entre 10 y 30% (v/v). El gradiente de sacarosa se preparó a partir de soluciones madres de 10 y 30% conteniendo 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM DTT, 2,5 mM $MgCl_2$ y 0,2 mM Na_2EDTA. Los gradientes se centrifugaron a 110.000 x *g* durante 40 hs, se colectaron las fracciones y se midió actividad de EM-NADP. Las fracciones conteniendo picos de actividad se juntaron para llevar a cabo estudios cinéticos. Las concentraciones de sacarosa fueron determinadas utilizando un refractómetro.

2.12. Estudios de entrecruzamiento de la EM-NADP purificada de maíz y de trigo

2.12.1. Asociación y disociación de las subunidades enzimáticas

Las enzimas purificadas de hojas de maíz y tallos de trigo se incubaron bajo distintas condiciones durante 10 minutos a 25 °C en buffer fosfato de potasio 50 mM previo al entrecruzamiento químico.

Para los estudios de pH, ambas enzimas fueron preincubadas en buffer fosfato de potasio en un rango entre 6,0 y 9,0.

Para los estudios de temperatura, las proteínas fueron preincubadas en buffer fosfato de potasio a pH 7,0 u 8,0 (según la fuente enzimática utilizada) a diferentes temperaturas (0-42 °C)

Para estudiar el efecto de distintos metabolitos en el estado de agregación de ambas enzimas, la EM-NADP fue preincubada a pH 7,0 u 8,0 (dependiendo de la enzima utilizada) en presencia de 10 mM Mg^{2+}, 10 mM L-malato, 0.5 mM NADP, 20% glicerol (v/v) o 33 mM sulfato de amonio. Después del agregado de cada metabolito, se ajustó el pH en los casos en los que fue necesario.

2.12.2. Entrecruzamiento químico

El entrecruzamiento de la EM-NADP de maíz y de trigo se realizó según la técnica descripta por CaJacob y colaboradores (183) con algunas modificaciones.

El entrecruzamiento se realizó con una concentración de glutaraldehído 4 mM y en una relación de 10 mmoles/µmol de enzima durante 15 minutos a 25°C. Luego se agregó borohidruro de sodio disuelto en NaOH 0,2% (p/v) a una concentración final de 2 moles/mol de glutaraldehído. Después de 20 minutos a 4°C, se agregaron 8 equivalentes molares de piruvato de sodio para eliminar el exceso de borohidruro de sodio. La mezcla de reacción se dejó una hora a 4°C.

Las muestras se diluyeron 20 veces con buffer fosfato de potasio 50 mM pH 8,0, se desalaron y concentraron utilizando tubos Centricon 30 (Amersham).

2.12.3. Cuantificación de cada forma enzimática a partir de los geles de poliacrilamida.

A pesar de que cada forma enzimática en los geles era difusa por el entrecruzamiento con glutaraldehído, el área correspondiente a cada forma enzimática se pudo estimar con razonable certeza mediante la digitalización de las imágenes y posterior integración de las áreas por densitometría utilizando el programa Quantiscan (Microbial System Ltd.). Al integrar las áreas se tomó una barra rectangular que cubrió un 80 % de cada calle. Cada análisis densitométrico fue determinado por triplicado para minimizar los errores. De esta forma, se identificaron los tetrámeros, dímeros y monómeros de la EM-NADP de trigo (288, 144 y 72 kDa) y de maíz (248, 124 y 62 kDa) por comparación con las movilidades relativas de los marcadores de masa molecular.

Para cuantificar las formas tetraméricas y monoméricas, diferentes cantidades conocidas de las EM-NADP de ambas fuentes fueron entrecruzadas a pH 9,0 (condición a la cual ambas enzimas existen exclusivamente como tetrámeros) o no se entrecruzaron (para el estudio del monómero), y se corrieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. En ambos casos se construyeron curvas de calibración graficando las áreas integradas determinadas por densitometría en función de la cantidad de proteína sembrada, obteniéndose gráficos con correlación lineal. Como no se observó ninguna condición bajo la cual toda la enzima existiera como dímero, se graficó para cada enzima una línea hipotética entre las líneas experimentales para el tetrámero y el monómero para obtener una curva de calibración para el dímero.

2.12.4. Cálculo de las constantes de disociación

Considerando la disociación secuencial de tetrámeros (T) a dímeros (D) y de dímeros (D) a monómeros (M), las reacciones de equilibrio para la disociación de la enzima pueden ser definidas como

$$T \rightleftarrows 2D \qquad y \qquad D \rightleftarrows 2M$$

y las constantes de equilibrio pueden ser calculadas de acuerdo a las siguientes ecuaciones

$$K_T = \frac{D^2}{T}$$

$$K_D = \frac{M^2}{D}$$

donde K_T y K_D representan las constantes de disociación para cada proceso.

2.13. Transformación de *E. coli* con ADN plasmídico

Para la transformación de *E. coli* se siguió la técnica de electroporación, utilizando un plásmido (pBS(-)) que contiene un fragmento EcoRI de 1,3 kb correspondiente al extremo 3' terminal del ADN copia (ADNc) de la EM-NADP de hojas verdes de maíz (provisto por el Dr. Timothy Nelson, Universidad de Yale, EEUU) ; o alternativamente un plásmido pBR325 conteniendo un fragmento de 1,1 kb correspondiente a la región 5´del ADNr 25s de *Vicia faba*. Para ello, se prepararon bacterias competentes inoculando 1 litro de medio LB (1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extracto de levaduras, 0,5% (p/v) NaCl) con un cultivo fresco de *E. coli* XL1 Blue. Las células se crecieron a 37°C con agitación continua hasta que la absorbancia a 600 nm fue de 0,5-0,8. El cultivo se incubó en hielo durante

15 minutos y se centrifugó a 4.000 x *g* por 15 minutos. El pellet conteniendo las células se lavó 2 veces con 1 litro de agua fría. El pellet obtenido en el último lavado, se resuspendió en 20 ml de 10% (v/v) glicerol frío. Se centrifugó como en el paso anterior y se resuspendió en 3 ml de 10% (v/v) glicerol. La concentración de células fue de 1-3 x 10^6 células/ml.

Para la electroporación, se colocaron 40 µl de la suspención celular con 1-2 µl del plásmido disuelto en agua en un tubo Eppendorf. La mezcla se incubó 1 minuto en hielo y se transfirió a una cubeta de electroporación preenfriada. Las condiciones para la electroporación fueron 25 µF, 2,0 kv. y 200 Ω. El electroporador utilizado fue el Gene Pulser de Bio Rad. Luego de la descarga, se agregó a la cubeta 1 ml de SOC (2% (p/v) triptona, 5% (p/v) extracto de levaduras, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM glucosa) y se resuspendió. La suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf y se agitó a 37°C durante 1 hora. Luego de este período las células se sembraron en cajas de Petri con LB agar (LB y 1,2% (p/v) agar) al que se le incorporaron 100 µg/ml de ampicilina.

2.14. Obtención de ADN plasmídico

La preparación de ADN plasmídico se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Birnboin y Doly (184). Dos mililitros de cultivo de células de *E. Coli* transformadas con los plásmidos a purificar y crecidas en presencia de ampicilina, se centrifugaron a 2.000 x *g* por 3 minutos. El pellet se resuspendió en 100 µl de una solución fría de 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA y 50 mM glucosa y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 200 µl de una solución 0,2 N NaOH, 1% (v/v) SDS y se incubó durante 5 minutos a 0°C. Se agregó 150 µl de 5 M

acetato de potasio, pH 4,8 y se agitó vigorosamente. Se incubó 5 minutos en hielo y se centrifugó a 11.600 x *g* por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf y se extrajo 2 veces con un volumen igual de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1). Se centrifugó a 11.600 x *g* durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregó dos volúmenes de etanol frío. Luego de incubar 5 minutos en hielo, se recuperó el ADN plasmídico por centrifugación a 11.600 x *g* durante 5 minutos. El pellet obtenido se lavó dos veces con 70% (v/v) etanol, se secó y se resuspendió en agua estéril.

2.15. Purificación de los fragmentos de ADN

El plásmido obtenido de las preparaciones conteniendo el fragmento de 1,3 kb del ADNc de la EM-NADP se digirió con EcoRI, y el plásmido conteniendo el fragmento de 1,1 kb del ADNr 25s con BamHI, siguiendo las instrucciones del fabricante de la enzima de restricción (Promega). El digerido resultante se separó electroforéticamente en geles de 0,7% (p/v) agarosa preparados con TAE (40 mM Tris-acetato, pH 8,0, 1 mM EDTA) y con una concentración de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (185).

El fragmento de 1,3 kb se recuperó de geles de agarosa de bajo punto de fusión, de donde se cortó la banda correspondiente y se colocó en un tubo estéril. La purificación del fragmento se llevó a cabo por la técnica de fenol. La banda cortada del gel se incubó a 65°C en presencia de 200 µl de TE y 100 µl de 3 M acetato de sodio durante 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 500 µl de fenol previamente llevado a 65°C y se agitó. La mezcla se centrifugó a 11.600 x *g* durante 5 minutos y se recuperó la fase superior. Se repitió la extracción con fenol y se

realizó una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó a 11.600 x *g* durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante al cual se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó a 0°C durante 10 minutos. Luego, se centrifugó a 11.600 x *g* durante 30 minutos, descartándose el sobrenadante. Se lavó el pellet con 70% etanol absoluto, se secó y se resuspendió en agua estéril. La calidad y concentración del fragmento obtenido se evaluó por electroforesis en geles de 1% agarosa sembrando en paralelo ADN λ cortado con Eco/HindIII (Promega) como marcador de tamaño molecular.

2.16. Preparación de la sonda radioactiva

Para el marcado de la sonda radioactiva se utilizó el kit de marcación Prime-a Gene de Promega. La mezcla (conteniendo 20-50 ng del fragmento purificado previamente calentado a 100°C durante 10 minutos y posteriormente transferido a hielo) se incubó toda la noche a temperatura ambiente en presencia de 5 µl de [α-^{32}P]dATP (3000 Ci/µl). Luego de este período, se le adicionó 200 µl de una solución conteniendo 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,25% (p/v) SDS, 1 µM dCTP. El [α-^{32}P]dATP no incorporado a la sonda fue eliminado por filtración en columnas de Sephadex G-50 (169). La radiactividad de la sonda fue medida por centelleo líquido, determinándose el porcentaje de incorporación del radiactivo y la relación cpm/µg de ADN.

2.17. Dot Blot de ARN total

2.17.1. Extracción de ARN total

Se extrajo ARN total a partir de hojas de maíz siguiendo la técnica descripta por Wadsworth y colaboradores (186). En todos los casos, 300 mg de hojas se lavaron con agua destilada, se cortaron en pequeños trozos y se homogeneizaron en mortero en presencia de N_2 líquido. El pulverizado se transfirió a tubos Eppendorf y se les adicionó 500 µl de buffer de extracción que consistía en 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM ácido aurín tricarboxílico, 200 mM LiCl, 100 mM EDTA, 100 mM 2-mercaptoetanol y 2% (p/v) N-lauril sarcosina. Se agitó durante 15 segundos, y se les agregó 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1). Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 15.800 x *g* por 5 minutos. Se extrajo la fase superior y se repitió la extracción 2 veces. Luego de la última extracción, se separó la fase acuosa, se le agregó un volumen de 6 M LiCl y se incubó toda la noche a 4°C. Luego, se centrifugó a 15.800 x *g* durante 15 minutos y el pellet se lavó 2 veces con 3 M LiCl. Finalmente, se disolvió en 400 µl de 2% acetato de potasio y se incubó a 55°C. Luego de 10 minutos se centrifugó para eliminar el material insoluble, se le adicionó 1 ml de etanol absoluto y se dejó precipitar a -20°C toda la noche. Se centrifugó a 15.800 x *g* durante 15 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en 20 µl de agua estéril. La concentración de ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y la pureza por la relación de absorbancias 260/280 nm.

2.17.2. Dot blot de ARN total

Para realizar los dot blots de ARN se siguió el protocolo descripto para la utilización de la membrana de nylon Hybond-N según sus fabricantes (Amersham). Se incubaron los ARN 5 minutos a 65 °C con 3 volúmenes de buffer conteniendo 500 µl de formamida, 162 µl de formaldehído 37 % (v/v) y 100 µl de buffer MOPS 10X (0,2 M MOPS, 0,5 M acetato de sodio pH 7,0; 0,01 M Na_2EDTA). Luego se colocaron las muestras en hielo y se agregó un volumen de SSC 20X (3 M NaCl; 0,3 M citrato de sodio). Posteriormente, se sembraron las muestras sobre la membrana de nylon Hybond-N previamente humedecida con SSC 10X. Se dejó secar y se fijó a 80°C durante 2 hs.

2.17.3. Hibridación de la membrana con la sonda radioactiva

Tanto la prehibridación como la hibridación de la membrana de Hybond-N se llevaron a cabo en horno a 65°C, siguiendo las indicaciones de los fabricantes (Amersham). La prehibridación se realizó durante 4 horas con una solución que contenía SSPE 5X (270 mM NaCl, 15 mM Na_2HPO_4, pH 7,0, 1,5 mM EDTA), 0,5% (p/v) SDS, solución Denhardt 5X (0,5% (p/v) Ficoll, 0,5% (p/v) PVPP, 0,5% (p/v) BSA) y 0,02 mg/ml de ADN esperma de salmón previamente hervido durante 5 minutos. Se utilizaron 0,2 ml de esta solución por cm^2 de membrana. Luego de la prehibridación, se adicionó la sonda radioactiva que fue previamente hervida durante 10 minutos. La sonda utilizada poseía un mínimo de radioactividad de 10^8 cpm/µg de ADN y una concentración final en la solución de hibridación de 10^7 cpm/ml. La hibridación se llevó a cabo durante 12 horas a 65°C. Luego de este

período, la membrana se lavó 2 veces con SSPE 2X, 0,1% SDS durante 10 minutos a temperatura ambiente y una vez con SSPE 1X, 0,1% SDS durante 15 minutos a 65°C. Finalmente, la membrana se expuso en condiciones de humedad durante al menos un día a -80°C. Las autoradiografías se obtuvieron por exposición en placas X-OMAT de Kodak.

2.18. Localización *in situ* de la EM-NADP utilizando la técnica de detección inmuno-oro

2.18.1 Preparación de las muestras para microscopía óptica y marcado con oro coloidal

Las muestras que se utilizaron para realizar los estudios de inmunolocalización fueron fijadas por un período de 12-24 horas a 2°C en 50 mM PIPES, pH 7,2, conteniendo 2% (v/v) paraformaldehído y 12,5% (v/v) glutaraldehído. Posteriormente, éstas fueron deshidratadas por incubación en una serie de soluciones de concentraciones crecientes de etanol y embebidas en resina acrílica Blanca L. R. Se cortaron secciones de 1 µm de espesor y se secaron sobre portaobjetos recubiertos de gelatina.

Para los estudios de inmunolocalización, las muestras se bloquearon durante 1 hora en TBST (50 Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20)-BSA, para eliminar los sitios de unión no específicos sobre las proteínas. Las muestras fueron incubadas durante 16 horas con suero preinmune o con los anticuerpos purificados contra la EM-NADP de 62 kDa. Luego de una serie de lavados con TBST-BSA, las secciones se incubaron durante 1 hora con Proteína A-oro (15 nm) diluida 1:1000 con TBST-BSA. Posteriormente, se expusieron al reactivo resaltador

de plata (de acuerdo a la descripción de los fabricantes (Amersham)), se tiñeron con 1% (p/v) Safranina O y se fotografiaron utilizando un microscopio Leitz Aristoplan.

2.18.2. Preparación de las muestras para microscopía electrónica de transmisión y marcado con oro coloidal

Las muestras fueron procesadas hasta el paso de embebido en resina acrílica como se describió para microscopía óptica. Luego, se cortaron en secciones finas (menores de 90 nm) y se incubaron durante 1 hora en TBST-BSA sobre gradillas de níquel no recubierto.

Para la inmunolocalización, los cortes se incubaron con el suero preinmune o los anticuerpos purificados durante 16 horas, se lavaron y trataron con proteína A-oro como se describió anteriormente. Las secciones se lavaron sucesivamente con TBST-BSA, TBST y agua destilada. Finalmente, se tiñeron con 1% (p/v) permanganato de potasio y 2% acetato de uranilo acuoso en una relación 1:4.

La densidad de las partículas de oro en las muestras se analizó por densitometría utilizando el programa NIH Image 1,56. Las imágenes de las microscopías ópticas y electrónicas se digitalizaron, y se llevó a cabo conteo de los puntos combinado con planimetría automática para determinar la distribución intracelular de las partículas de oro.

2.19. Localización de la EM-NADP en protoplastos de células mesofílicas y de la vaina vascular de *Flaveria floridana*

Para realizar los estudios de localización de la EM-NADP a partir de hojas de *F. floridana* se siguió la técnica descripta por Moore y colaboradores (187) para la separación de protoplastos de células mesofílicas y de la vaina vascular de una especie intermediaria C_3-C_4 *Flaveria ramossisima*. En primer lugar, se realizó la digestión de fragmentos de hojas frescas (2 mm x 5 mm) en un medio conteniendo 2,5% celulasa, 0,3% macerosima, 0,5 M manitol, 20 mM buffer MES-KOH pH 5,5, 1 mM $CaCl_2$ y 0,5% albúmina sérica bovina durante 3 horas. Luego de la digestión los fragmentos se filtraron por una malla de 230 μm y se lavaron con una solución (medio 1) conteniendo 0,5 M manitol, 5 mM buffer HEPES-KOH pH 7,0, 1 mM $CaCl_2$ y 0,2% albúmina sérica bovina con agitación suave durante 20 minutos. Este paso se repitió 2 veces y se recuperaron los filtrados. El filtrado se centrifugó durante 1 minuto a 1300 rpm y se separó el pellet del sobrenadante. Cada una de estas fracciones se trató de la siguiente manera:

TRATAMIENTO DEL SOBRENADANTE: El sobrenadante se diluyó con medio volumen de medio KCl (0,25 M KCl, 5 mM buffer HEPES-KOH pH 7,0, 1 mM $CaCl_2$ y 0,2% albúmina sérica bovina) y se centrifugó 3 minutos a 1300 rpm. El sobrenadante se descartó y el pellet fue resuspendido en 3 ml de medio 2 (0,5 M sacarosa, 5 mM HEPES-KOH pH 7,0, 1 mM $CaCl_2$ y 0,2% albúmina sérica bovina) con 16% dextrano (16% dextrano en medio 2). Sobre esta fracción se adicionaron 2

ml de cada uno de los siguientes medios: 3% dextrano en medio 2 y medio KCl-manitol (0,25 M manitol, 0,125 M KCl, 5 mM HEPES-KOH pH 7,0, 1 mM $CaCl_2$ y 0,2% albúmina sérica bovina) formándose un gradiente discontinuo. Este gradiente se centrifugó 5 minutos a 1600 rpm, recuperándose la interfase entre el medio 2 con 3% dextrano y el medio KCl-manitol indicada como PM1 (protoplastos mesofílicos 1).

TRATAMIENTO DEL PELLET: El pellet fue resuspendido en 3 ml de medio 2 con 16% dextrano. Se adicionaron sobre esta fracción 2 ml de cada uno de los siguientes medios: medio 2 con 12% dextrano, medio 2 con 3% dextrano, medio 2 con 0,5% dextrano y medio KCl-manitol formándose un gradiente discontinuo. Este gradiente se centrifugó 10 minutos a 1600 rpm, separándose 2 fracciones: PVV (protoplastos de la vaina vascular) en la interfase entre el medio 2 con 12% dextrano y 3% dextrano ; y PM2 (protoplastos mesofílicos 2) en la interfase entre el medio 2 con 0,5% dextrano y el medio KCl-manitol.

Las tres fracciones (PM1, PM2 y PVV) fueron diluídas en un volumen de medio 1 y centrifugadas a 1300 rpm durante 2 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y las muestras se resuspendieron en medio de ruptura (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM Na_2HPO_4, 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol, 20% (v/v) glicerol, 1 mM PMSF) y se utilizaron para realizar las medidas de actividad y los experimentos de Western blot.



3. CARACTERÍSTICAS Y FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LA ENZIMA MÁLICA DEPENDIENTE DE NADP DE TRIGO.

3.1. Introducción

La EM-NADP (EC 1.1.1.40) está presente en todas las especies vegetales, y además de cumplir un rol importante en algunos tipos de metabolismos fotosintéticos (C_4 y CAM) llevaría a cabo distintas funciones. Estos otros roles no fotosintéticos son poco conocidos, pudiendo actuar junto con la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa como reguladora del pH intracelular, o bien cumpliendo funciones anapleróticas, como fuente de NADPH y piruvato para la biosíntesis, o catabólicas, participando en la respiración de estos productos (94).

Actualmente, la mayor parte de la información sobre la EM-NADP está relacionada con la enzima de plantas C_4 (94). En estos casos, las propiedades físicas y cinéticas; su localización, función y regulación son conocidas. Por el contrario, la información acerca de la enzima de plantas C_3 es escasa. Por ésto, el objetivo de este capítulo fue purificar y estudiar las propiedades físicas y cinéticas de la EM-NADP de trigo, además de intentar dilucidar su posible rol fisiológico.

3.2. Resultados

3.2.1. Propiedades físicas de la EM-NADP de trigo.

Se prepararon extractos crudos de hojas de trigo (C_3) y de maíz (C_4) y con ellos se realizaron geles de isoelectroenfoque que se revelaron para actividad de EM-NADP. Los resultados indicaron que la EM-NADP de trigo posee un punto isoeléctrico de 5,7 ± 0,1 mientras que el valor obtenido para la enzima mayoritaria de hojas de maíz fue de 6,6 ± 0,2 (Figura 11). La misma técnica fue ensayada sobre extractos de diferentes tejidos de trigo (hojas, raíces y tallos) y reveló la presencia de una banda con actividad EM-NADP con el mismo punto isoeléctrico en todas las calles (Figura 11). Por otra parte, experimentos de Western blot en condiciones desnaturalizantes revelados con anticuerpos contra la EM-NADP C_4 de maíz realizados con estos mismos extractos dieron como resultado una única banda correspondiente a una masa molecular de 72 kDa en todas las calles (no mostrado). Estos datos sugieren la presencia de una isoforma de la enzima málica con igual punto isoeléctrico y masa molecular en distintos tejidos de trigo.

Por otra parte, la actividad específica de los extractos crudos de los distintos tejidos fue mayor en raíces que en tallos, y ésta mayor que la determinada en extractos crudos de hojas (0,159, 0,130 y 0,051 UI/mg de proteína, respectivamente).

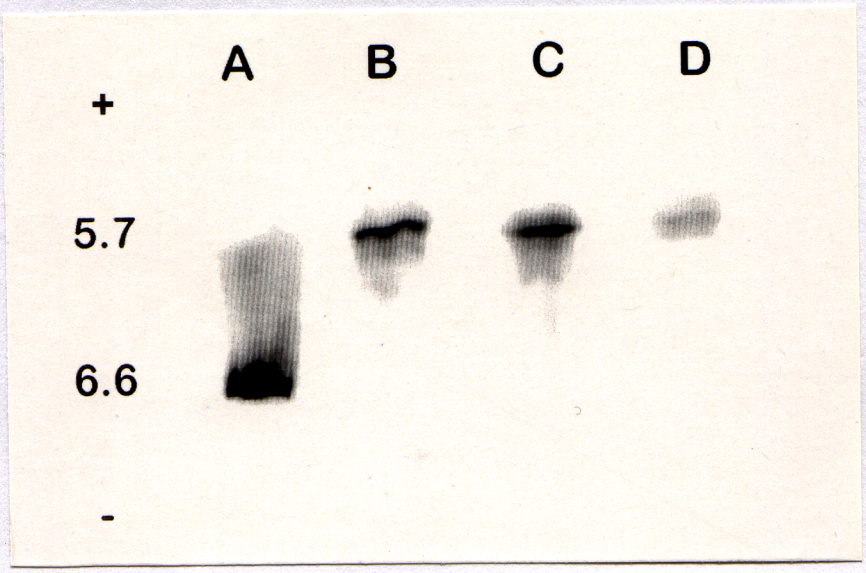


Figura. 11. Isoelectroenfoque nativo en gel de poliacrilamida revelado para actividad EM-NADP. En cada calle se sembraron extractos crudos (1 mUI de actividad de EM-NADP) de hojas de maíz (A), de hojas de trigo (B), de tallos de trigo (C) y de raíces de trigo (D). Los números a la izquierda de la figura indican los puntos isoeléctricos de las enzimas.

Teniendo en cuenta que la actividad específica fue mayor para raíces y para tallos, se optimizaron dos métodos alternativos para la purificación de la EM-NADP a partir de estos tejidos. La enzima málica de raíces se purificó 10 veces y la EM-NADP de tallos se purificó 21 veces. La Figura 12 muestra el resultado luego de una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y posterior tinción con azul de Coomassie en el que se sembraron la enzima purificada de tallos (Figura 12 calle A) y de raíces (Figura 12 calle B). Ambas calles muestran una única banda de masa molecular 72 kDa, similar a la masa molecular anteriormente descripta para la enzima no fotosintética de maíz (98), pero diferente a la

correspondiente a la de la enzima fotosintética de maíz (62 kDa) (98, 127) (Figura 12 calle C).

Con la enzima purificada de tallos de trigo se obtuvieron anticuerpos; la calle D de la Figura 12 muestra un Western blot en el que se sembraron 3 μg de la EM-NADP purificada de trigo, verificándose la inmunoreactividad de la enzima con los anticuerpos producidos. Sin embargo, dichos anticuerpos no mostraron reactividad cruzada con la enzima de 62 kDa de maíz.

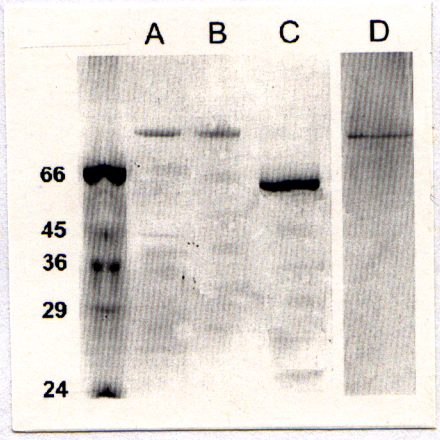


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de la enzima málica purificada de tallos de trigo (3 μg) (A, D), de raíces de trigo (3 μg) (B) y de hojas de maíz (6 μg) (C) teñidas con azul de Coomassie (A, B, C) y revelado por Western blot con anticuerpos contra la EM-NADP de tallos de trigo (D). Los números a la izquierda de la figura corresponden a la masa molecular de los marcadores utilizados, expresados en kDa.

Por otra parte se realizó un gel de poliacrilamida en condiciones nativas con las EM-NADP purificadas de hojas de maíz y de tallos de trigo (Figura 13) que se

reveló para actividad de EM-NADP, donde se observaron tres bandas que podrían corresponder a distintos estados agregacionales de la enzima (tetrámero, dímero y monómero). Este resultado indicaría que tres estados oligoméricos con actividad EM-NADP podrían existir en un equilibrio bajo las condiciones de trabajo para el caso de la enzima de trigo, a diferencia de lo que sucede con la enzima de maíz, donde se observa una única banda que podría corresponder al tetrámero de acuerdo a su movilidad electroforética.

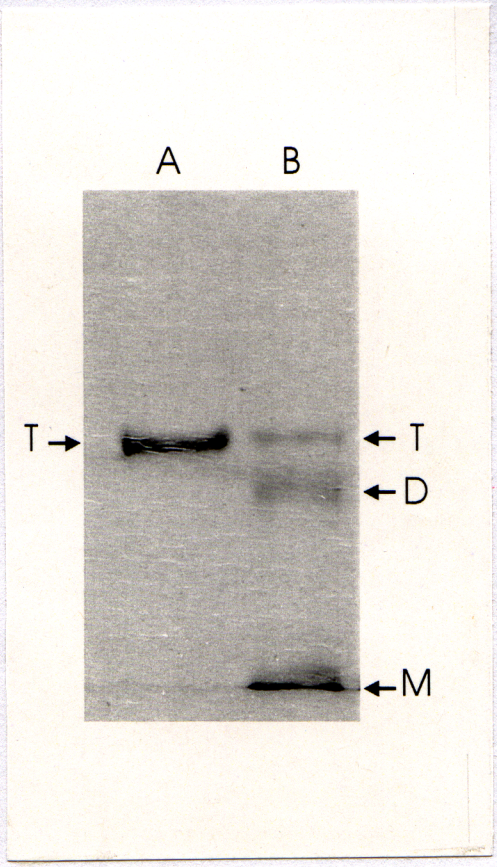


Figura. 13. Gel de poliacrilamida nativo revelado para actividad de EM-NADP con la enzima purificada de hojas de maíz (A) y de tallos de trigo (B) (3 μg). T, D y M corresponden al tetrámero, dímero y monómero, respectivamente. M corrió con el frente del colorante.

3.2.2. Propiedades cinéticas de la enzima málica purificada de tallos de trigo.

Con el fin de estudiar si la EM-NADP purificada de tallos de trigo presenta algún comportamiento histerético, se preincubó la enzima en presencia o ausencia del cofactor y/o sus sustratos previo al ensayo. Bajo ninguna de las condiciones estudiadas se observaron diferencias en la actividad de la enzima con el tiempo de reacción, indicando que la enzima purificada de tallos de trigo no muestra propiedades histeréticas.

3.2.2.1. Efecto del pH y la temperatura. La actividad enzimática, ensayada en presencia de 10 mM L-malato, 0,5 mM NADP y 10 mM Mg^{2+}, exhibió un amplio espectro de pH/actividad con un máximo entre los valores de pH 7,0 y 7,5 (Figura 14 A). Este resultado coincide con resultados obtenidos con la enzima de otras enzimas de plantas C_3 y CAM y es diferente al de la enzima málica de tejidos fotosintéticos de plantas C_4 (94).

Cuando la actividad enzimática se ensayó utilizando un medio de reacción estándar a distintas temperaturas (entre 5 hasta 70°C), se observó un máximo de actividad a 55°C (Figura 14 B). A partir de un gráfico lineal de Arrhenius, en el rango entre 5 y 40°C, se calculó la energía de activación obteniéndose un valor de 10.023 ± 404 Kcal/mol (inserto Figura 14 B). Este resultado es similar al obtenido con la enzima purificada a partir de tejidos fotosintéticos de maíz (165).

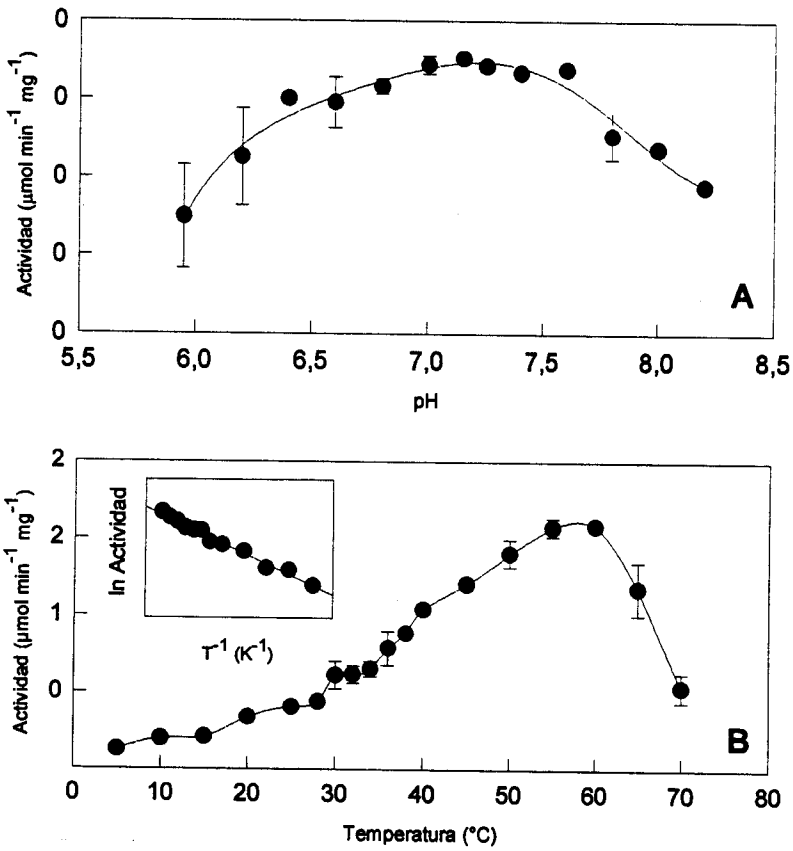


Figura. 14. A, Dependencia del pH sobre la actividad de la EM-NADP de tallos de trigo. El ensayo se realizó por triplicado. B, Efecto de la temperatura sobre la actividad de la EM-NADP de trigo. Inserto: gráfico de Arrhenius de los datos en un rango de temperatura desde 5 hasta 40°C. Los resultados son el promedio de tres experimentos.

3.2.2.2. Cationes divalentes. Como en el caso de otras EM-NADP (94, 132), la enzima de trigo requirió un metal divalente para su actividad, sin observarse actividad enzimática en ausencia de cationes. La cinética de saturación a diferentes concentraciones de Mg^{2+} y Mn^{2+} a concentraciones saturantes de NADP (0,5 mM) y L-malato (10 mM) mostraron una respuesta no hiperbólica obteniéndose gráficos de Lineweaver-Burk bifásicos (Figura 15), sugiriendo la existencia de al menos dos

sitios diferentes de unión en la enzima, como lo informado anteriormente para la enzima de plantas C_4 (124, 132). De esta forma fue posible calcular dos valores de $V_{máx}$ y de K_m (Tabla 2) para cada uno de los cationes, pudiéndose observar que en el caso de Mn^{2+} se obtenían valores de K_m menores. Por otra parte, la comparación entre los cocientes de $V_{máx}/K_m$ indicaron que la enzima posee una mayor preferencia para Mn^{2+} que para Mg^{2+}.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la EM-NADP utilizando Mg^{2+} o Mn^{2+} como cofactores. El rango de concentraciones utilizados fueron 4 10^{-3}-10 mM y 10^{-3}-1 mM, respectivamente. Los ensayos cinéticos se realizaron a concentraciones saturantes de NADP (0,5 mM) y L-malato (10 mM), pH 7,5.

Catión	$V_{máx}$ (UI/mg)	K_m (mM)	$V_{máx}/K_m$
Mg^{2+}	0,161 ± 0,016	$5,8\ 10^{-3} \pm 1,5\ 10^{-3}$	27,8
	0,979 ± 0,022	$2,0\ 10^{-1} \pm 2,0\ 10^{-2}$	4,9
Mn^{2+}	0,407 ± 0,011	$6,6\ 10^{-5} \pm 8,0\ 10^{-6}$	6167
	0,574 ± 0,006	$5,6\ 10^{-4} \pm 5,4\ 10^{-5}$	1025

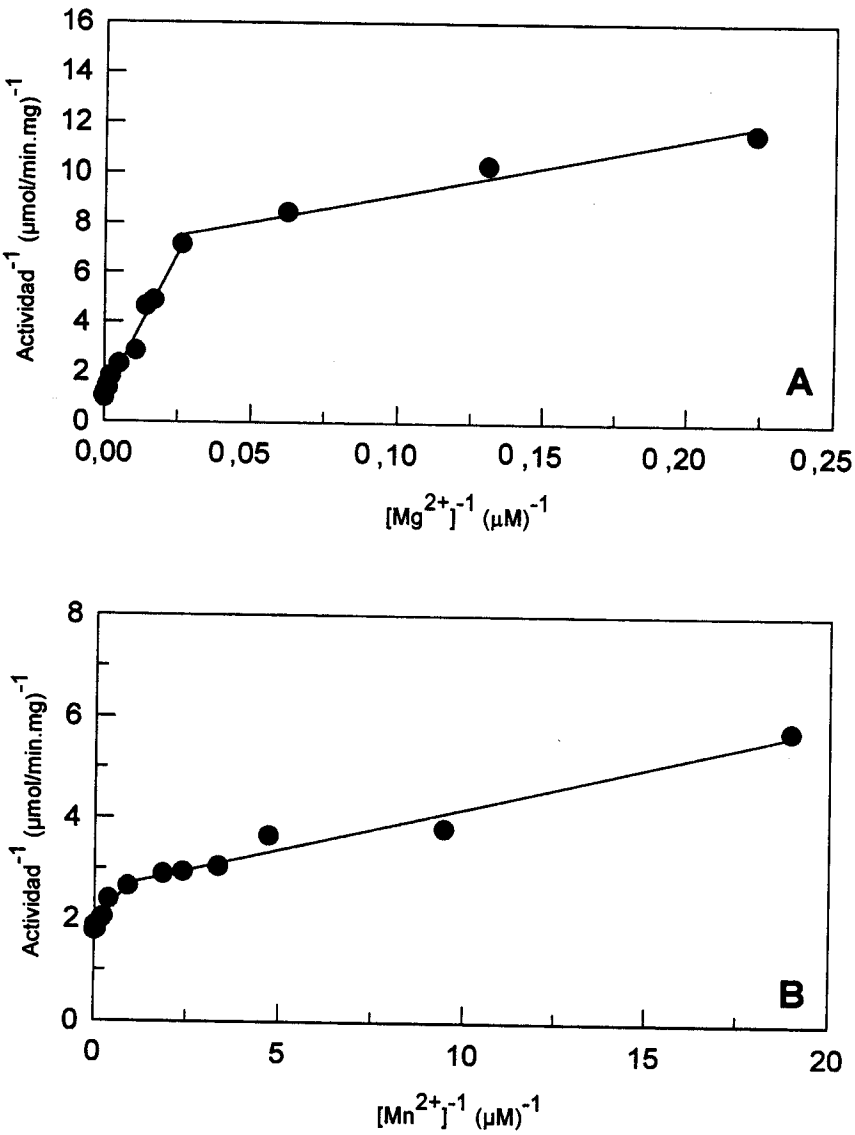


Figura 15. Gráficos de Lineweaver-Burk de la actividad de la EM-NADP como función de la concentración libre de Mg^{2+} (A) y Mn^{2+} (B). El ensayo cinético fue realizado a concentraciones saturantes de NADP (0,5 mM) y L-malato (10 mM), pH 7,5.

3.2.2.3. NADP y L-malato. Las curvas de saturación obtenidas cuando la velocidad de la reacción se estudió como función de la concentración de NADP libre en presencia de L-malato (10 mM) y Mg^{2+} (10 mM) fueron típicamente hiperbólicas, con

un índice de Hill (n_H) de 1,0 (Figura 16). De esta manera se calculó un valor de K_m de 37 ± 3 μM para NADP. Por otra parte, no se observó actividad utilizando NAD como cofactor, coincidiendo con los resultados anteriormente descriptos para la enzima de maíz (153).

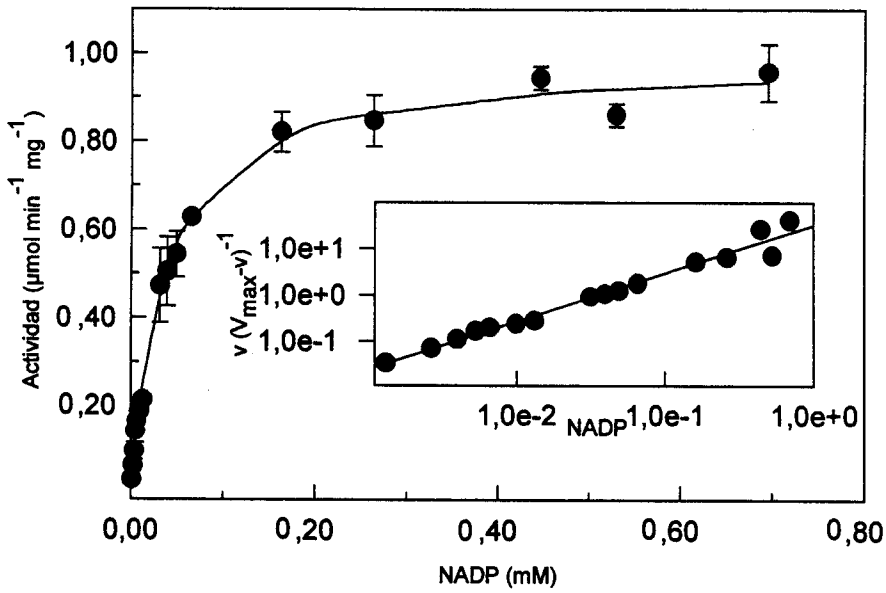


Figura 16. Efecto de la concentración de NADP sobre la actividad de la enzima málica. Los ensayos cinéticos se realizaron a concentraciones saturantes de L-malato (10 mM) y Mg^{2+} (10 mM) a pH 7,5. Inserto: gráficos de Hill de la actividad de la enzima en función de la concentración de NADP. Los datos se presentan en términos de las concentraciones libres calculadas de NADP (ver Materiales y Métodos). Los ensayos fueron realizados por duplicado.

Cuando la velocidad inicial de reacción se estudió en función de concentraciones libres de L-malato a concentraciones saturantes de NADP (0,5 mM)

y Mg^{2+} (10 mM) a pH 7 y 7,5, se observó una respuesta hiperbólica ; y a pH 7,5 se obtuvieron valores de K_m y de $V_{máx}$ iguales a 0,96 mM y 0,98 UI/mg respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Características de la EM-NADP de maíz (fotosintética y no fotosintética) y de trigo.

Propiedades cinéticas y estructurales	EM-NADP de maíz		EM-NADP de trigo
	fotosintética	no fotosintética	
Masa molecular	61,3 [98, 127]	72,0 [98]	72,0
Punto isoeléctrico	6,6	5,4 [188]	5,7
pH óptimo	7,8 - 8,4 [165]	7,0 [98]	7,2
T óptima (°C)	53 [165]	nd	55
Energía de activación (Kcal mol^{-1})	9,5 [165]	nd	10,0

	pH 8,0	pH 7,0	pH 7,0	pH 7,5
$V_{máx}$ (UI mg^{-1})	30,9 [153]	8,1 [132]	1,10 [98]	0,98
K_m NADP (µM)	8,6 [153]	nd	6,9 [98]	37
K_m Mg (mM)	0,23 [132] 0,05 [132]	0,94 [132] 0,11 [132]	0,089 [98] 0,022 [98]	0,20 0,006
K_m Mn (µM)	1100 [132]	1830 [132] 1,2 [132]	nd	0,56 0,066
K_m Malato (mM)	0,18 [154]	0,088 [154]	0,17 [98]	0,96
K_i Malato (mM)	ni	4,3 [154]	nd	ni

nd: no determinado; **ni**: no se observó inhibición.

3.2.3. Función fisiológica.

Aunque la EM-NADP cumple roles cruciales en el metabolismo C_4 y CAM, la presencia de la enzima málica en otras plantas sugiere que la enzima podría cumplir funciones más amplias que estas funciones especializadas. Por esta razón, se probaron una serie de compuestos como posibles inductores de la síntesis y actividad de la enzima y se analizó la inducción de la enzima mediante técnicas de Western blot y medidas de actividad enzimática en extractos crudos.

Algunos compuestos resultaron ineficaces en la inducción de la enzima, como el NO_3^- (0,8 y 40 mM) (administrado en soluciones acuosas tanto a plantas enteras crecidas en un sistema hidropónico como a hojas aisladas), el ácido absícico (100 μM), el H_2O_2 (300 mM) y el ácido ascórbico (10 mM) (administrados a hojas separadas).

Se analizó también una posible inducción de la enzima por luz. Para ello, se crecieron plantas de trigo durante 10 días en oscuridad y luego se expusieron a luz blanca por períodos entre 2 y 120 hs. En este caso, tampoco se observó ningún efecto de la luz sobre la expresión de la EM-NADP.

Por otra parte, al incubar las hojas aisladas de trigo con celulasa (0,5 mg/ml) o macerosima (0,5 mg/ml) (enzimas que degradan la pared celular de las plantas), se observó un aumento de la actividad enzimática de 2,2 y 1,2 veces con respecto al control, respectivamente (Tabla 4). El aumento en actividad se vio asociado con un aumento en la cantidad de proteína (Figura 17 A), indicando que la respuesta frente a los agentes inductores estaría dada por un aumento en la cantidad de la enzima. El análisis densitométrico de las bandas mostró que los niveles de la enzima después del tratamiento con celulasa y macerosima aumentaron 2,5 y 1,9 veces, respectivamente (Figura 17 B). Otro compuesto que se comportó como

inductor de la EM-NADP fue el glutatión (10 mM), produciendo un aumento de 1,4 y 1,5 veces en actividad y en cantidad de la enzima, respectivamente (Tabla 4, Figura 17).

Tabla 4. Efecto de distintos compuestos en la actividad específica de la EM-NADP de hojas de trigo. Hojas separadas se incubaron en ausencia y presencia de celulasa (0,5 mg/ml), macerosima (0,5 mg/ml) o GSH (10 mM) durante los tiempos indicados. Las actividades se expresan como UI. mg de proteínas totales^{-1} ; y son un promedio de 4 repeticiones.

	Tratamiento			
Tiempo (hs.)	Control	Celulasa	Macerosima	GSH
0	0,048	0,048	0,048	0,048
24	0,060	0,086	0,059	0,056
48	0,066	0,140	0,079	0,093

A



B

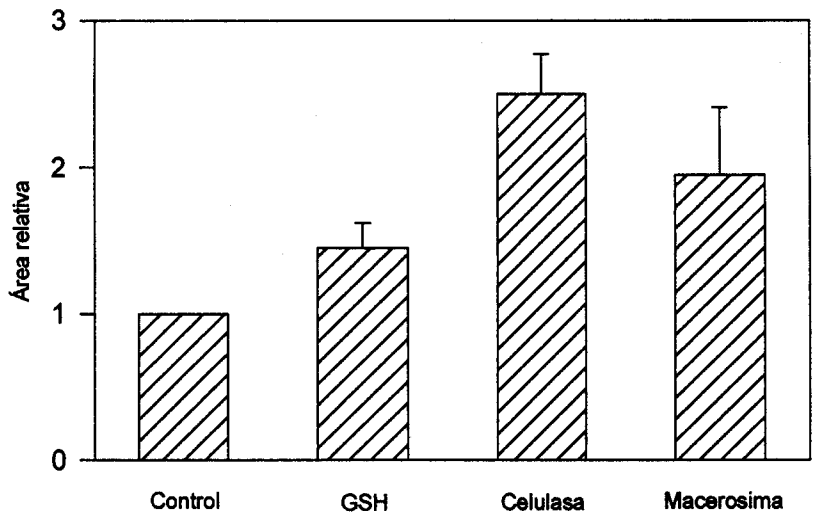


Figura 17. A, Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de extractos crudos (30 µg de proteína total) de hojas de trigo incubadas 48 hs en ausencia (control) o presencia de GSH (10 mM), celulasa (0.5 mg ml^{-1}) o macerosima (0.5 mg ml^{-1}) revelado por Western blot utilizando anticuerpos contra la EM-NADP de tallos de trigo. B, Áreas relativas de los picos integrados determinados por análisis densitométrico de A. Cada pico fue integrado por triplicado para minimizar los errores sistemáticos.

3.3. Discusión

En el presente capítulo se estudiaron las propiedades cinéticas y estructurales de la enzima málica dependiente de NADP (EM-NADP E.C. 1.1.1.40.) purificada de tallos y raíces de trigo, además de su posible rol fisiológico.

En primer lugar, los resultados obtenidos en los experimentos de isoelectroenfoque y Western blot con extractos crudos de distintos tejidos de trigo sugieren la existencia de una isoforma de la EM-NADP con igual punto isoeléctrico y masa molecular en los distintos tejidos de esta especie C_3. A partir de estos datos y del hecho que el contenido de esta enzima con respecto a otras proteínas fue mayor en raíces y en tallos, se purificó la enzima a homogeneidad a partir de estos tejidos. La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes mostró una única banda proteica correspondiente a una masa molecular de 72 kDa. Por otra parte, los resultados obtenidos a partir de geles nativos revelados para actividad de EM-NADP (Figura 3), muestran 3 bandas reactivas que podrían corresponder a distintos estados agregacionales de la enzima, por ejemplo monómero, dímero y tetrámero (ver capítulo 4).

Los estudios cinéticos realizados con la EM-NADP demostraron que la preincubación de la enzima en presencia o ausencia del cofactor o sus sustratos previo al ensayo no produce cambios en las propiedades cinéticas observadas. Estos resultados indican que la enzima purificada de plantas C_3 no muestra propiedades histeréticas, contrariamente a los resultados descriptos para la enzima de plantas C_4 (94). La enzima purificada de caña de azúcar muestra histéresis, mostrando cambios lentos en sus propiedades cinéticas luego de la preincubación en presencia de alguno de los ligandos (131), observándose este efecto en forma

de una fase estacionaria, con un cambio de velocidades desde lenta hasta rápida durante el período de ensayo.

Los valores obtenidos de pH y temperatura óptima coinciden con los anteriormente descriptos para otras enzimas. En lo referente al estudio del efecto del pH, la enzima exhibe un máximo entre los valores de pH 7,0 y 7,5 (Figura 14 A) de manera similar a lo observado con otras enzimas de plantas C_3 y CAM y difiriendo con el comportamiento de la enzima de plantas C_4 (94), cuyo máximo de actividad se encuentra cercano a 8,0. Se ha sugerido previamente que un grupo con un valor de pKa de 8,4 podría ser en parte responsable de la alta actividad de la enzima de plantas C_4 a este pH, y se ha propuesto que este grupo, que podría controlar la unión del L-malato y la catálisis manteniendo una conformación propicia de las enzimas de plantas C_4, estaría ausente en enzimas málicas con menor pH óptimo (94).

La actividad enzimática fue absolutamente dependiente de la presencia de un catión bivalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}). Diferentes estudios sobre la unión de Mg^{2+} y Mn^{2+} a enzimas málicas provenientes de plantas han indicado una cinética de unión hiperbólica (136, 144, 145). Por el contrario, nuestros estudios de actividad de la EM-NADP de trigo en función de la concentración de estos cationes muestran cinéticas de saturación no hiperbólicas y coinciden con aquellos previamente descriptos indicando la existencia de al menos dos sitios de unión con diferentes afinidades en la EM-NADP de hígado de paloma (189), caña de azúcar (124) y de maíz (132). De este modo, sugerimos la existencia de al menos dos sitios de unión de los cationes en la enzima purificada de trigo, aunque no es posible descartar la posibilidad de que la bifasidad de los gráficos de dobles recíprocas obtenidos puedan deberse a cambios en el estado de agregación de la enzima. Mn^{2+} fue el

RC

catión que mostró menores valores de K_m y una mayor relación $V_{máx}/K_m$. Este resultado indica que la enzima posee preferencia por este catión. Sin embargo, el rol fisiológico para Mg^{2+} o Mn^{2+} sigue siendo incierto en ausencia de datos precisos de la concentración relativa de los cationes en la célula.

Las curvas de saturación obtenidas cuando la velocidad de la reacción se estudió como función de la concentración de NADP fueron típicamente hiperbólicas, obteniéndose un valor de K_m similar al obtenido anteriormente para la EM-NADP de otras fuentes. En general, no existe evidencia de diferencias en las cinéticas con respecto al NADP entre diferentes isoenzimas de la enzima málica, por lo que es probable que la alta afinidad y el sitio de unión del NADP deben haberse conservado durante la evolución (127). Es interesante notar que no se observó actividad con NAD, coincidiendo con los resultados anteriormente descriptos para la enzima de maíz (153).

Por el contrario, las cinéticas con respecto al L-malato varían desde hiperbólicas, hasta con cooperatividad negativa o sigmoidal dependiendo de la fuente de la enzima y el pH de ensayo (94). La enzima purificada de numerosas fuentes se caracteriza generalmente por una fuerte disminución de la afinidad por el L-malato al aumentar el pH, y por una aparición de inhibición por malato a bajos valores de pH. Por el contrario, nuestros resultados indican una ausencia de inhibición por este sustrato a pH 7,0 (no mostrado), y poco cambio de la K_m para malato entre pH 7,0 y 7,5 (no mostrado), obteniéndose una respuesta hiperbólica cuando la velocidad inicial de reacción se estudió en función de concentraciones libres de L-malato a concentraciones saturantes de NADP y Mg^{2+} a pH 7,5 con un valor de K_m igual a 0,96 mM. Este resultado coincide con algunos valores de K_m previamente calculados para otras enzimas de plantas C_3 y CAM, indicando que el

valor de K_m para L-malato es mayor para la enzima de estas fuentes que para la enzima de plantas C_4 (94).

La actividad de EM-NADP fue incrementada luego del tratamiento con celulasa, macerosima y glutatión, y este aumento fue asociado con un aumento de proteína determinado a partir de Western blot. La celulasa ha sido descripta como el más potente elicitor en la inducción de la lignificación en hojas heridas de trigo (190). La macerosima también posee actividad elicitora aunque mucho más débil que la de la celulasa (190). Por otra parte, el glutatión, la molécula tiólica no proteica más abundante en células vegetales, parece jugar un rol importante en la protección contra las especies activas del oxígeno (191). El nivel de glutatión en tejidos foliares aumenta bajo varias condiciones de stress oxidativo (191) e induce una masiva y selectiva transcripción de genes de defensa que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas y ligninas como así también de genes que codifican para glicoproteínas de la pared celular ricas en hidroxiprolina (192).

Resultados anteriores demuestran que el daño causado por heridas produce una marcada actividad del promotor de la enzima málica de poroto en plantas de tabaco transformadas, y esta actividad es fuertemente aumentada luego de la aplicación de un estímulo relacionado a la defensa contra patógenos (114). Además, el gen que codifica para la enzima málica de poroto posee regiones regulatorias características en la respuesta a UV y elicitores para hongos patógenos (103), sugiriendo una participación de la EM-NADP en la defensa relacionada a stress y ataque por patógenos.

Estos resultados sugieren que la EM-NADP de plantas C_3 podría estar involucrada en la biosíntesis de lignina relacionada con respuestas de defensa de la

planta, proveyendo de NADPH a los dos pasos dependientes de NADPH de la biosíntesis de monolignol (193). La provisión de NADPH ha sido atribuida al ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (194). Sin embargo, en el hígado de rata realizando lipogénesis, el ciclo de las pentosas fosfato es ayudado por la EM-NADP para obtener la gran cantidad de NADPH necesaria en estas circunstancias particulares del desarrollo (195). Una situación similar podría existir en las plantas al sintetizar lignina.

4. FACTORES QUE AFECTAN EL ESTADO OLIGOMÉRICO DE LA ENZIMA MÁLICA DEPENDIENTE DE NADP DE TEJIDOS DE MAÍZ Y DE TRIGO.

4.1. Introducción

La EM-NADP es una proteína oligomérica compuesta por subunidades idénticas. En maíz han sido descriptas 2 isoformas predominantes, una constitutiva de masa molecular mayor (masa molecular del monómero 72 kDa) y otra, mayoritaria de hojas verdes, involucrada en la fotosíntesis C_4 y de menor masa molecular (masa molecular del monómero 62 kDa) (98). El tamaño del monómero de la EM-NADP de trigo fue estimado como de 72 kDa por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con la proteína pura (ver el capítulo anterior).

El estado de oligomerización de la enzima málica varía de acuerdo a la fuente y condiciones de estudio. La enzima purificada de hígado de rata ha sido cristalizada y descripta como un tetrámero de unidades asimétricas (196). A partir de las microscopías electrónicas de la enzima purificada de hígado de paloma se ha observado que ésta posee una estructura planar tetramérica con las cuatro

subunidades ubicadas en las esquinas del cuadrado (197). Esta enzima se disocia al disminuir el pH del medio (198). A valores de pH mayores a 8,0 la mayoría de las moléculas existen como tetrámeros, mientras que a valores de pH menores que 5,0 la enzima se encuentra como monómero. En presencia de los sustratos, el equilibrio entre monómero-dímero-tetrámero se ve favorecido hacia la disociación, al igual que al modificarse la fuerza iónica y la temperatura de la solución (199).

La mayoría de los estudios realizados sobre el estado de oligomerización de la enzima málica dependiente de NADP de plantas han sido realizados con la forma C_4. Estudios con la enzima málica de hojas maíz proponen la existencia de diferentes estados oligoméricos dependiendo del pH (tetrámero a pH 7,5 y dímero a pH 7,0), y la disociación del tetrámero al dímero en ausencia de ditiotreitol (129). La enzima de hojas de caña de azúcar puede cambiar su estado oligomérico entre las formas monoméricas, diméricas y tetraméricas, siendo la forma tetramérica la predominante a pH 8,0 (130) . Todos los estados oligoméricos de esta proteína son enzimáticamente activas, pero la mayor actividad específica se observa a pH 8,0, cuando predomina la forma tetramérica. El catión Mg^{2+} induce la formación del tetrámero, mientras que altas concentraciones de NaCl causan la disociación de la forma dimérica a la forma monomérica. Por otra parte, se ha observado una inactivación térmica bifásica para la EM-NADP de caña de azúcar, y este hecho ha sido interpretado como consecuencia de diferencias en la estabilidad térmica del dímero y del tetrámero, siendo el tetrámero más lábil (200).

En este capítulo se estudiaron los factores que afectan los equilibrios de asociación/disociación de la EM-NADP purificada de hojas verdes de maíz (C_4) y de tallos de trigo (C_3). El efecto del pH, la fuerza iónica, la presencia de sustratos y

efecto de la temperatura, fueron analizados utilizando una técnica de entrecruzamiento de las subunidades con glutaraldehído y posterior electroforesis de los productos de entrecruzamiento en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

4.2. Resultados

4.2.1. Efecto del pH sobre el estado de agregación de la EM-NADP de maíz y de trigo.

Se preincubó la EM-NADP de 62 kDa de hojas de maíz y de 72 kDa de tallos de trigo a distintos valores de pH (entre 6,2 y 9,0), permitiéndose que se alcance un equilibrio entre las distintos estados oligoméricos a cada pH y, posteriormente, se procedió a entrecruzar las subunidades que interaccionaran entre sí en presencia de glutaraldehído. Cada uno de los estados oligoméricos se identificó por comparación con marcadores de masa molecular en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes teñidos con azul de Coomassie. De esta forma, la enzima málica mostró una disociación dependiente del pH.

La EM-NADP de maíz existió predominantemente como monómero a pH 6,2 o valores de pH menores (Figura 18). Valores de pH más alcalinos promovieron la asociación aumentando la concentración del dímero, obteniéndose la concentración máxima de esta forma a pH 7,0 (Figura 18). Un mayor aumento en el pH causó un corrimiento de los equilbrios hacia la formación del tetrámero y, consecuentemente, disminuyó la concentración de los otros estados oligoméricos (Figura 18). A valores de pH mayores a 8,0, casi toda la enzima se encontró como tetrámero.

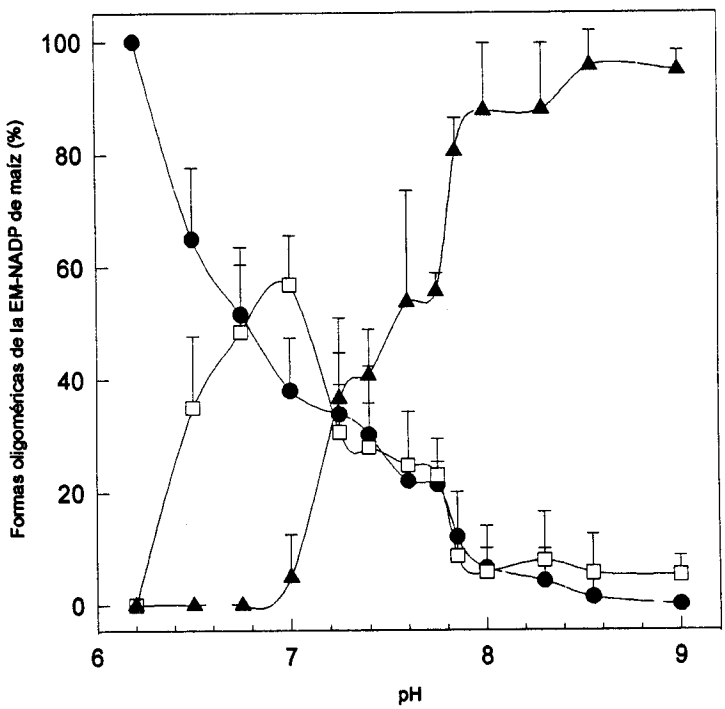


Figura 18. Distribución del monómero (●), dímero (□) y tetrámero (▲) de la EM-NADP de 62 kDa de hojas de maíz a diferentes valores de pH. Se preincubó la enzima a distintos valores de pH (entre 6,2 y 9,0), se entrecruzaron las subunidades asociadas con glutaraldehído y se sembraron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Cada uno de los estados oligoméricos se identificó por comparación con marcadores de masa molecular y se cuantificó en forma relativa por densitometría de las bandas correspondiente a cada forma. Las barras de error indican la desviación estándar.

La dependencia con el pH de las K_T y K_D calculadas según se describe en Materiales y Métodos se muestra en la Figura 19. En A y D, se graficaron los valores de pK en función del pH. B y E son las derivadas primeras de A y D, respectivamente, mientras que C y F representan las derivadas segundas, respectivamente. Los puntos de inflexión de los gráficos primarios (Figura 19 A y D) y los máximos (Figura 19 B y E) y los mínimos (Figura 19 C y F) de los gráficos secundarios muestran que residuos de aminoácidos con una cadena lateral con valores de pKa de 6,51 ± 0,06 y de 7,85 ± 0,05 son importantes en los equilibrios entre M-D y D-T, respectivamente.

BC

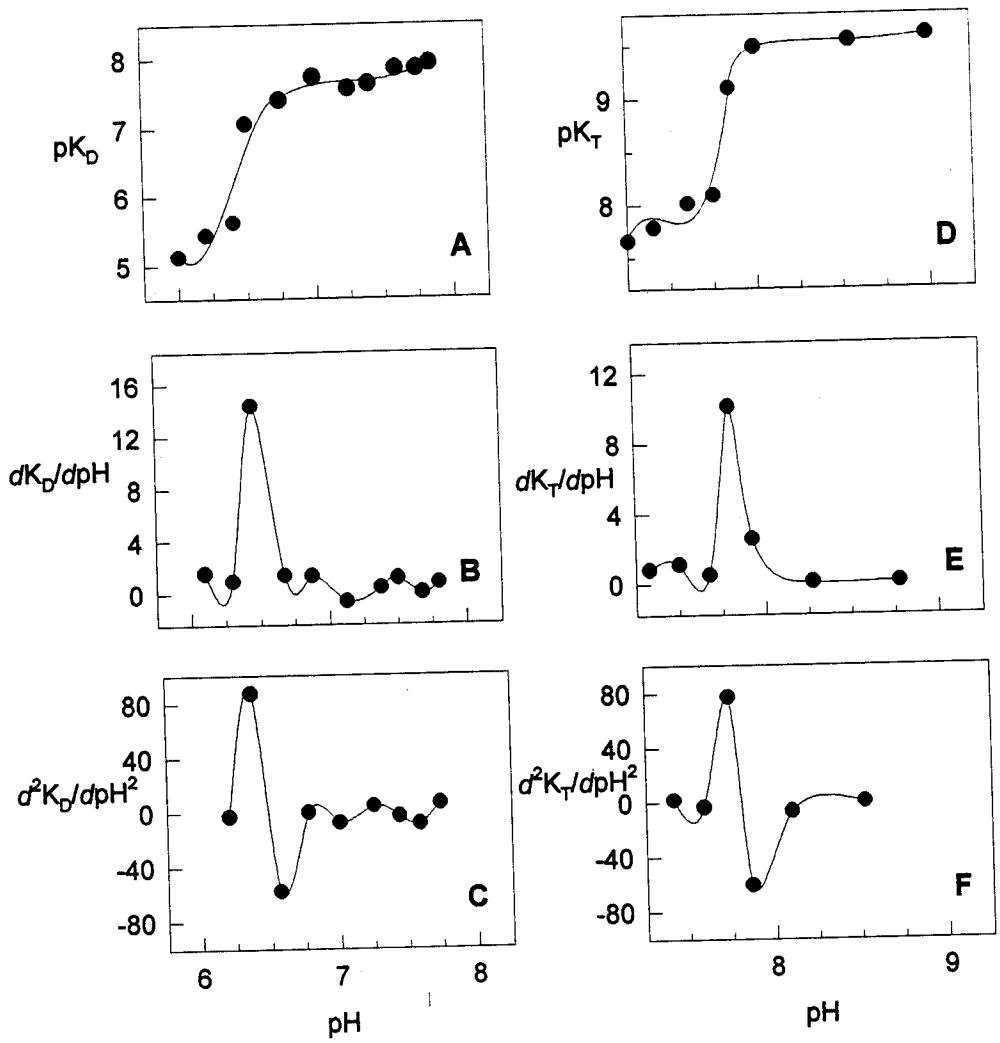


Figura 19. Variación de las constantes de equilibrio para los procesos monómero-dímero (A,B,C) y dímero-tetrámero (D,E,F) con el pH de la EM-NADP de maíz. A y D muestran los gráficos de pKa en función del pH; B y E son las curvas de primera derivada de A y D; C y F son los gráficos de segunda derivada de A y D.

La Figura 20 muestra los distintos estados de agregación de la enzima málica de trigo a distintos valores de pH. A valores de pH menores a 7,6; la enzima fue mayoritariamente monomérica, mientras que al aumentar el pH la cantidad de tetrámero aumentó alcanzando el 80% del total a valores de pH mayores a 8,0. El dímero se presentó a muy bajas concentraciones en todo el rango de pH probado, alcanzando un máximo a pH 8,3 (alrededor de un 20% del total de la proteína) (Figura 20). Es importante notar que el dímero apareció junto con el tetrámero, no se observó ningún valor de pH en el cual el monómero coexistió sólo con el dímero; y dentro de una unidad de pH la forma monomérica cambió abruptamente a tetramérica, difiriendo con el comportamiento encontrado para la enzima de maíz. Los valores de pKas de los residuos involucrados en los equilibrios M-D y D-T de la EM-NADP de trigo fueron calculados como se indicó anteriomente con la enzima de maíz, siendo 7,74 ± 0,08 para el primer equilibrio y 8,07 ± 0,15 para el segundo.

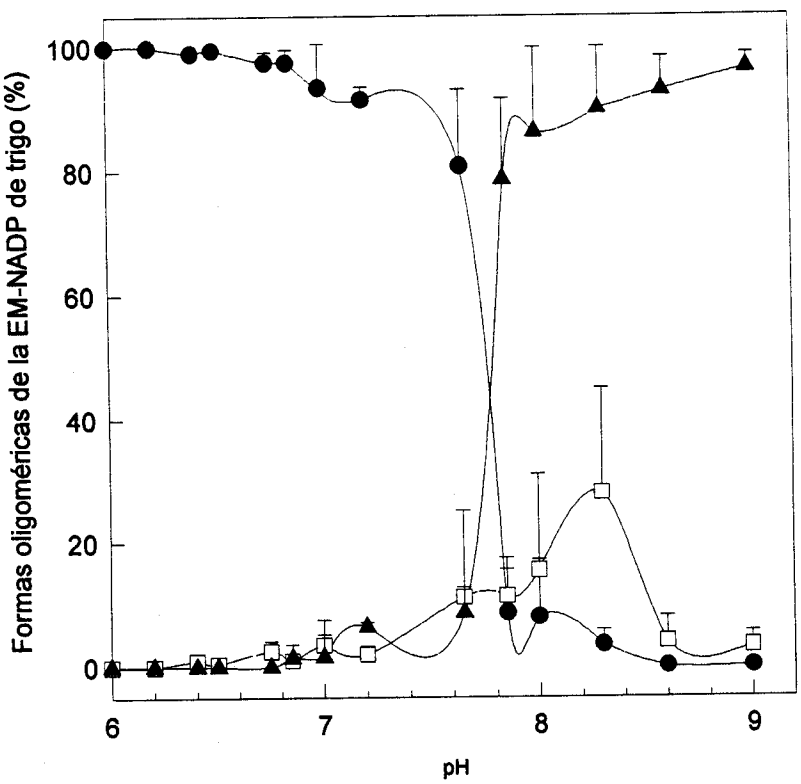


Figura 20 Distribución del monómero (●), dímero (□) y tetrámero (▲) de la EM-NADP de trigo a diferentes valores de pH. Las barras de error indican la desviación estándar.

4.2.2. Efecto de la temperatura sobre la disociación de la EM-NADP.

Cuando las enzimas provenientes de maíz y de trigo se preincubaron a distintas temperaturas y se entrecruzaron; mostraron una progresiva disociación cuando se disminuyó la temperatura desde 42°C hasta 0°C. Las constantes de disociación se determinaron para ambas proteínas a los valores de pH óptimo para la actividad de cada una de ellas (8,0 para la enzima de maíz y 7,0 para la de trigo) y a valores de temperatura diferentes donde cantidades de T, D y M coexistían para

cada enzima. A partir de los valores de K_T y K_D calculados se realizaron gráficos de van't Hoff que permitieron calcular los cambios en la entalpía ($\Delta H°$) y en la entropía ($\Delta S°$). La Figura 21 muestra los resultados obtenidos con la enzima de trigo. Con los resultados obtenidos se calcularon los cambios de energía de Gibbs ($\Delta G°$) a 25°C (Tabla 5).

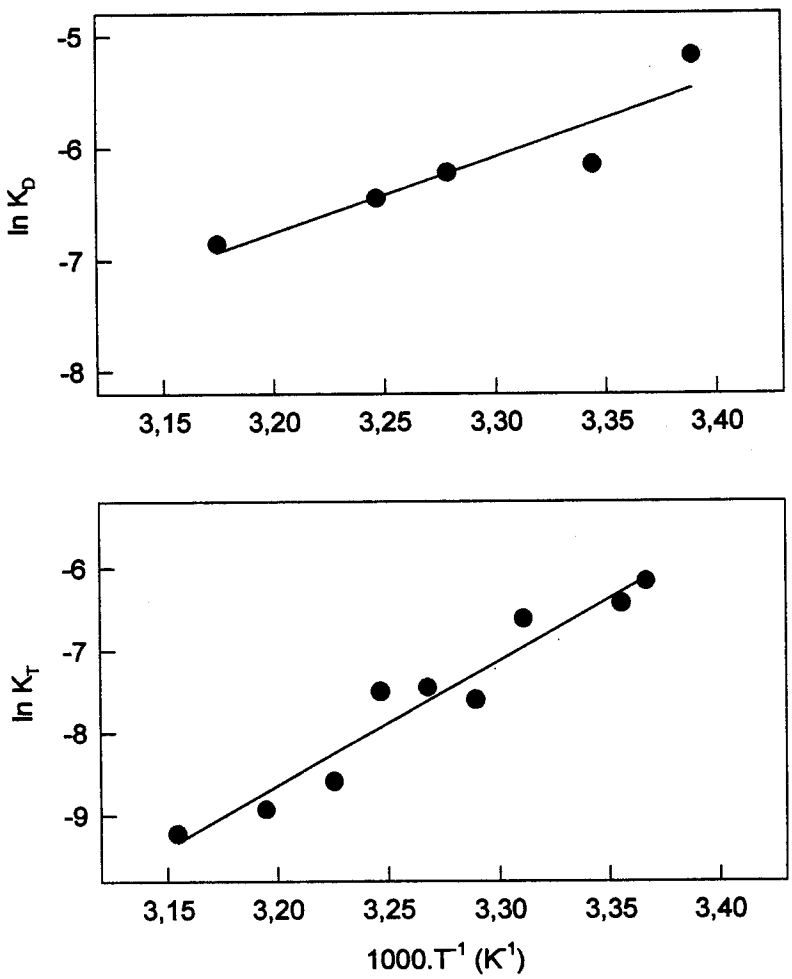


Figura 21. Gráficos de van't Hoff para los procesos de equilibrio entre M-D y D-T de la EM-NADP de trigo. El logaritmo natural de K_D (A) and K_T (B) se graficó en función de la recíproca de la temperatura expresada en grados Kelvin.

Tabla 5. Parámetros termodinámicos para los equilibrios tetrámero-dímero (T-D) y dímero-monómero (D-M) de la EM-NADP de maíz y de trigo a 25°C

Fuente	Proceso	$\Delta H°$(kcal.mol^{-1})^a	$\Delta G°$(kcal.mol^{-1})^a	$\Delta S°$(cal.mol^{-1} K^{-1})^a
Maíz (pH 8,0)	T-D	-47,4	9,2	-192
	D-M	-54,8	10,8	-216
Trigo (pH 7,0)	T-D	-30,2	3,8	-114
	D-M	-13,6	3,4	-57

Los $\Delta H°$ y $\Delta S°$ se obtuvieron a partir de gráficos de van't Hoff y el valor de $\Delta G°$ fue calculada a partir de la ecuación $\Delta G° = \Delta H° - T.\Delta S°$

Para ambas enzimas, los equilibrios M-D y D-T fueron exotérmicos como muestran los valores negativos calculados de $\Delta H°$ para todos los equilibrios (Tabla 5). Sin embargo, el proceso de disociación no sería espontáneo en condiciones estándar como lo indica el valor positivo de $\Delta G°$ considerando que lo valores de $\Delta S°$ fueron negativos para todas las interacciones (Tabla 5).

4.2.3. Efecto de la presencia de distintos metabolitos

En los sistemas de asociación-disociación de proteínas, la presencia de los sustratos usualmente favorecen la asociación. Por ello, se estudió el efecto de los sustratos sobre el estado oligomérico de la EM-NADP en experimentos llevados a cabo a valores de pH donde existían cantidades observables de T y D para cada enzima (7,0 y 8,0 para maíz y trigo, respectivamente) (Figuras 18 y 20).

A pH 7,0, y en ausencia de los distintos metabolitos estudiados, casi toda la EM-NADP de maíz se encontró en un equilibrio en donde coexistían

concentraciones equimolares entre dímero y tetrámero (Tabla 6, Figura 22 calle A). El agregado de Mg^{2+} dirigió la reacción completamente hacia la formación del tetrámero (Tabla 6, Figura 22 calle B). Por el contrario, 0,5 mM NADP y 10 mM L-malato (Tabla 6, Figura 22 calles C y D) no modificaron el estado de agregación de la enzima. El glicerol, un compuesto orgánico que estabiliza la estructura cuaternaria de algunas proteínas (201), mostró el mismo efecto que el Mg^{2+} agregando a la EM-NADP de maíz (Tabla 6, Figura 22 calle E), mientras que el sulfato de amonio mostró un efecto contrario, disociando al tetrámero en dímeros y monómeros (Tabla 6, Figura 22 calle F).

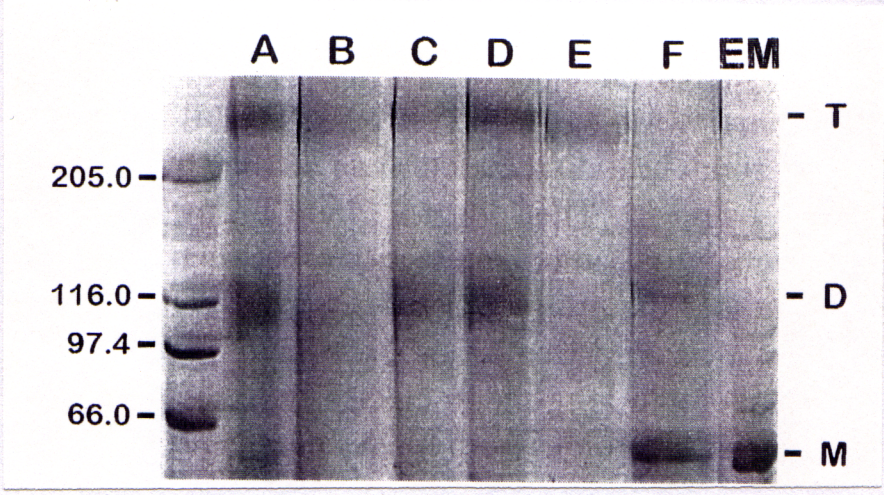


Figura 22. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de la EM-NADP de maíz entrecruzada en la presencia de diferentes metabolitos. A, control (sin adición); B, con 10 mM Mg^{2+}; C, con 0,5 mM NADP; D, con 10 mM L-malato; E, con 20% glicerol; F, con 33 mM $(NH_4)_2SO_4$. EM muestra la enzima sin entrecruzar como control. Los números en el lado izquierdo de la figura corresponden a la masa molecular de los marcadores, expresados en kDa. Las letras en el lado derecho representan al tetrámero (T), al dímero (D) y al monómero (M).

Tabla 6. Efecto de la presencia de diferentes metabolitos sobre el estado oligomérico de la EM-NADP de maíz a pH 7,0.

	Cantidad (%)		
Adiciones	Tetrámero	Dímero	Monómero
Ninguna	47,5 ± 0,7	50,3 ± 1,8	3,3 ± 1,1
Mg^{2+} (10 mM)	100,0 ± 0,0	0,0	0,0
NADP (0.5 mM)	42,4 ± 4,2	58,7 ± 4,3	0,0
L-malato (10 mM)	45,0 ± 0,6	53,5 ± 0,8	2,5 ± 0,0
Glicerol (20%)	100,0 ± 0,0	0,0	0,0
$(NH_4)_2SO_4$ (33 mM)	0,0	43,4 ± 2,3	57,6 ± 2,0

El comportamiento de la enzima de trigo fue similar al de la enzima de maíz (no mostrado). Mg^{2+} y glicerol favorecieron la agregación de los monómeros hacia la conformación tetramérica aunque no completamente ya que se observó una concentración importante del dímero bajo estas condiciones. El sustrato L-malato no modificó significativamente el estado agregacional de la enzima, pero contrariamente a lo observado con la enzima de maíz, el NADP indujo una agregación substancial de la EM-NADP hacia el tetrámero, de la misma magnitud que lo realizado por el Mg^{2+}. El sulfato de amonio disoció el tetrámero con un aumento concomitante en la concentración de monómero.

4.3. Discusión

Estudios previos con la EM-NADP de distintas fuentes (124, 130, 198, 199) mostraron que las propiedades estructurales y cinéticas de la proteína dependían de las condiciones experimentales. De esta forma, un cambio en el pH de 8,0 a 7,0 produjo una disociación de la enzima tetramérica de caña de azúcar a un dímero (124). Los resultados cinéticos mostraron que las estructuras tetraméricas, diméricas y monoméricas son activas pero poseen diferentes valores de K_m y $V_{máx}$ (130). La eficiencia catalítica de los oligómeros es mayor para el tetrámero seguido por el dímero y finalmente del monómero. Según estos resultados bajo condiciones de iluminación (pH 8,0 y altos niveles de Mg^{2+}) (21), la formación del tetrámero se vería favorecida y la EM-NADP cloroplástica podría trabajar de manera más eficiente.

En este trabajo observamos que la EM-NADP de hojas verdes de maíz y de tallos de trigo se disocian en un medio acídico (Figuras 18 y 20). Este proceso puede ser el resultado de interacciones iónicas entre las subunidades, debido a la protonación de un grupo aniónico que podría eliminar una atracción catiónica-aniónica o al aumento de una repulsión electrostática de larga distancia desfavorable entre dos macroiones con una carga neta negativa (202). Los resultados obtenidos sugieren que en maíz, residuos de aminoácidos con una cadena lateral con valores de pKa de 6,51 y 7,85 estarían involucrados en las interacciones entre M-M y D-D (Figura 19). Estos valores podrían ser identificados con residuos de histidina y tirosina/cisteína/lisina, respectivamente. Anteriormente Iglesias y colaboradores (200) encontraron que un grupo con un valor de pKa

aparente de 7,7 debe estar deprotonado para estabilizar la agregación de la EM-NADP de caña de azúcar a una forma tetramérica. Este valor se acerca a nuestro valor de pKa determinado para el equilibrio D-T. Por otra parte, los valores de pKa determinados para la EM-NADP de trigo fueron mayores (7,74 y 8,07). Estos resultados explican la aparición del dímero junto con el tetrámero en forma simultánea a valores básicos de pH para la EM-NADP de trigo. De esta manera, residuos de aminoácidos que podrían ser de tirosina, cisteína o lisina podrían estar involucrados en interacciones entre M-M y D-D. Las diferencias encontradas entre los valores de pKa calculados entre ambas enzimas podrían corresponder a residuos de aminoácidos diferentes, o bien a distintos microentornos donde se localizarían los aminoácidos involucrados en estos equilibrios.

La EM-NADP se disocia a bajas temperaturas de una manera secuencial siguiendo el orden T-D-M (Figura 21). Se debe destacar que los valores de entalpías calculados fueron negativos requiriendo una cantidad sustancial de calor, pero el proceso total causó un cambio de energía libre estándar positiva (Tabla 5). De esta forma, el proceso de disociación requiere energía para llevarse a cabo bajo condiciones estándar, siendo la entropía del sistema un factor importante en ambos equilibrios. Estos datos son diferentes de los resultados obtenidos para los equilibrios de disociación de la enzima de hígado de paloma, donde todos los parámetros termodinámicos fueron negativos (199).

El efecto de distintos metabolitos también fue estudiado. La presencia de Mg^{2+}, NADP y L-malato modifica los equilibrios entre M, D y T dependiendo de la fuente enzimática. El catión divalente agregó ambas enzima hacia la forma tetramérica. Este efecto también fue observado previamente con la enzima de caña de azúcar (130, 200). Estos resultados sugieren, como se postuló previamente (124,

130), que los cambios en el estroma cloroplástico durante los períodos de luz y de oscuridad podrían ser importantes regulando la actividad de esta enzima *in vivo*, principalmente afectando la estructura cuaternaria. De esta forma, niveles aumentados de Mg^{2+} y un aumento del pH en el estroma del cloroplasto podrían inducir la agregación de la enzima.

El L-malato resultó ineficaz con respecto a la asociación de la enzima málica de ambas fuentes (Tabla 6, Figura 22), como anteriormente se describió para la enzima de hígado de paloma (198) y la EM-NAD de *Solarum tuberosum* (203). Estos últimos autores describieron que el malato podría inducir la agregación a otros valores de pH o en presencia de NADH (203).

El NADP no cambió el estado multimérico de la enzima de maíz aunque la enzima de trigo se asoció en la presencia de la coenzima, probablemente debido a los diferentes pH en los cuales se realizaron ambos experimentos. Este resultado es consistente con lo propuesto por Grover y Wedding (203), quienes sugieren que el valor de pH sería importante para la agregación de la EM-NAD en presencia del malato.

Ha sido descripto que la inestabilidad de algunas enzimas en sistemas acuosos puede ser revertida por la presencia de glicerol (201). La acción de este compuesto, cuando está presente como cosoluto, es la de comportarse como un estabilizador de la estructura de las proteínas y de la actividad enzimática. Nuestros resultados indican que el glicerol estabiliza la forma tetramérica en ambos sistemas. Este efecto fue descripto para la enzima PEPC de maíz, donde el cosoluto optimizó la eficiencia del uso del PEP como sustrato por asociación de la enzima formando un tetrámero (205).

Por otra parte, la alta fuerza iónica disoció la estructura oligomérica de la EM-NADP. Ambas enzimas fueron igualmente sensibles al agregado de $(NH_4)_2SO_4$. Este efecto podría atribuirse a un posible efecto de la fuerza iónica en la ionización de grupos esenciales o de residuos de aminoácidos participando en la asociación de las subunidades. Experimentos realizados con la EM-NADP de caña de azúcar mostraron que la enzima se disoció en dímeros y monómeros cuando se expuso a altas concentraciones de NaCl (130). Este efecto se observó también con la enzima PEPC de maíz (205) donde la exposición de la enzima a alta fuerza iónica disoció a la proteína y como consecuencia modificó su actividad.

Finalmente, los resultados presentados en este capítulo indicarían que la EM-NADP de maíz y de trigo existiría en varios estados oligoméricos (M, D y T) *in vivo* y que este proceso de asociación-disociación podría estar sustancialmente regulado. Esta regulación podría estar mediada por la concentración de metabolitos en el medio, condiciones de luz, fuerza iónica y pH. Estos estudios sugieren que las condiciones naturales juegan un papel importante regulando tanto las enzimas de plantas C_4 como C_3 mediante el control en el cambio de los estados de agregación que podrían afectar la actividad de estas enzimas (124, 130).

5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA MÁLICA DEPENDIENTE DE NADP EN PLÁNTULAS ETIOLADAS Y VERDES DE MAÍZ POR RADIACIÓN UV-B, LUZ ROJA Y ROJA LEJANA.

5.1. Introducción

La luz es esencial para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, no sólo como fuente de energía sino también como estímulo que regula numerosos procesos metabólicos y del desarrollo a través de la inducción de la expresión génica. Las respuestas de las plantas a la luz están mediadas por la transcripción de genes que son regulados por tres clases descriptas de receptores: la familia de fitocromos, los receptores de luz azul y ultravioleta-A (criptocromo) y los receptores de luz ultravioleta B (206, 207). Los genes regulados por luz responden a uno o más de estos fotoreceptores mediante diferentes rutas de transducción de señales, y estas respuestas pueden ser moduladas por otros factores ambientales o por diferentes estadíos de desarrollo de la planta (208, 209).

El fitocromo es el fotoreceptor involucrado en las reacciones que responden a la luz roja y roja lejana, y ha sido el fotoreceptor mejor caracterizado (210, 211). La

JC

forma biológicamente activa del fitocromo existe en dos formas fotoconvertibles diferentes, la que absorbe luz roja (Pr) y la que absorbe luz roja lejana (Pfr). Estas formas pueden ser interconvertidas reversiblemente por luz, por medio de isomerizaciones del cromóforo del fitocromo, el tetrapirrol lineal biliverdina (212). Las plantas crecidas en oscuridad poseen la forma Pr, a veces referida como la forma inactivà del fitocromo. La absorción de luz roja convierte Pr a Pfr, y ésto lleva a muchos cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos (208). Dentro de estos últimos se incluyen cambios en la transcripción, y en la abundancia de ARNm y proteínas. La luz roja lejana (720-760 nm) convierte la mayoría de las moléculas de Pfr en Pr, por lo que la luz roja lejana cancela los efectos provenientes de la luz roja. Aunque el fitocromo es primariamente un receptor de luz roja y roja lejana, tanto Pr como Pfr también absorben en la región azul del espectro, y en las regiones del ultravioleta (213). Varios tipos de fitocromos pueden ser distinguidos en base a sus características fisiológicas, bioquímicas o inmunológicas. Por ejemplo, el fitocromo más abundante en tejidos etiolados (Tipo I) puede ser distinguido del fitocromo más abundante de tejidos verdes (Tipo II) por sus propiedades inmunológicas, por mapeo de péptidos y en base a su secuencia aminoacídica (214). El fitocromo de tipo I se degrada proteolíticamente cuando se convierte en Pfr por iluminación, mientras que el contenido de fitocromo de tipo II es relativamente estable en condiciones de luz.

Las respuestas mediadas por fitocromo permiten distinguir entre distintos niveles de sensibilidad (209): las respuestas de baja intensidad son saturadas por pulsos con intensidades de luz roja entre 1 hasta 1000 μmol fotones m^{-2} s^{-1}. Estas respuestas son al menos parcialmente reversibles con un pulso inmediato de luz roja lejana. La efectividad del pulso de luz roja lejana es función de la duración del

período de oscuridad entre ambos pulsos. Esta función es conocida como cinética de escape, y es una herramienta importante para probar la cadena de eventos de señalización posteriores a la absorción de la luz. Las respuestas de muy baja intensidad (con intensidades menores a 1 μmol fotones m^{-2} s^{-1}) son inducibles por pulsos de luz roja lejana. Las respuestas de alta irradiancia (típicamente de intensidades mayores a 1 μmol fotones m^{-2} s^{-1}) requieren iluminación continua, hecho que impide el análisis de reversibilidad por luz roja lejana.

Una variedad de respuestas biológicas y de desarrollo son mediadas por luz azul, como el fototropismo, la inhibición del elongamiento del hipocótilo y la apertura de estomas en muchas plantas. Los receptores de luz azul y UV-A han sido denominados "criptocromos". Los espectros de acción asociados con muchas de estas respuestas son similares a las propiedades de absorción de la flavina adenina dinucleótido (FAD) (215). Hasta el momento se han aislado dos genes de *Arabidopsis thaliana* (*cry* 1 y *cry* 2) que codifican para proteínas con homología a fotoliasas (216, 217) y que actuarían como fotoreceptores de luz azul. Estas proteínas poseen 2 cromóforos: FAD y otro cromóforo que podría ser una deazaflavina o una pterina (218). El cromóforo secundario sería el que domina el espectro de absorción y su espectro de acción, por lo tanto los receptores conteniendo deazaflavina absorberían y actuarían en el azul y aquellas conteniendo pterina actuarían en el UV-A.

La naturaleza química del fotoreceptor de UV-B es hasta el momento desconocida, y por lo tanto el mecanismo de fotorecepción de UV-B no es claro (219). Sin embargo, los efectos de la radiación UV-B en el crecimiento de las plantas y en la fotosíntesis han sido ampliamente investigados (220). La luz UV-B reduce la capacidad fotosintética mediante el daño al fotosistema II y a

componentes vitales de la ruta de carboxilación en *Pisum*, este daño puede ser reparado *de novo* por biosíntesis enzimática y del fotosistema II (221, 222). La radiación UV-B también induce la formación de los dímeros de pirimidina en el ADN que normalmente son reparados por fotoreactivación en la presencia de UV-A y luz visible. El daño causado en las plantas por UV-B puede ser atenuado por la expresión de genes que ayuden a prevenir o reparar el daño. Recientemente se ha sugerido que la activación de rutas de señalización para la inducción de genes de defensa por exposición a luz ultravioleta están mediadas por la vía del ácido octadecanoico (223). En la vía de los fenilpropanoides, que producen flavonoides que absorben el UV y otros metabolitos secundarios, la radiación UV-B induce la expresión de algunas enzimas como la chalcona sintasa y la fenilalanina amonio liasa (208), ya que existe evidencia que los flavonoides se acumulan en la epidermis de las plantas y reducen el daño contra la radiación ultravioleta al absorber energía de estas longitudes de onda (224).

El espectro de radiación ultravioleta se divide generalmente en tres partes: UV-C, UV-B y UV-A. La luz UV-C (correspondiente a longitudes de onda menores a 280 nm) es altamente energética y extremadamente perjudicial para los sistemas biológicos, pero esta radiación no llega a la tierra porque es absorbida por el oxígeno y el ozono en la estratosfera. La luz UV-B (280-320 nm) es también potencialmente perjudicial y es fuertemente absorbida por el ozono atmosférico. Como la transmisión de la radiación UV-B es función de la concentración de ozono, los niveles terrestres de UV-B están aumentando con la disminución de la capa de ozono (225, 226). Finalmente, la radiación UV-A (320-400 nm) no es atenuada por el ozono, causa menos daño y puede ser una importante señal fotomorfogénica en el desarrollo de las plantas (206).

BC

El promotor del gen de la EM-NADP de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) (103) muestra un motivo con homología a una secuencia consenso responsable de la inducción de genes por UV-B y elicitores fúngicos de la ruta de los fenilpropanoides (227). Además, plantas transgénicas con el promotor unido a un gen reportero (114) muestra que dicho promotor responde a diferentes estímulos asociados a la defensa de la planta contra diferentes elicitores.

En la primer parte de este capítulo se estudió el efecto de la radiación UV-A y UV-B sobre la expresión de la EM-NADP de plántulas de maíz. Como se describió previamente, en tejidos de esta especie existen al menos dos isoformas de la enzima, ambas localizadas en los plastidios (96). La isoforma involucrada con el metabolismo C_4 es inducida por luz blanca y esta inducción ocurre a nivel transcripcional (97, 98), mientras que la forma constitutiva que es mayoritaria en tejido etiolado no aumenta su expresión luego de la exposición a luz fotosintéticamente activa (PAR) (98).

En la segunda parte, se estudió la inducción de la enzima málica dependiente de NADP de hojas etioladas de maíz en función de la intensidad y duración de los tratamientos con UV-B, y la manera por la cual tratamientos con luz roja y roja lejana (sistema del fitocromo) influyen en esta respuesta.

5.2. Resultados

5.2.1. Inducción de la enzima málica dependiente de NADP de plántulas etioladas y verdes de maíz por UV-B.

Se expusieron plántulas de maíz bajo diferentes condiciones lumínicas (Tabla 7) y se utilizó la tercer hoja de cada plántula para la extracción de proteínas y de ARN. La variación en los niveles de la EM-NADP fue estudiada a través de ensayos de actividad enzimática, por análisis de Western blot de extractos proteicos utilizando anticuerpos contra la enzima de 62 kDa de maíz y por análisis de dot blot de muestras de ARN total utilizando una sonda específica correspondiente al extremo 3´terminal del ADNc de la forma C_4.

Tabla 7. Tratamientos lumínicos ensayados en las plántulas de maíz. Todas las medidas se presentan en μmol m^{-2} s^{-1}. Las longitudes de onda se presentan en nm. Los números de las muestras corresponden a los indicados en las Figuras 23-28.

Muestra	**Tratamiento (hs)**	**PAR (400-700)**	**UV-A (320-400)**	**UV-B (280-320)**
1	oscuridad (0)	0	0	0
2	alta (6)	300	33	0,06
3*	alta (24)	300	33	0,06
4	baja (6)	14	0,35	0
5	baja (24)	14	0,35	0
6	UV-A (6)	13	11	0,1
7	UV-A (24)	13	11	0,1
8*	UV-B (6)	13	11	9
9	UV-B (12)	13	11	9
10	UV-B (24)	13	11	9
11	control verde (12 hs luz/12 hs oscuridad)	300	33	0,06

*En el caso del dot blot de ARN (Figura 27) se estudiaron tiempos adicionales. 3#: 12 hs alta PAR, 8#: 3 hs UV-B.

La actividad de la EM-NADP de hojas etioladas de maíz aumentó marcadamente luego de una exposición a altos niveles de luz blanca y a bajos niveles de luz blanca suplementada con radiación UV-B (Figura 23). El tratamiento con radiación UV-B causó una mayor actividad que la medida a partir de extractos de plántulas expuestas a bajas intensidades de luz blanca, mientras que el suplemento con radiación UV-A no produjo ningún efecto significativo en la actividad de la enzima (Figura 23). La baja actividad específica medida en extractos de hojas etioladas (0,05 UI mg de proteína soluble^{-1}) puede ser atribuída a la expresión de la isoforma constitutiva, a bajos niveles de expresión de la isoforma fotosintética, o a ambas (98).

De esta forma, luego de 6 hs de iluminación continua con baja intensidad de luz fotosintéticamente activa (PAR) (muestra 4), la actividad específica aumentó 1,7 veces relativa al control de plantas etioladas. Por otra parte, luego del tratamiento con alta PAR y baja PAR suplementada con UV-B, la actividad específica aumentó alrededor de 2,6 veces en comparación con el control (muestras 2 y 8, Figura 23).

La actividad de la enzima málica también aumentó con el tiempo de exposición a la luz. Bajas intensidades de PAR durante 24 hs (muestra 5) produjeron un aumento en la actividad enzimática de 4,5 veces relativa a la actividad del control. Sin embargo, no se alcanzó el nivel obtenido luego del tratamiento durante tiempos iguales con alta intensidad de PAR (8,1 veces) (muestra 3) o baja PAR + UV-B (7 veces) (muestra 10). La actividad enzimática de hojas etioladas expuestas a bajos niveles de luz blanca no aumentó al suplementarla con UV-A (muestras 6 y 7 en comparación con 4 y 5).

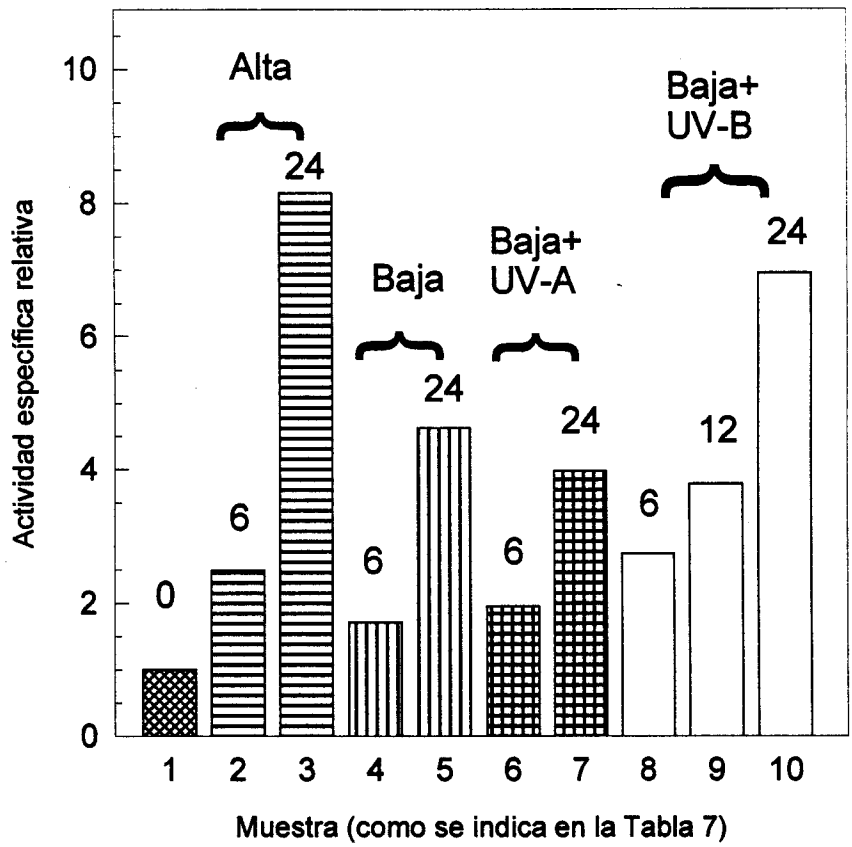


Figura 23. Inducción por luz de la actividad de la EM-NADP en plántulas etioladas de maíz. El número de muestra corresponde al tratamiento lumínico descripto en la Tabla 7. La actividad específica de cada muestra se presenta en forma relativa a la actividad específica medida en hojas etioladas sin tratar (0,05 UI. mg^{-1} de proteína total). Se indica un promedio de los resultados obtenidos a partir de 4 diferentes repeticiones. Los valores de desviación estándar fueron menores del 5% en todos los casos.

Para determinar si el aumento de actividad fue resultado de un aumento en la cantidad de proteína, se realizaron experimentos de Western blot con las muestras

anteriores. La Figura 24 muestra un resultado típico proveniente de un experimento, el cual fue repetido cuatro veces con resultados similares. La expresión de la enzima fotosintética fue baja en tejido etiolado (muestra 1) y en hojas iluminadas con baja intensidad de luz blanca (muestra 4) y baja PAR suplementada con UV-A (muestra 6) durante 6 hs (Figura 24 A). Se observaron altos niveles de esta proteína luego de la iluminación con alta PAR (muestras 2 y 3) o baja PAR + UV-B (muestras 8, 9 y 10). De igual manera a lo observado en las medidas de actividad, la EM-NADP luego de la exposición con baja intensidad de luz blanca aumentó con el tiempo de exposición (muestra 5), aunque menos que lo observado con alta PAR (muestra 3) o baja PAR + UV-B (muestra 10) (Figura 24 A).

Western blots realizados sembrando mayores cantidades de proteína en el gel mostraron la forma constitutiva de la enzima (72 kDa). Sin embargo, el nivel de la isoforma no fotosintética no se vio afectada por los tratamientos utilizados. Una inspección general de los geles teñidos con azul de Coomassie (Figura 24 B) muestra que la misma cantidad de proteína fue sembrada en cada calle. La aparente ausencia de cambio en la intensidad de algunas bandas indica la selectividad en la respuesta de la EM-NADP a los efectos de la luz.

QC

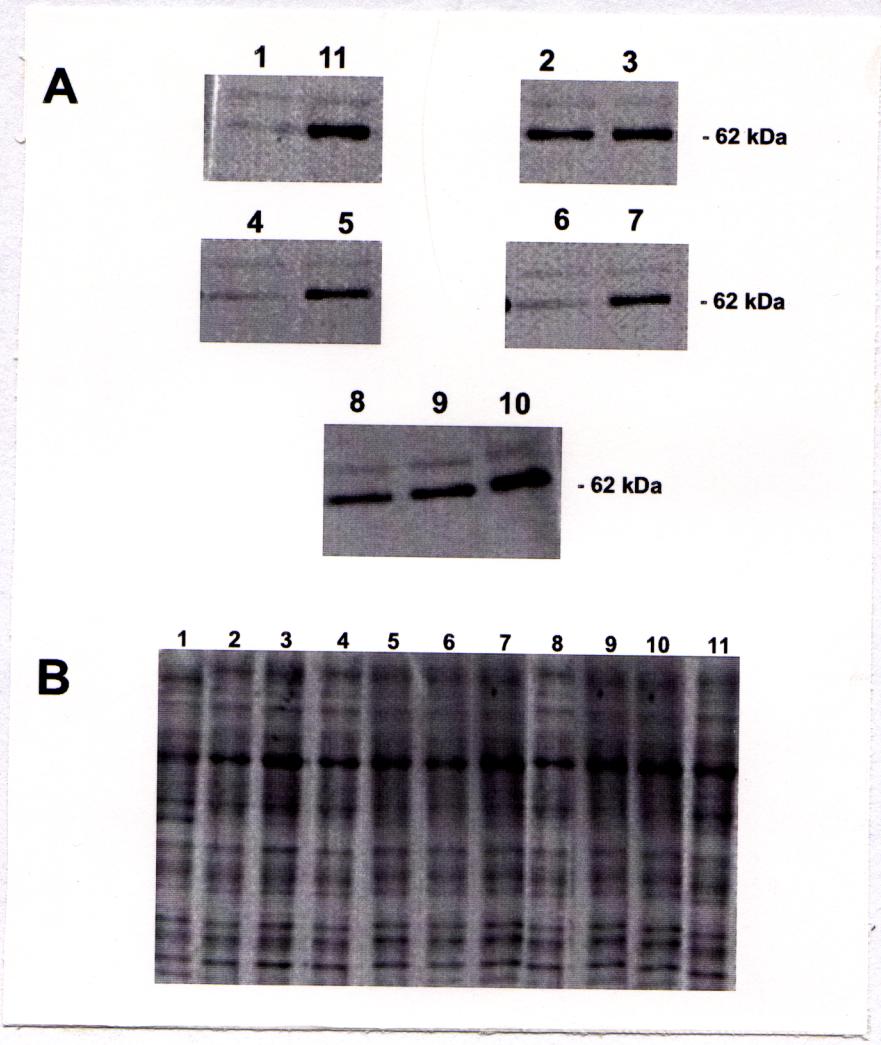


Figura 24. Inducción lumínica del contenido de la EM-NADP en plántulas etioladas de maíz. A, Análisis por Western blot de la EM-NADP separada por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se sembraron 10 μg de proteína en cada calle. Se indica la masa molecular calculada de cada banda. El número de muestra corresponde al tratamiento lumínico descripto en la Tabla 7. B, Tinción con azul de Coomassie de las proteínas totales. En cada calle se sembró 20 μg de proteína total soluble.

Se llevaron a cabo análisis densitométricos sobre los distintos Western blots para comparar las intensidades de las bandas correspondientes a la enzima málica. La Figura 25 muestra un promedio de las áreas densitométricas de los distintos Western blots para cada uno de los tratamientos utilizados. Los resultados muestran claramente que la expresión de la enzima es inducida por luz en una forma dependiente tanto de la cantidad y calidad de la luz. Las plántulas expuestas a alta luz visible durante 6 hs (muestra 2) poseen 2 veces más de esta proteína que aquellas expuestas a baja luz blanca (muestra 4) y baja PAR + UV-A (muestra 6). Bajos niveles de PAR suplementada con UV-B (muestra 8) causaron aumentos en los niveles de EM-NADP comparables a los alcanzados luego de la exposición bajo alta intensidad de PAR durante el mismo tiempo. La cantidad de enzima aumentó con el tiempo de exposición, y los mayores niveles se alcanzaron luego de 24 hs de exposición bajo alta PAR (muestra 3) y baja PAR + UV-B (muestra 10).

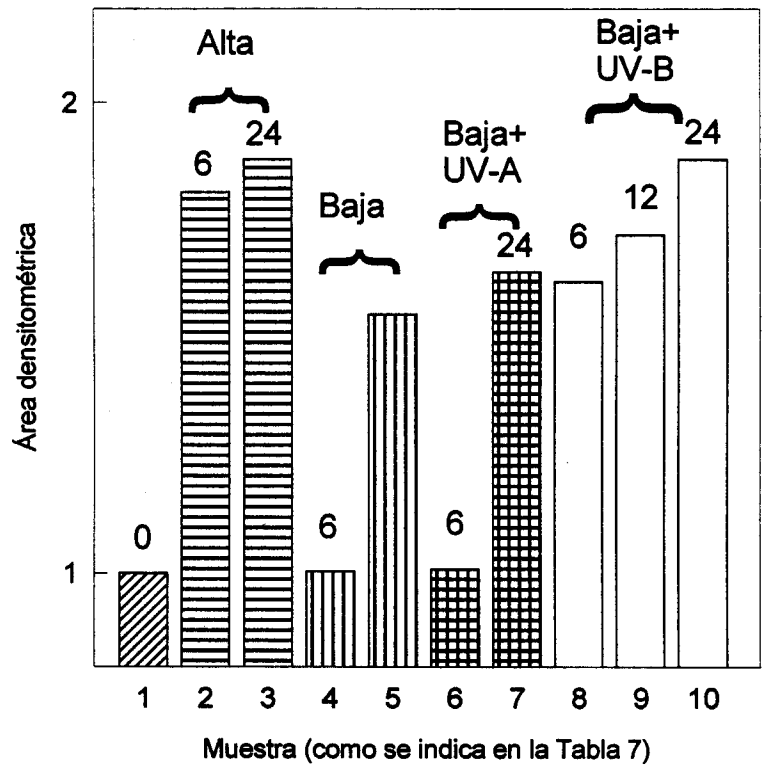


Figura 25. Las densitometrías de las bandas de los Western blots revelados con los anticuerpos contra la EM-NADP de maíz (Figura 24 y otras repeticiones) fueron normalizadas al área calculada correspondiente a la proteína de las hojas etioladas no tratadas (calle 1). Las área relativas fueron calculadas a partir de 4 experimentos diferentes y promediadas. Los valores de desviación estándar fueron menores al 3%.

Para determinar si los niveles de ARN también cambiaban con los diferentes tratamientos, se realizaron dot blots de ARN con muestras extraídas luego de cada tratamiento (Figura 26). Se encontraron bajos niveles del mensajero de la EM-NADP en hojas etioladas. Luego de la exposición durante 3 hs con UV-B, el nivel del ARN

de la EM-NADP aumentó marcadamente, alcanzando un máximo nivel entre las 6 y 12 hs de exposición (Figura 26, muestras 8#, 8 y 9). Por el contrario, luego del tratamiento con baja intensidad de luz blanca, el nivel del mensajero fue poco afectado (Figura 26, muestra 4). Alta intensidad de PAR indujo la expresión del mensajero de forma similar que lo observado luego del tratamiento con UV-B (Figura 26, muestras 2, 3# y 3). De esta forma, la cantidad de ARNm se correlaciona con el aumento de proteína y actividad de EM-NADP.

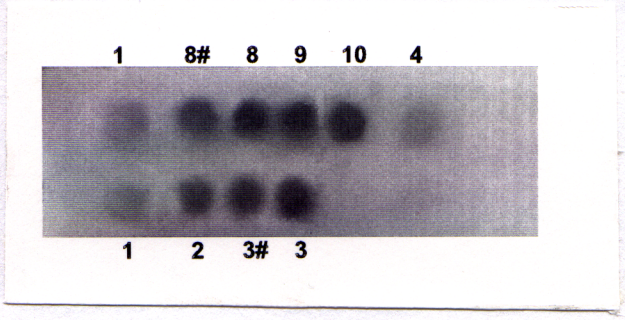


Figura 26. Análisis de dot blot de ARN total luego del tratamiento bajo distintas condiciones lumínicas. El número de cada muestra corresponde al tratamiento lumínico descripto en la Tabla 7.

Posteriormente, se realizaron Western blots con plántulas etioladas de maíz defectivas en flavonoides (mutante 224H). Se obtuvo el mismo patrón de inducción que el anteriormente observado con el tipo salvaje con respecto a la cantidad y calidad de luz (no mostrado). Estos resultados sugieren que el contenido de flavonoides en la epidermis no afecta la inducción de la enzima málica en respuesta a la radiación UV-B.

Por otra parte, se realizaron experimentos utilizando plántulas verdes de maíz, de la misma manera que los realizados sobre las plántulas etioladas. Las plántulas verdes fueron sometidas a los tratamientos indicados en la Tabla 7 luego de un período de oscuridad de 12 hs. Como se vio anteriormente con las plantas etioladas, la actividad de EM-NADP aumentó en las hojas verdes en función de la calidad y cantidad de luz y el tiempo de exposición (Figura 27 A). Se observó un aumento significativo de la actividad después de sólo 6 hs de tratamiento con baja PAR + UV-B (muestra 8) o alta PAR (muestra 2). Solamente se midió un leve aumento en la actividad después del tratamiento con baja intensidad de luz visible con o sin suplemento de UV-A después de 24 hs de iluminación (muestras 7 y 5). Las plántulas verdes tratadas durante 24 hs con UV-B mostraron un aumento del 30% en la actividad de EM-NADP (muestra 10). Los Western blots realizados con las muestras tratadas durante 24 hs (Figura 27 B) muestran el mismo aumento en la cantidad de proteína, coincidiendo con las medidas de actividad de la Figura 27A.

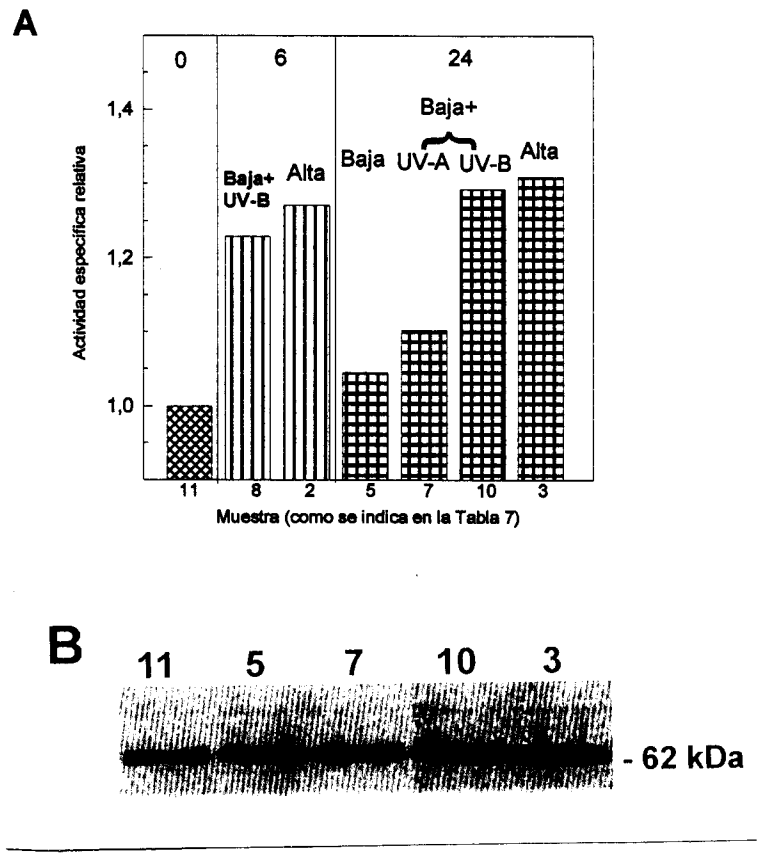


Figura 27. Efecto de la radiación UV-B y de la luz blanca en la actividad y contenido de la EM-NADP en hojas verdes de maíz luego de un período de 12 hs de oscuridad. A, Actividad específica de la EM-NADP de hojas verdes de maíz luego de 6 hs y 24 hs de tratamiento lumínico. La actividad específica se presenta en forma relativa a la actividad de las hojas verdes luego de un período de 12 hs de oscuridad (1,10 UI mg^{-1} de proteína soluble). Se indica un promedio de los resultados obtenidos a partir de 4 repeticiones diferentes. La desviación estándar fue menor a un 5% en todos los casos. B, Análisis por Western blot de las muestras de proteína luego de los tratamientos lumínicos durante 24 hs. Se sembraron 10 µg de proteína total soluble en cada calle. Los números de muestra corresponden al tratamiento lumínico que recibió cada muestra (Tabla 7).

Finalmente, se probó el efecto de la intensidad de la radiación UV-B sobre la actividad de la EM-NADP. Para ello, se irradiaron plántulas etioladas de maíz con distintas intensidades de luz UV-B (2,5 ; 5,0 y 9,0 μmol m^{-2} s^{-1}) por un período de hasta 32 hs. La Figura 28 muestra la actividad específica de la EM-NADP en función del tiempo de exposición bajo los diferentes regímenes lumínicos. La intensidad de UV-B no afectó la velocidad inicial de aumento en la actividad ni la actividad final alcanzada después de las 32 hs de iluminación. El nivel de la enzima luego de los 3 tratamientos con UV-B fue menor que el alcanzado luego del tratamiento con alta intensidad de luz visible, pero considerablemente mayor que el obtenido luego de la exposición con baja PAR (Figura 28).

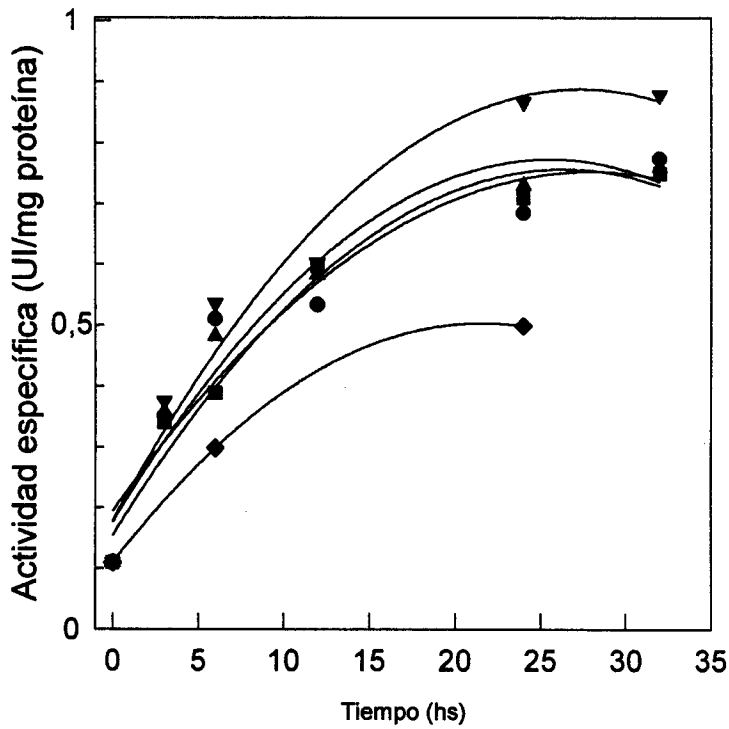


Figura 28. Actividad de EM-NADP de plántulas etioladas luego de la exposición bajo diferentes intensidades de UV-B durante 32 hs. Las plántulas fueron expuestas a baja PAR (13 μmol m^{-2} s^{-1}) en ausencia (♦) o presencia de 2,5 (•), 5,0 (■) o 9,0 (▲) μmol m^{-2} s^{-1} UV-B, y 300 μmol m^{-2} s^{-1} PAR (▼). La actividad específica de EM-NADP se graficó en función del tiempo desde el comienzo de la inducción. Se indica un promedio de los resultados obtenidos de diferentes repeticiones. Los valores de desviación estándar fueron menores del 3% en todos los casos. Las líneas se graficaron de acuerdo a una regresión de segundo orden.

5.2.2. Regulación de la expresión de la isoforma C_4 de la enzima málica dependiente de NADP en plántulas etioladas de maíz por radiación UV-B, roja y roja lejana.

En la sección anterior se mostró que la radiación UV-B puede inducir la expresión de la EM-NADP de 62 kDa de maíz luego de iluminación continua. Para probar el efecto de intensidades menores y tiempos de exposición más cortos se expusieron plántulas etioladas de maíz bajo una intensidad de luz UV-B igual a 2 μmol m^{-2} s^{-1} según se describe en la Tabla 8, tratamiento 1 C; durante 5, 30 y 60 minutos y luego se transfirieron a oscuridad hasta completar un período de 6 horas. Como controles se utilizaron plántulas etioladas sin tratamiento y plántulas etioladas expuestas durante 6 hs bajo luz UV-B en forma continua. Luego de los diferentes tratamientos, se cortó la tercera hoja de cada planta para realizar extractos proteicos y de ARN total. La EM-NADP fue medida, de igual manera a lo descripto en la primera parte del capítulo, tanto por ensayos de actividad enzimática, por análisis por Western blot de los extractos proteicos utilizando anticuerpos contra la EM-NADP fotosintética de maíz y por dot blot de ARN utilizando una sonda específica de ADNc. La Tabla 9 muestra que exposiciones cortas (entre 5 y 60 minutos) de una intensidad de sólo 2 μmol m^{-2} s^{-1} de radiación UV-B fueron efectivas para aumentar la actividad de la enzima, y el grado de aumento dependió de la duración de la exposición. Luego de 5 minutos de exposición con radiación UV-B la actividad específica de la EM-NADP aumentó más de dos veces con respecto al valor medido a partir de extractos crudos de hojas etioladas (Tabla 9).

Tabla 8. Características de las fuentes de luz utilizadas y calidad y cantidad de luz emitida. La intensidad luminosa se expresa en $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$. La longitud de onda se expresa en nm.

Tratamiento	Lámpara		UV-B	UV-A	PAR
1. UV-B	UVB-313 +filtro de acetato de celulosa[a]	a)	0,5	0,6	0,7
		b)	1,0	1,2	1,4
		c)	2,0	2,4	2,8
2. Como 1 menos UV-B	UVB-313 +filtro de poliéster[b]	a)	0,005	0,6	0,7
		b)	0,011	1,2	1,4
		c)	0,022	2,4	2,8
3. Blanca	Fluorescente blanco frío	a)	0	0,35	14
		b)	0	7	300
4. Roja	Diodo de luz roja[c]		0	0	10

[a]UVB-313, Q-panel, Cleveland, OH, EEUU + filtro de acetato de celulosa de 0,076 mm para absorber radiación de longitudes de onda menores a 280 nm.

[b]UVB-313, Q-panel, Cleveland, OH, EEUU + filtro de poliéster de 0,127 mm para absorber la radiación UV-B.

[c] Diodo de luz roja con un $\lambda_{máx}$ 658 nm, Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, Inglaterra.

Tabla 9. Actividad específica de la EM-NADP de hojas etioladas de maíz luego de la exposición bajo pulsos de distinta duración de radiación UV-B. Las plántulas fueron expuestas a una intensidad de 2 μmol m^{-2} s^{-1} de UV-B (Tratamiento 1 C, Tabla 8) durante 5, 30 y 60 minutos y 6 hs. Los resultados son el promedio de 3 experimentos diferentes con plántulas distintas.

Tratamiento	Actividad específica (UI. mg^{-1})
0 hs	0,050 ± 0,002
5 minutos	0,107 ± 0,010
30 minutos	0,124 ± 0,012
60 minutos	0,133 ± 0,011
6 hs	0,142 ± 0,012

La inducción de la EM-NADP se verificó también por experimentos de Western blot y por dot blot de ARN (Figura 29). La Figura 29 A muestra un Western blot de las muestras que se utilizaron para realizar las medidas de actividad enzimática y cuyos valores se presentan en la Tabla 9. En extractos crudos de hojas etioladas se observó un bajo nivel de expresión de la enzima C_4 (62 kDa) (calle 1), observándose que la síntesis de la EM-NADP C_4 fue inducida luego de los distintos tratamientos con luz UV-B (calles 2-5). La banda correspondiente a la isoforma constitutiva (72 kDa) no mostró alteración en su expresión por luz visible (98) y como se describió en la sección anterior, no cambió luego del tratamiento con UV-B (no mostrado). Se realizaron controles utilizando las mismas lámparas de UV-B con filtros para excluir longitudes de onda menores a 320 nm (Tabla 8, tratamiento 2 C) y como se describió en la sección anterior, no se observó cambio significativo en la cantidad de enzima málica en comparación a lo observado en plántulas etioladas.

Se realizó un experimento de Western blot con las mismas muestras proteicas, el cual se reveló utilizando anticuerpos contra la enzima malato deshidrogenasa dependiente de NAD (MDH-NAD) para verificar la especificidad de la respuesta de acumulación de la EM-NADP (Figura 29 B), observándose que el nivel de esta enzima se mantuvo constante luego del tratamiento con UV-B.

La Figura 29 C muestra los resultados de un dot blot de ARN total obtenido luego de los distintos tratamientos. Se encontró baja expresión de los transcriptos correspondientes al gen de la EM-NADP en hojas etioladas (posición 1), mientras que luego de un pulso de 5 minutos con UV-B seguido de un tratamiento en oscuridad (posición 2) el nivel del ARNm de la EM-NADP aumentó marcadamente, y este aumento fue todavía mayor luego de 6 hs de exposición continua con UV-B (posición 3). Por el contrario, luego del tratamiento con baja PAR durante 5 minutos seguido de un período de oscuridad hasta completar las 6 hs (posición 4) el nivel del ARNm de la EM-NADP fue muy poco afectado. Bajo altas condiciones lumínicas durante 6 hs (posición 6) el nivel del mensajero de esta enzima fue similar al observado luego del tratamiento con UV-B en forma continua durante 6 hs (posición 3). Se realizaron dot blots controles de las mismas muestras de ARN utilizando como sonda el extremo 5´del ADNr 25s de *Vicia faba* (Figura 29 D). Una señal de intensidad similar fue detectada en cada posición, indicando la especificidad de la respuesta de acumulación del mensajero de la EM-NADP. De esta manera, se observó una correspondencia general entre la cantidad de ARNm y el aumento en actividad de EM-NADP y cantidad de proteína determinada por Western blot (Tabla 9 y Figura 29 A).

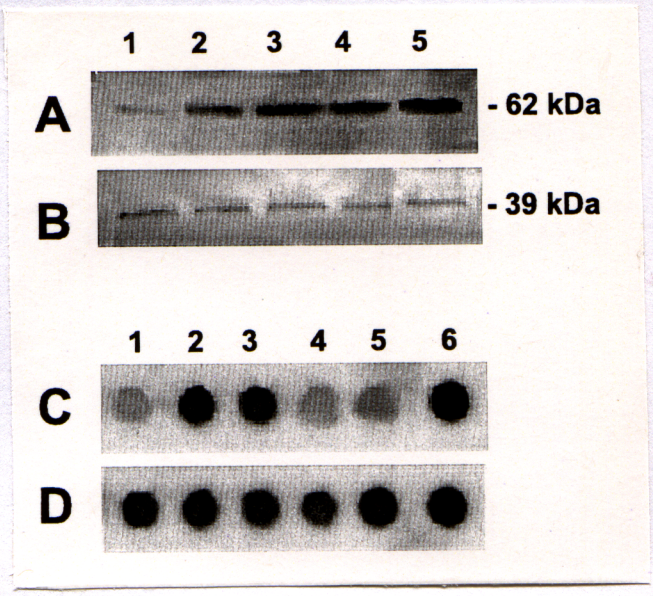


Figura 29. Efecto de pulsos de UV-B en la inducción de la EM-NADP de 62 kDa en hojas etioladas de maíz. A y B, Análisis de Western blot de la EM-NADP (A) y de la MDH-NAD (B) separada por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Las muestras fueron tratadas durante distintos tiempos a intensidades de 2 μmol m^{-2} s^{-1} de UV-B como se describe en la Tabla 8. Luego de 6 hs de tratamiento se extrajeron las proteínas de hojas etioladas (1), luego de 5 min de UV-B + oscuridad (2), 30 min de UV-B + oscuridad (3), 60 min de UV-B + oscuridad (4) y 6 hs de UV-B (5) (20 μg). Se indica la masa molecular de la banda correspondiente a la EM-NADP y al MDH-NAD. C y D, Análisis de dot blot de ARN total luego del tratamiento bajo las diferentes condiciones lumínicas durante 6 hs de la EM-NADP (C) y del ADNr 25s (D). Se utilizaron 30 μg de ARN (C) y 5 μg de ARN (D) para los análisis de dot blot a partir de hojas etioladas (1), luego de la exposición bajo radiación UV-B por 5 minutos + oscuridad (2) y 6 hs (3), y bajos niveles de PAR (Tratamiento 4a, Tabla 8) por 5 minutos + oscuridad (4) y 6 hs (5) y altos niveles de PAR (Tratamiento 4b, Tabla 8) por 6 hs (6).

El efecto inductivo fue luego determinado a menores intensidades de luz UV-B y a diferentes tiempos de exposición (Tabla 8, tratamiento 1a, b y c). Estos experimentos mostraron que bajas intensidades de radiación UV-B, pero no baja PAR o UV-A, aumentan la actividad de la enzima málica (Tabla 10), a pesar de que la intensidad de UV-B utilizada fue menor a los niveles más altos que ocurren en la naturaleza (por ejemplo, 5,3 μmol m^{-2} s^{-1} en Pullman, estado de Washington, EEUU, en el mes de julio). Por otra parte, se midió un pequeño aumento de actividad en los experimentos realizados utilizando lámparas UVB-313 con filtros de poliéster (que excluye las longitudes de onda menores a 320 nm, Tabla 8, tratamiento 2c). Este resultado puede deberse a muy bajos niveles de UV-B que no son filtrados (0,02 μmol m^{-2} s^{-1}). Para estudiar si existe reciprocidad del tiempo en función a la intensidad del tratamiento, la dosis total de UV-B (μmol m^{-2}) de los distintos tratamientos mostrados en la Tabla 10 se graficaron en función de la actividad de la EM-NADP (Figura 30). A partir de los datos del gráfico se observó que para una dada intensidad de UV-B se obtuvieron curvas bifásicas con un rápido aumento en la actividad de la enzima con el aumento de la dosis de UV-B y finalmente se alcanza una meseta con un aumento más gradual. La dosis requerida para alcanzar la meseta aumentó al aumentar la intensidad, y a partir de los resultados de la Tabla 10 se verificó que el punto en el que se alcanza la meseta se halla dentro de los 5 minutos de iluminación. De esta forma, una alta intensidad de luz UV-B aplicada en un período corto de tiempo fue más efectiva que una baja intensidad de luz visible administrada en forma continua. El hecho de que las tres curvas no posean la misma forma de respuesta indicó la no existencia de reciprocidad con el tiempo y la duración del tratamiento.

Tabla 10. Actividad específica de la EM-NADP luego de la exposición de plántulas etioladas de maíz bajo distintas dosis de radiación UV-B. Las plántulas fueron expuestas a intensidades de UV-B iguales a 0,5; 1 o 2 μmol m^{-2} s^{-1} (Tabla 8, tratamiento 1) durante 2, 5, 15 o 30 minutos. El experimento también fue realizado utilizando la misma lámpara con un filtro de poliéster que elimina la radiación UV-B (0,02 μmol m^{-2} s^{-1}, Tabla 8, tratamiento 2c). Cada resultado es el promedio de 3 experimentos separados utilizando plántulas diferentes.

	Intensidad de UV-B (μmol m^{-2} s^{-1})			
	2	1	0,5	0,02*
	(Actividad específica, UI. mg proteina^{-1})			
0	0,050 ± 0,002	0,050 ± 0,002	0,050 ± 0,002	0,050 ± 0,002
2 minutos	0,070 ± 0,004	0,068 ± 0,003	0,060 ± 0,005	0,055 ± 0,003
5 minutos	0,102 ± 0,009	0,095 ± 0,007	0,071 ± 0,004	0,055 ± 0,005
15 minutos	0,107 ± 0,010	0,095 ± 0,007	0,073 ± 0,009	0,053 ± 0,004
30 minutos	0,120 ± 0,018	0,096 ± 0,010	0,076 ± 0,010	0,061 ± 0,011

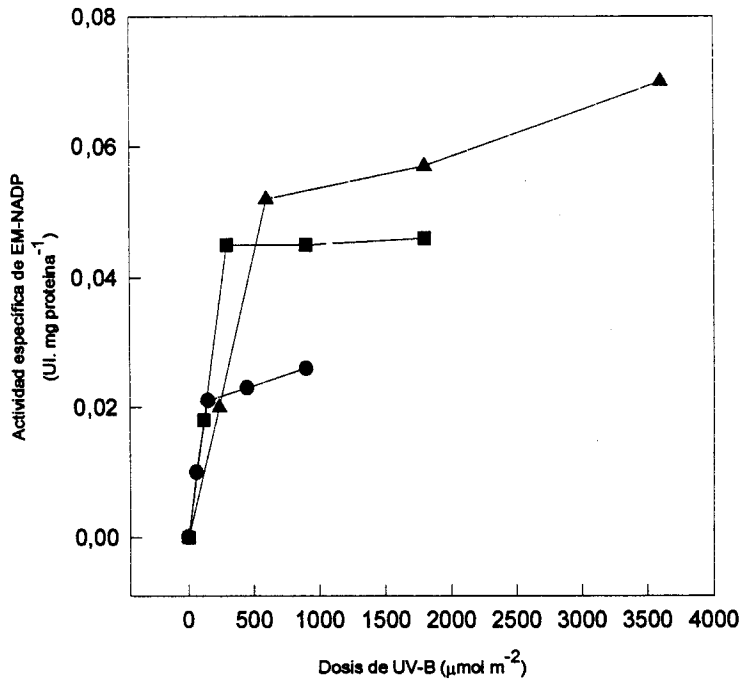


Figura 30. Efecto de la dosis total de UV-B (µmol m^{-2}) sobre el aumento en la actividad de la EM-NADP a tres intensidades de UV-B diferentes: 0,5 (•), 1 (■) y 2 (▲) µmol m^{-2} s^{-1}. Las plántulas etioladas de maíz fueron tratadas como se indican en la Tabla 8.

Por otra parte, se realizaron pruebas para determinar la participación del fitocromo en la modulación de la expresión de la EM-NADP. Las plántulas etioladas de maíz fueron tratadas en forma continua durante 6 hs con luz roja (Tabla 8, tratamiento 4) o con UV-B (Tabla 8, tratamiento 1c) (Tabla 11, Figura 31 A) o bien con pulsos de 5 minutos con ambos tipos de radiaciones seguidos de un período de oscuridad hasta cumplir un tratamiento de 6 hs (Tabla 11, Figura 31 C). Estos tratamientos resultaron en un aumento de la actividad de la enzima (Tabla 11) y de los niveles de proteína (Figura 31 A y C calles 2 y 3). Como control de la Figura 31 A, se realizaron Western blots con las mismas muestras proteicas que se revelaron

utilizando anticuerpos anti-(MDH-NAD) (Figura 31 B). Estos resultados muestran que la inducción de la EM-NADP es específica, ya que los niveles de la MDH-NAD no cambiaron luego de los tratamientos (Figuras 31 A y B). Luego de los tratamientos con pulsos de UV-B o luz roja, el aumento en la actividad fue alrededor de 2 veces mayor que la actividad del control etiolado. Después de una exposición continua durante 6 hs, el aumento fue de 2,8 veces para ambos tratamientos (Tabla 11).

Para estudiar si las respuestas frente a la luz roja y UV-B eran revertidas por la acción de la luz roja lejana, plántulas etioladas de maíz fueron expuestas a luz roja lejana durante 5 minutos inmediatamente después de exponer las plántulas 5 minutos bajo radiación UV-B o roja y antes de transferir las plantas a oscuridad. Los tratamientos con luz roja lejana resultaron en una reversión mayor al 75% en la respuesta inductiva en ambos casos, y el valor obtenido tanto de actividad específica como de proteína que reaccionó en los Western blots fue similar al obtenido con extractos de hojas etioladas sin tratamiento (Tabla 11 líneas 6 y 7, Figura 31 C calles 4 y 5). Sin embargo, cuando el pulso de luz roja lejana fue seguido por pulsos de 5 minutos de luz UV-B o roja, tanto la actividad enzimática (Tabla 11 líneas 8 y 9) como los niveles de la forma fotosintética de la EM-NADP (Figura 31 C calles 6 y 7) aumentaron de una manera similar a lo anteriormente observado en los tratamientos sin luz roja lejana. La Figura 3 D muestra un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes teñido con azul de Coomassie con las mismas muestras proteicas de la Figura 31 C, mostrando que no se observa cambio aparente en la intensidad de algunas bandas con los tratamientos lumínicos.

Tabla 11. Actividad específica de la EM-NADP de hojas etioladas de maíz luego de la exposición bajo pulsos de luz UV-B, roja y roja lejana. Las plántulas fueron expuestas bajo UV-B (Tabla 8, tratamiento 1c), luz roja (Tabla 8, tratamiento 4) y 100 μmol m^{-2} s^{-1} de luz roja lejana donde se indica, tanto en forma continua durante 6 hs. o durante 5 min seguido por un período de oscuridad hasta 6 hs. Los resultados son el promedio de 3 experimentos separados con plántulas diferentes.

Tratamiento	Actividad específica (UI. mg proteina^{-1})
etiolada	0,050 ± 0,002
5 min UV-B + 6 hs oscuridad	0,107 ± 0,010
5 min roja + 6 hs oscuridad	0,116 ± 0,011
6 hs UV-B	0,142 ± 0,010
6 hs roja	0,141 ± 0,018
5 min UV-B + 5 min roja lejana + 6 hs oscuridad	0,060 ± 0,013
5 min roja + 5 min roja lejana + 6 hs oscuridad	0,066 ± 0,010
5 min UV-B + 5 min roja lejana + 5 min UV-B + 6 hs oscuridad	0,151 ± 0,011
5 min roja + 5 min roja lejana + 5 min roja + 6 hs oscuridad	0,150 ± 0,009

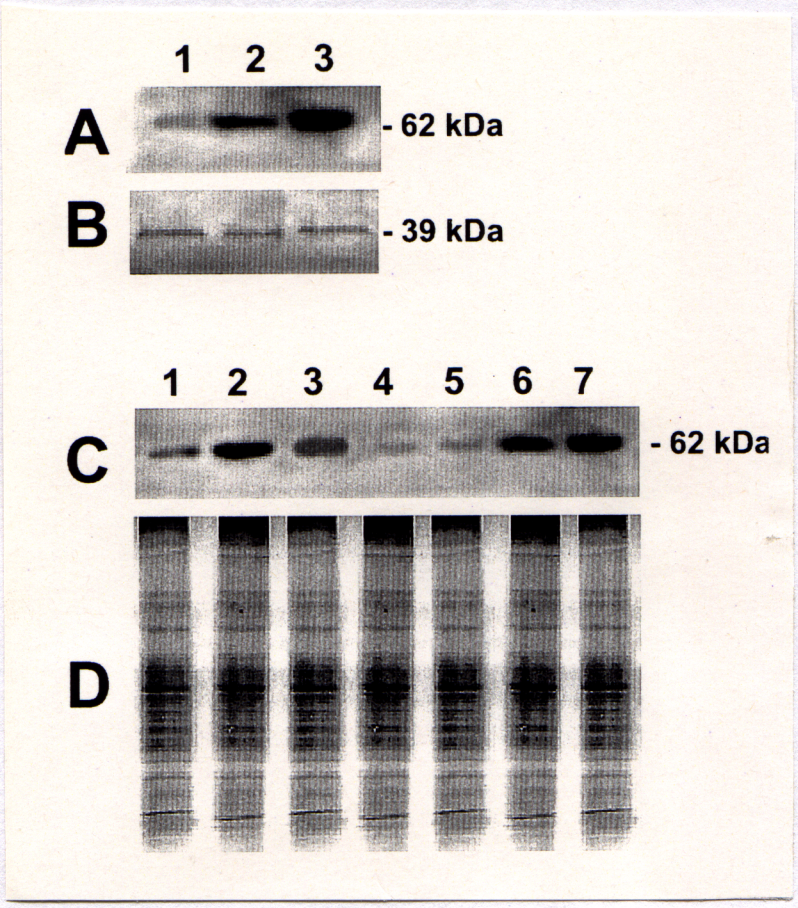


Figura 31. A y B, Efecto de la exposición continua bajo radiación UV-B y luz roja sobre la inducción de la EM-NADP en plántulas etioladas de maíz. Análisis por Western blot de la EM-NADP (A) y de la MDH-NAD (B) según los tratamientos descriptos en la Tabla 11. Se sembraron 20 µg de proteína de hojas etioladas (1), y de hojas expuestas 6 hs bajo radiación UV-B (2) o roja (3). C y D, Efecto de pulsos de luz roja lejana después de la exposición de las plantas bajo otros tratamientos lumínicos sobre la expresión de la EM-NADP. Análisis por Western blot de la EM-NADP (C) y gel de poliacrilamida desnaturalizante teñido con azul de Coomassie (D) de extractos obtenidos a partir de hojas etioladas (1), luego de un pulso de 5 min de luz roja (2) o UV-B (3), luego de un pulso de 5 min de luz roja lejana posterior al pulso de luz roja (4) o UV-B (5), o luego de otro pulso de 5 min de luz roja (6) o UV-B (7) posterior al pulso de luz roja lejana (20 µg).

3C

Por último, se estudió el efecto de tratamientos con distintas radiaciones durante 6 horas, con o sin exposición previa a pulsos de radiación UV-B sobre la expresión de la EM-NADP. La Tabla 12 muestra que los tratamientos con pulsos de 5 minutos con UV-B seguidos de un período de oscuridad dan una inducción equivalente (alrededor de 2 veces) al tratamiento durante 6 horas continua con baja PAR con o sin un suplemento de UV-A. Se midieron actividades mayores con tratamientos aplicando pulsos de luz UV-B seguido por exposición de baja PAR con o sin suplemento con UV-A hasta 6 hs, y estos tratamientos fueron igualmente efectivos a los tratamientos con iluminación continua con UV-B o luz roja, o con un pulso de UV-B seguido por exposición continua con luz roja (Tabla 12).

Tabla 12. Actividad específica de EM-NADP luego de la exposición de plántulas etioladas de maíz bajo diferentes tipos de radiación. Se utilizó una intensidad de 2 μmol m^{-2} s^{-1} de UV-B (Tabla 8, tratamiento 1c), baja PAR (Tabla 8, tratamiento 3a), alta PAR (Tabla 8, tratamiento 3b), luz roja (Tabla 8, tratamiento 4), o UV-A/ baja PAR (Tabla 8, tratamiento 2c). Los tratamientos se realizaron durante 6 hs.

Tratamiento	Actividad específica (UI. mg proteina^{-1})
etiolada	0,050 ± 0,002
5 min UV-B + oscuridad	0,107 ± 0,010
6 hs baja PAR	0,099 ± 0,017
6 hs baja UV-A/baja PAR	0,105 ± 0,006
5 min UV-B + baja UV-A/baja PAR	0,132 ± 0,010
6 hs UV-B	0,142 ± 0,010
5 min UV-B + baja PAR	0,144 ± 0,012
5 min UV-B + roja	0,122 ± 0,020
6 hs roja	0,141 ± 0,018

5.3. Discusión

5.3.1.Inducción de la EM-NADP de maíz por radiación UV-B.

La EM-NADP fotosintética de maíz fue inducida por radiación UV-B de manera similar que por altos niveles de luz blanca. De esta forma, la inducción en la síntesis de esta enzima esta controlada tanto por luz blanca como por UV-B, dependiendo de la intensidad de la luz y de la duración del tratamiento. El aumento en el nivel del ARN puede ser atribuído a una alta velocidad de transcripción o bien a una mayor estabilidad del mensajero sintetizado, o a ambos.

El perfil de inducción observado en este estudio en los análisis de Western blot luego del tratamiento de las plántulas de maíz con UV y distintos niveles de PAR coinciden con las medidas de actividad. Sin embargo, el grado de aumento medido por actividad enzimática fue superior que el aumento en la cantidad de proteína determinado por densitometría de los Western blots. Esta diferencia puede deberse a la naturaleza no lineal de la técnica de Western blot (la intensidad de las bandas medidas por densitometría no es completamente lineal con la cantidad de proteína) (96), y esto puede subestimar la cantidad real de proteína. Alternativamente, la mayor respuesta en las medidas de actividad podría ocurrir si la luz causara algún tipo de activación en la enzima además de inducir la síntesis *de novo* de la proteína.

Como se indicó en la introducción, múltiples fotoreceptores regulan la expresión de algunos genes. Una región en el espectro solar puede afectar la expresión de muchas enzimas (206), por ejemplo, la inducción por UV-B de un grupo de enzimas en la síntesis de los flavonoides. En *Petroselinum*, solamente la radiación UV puede inducir la ruta de los flavonoides y la luz roja y roja lejana solas

no tienen efecto inductivo. Sin embargo, luego de administrar una dosis de radiación UV, la magnitud de la respuesta puede estar afectada por acción del fitocromo (228). Otros trabajos posteriores muestran que tanto el fitocromo como el fotoreceptor de luz azul interaccionan en la respuesta inducida por luz UV (229). En general, la síntesis de flavonoides y antocianinas es inducida por exposición a UV-B en varias especies (230, 231). Ambos pigmentos absorben la luz UV-B, y generalmente se acumulan en la epidermis donde pueden filtrar la radiación UV-B y prevenir que alcance los tejidos fotosintéticos. El mecanismo específico de inducción de la fenilalanina amonio liasa (PAL), una enzima que participa en la biosíntesis de los flavonoides es poco claro. Se ha sugerido (232) que el fitocromo es el único fotoreceptor involucrado en la inducción de la PAL, aunque los datos presentados no eliminan la posibilidad de la participación de 2 fotoreceptores. Tanto en tomate como en *Arabidopsis*, se ha demostrado sensibilidad a luz UV-B como a luz roja para la respuesta fotomorfogénica de elongación del hipocótilo (233, 234).

5.3.2. Regulación de la expresión de la EM-NADP C_4 de maíz por radiación UV-B, roja y roja lejana.

Los resultados descriptos en esta sección muestran que pequeñas dosis de UV-B emitidas por lámparas de UV-B (0,5-2 μmol m^{-2} s^{-1}) seguidas por un tratamiento de oscuridad por 6 hs producen un aumento sustancial de la EM-NADP en hojas etioladas de maíz. La inducción es dependiente de la intensidad, y los controles utilizando filtros que excluyen UV-B no producen un aumento significativo de la actividad. El grado de inducción por UV-B aumenta con el aumento de la dosis desde 0,5 hasta 2 μmol m^{-2} s^{-1}, teniendo su principal efecto luego de los 5 minutos

de iluminación. Estos niveles son bastante menores a las máximas intensidades medidas en la naturaleza. La respuesta a la dosis total de UV-B es bifásica, siendo el efecto inductivo más notorio durante los primeros 5 minutos del tratamiento seguido de un aumento gradual de la actividad a tiempos mayores de exposición. El perfil de inducción observado por Western blot y dot blot de ARN luego de los distintos tratamientos coinciden con los resultados obtenidos en los ensayos de actividad de EM-NADP, sugiriendo que estos aumentos en la actividad se deben parcial o totalmente a aumentos en la síntesis de la proteína, y eventos transcripcionales y/o postranscripcionales estarían involucrados en este proceso.

La luz roja es efectiva en la inducción de la EM-NADP, de manera similar a la radiación UV-B, tanto si es administrada en forma continua o durante períodos cortos. Nuestros resultados también muestran que luego de una exposición corta bajo luz roja lejana aplicada inmediatamente después de los pulsos de luz UV-B o roja, el efecto inductivo sobre la enzima málica se reduce significativamente, y el efecto de la luz roja lejana se revierte por un pulso final con luz roja o UV-B. La inducción causada por la luz roja y la reversión causada por la luz roja lejana muestran que la presencia de la forma activa del fitocromo (Pfr) puede resultar en la acumulación de la enzima sin requerimiento de otro fotoreceptor. La reversión del efecto inductivo causado por UV-B por luz roja lejana podría deberse a que esta inducción estaría mediada a través del sistema del fitocromo. La interpretación más simple es que la radiación UV-B causa un aumento de la forma Pfr del fitocromo. De hecho, existe evidencia que la luz UV-B convierte la forma que absorbe luz roja del fitocromo (Pr) a la forma que absorbe luz roja lejana (Pfr) estableciendo una relación de Pfr/Pr de alrededor del 70% (229). Sin embargo, el espectro de absorción del fitocromo purificado sugiere que la radiación UV-A también debería ser efectiva en

RC

la formación de Pfr (235). Nuestros resultados muestran que cuando se elimina la radiación UV-B con los filtros, la radiación UV-A remanente no es efectiva para inducir la expresión de la enzima durante los períodos de exposición (Tabla 10), lo que sugiere que el mecanismo de inducción por radiación UV-B podría ser más complejo y posiblemente requeriría la participación de un fotoreceptor de UV-B además del fitocromo.

Este estudio muestra que un tratamiento con un pulso de 5 minutos con UV-B seguido por 6 hs de baja PAR con o sin UV-A es igualmente efectivo al tratamiento continuo con UV-B o luz roja durante 6 hs produciendo un aumento en la actividad de la enzima (Tabla 11), y todos estos tratamientos son más efectivos que un pulso de UV-B seguido de un período de oscuridad. Estos resultados sugieren que eventos tempranos en el proceso de inducción podrían ser saturados por pequeñas cantidades de un estímulo, y pasos posteriores en el proceso de señalización podrían estar influenciados por bajos niveles de PAR. Alternativamente, los bajos niveles de PAR podrían mantener un nivel suficiente de la forma activa del fitocromo necesaria para inducir la expresión de la enzima.

No es claro si la regulación de ciertos procesos en las plantas, inducidos por UV-B, son respuestas específicas a este tipo de radiación, o si estos efectos observados son mediados a través del sistema de fitocromo y/o a través de un fotoreceptor de UV-B. La complejidad de la regulación por luz y los fotoreceptores se ilustra en la producción de flavonoides y antocianinas en estudios realizados con distintas especies vegetales donde se sugieren estarían involucrados los fotoreceptores de luz azul, roja y UV-B. Por ejemplo, Beggs y colaboradores (230) propusieron que la producción de isoflavonoides en poroto inducida por UV-B estaría mediada por la formación de dímeros de pirimidina en el ADN de la planta.

Ohl y colaboradores (236) propusieron que la radiación UV-B es mucho más efectiva que la luz roja o la azul en la inducción de la expresión del gen de la chalcona sintasa en células en cultivo de perejil, y la luz roja lejana no es efectiva para revertir esta inducción sugiriendo la participación de un fotoreceptor de UV-B. Kubasek y colaboradores (231) concluyeron que los genes para la biosíntesis de flavonoides en *Arabidopsis* son más efectivamente inducidos por radiación UV-B con un efecto mínimo ejercido por la luz azul, proponiéndose nuevamente la participación de un fotoreceptor de UV-B. Por otra parte, Duell-Pfaff y Wellman (229) mostraron que un tratamiento con luz roja lejana sobre células en cultivo de perejil resulta en una reversibilidad parcial de la acumulación de flavonoides inducida por UV. La participación del fitocromo en la síntesis de antocianinas mediada por luz en plántulas de mostaza está bien documentada (235). En experimentos utilizando mesocótilos de sorgo, se describió que la síntesis de antocianinas sería activada por Pfr a través de la inducción de los genes responsables, mientras que el efecto causado por la luz azul sería el de establecer la capacidad de respuesta hacia el fitocromo (237). Una mutante doble de *Arabidopsis* en la producción de fitocromo A y B (phyA/B) mostró que la acumulación de antocianinas en estas especies está predominantemente controlada por fitocromo. La mutante de tomate *aurea* deficiente en fitocromo es deficiente en antocianinas, y la microinyección del fitocromo A reconstituye la expresión del gen reportero β-glucuronidasa unida al promotor de la chalcona sintasa y la síntesis de antocianinas mediada por luz (238). De esta manera, los distintos estudios realizados muestran que mientras por un lado existen ejemplos claros que involucran la participación del fitocromo, se requieren más estudios para delucidar si

QC

las respuestas inducidas por UV-B ocurren a través del fitocromo o de un fotoreceptor de UV-B separado.

En resumen, la síntesis de la EM-NADP de 62 kDa está controlada por la calidad (UV-B, luz roja y roja lejana) y la dosis de luz aplicada. La radiación UV-B produce un aumento en los niveles de mensajero, proteína y actividad. El efecto de la radiación UV-B en el nivel de la EM-NADP de plantas C_4 como el maíz podría ser importante. De estos estudios se puede sugerir que elevados niveles de EM-NADP podrían proveer a las plantas de una mayor cantidad de poder reductor (NADPH) requerido en procesos de reparación celular; y además aumentar el contenido de piruvato para la respiración mitocondrial y como sustrato metabólico para la síntesis de lípidos necesarios en la reparación de la membranas. La relativa baja intensidad de luz UV-B presente en la luz solar podría proveer una señal importante que facilitaría la reparación causada por daño por UV-B a través de un aumento en diferentes enzimas, incluyendo a la enzima málica. El 20-30% de aumento de la actividad enzimática en tejidos fotosintéticos indica un rol potencial de la radiación UV-B como regulador positivo de enzimas importantes de la fotosíntesis C_4. El aumento en la actividad de la EM-NADP en respuesta a la luz UV-B sugiere que la asimilación fotosintética del carbono podría aumentar en condiciones de alta iluminación, que naturalmente viene acompañada por mayores niveles de radiación UV-B.

BC

6. ISOFORMAS DE LA ENZIMA MÁLICA DEPENDIENTE DE NADP EN *Flaveria*

6.1. Introducción

El género *Flaveria* contiene especies C_3 y C_4, y un número de especies con metabolismo intermedio (que abarcan especies C_3-C_4, con metabolismo intermedio similar a C_3 y con metabolismo intermedio similar a C_4) con diferentes capacidades para reducir la fotorespiración por los mecanismos descriptos en la introducción de esta tesis (82). Las especies C_4 han sido clasificadas como pertenecientes al subtipo EM-NADP debido a que ésta es la enzima mayoritaria para la decarboxilación de ácidos C_4 (81). Han sido aislados clones de ADNc completos que codifican para la EM-NADP de *F. trinervia* (C_4) (128) y de la especie C_3 *F. pringlei* (110). Ambas secuencias contienen un péptido de tránsito putativo para la localización cloroplástica de las proteínas. Por otra parte, se ha informado el aislamiento de un ADNc parcial para la enzima de *F. linearis*, una especie intermedia C_3-C_4 (162). Lipka y colaboradores (110) concluyeron que el gen que codifica la isoforma de la EM-NADP C_4 desciende de un gen común ancestral ya presente en especies C_3. Más recientemente, Marshall y colaboradores (239)

aislaron 3 clones genómicos de la EM-NADP de la especie C_4 *F. bidentis* y concluyeron, a partir de análisis por Southern blot y comparación de secuencias con ADNc de otras especies, que las especies de *Flaveria* poseerían tres, o posiblemente cuatro genes que codifiquen para la EM-NADP. Estos resultados proponen que la familia de la EM-NADP sería más compleja que lo anteriormente pensado. Dos de los clones genómicos caracterizados codifican dos formas altamente similares de la enzima, una se expresa en tejidos fotosintéticos C_4 (*Me1*), mientras que el otro (*Me2*) se expresaría constitutivamente. Southern blots genómicos con sondas específicas para cada gen mostraron que tanto *Me1* como *Me2* se encuentran en especies de *Flaveria* C_3 y C_4, y se ha sugerido que estos genes provendrían de la duplicación de un gen ancestral (239).

Por lo anteriormente descripto, existiría evidencia de una familia multigénica de la EM-NADP en *Flaveria*; sin embargo, no existen estudios sobre la población de isoformas de la EM-NADP presente en cada especie. En este capítulo, se caracterizaron las isoenzimas presentes en los diferentes tipos fotosintéticos de *Flaveria*, y su localización específica en los distintos tejidos y en las células fotosintéticas. Particularmente, se estudió la población de isoformas de la EM-NADP presentes en *Flaveria floridana*, una especie C_3-C_4, y su localización en los distintos tipos celulares; y se purificó y caracterizó una de estas formas presente en hojas de esta especie.

6.2. Resultados

6.2.1. Isoformas de la EM-NADP en distintas especies de *Flaveria*

6.2.1.1. Actividad de EM-NADP en hojas de distintas especies de *Flaveria*

Se realizaron extractos crudos de hojas de distintas especies de *Flaveria* representantes de los distintos tipos fotosintéticos y se realizaron ensayos de actividad de EM-NADP. Se observó un aumento progresivo en la actividad desde los extractos de plantas C_3 hacia los de C_3-C_4, especies con un metabolismo intermedio con mayor proporción de características C_4 (similar a C_4) y C_4 con valores promedio de 131, 188, 870 y 1224 μmol mg clorofila^{-1} h^{-1}, respectivamente. Sin embargo, se observó un rango variable de actividades entre las especies con metabolismo intermedio, presentando valores similares a los obtenidos utilizando extractos de plantas C_3 hacia valores mayores (desde 85 hasta 359 μmol mg clorofila^{-1} h^{-1}). Entre los intermediarios con menor actividad, *F. sonorensis* no posee un ciclo funcional C_4, y *F. angustifolia* y *F. linearis* poseen muy poca actividad del ciclo C_4. La mayor actividad se observó para *F. ramossisima*, la cual posee un ciclo C_4 limitado y funcional (82, 240, 241). Los resultados mostraron una clara relación entre el nivel de la actividad de EM-NADP y la capacidad para la fotosíntesis C_4 en este género.

6.2.1.2. Separación de la EM-NADP por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa.

Se utilizó una especie representativa de cada tipo fotosintético (C_3 *F. cronquistii*, C_3-C_4 *F. ramossisima*, similar a C_4 *F. brownii*, y C_4 *F. trinervia*) para la separación de las proteínas de hojas por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, y posterior fraccionamiento y ensayo de la actividad de EM-NADP (Figura 32). Luego de la centrifugación, las proteínas con mayores masas moleculares se localizaron a mayores densidades de sacarosa. Aunque la resolución de proteínas con pequeñas diferencias en masa es limitada mediante esta técnica, se evidenció la presencia de múltiples formas de la EM-NADP. En *F. cronquistii* (C_3), se obtuvieron 2 picos con actividad de EM-NADP, siendo predominante la forma de mayor masa molecular (fracción 19 a 19,5% de sacarosa) en comparación con la forma de menor masa molecular (fracción 13 a 16,5% de sacarosa), mientras que en *F. trinervia* se observó una forma mayoritaria de menor masa molecular (fracción 12 a 16,5% de sacarosa) y un pequeño hombro con actividad a mayores densidades. En la especie C_3-C_4 *F. ramossisima*, se separaron 2 formas predominantes (entre 19,5% y 16,5% de sacarosa), mientras que en la especie similar a C_4 *F. brownii* sólo se observó un pico predominante con un máximo de actividad en la fracción 15 (17,5% de sacarosa). Estos resultados sugieren la existencia de isoformas de la EM-NADP con diferentes masas moleculares en las distintas especies de *Flaveria*, y que la abundancia relativa de las isoformas varía entre los distintos tipos fotosintéticos.

Las constantes de Michaelis para NADP y L-malato como sustratos de la enzima fueron determinadas en fracciones del gradiente seleccionadas para las

distintas especies, las cuales son fracciones parcialmente purificadas de cada forma. Las diferencias mayores se observaron en el cálculo de la K_m para NADP. La forma de mayor masa molecular de *F. cronquistii* y *F. ramossisima* tuvieron un valor de K_m para NADP de 150 y 120 μM, respectivamente, mientras que las formas de menor masa molecular dieron un valor de K_m de 11 y 20 μM, respectivamente. La forma de menor masa molecular de *F. trinervia* dio un valor de K_m de 35 μM comparado con un valor de 45 μM para la forma de *F. brownii*. Aunque se requieren análisis detallados de las isoformas purificadas, estos resultados indicarían nuevamente, la existencia de diferentes formas de la EM-NADP en distintas especies de *Flaveria* ya que los picos de las distintas fracciones exhiben distintas afinidades aparentes por los sustratos.

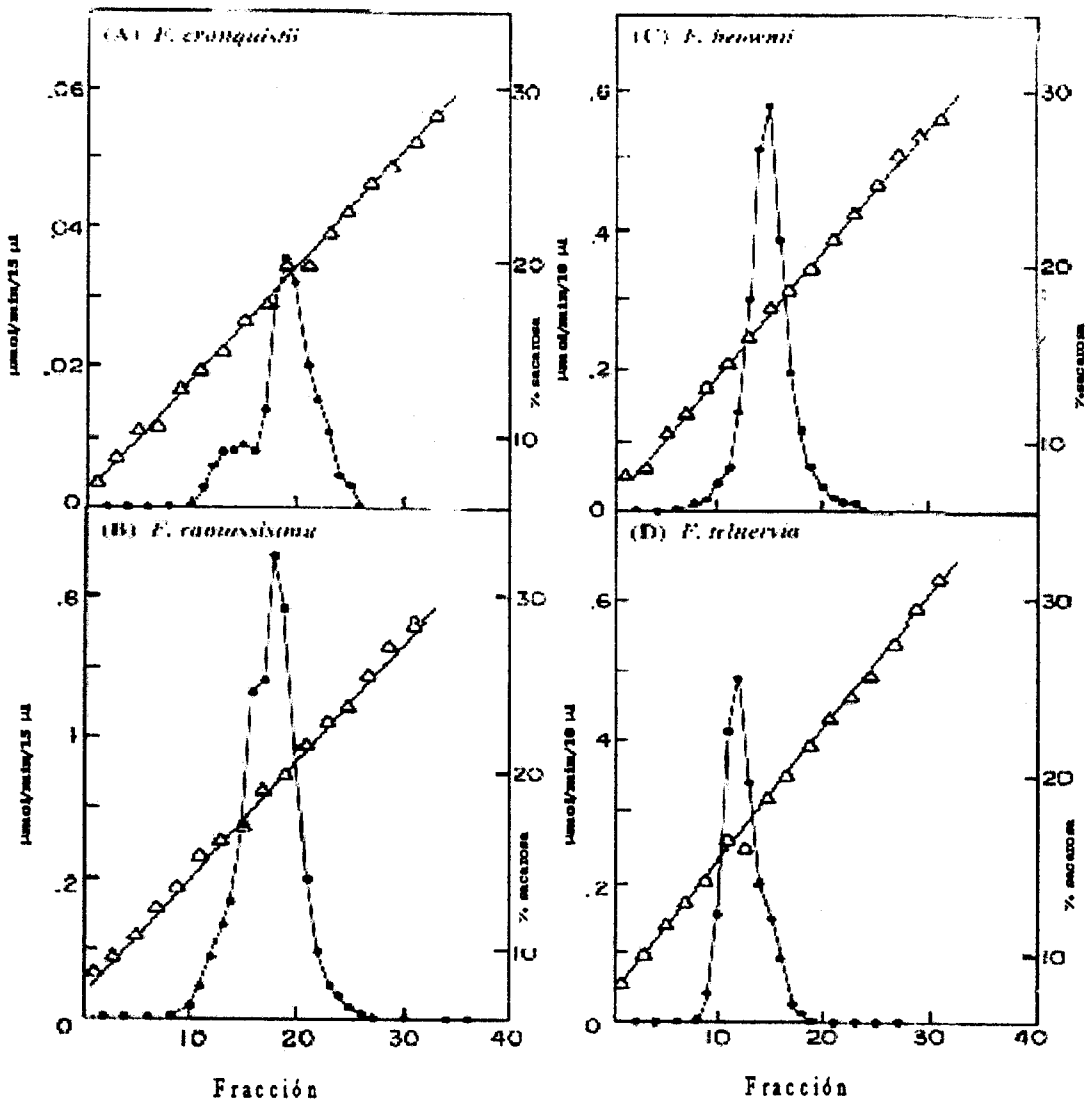


Figura 32. Resolución de las isoformas de la EM-NADP de especies representativas de los diferentes tipos fotosintéticos de *Flaveria* por centrifugación en gradiente de sacarosa: *F. cronquistii* (C_3, panel A), *F. ramossisima* (C_3-C_4, panel B), *F. brownii* (similar a C_4, panel C) y *F. trinervia* (C_4, panel D). La actividad de EM-NADP (•) se muestra en el eje y izquierdo y el porcentaje de sacarosa en el gradiente (Δ) en el eje y derecho.

6.2.1.3. Análisis por Western blot de la EM-NADP en diferentes especies de *Flaveria*

Se extrajeron las proteínas totales a partir de hojas de trece especies diferentes de *Flaveria* siguiendo el protocolo de extracción con fenol en presencia de dos inhibidores de proteasas y un fuerte agente reductor de puentes sulfhidrilos para minimizar la ruptura proteolítica durante la extracción. Estos extractos proteicos fueron separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, transferidos a membranas de nitrocelulosa y revelados utilizando anticuerpos específicos generados contra la EM-NADP de 62 kDa de maíz (98). Este anticuerpo reacciona en forma cruzada con la isoenzima de maíz de 72 kDa presente en hojas verdes y etioladas de maíz, raíces de maíz y la enzima de una planta C_3 como el trigo (96, 98).

Los resultados con *Flaveria* (Figura 33) mostraron que los anticuerpos reaccionan con tres formas monoméricas con diferente tamaño de la EM-NADP en las especies estudiadas. En tres especies C_3 se pudo observar una banda principal inmunoreactiva de 72 kDa (Figura 33 calles 12-14). Estas especies poseen una anatomía típica C_3 y se han clasificado como plantas C_3 en base a un número de criterios fisiológicos y bioquímicos relacionados a la fotosíntesis (48, 81, 242). En las especies C_3-C_4 de *Flaveria*, los anticuerpos reaccionaron con una, dos o tres diferentes isoformas monoméricas según la especie en estudio, de masa molecular 62, 64 y 72 kDa (Figura 33 calles 6-11). La isoforma de 72 kDa se encontró presente en todas las especies. En el caso de *F. sonorensis*, la única banda reactiva correspondió a una masa molecular de 72 kDa (Figura 33 calle 6). Esta

QC

planta posee una baja fotorespiración aparente sin realizar fotosíntesis C_4 y la RuBisCO y el ciclo C_3 se consideran funcionales en las células mesofílicas como en plantas C_3, con refijación del CO_2 fotorespirado en las células de la vaina vascular por la RuBisCO (82). Las otras 5 especies C_3-C_4, que exhiben una capacidad variable para la fotosíntesis C_4 (82), mostraron además de la enzima de 72 kDa, una banda reactiva de 62 y/o de 64 kDa. *F. oppositifolia* (Figura 33 calle 7) y *F. floridana* (Figura 33 calle 10) expresaron las tres bandas a casi el mismo nivel. *F. angustifolia* (Figura 33 calle 8) mostró las bandas de 62 y 72 kDa, mientras que en *F. ramossisima* se encontraron las formas de 72 y 64 kDa, con un bajo nivel de la enzima de 62 kDa (Figura 33 calle 9). *F. linearis* (Figura 33 calle 11) mostró las 3 formas, siendo la de 62 kDa la isoenzima predominante.

Las especies con metabolismo similar al C_4 como *F. brownii* (Figura 33 calle 4) y *F. vaginata* (Figura 33 calle 5) expresaron fuertemente las formas de 62 y 64 kDa. Debido a que estas dos formas son muy similares en tamaño, es probable que la mayor actividad haya aparecido en los experimentos de centrifugación en gradiente de sacarosa como un único pico (Figura 32 C) y a una densidad intermedia a aquella de los picos principales de las especies C_3 (Figura 32 A) y C_4 (Figura 32 D). Estas especies similares a C_4 poseen altos niveles de las enzimas C_4 pero no poseen una estricta compartamentalización de la RuBisCO en las células de la vaina vascular en comparación con las especies C_4 (243). En las especies C_4 *F. trinervia* (Figura 33 calle 2) y *F. bidentis* (Figura 33 calle 3), la banda con mayor intensidad correspondió al monómero de 62 kDa. Sin embargo, una banda débil de 72 kDa también se pudo observar, al igual que bajos niveles de la forma de 64 kDa. Este patrón de isoformas de la EM-NADP en las especies de *Flaveria* C_4, con

excepción de la presencia de bajos niveles de la forma de 64 kDa, fue igual al observado en hojas verdes de maíz (Figura 33 calle 1).

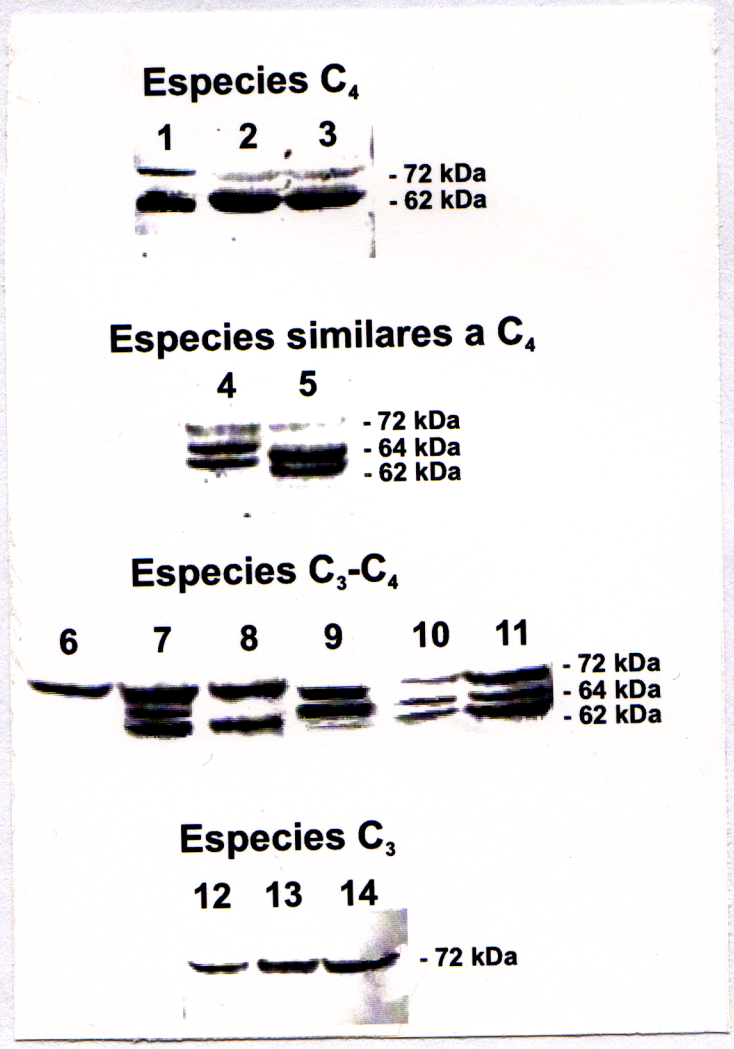


Figura 33. Análisis por Western blot de las proteínas de hojas de distintas especies de *Flaveria*. Las proteínas de las hojas de *Flaveria* (60 µg) y de *Zea mays* (10 µg) fueron separadas y reveladas utilizando anticuerpos contra la enzima de 62 kDa de maíz. Las especies utilizadas fueron: C_4: *Z. mays* (1), *F. trinervia* (2), *F. bidentis* (3); similares a C_4: *F. brownii* (4), *F. vaginata* (5); C_3-C_4: *F. sonorensis* (6), *F. oppositifolia* (7), *F. angustifolia* (8), *F. ramossisima* (9), *F. floridana* (10), *F. linearis* (11); C_3: *F. cronquistii* (12), *F. pringlei* (13), *F. robusta* (14).

Los Western blots de la Figura 33, junto con otras repeticiones, fueron analizados por densitometría y se realizaron comparaciones de las intensidades de cada banda entre los diferentes grupos fotosintéticos (Figura 34). Los resultados mostraron una progresiva disminución en la abundancia de la isoforma de 72 kDa desde las especies C_3 hasta las C_3-C_4, similares a C_4 y C_4 (100, 56, 19 y 16%, respectivamente), mientras que se observó un aumento progresivo de la forma de 62 kDa (8, 39, 47 y 100%, respectivamente). Por otra parte, la forma de 64 kDa fue más abundante en especies C_3-C_4 y similares a C_4 (15, 45, 100 y 15% para los 4 grupos fotosintéticos, respectivamente). No fue posible realizar estimaciones cuantitativas de los valores relativos de las isoformas en una misma especie a partir de estos resultados ya que los anticuerpos utilizados pueden no tener el mismo grado de reactividad cruzada con las diferentes isoenzimas (98). Sin embargo, los resultados mostraron una expresión preferencial de las distintas isoformas de la EM-NADP con los distintos mecanismos fotosintéticos en *Flaveria*.

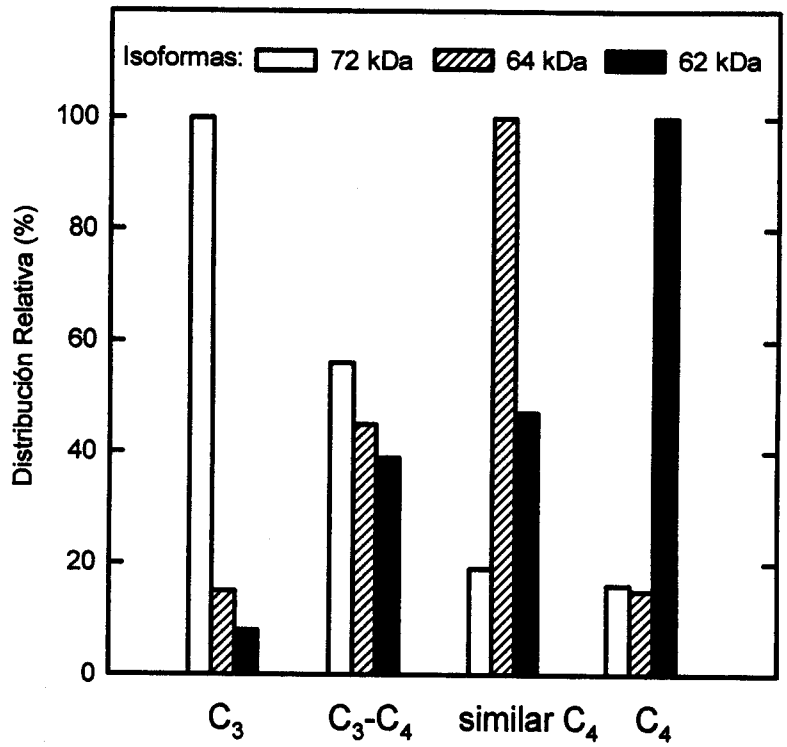


Figura 34. Abundancia relativa de las tres isoformas monoméricas de la EM-NADP en los diferentes tipos fotosintéticos de *Flaveria*. Los Western blots presentados en la Figura 33, junto con otras repeticiones, fueron analizados por densitometría, se determinaron las áreas correspondientes a cada banda y se calculó la abundancia relativa de cada banda en cada tipo fotosintético. Para cada forma, los resultados se presentan como porcentaje del máximo, considerando que el grupo fotosintético con la máxima cantidad de alguna forma posee el 100%.

Posteriormente se realizaron extractos proteicos con diferentes tejidos (hojas, tallos y raíces) de *F. pringlei* (C_3), *F. floridana* (C_3-C_4) y *F. trinervia* (C_4) y se realizaron Western blots revelados con los anticuerpos contra la EM-NADP de 62

kDa de maíz, encontrándose sólo la isoforma de 72 kDa en tallos y raíces en las tres especies (no mostrado). Estos resultados indican la existencia de tres isoenzimas de la EM-NADP en *Flaveria* que se expresan de manera tejido-específica y de forma específica de acuerdo al mecanismo fotosintético empleado.

6.2.1.4. Patrón de isoformas de la EM-NADP por isoelectroenfoque.

Se determinó el patrón de isoformas de la EM-NADP en extractos de hojas de *F. pringlei* (C_3), *F. floridana* (C_3-C_4) y *F. trinervia* (C_4) por isoelectroenfoque nativo revelado para actividad de EM-NADP. Estos resultados mostraron que en *F. floridana* existen tres bandas de reacción con distintos puntos isoeléctricos, por lo que existirían tres isoformas nativas de la EM-NADP en esta especie (Figura 35 calle 2), que podrían corresponder a las tres formas monoméricas observadas por Western blot (Figuras 33 y 34). Para la especie C_4 *F. trinervia*, que posee una forma monomérica predominante de 62 kDa y bajos niveles de los monómeros de 64 y 72 kDa (Figuras 33 y 34), se observó una banda mayoritaria de actividad en los isoelectroenfoques con dos bandas reactivas menores (Figura 35 calle 3). Por otra parte, la especie C_3 *F. pringlei* dio una banda mayoritaria en los isoelectroenfoques que correspondería a la banda menos intensa y más alcalina en los extractos de plantas C_4 y C_3-C_4 (Figura 35 calle 1); que puede deberse a la isoenzima predominante de 72 kDa. Los puntos isoeléctricos de estas formas varían entre 5,3 y 5,8. Estos datos sugieren que las tres formas activas de la EM-NADP con distintos tamaños y puntos isoeléctricos se expresan en las especies de *Flaveria* a diferentes niveles. Además, la comparación de las 3 isoformas en geles de isoelectroenfoque

nativos (Figura 35) con los Western blots (Figura 33) para las tres especies indicarían que la forma con un punto isoeléctrico más alcalino corresponde a la forma de 72 kDa (con expresión constitutiva en todas las especies), la banda más acídica a la isoenzima de 64 kDa (con alta expresión en plantas C_3-C_4) y la banda con punto isoeléctrico intermedio a la isoenzima de 62 kDa (con alta expresión en plantas C_4), aunque no se puede descartar otro tipo de relación entre estas bandas.

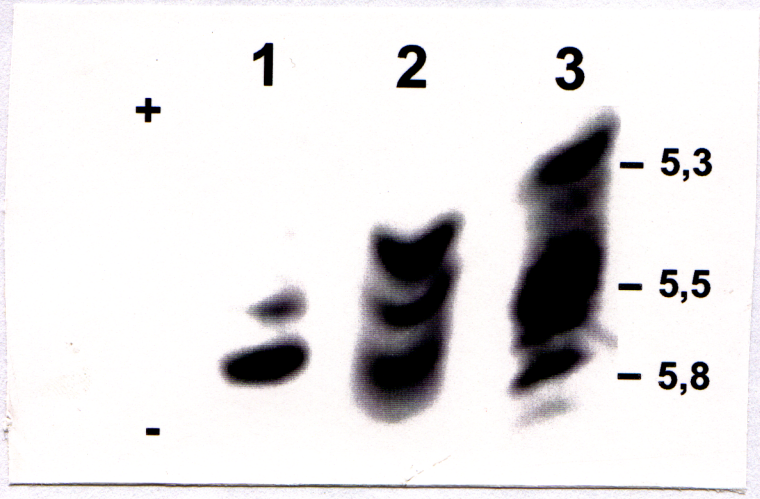


Figura 35. Isoelectroenfoque nativo revelado para actividad de EM-NADP de extractos de hojas de *F. pringlei* (C_3), *F. floridana* (C_3-C_4) y *F. trinervia* (C_4). El gradiente de pH utilizado fue desde 5,0 hasta 7,0. Los puntos isoeléctricos de las bandas reactivas se indican en la figura. Los extractos proteicos sembrados fueron de hojas de *F. pringlei* (1), *F. floridana* (2), y *F. trinervia* (3). Se sembró 1 mUI de actividad de EM-NADP por calle.

6.2.1.5. Estudios de inmunolocalización

Se realizaron los estudios de inmunolocalización mediante técnicas de microscopía óptica (Figura 36) y electrónica (Figura 37) utilizando anticuerpos contra la enzima de 62 kDa de maíz para analizar la distribución de la EM-NADP en distintos tipos celulares de diferentes especies de *Flaveria*. El marcado inespecífico con suero pre-inmune fue muy bajo en todos los casos. En *F. bidentis* (C_4), donde la enzima mayoritaria es la correspondiente al monómero de 62 kDa (Figura 33 calle 3), la inmunolocalización utilizando microscopía óptica mostró una reacción muy intensa en las células de la vaina vascular y poca marca en las células mesofílicas (Figura 36). La microscopía electrónica mostró que las partículas de oro se localizaron principalmente en los cloroplastos de las células de la vaina vascular (Figura 37 paneles 1 y 3). Mientras que los plastidios de las células de la vaina vascular aparecieron marcados fuertemente, los plastidios de las células acompañantes mostraron poca marca (Figura 37 panel 3). En las células mesofílicas de *F. trinervia* se observó escasa marca en los cloroplastos, mientras que no se observó marca en el núcleo y tampoco en el citosol (Figura 37 panel 2).

En *F. robusta* (C_3), donde el monómero de 72 kDa es la principal especie inmunoreactiva (Figura 33 calle 14), la marca más abundante apareció en la cara superior de las células mesofílicas en empalizada (Figura 36). La inmunolocalización de alta resolución por microscopía electrónica mostró que la marca ocurre en los plastidios de las células mesofílicas (Figura 37 panel 4). En el caso de *F. ramossisima* (C_3-C_4), que expresa las formas de 72 y 64 kDa de la EM-NADP, con una banda tenue correspondiente a la enzima de 62 kDa (Figura 33 calle 9), la marca ocurrió tanto en células mesofílicas como en células de las vaina

vascular, con un marcado más intenso en estas últimas (Figura 36). Por otra parte, la marca mayoritaria en células de la vaina vascular (Figura 37 panel 5) y mesofílicas (Figura 37 panel 6) se vio asociada con los plastidios, aunque se observó algo de marca fuera de los cloroplastos. Estos resultados de localización *in situ* (Figura 37), indican que las tres isoformas de la EM-NADP en *Flaveria* estarían localizadas mayoritariamente, sino exclusivamente, en los cloroplastos.

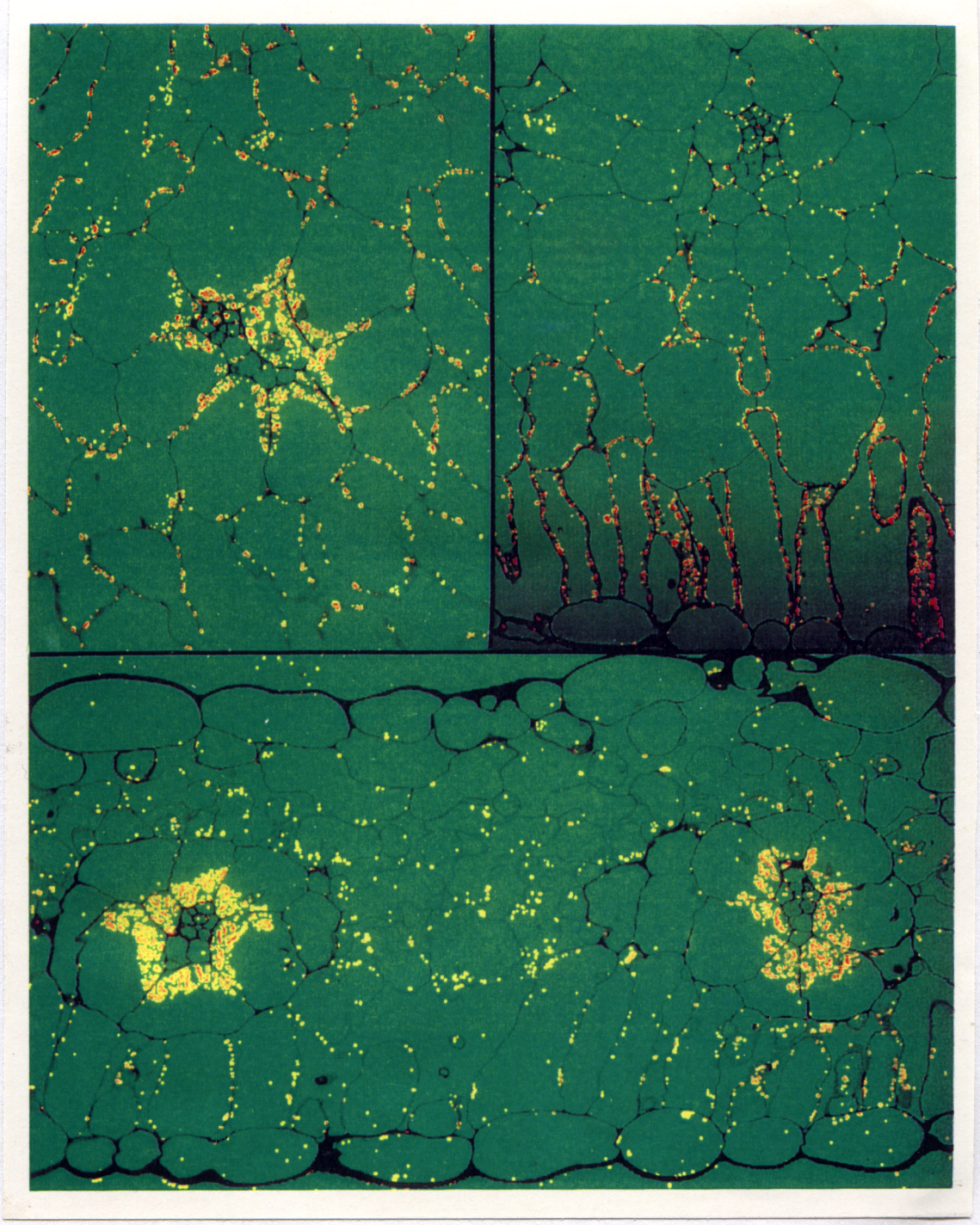


Figura 36. Microscopía óptica de la inmunolocalización *in situ* de la EM-NADP en hojas de *F. bidentis* (C_4, panel superior), *F. robusta* (C_3, panel inferior, izquierda), y *F. ramossisima* (C_3-C_4, panel inferior, derecha).

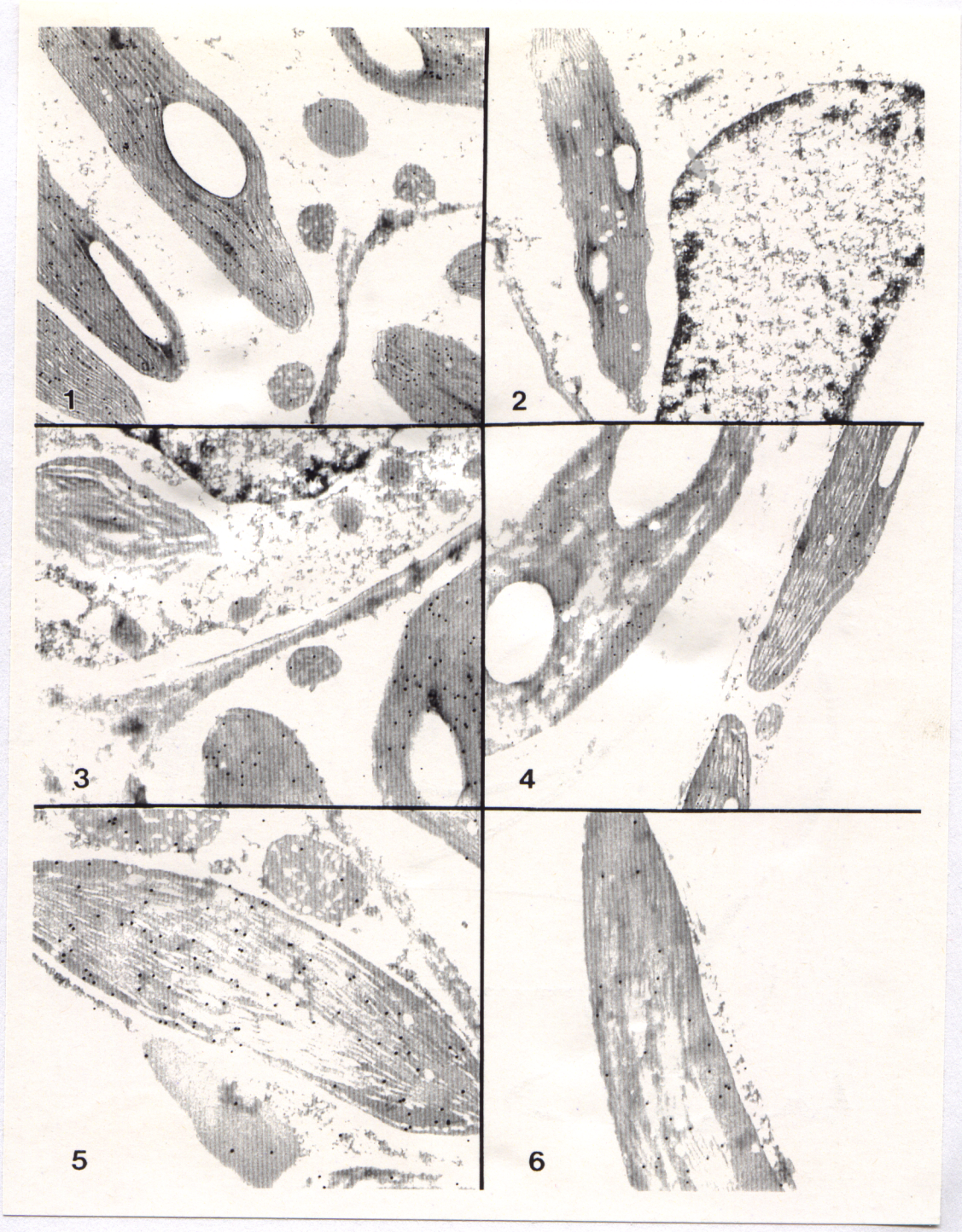


Figura 37. Microscopía electrónica de la inmunolocalización *in situ* de la EM-NADP en hojas de *Flaveria*. Se muestran secciones de *F. bidentis* (C_4, panel 1: células de la vaina vascular; panel 2: células mesofílicas; panel 3: parte de una célula acompañante arriba y una célula de la vaina vascular abajo), *F. robusta* (C_3, panel 4: células mesofílicas), y *F. ramossisima* (C_3-C_4, panel 5: células de la vaina vascular, panel 6: célula mesofílica).

6.2.2. Purificación y caracterización de una EM-NADP de *Flaveria floridana*, una especie con metabolismo intermedio C_3-C_4.

6.2.2.1. Localización de las isoformas de la EM-NADP en protoplastos de células mesofílicas y de la vaina vascular.

Como se observó en la sección anterior, las tres isoformas de la EM-NADP con masas moleculares de 62, 64 y 72 kDa (Figura 33 calle 10) y con puntos isoeléctricos nativos que varían entre 5,3 y 5,8 (Figura 35 calle 2) se expresan en hojas de *Flaveria floridana*, una especie C_3-C_4. En esta sección se estudió la localización de cada una de estas isoenzimas mediante la separación de protoplastos mesofílicos y de la vaina vascular por digestión con enzimas que degradan la pared celular y centrifugación en un gradiente discontinuo de dextrano. De esta forma se obtuvieron 3 fracciones a las que se denominaron PM1 (protoplastos mesofílicos 1), PM2 (protoplastos mesofílicos 2, con características similares a los de la vaina vascular) y PVV (protoplastos de la vaina vascular), los cuales se diferencian claramente por sus densidades. Con estas fracciones se prepararon extractos crudos en presencia de inhibidores de proteasas y se realizaron medidas de actividad enzimática de EM-NADP, y de PEPC y MDH-NADP como controles; y Western blot revelados utilizando anticuerpos contra la isoforma de la EM-NADP de 62 kDa de maíz, y contra la RuBisCO de espinaca como control.

Los resultados obtenidos a partir de las medidas de actividad enzimática de la EM-NADP demuestran que la mayor actividad se obtuvo a partir de los extractos de la fracción PVV (Tabla 13), seguido de los extractos de PM2 y con la menor actividad en PM1. Se observó una diferencia de aproximadamente 2,2 veces en la

actividad medida en protoplastos de la vaina vascular con respecto a los protoplastos mesofílicos 2, y de alrededor de 7,5 veces con respecto a los protoplastos mesofílicos 1. Por otra parte, las actividades de PEPC y MDH-NADP medidas en las mismas fracciones fueron máximas en los protoplastos mesofílicos 1, y mínimas en los protoplastos de las células de la vaina vascular, mostrando una compartamentalización parcial de estas enzimas en los distintos tipos celulares de *F. floridana*, de la misma manera a lo observado para la EM-NADP (Tabla 13).

Tabla 13. Actividad de EM-NADP, PEPC y MDH en las distintas fracciones. Las actividades se expresan en UI mg^{-1}.

Fracción	EM-NADP	PEPC	MDH-NADP
Protoplastos mesofílicos 1 (PM1)	0,094	0,550	0,107
Protoplastos mesofílicos 2 (PM2)	0,325	0,160	0,096
Protoplastos de la vaina vascular (PVV)	0,702	0,052	0,064

Posteriormente, se realizaron experimentos de Western blot con los extractos provenientes de las distintas fracciones que se revelaron utilizando anticuerpos contra la EM-NADP de 62 kDa de maíz y contra la RuBisCO de espinaca. La Figura 38 A muestra los Western blots revelados utilizando los anticuerpos anti-(EM-NADP) de maíz. Los resultados obtenidos demuestran que en las células de la

vaina vascular se expresan las tres isoenzimas, al igual de lo que sucede en las células mesofílicas 2. Por otra parte, en las células mesofílicas 1 sólo se expresa la isoenzima de 72 kDa, que sería responsable de la actividad EM-NADP medida en los ensayos enzimáticos. Como fue descripto anteriormente por Reed y Chollet (244) para el estudio de localización de RuBisCO en algunas especies con metabolismo fotosintético intermedio, no se observó compartamentalización de esta enzima en *F. floridana*, ya que la enzima se expresó de manera similar en los tres tipos celulares (Figura 38 B). Los resultados obtenidos por esta técnica para la localización de la EM-NADP, al igual a lo observado en la sección anterior con *F. ramossisima* (C_3-C_4) (Figuras 36 y 37), demuestran una compartamentalización parcial de la EM-NADP. Esta compartamentalización estaría dada en *F. floridana* por las enzimas de 62 kDa (forma C_4) y de 64 kDa, estando la forma de 72 kDa presente en todos los tipos celulares.

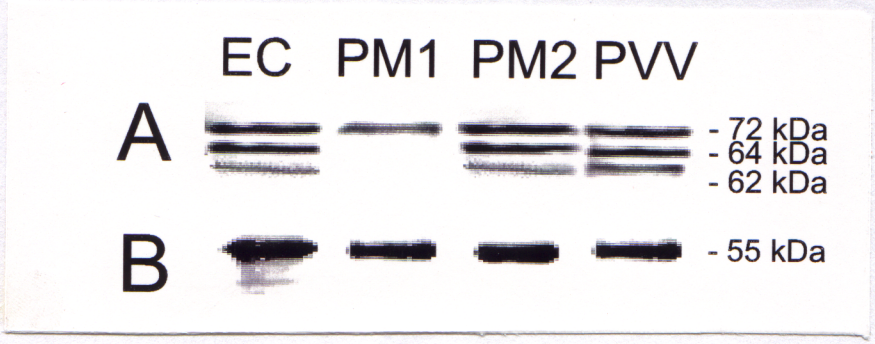


Figura 38. Western blots de las fracciones obtenidas por digestión enzimática de la pared celular de hojas de *F. floridana* revelados con anticuerpos contra la EM-NADP de 62 kDa de maíz (A) (30 μg) y contra la RuBisCO de espinaca (B) (5 μg). EC, extracto crudo total de hojas de *F. floridana*; PM1, protoplastos mesofílicos 1; PM2, protoplastos mesofílicos 2;PVV, protoplastos de la vaina vascular.

BIBLIOTECA HIPOLITO GONZALEZ

6.2.2.2. Purificación de la forma C_4 de la EM-NADP de hojas de *F. floridana*.

Se procedió a la purificación de la forma C_4 de hojas de esta especie C_3-C_4 de acuerdo a la metodología descripta en Materiales y Métodos. Este protocolo incluyó un corte entre 30-70% de saturación con sulfato de amonio, una cromatografía de exclusión molecular en *Sephadex G-50*, una cromatografía de intercambio aniónico en *DEAE-celulosa*, una cromatografía de adsorción en hidroxilapatita y una cromatografía de exclusión molecular en FPLC *Superosa 12 HR 12/30*. La Figura 39 A muestra un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes teñido con azul de Coomassie en donde se muestra la EM-NADP de 62 kDa de *F. floridana* purificada a homogeneidad (calle 2). Se observó que la masa molecular coincide con la de la forma C_4 purificada de maíz (no mostrado). Por otra parte se realizaron experimentos de Western blot (Figura 39 B) que se revelaron utilizando anticuerpos contra la enzima C_4 de maíz en los cuales se sembraron las proteínas de un extracto crudo de hojas de *F. floridana* (calle 2), la EM-NADP purificada de hojas *de F. floridana* (calle 4) y extractos crudos de hojas de maíz (calle 1) y de hojas de trigo (calle 3). Nuevamente se observó que la isoforma purificada es la de menor masa molecular presente en extractos crudos de hojas, y posee la misma masa molecular que la forma C_4 de maíz.

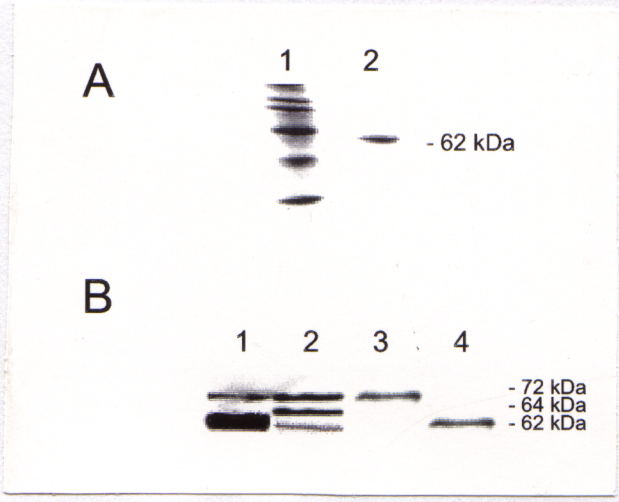


Figura 39. A, Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes revelado con azul de Coomassie con la EM-NADP purificada de hojas de *F. floridana*. 1, marcadores de masa molecular; 2, EM-NADP purificada de hojas de *F. floridana* (5 μg). B, Western blot revelado utilizando anticuerpos contra la EM-NADP de maíz. 1, extracto crudo de hojas de maíz (10 μg); 2, extracto crudo de hojas de *F. floridana* (30 μg); 3, extracto crudo de hojas de trigo (30 μg); 4, EM-NADP purificada de *F. floridana* (2 μg).

Con la isoenzima purificada se hicieron estudios cinéticos para comparar las propiedades de esta enzima con la de las enzimas purificadas de plantas C_4 y las formas constitutivas de mayor masa molecular. Se estudió la dependencia de la actividad enzimática con el pH, ensayada en presencia de 0,4 o 4 mM L-malato, 0,5 mM NADP y 10 mM Mg^{2+}. En ambos casos se observó un amplio espectro de pH/actividad con un máximo a un valor de pH igual a 7,5 (no mostrado). Este resultado no coincide con resultados obtenidos con la enzima de plantas C_4, donde el valor de pH óptimo se aproxima a 8,0, que sería el pH alcanzado en el estroma

cloroplástico en condiciones lumínicas, y es similar al obtenido para enzimas de plantas C_3 y CAM (94), como se describió en el capítulo 3 para la enzima de trigo.

Como en el caso de otras EM-NADP (94, 132), la enzima de 62 kDa de esta especie requirió un metal divalente para su actividad. La cinética de saturación para la enzima a diferentes concentraciones de Mg^{2+} y Mn^{2+} a concentraciones saturantes de NADP (0,5 mM) y L-malato (10 mM), pH 7,5; mostraron una respuesta no hiperbólica, pudiéndose calcular dos valores de K_m (Tabla 14) para cada uno de los cationes. Se observó que con Mn^{2+} se obtenían valores de K_m menores. La respuesta bifásica sugiere la existencia de al menos dos sitios diferentes de unión en la enzima, como lo informado anteriormente para la enzima de plantas C_4 (94, 132) y en el capítulo 3 para la enzima de trigo.

Tabla 14. Parámetros cinéticos de la EM-NADP utilizando Mg^{2+} o Mn^{2+} como cofactores. El rango de concentraciones utilizados fueron 4 10^{-3}-10 mM y 10^{-3}-1 mM, respectivamente. Los ensayos cinéticos se realizaron a concentraciones saturantes de NADP (0,5 mM) y L-malato (10 mM), pH 7,5.

Catión	K_m (mM)
Mg^{2+}	$5,0\ 10^{-3}$
	$1,6\ 10^{-1}$
Mn^{2+}	$3,0\ 10^{-5}$
	$6,7\ 10^{-4}$

Las curvas de saturación obtenidas cuando la velocidad de la reacción se estudió como función de la concentración de NADP libre en presencia de L-malato (10 mM) y Mg^{2+} (10 mM), pH 7,5; fueron típicamente hiperbólicas, calculándose un valor bajo de K_m (12 μM) para NADP libre coincidiendo con los resultados obtenidos en la mayoría de los estudios realizados con enzimas de otras fuentes (94). Por otra parte, y cuando la velocidad inicial de reacción se estudió en función de concentraciones libres de L-malato a concentraciones saturantes de NADP (0,5 mM) y Mg^{2+} (10 mM), pH 7,5; se observó una respuesta hiperbólica y se obtuvieron valores de K_m y de $V_{máx}$ iguales a 0,46 mM y 0,15 UI mg^{-1} respectivamente. Por otra parte, no se observó inhibición de la actividad enzimática por L-malato a pH 7.0 (no mostrado), contrariamente a lo que sucede con la EM-NADP de plantas C_4 (94). Tanto los valores obtenidos para las K_m para ambos sustratos como el valor medido de $V_{máx}$ resultaron intermedios entre los obtenidos en el capítulo 3 para la enzima C_3 purificada de trigo y los de la enzima C_4 de maíz (Tabla 3).

6.3. Discusión

6.3.1. Isoformas de la EM-NADP en *Flaveria* e inmunolocalización

6.3.1.1. Especies C_4 y C_3.

Las especies C_3 de *Flaveria* poseen baja actividad de EM-NADP, que es principalmente atribuída a la forma de mayor masa molecular nativa de la enzima observada en gradientes de densidad con sacarosa, con un pico menor de actividad para la forma de menor masa molecular (Figura 32 A). Por otra parte, las especies C_4 de *Flaveria* poseen muy altas actividades de EM-NADP en hojas debido a la

RC

forma mayoritaria, de baja masa molecular nativa de la enzima en gradientes de densidad con sacarosa (Figura 32 C). Esta diferencia entre especies C_3 y C_4 en masa molecular en el género *Flaveria* es análogo a las diferencias interespecies que se han observado anteriormente: la forma nativa de la EM-NADP de trigo, una especie C_3, posee una mayor masa molecular y menor actividad que la forma nativa de hojas verdes de maíz que es utilizada en el proceso de fotosíntesis. La isoforma de mayor masa molecular en las especies de *Flaveria* C_3 tendría, además, una mayor K_m para el NADP que la forma de menor masa molecular de las especies de *Flaveria* C_4. Ésto es consistente con las diferencias en las propiedades cinéticas halladas previamente para las enzimas de plantas C_3 y C_4 (94).

Los Western blots realizados con extractos proteicos de hojas de distintas especies C_3 revelados con anticuerpos contra la enzima de 62 kDa de maíz, muestran que la banda inmunoreactiva mayoritaria es el monómero de 72 kDa (Figura 33). Sólo bajos niveles de las formas de menor masa molecular (62 y 64 kDa) se detectaron por densitometría de los Western blots (Figura 34). Previamente, Cameron y colaboradores (245) no obtuvieron inmunoreactividad de la EM-NADP de extractos de hojas de la especie C_3 *F. pringlei* en Western blots utilizando anticuerpos contra la enzima de maíz, hecho que podría explicarse a diferencias en los epitopes que podrían reconocer los anticuerpos contra la enzima de maíz de 62 kDa producidos por este grupo (96).

Por otra parte, los Western blots de las especies de *Flaveria* C_4 muestran una banda muy reactiva de 62 kDa, y bandas menores de 64 y 72 kDa (Figuras 33 y 34). Esta forma corresponde en tamaño y abundancia con la especie mayoritaria de la enzima en hojas de maíz y actúa en la fotosíntesis C_4. Esta forma sólo aparece en hojas verdes de plantas C_4, a veces acompañada de la forma de 64 kDa. Dos

formas de la EM-NADP con diferentes masas moleculares fueron previamente observadas en hojas de *F. trinervia* (C_4) en Western blots utilizando anticuerpos contra la enzima de maíz, siendo la forma de menor masa molecular la mayoritaria (246). Los tamaños de las formas monoméricas no fueron determinados en este estudio.

Los estudios de inmunolocalización por microscopía óptica y electrónica de hojas de especies C_4 de *Flaveria* muestran que las marcas inmunoreactivas ocurren principalmente en los cloroplastos de las células de la vaina vascular, con marcas menores en los cloroplastos mesofílicos (Figuras 36 y 37). Estos resultados están de acuerdo con la función de la forma C_4 de la enzima como dadora del CO_2 en los cloroplastos de las células de la vaina vascular en plantas C_4. En estudios con protoplastos mesofílicos y de la vaina vascular aislados de la especie *F. trinervia* (C_4) se encontró alta actividad de EM-NADP en los protoplastos de la vaina vascular (40 veces mayor que en los protoplastos mesofílicos), con una compartamentalización cloroplástica de la enzima (247). Recientemente se demostró que cloroplastos aislados de las células de la vaina vascular de *F. bidentis* poseían alta actividad de EM-NADP (248). En maíz, los cloroplastos de las células de la vaina vascular poseen altos niveles de la isoenzima de 62 kDa, hecho que aporta evidencia directa para su rol en la fotosíntesis C_4, mientras que los cloroplastos mesofílicos poseen sólo la enzima constitutiva de 72 kDa (96). Por lo tanto, y por analogía, la marca hallada en los cloroplastos de las células mesofílicas podría deberse a la forma de 72 kDa.

En las especies C_3 de *Flaveria*, que poseen la isoforma de 72 kDa, la marca ocurre predominantemente en los cloroplastos de las células superiores del mesófilo

en empalizada. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en hojas de trigo, donde la marca se localiza principalmente en los cloroplastos mesofílicos (96).

6.3.1.2. Especies C_3-C_4.

En la especie C_3-C_4 *F. ramossisima* parecen existir al menos dos formas de la EM-NADP a partir de los resultados obtenidos en gradientes de densidad en sacarosa (Figura 32 B). Sin embargo, mediante Western blots realizados con extractos de hojas de diversos intermediarios, se observó que dependiendo de la especie, existen hasta tres formas monoméricas de la enzima de 62, 64 y 72 kDa (Figuras 33 y 34). Por ejemplo, en *F. floridana*, los análisis por Western blot de geles desnaturalizantes mostraron tres isoenzimas, y los isoelectroenfoques en condiciones nativas revelados para actividad de EM-NADP también muestran tres formas de la enzima (Figura 35). Esto indica que en especies con metabolismo intermedio podrían ocurrir al menos 3 formas enzimáticas. Aparentemente, la cantidad relativa de cada forma puede variar entre los intermediarios (Figura 33). En hojas de la especie C_3-C_4 *F. sonorensis*, que no posee un ciclo funcional C_4 (82), la forma de 72 kDa es predominante, similar a lo que sucede en plantas C_3. En otros intermediarios, donde existe evidencia de un grado limitado del funcionamiento de la fotosíntesis C_4, como *F. ramossisima*, *F. linearis* y *F. floridana* (82, 240, 241), formas múltiples de la EM-NADP están presentes en extractos de hojas.

En el estudio de inmunolocalización, la marca mayoritaria se encontró en los cloroplastos de la vaina vascular mientras que una marca significativa también se observó en cloroplastos mesofílicos de la especie C_3-C_4 *F. ramossisima*, una especie que posee un ciclo C_4 parcialmente funcional (82). La distribución de las

tres formas identificadas por Western blot entre los dos tipos celulares no se puede conocer con estos resultados.

6.3.1.3. Especies similares a C_4.

En hojas de especies similares a C_4, como *F. brownii*, se vio una banda mayoritaria con actividad EM-NADP en gradientes de densidad con sacarosa (Figura 32 C). Sin embargo, dos bandas predominantes de 62 y 64 kDa fueron observadas por Western blot, estando la forma de 72 kDa presente a muy bajos niveles (Figura 33). Por ello, las especies similares a C_4 poseen una cantidad significativa de la forma de 64 kDa que también ocurre en menor grado en intermediarios (Figura 34), y una forma de 62 kDa que es la mayoritaria en especies C_4.

En conjunto, todos estos resultados demuestran la presencia de tres isoformas de la EM-NADP con diferentes masas moleculares en *Flaveria*, un aumento en la expresión de la forma de 64 kDa desde las especies C_3 hasta las similares a C_4, y un aumento en la expresión de la forma de 62 kDa y una disminución de la expresión de la forma de 72 kDa desde las especies C_3 hasta las C_3-C_4, similar a C_4 y las C_4.

6.3.2. Isoformas y familia génica de la EM-NADP en *Flaveria*.

Marshall y colaboradores (239) mostraron que la especie C_3 *F. pringlei* y la C_4 *F. bidentis* y *F. trinervia* poseen al menos tres o tal vez cuatro genes que codifican para la EM-NADP. Examinando dos de los genes de *F. bidentis* en detalle, *Me1* y *Me2*, concluyeron que estos genes son muy similares en secuencia, ambos están

presentes en especies de *Flaveria* C_3 y C_4, y que ambos codifican para preproteínas con un péptido de tránsito para su localización cloroplástica. Estos investigadores sugieren que estos genes son parálogos y surgieron por duplicación de un gen en una especie ancestral común. Además, a partir de examinar los niveles de ARNm de la expresión de *Me1* y *Me2* se observó que *Me1* codifica a la forma C_4 en hojas (el mensajero se expresa específicamente en hojas y la expresión depende de la luz sólo en plantas C_4) y que *Me2* se expresa en forma constitutiva (no posee expresión órgano-específica y con bajo nivel de expresión). Las regiones 5´ y 3´ flanqueantes del gen *Me1* son importantes para la especificidad en la expresión en células de la vaina vascular y alto nivel de expresión en hojas, respectivamente (249). Por ello, al menos dos formas cloroplásticas de la EM-NADP podrían expresarse en especies de *Flaveria*. Es razonable sugerir a partir de estos resultados que *Me1* codificaría para la forma de 62 kDa que se localiza en los cloroplastos de las células de la vaina vascular en especies C_4 y que *Me2* codificaría para la enzima constitutiva de 72 kDa que se localiza en los plastidios de hojas y en tejidos de tallos y raíces de plantas C_3 y C_4, aunque deberían realizarse otros estudios para confirmarlo. Además, el presente estudio identificó una tercera forma de la EM-NADP en *Flaveria* de 64 kDa que es más abundante en plantas similares a C_4 e intermediarios C_3-C_4 y se expresa en tejidos de hojas verdes pero no en raíces y tallos de las especies investigadas. Por ello, esta forma podría ser el producto de otro gen que se expresaría más activamente durante la transición evolutiva desde la fotosíntesis C_3 hasta la C_4.

La expresión preferencial de la isoforma de 64 kDa de la EM-NADP en especies similares a C_4 e intermediarios C_3-C_4 de *Flaveria*, y la forma de 62 kDa en especies de *Flaveria* C_4 es interesante. Es posible que estas isoformas posean

distintas propiedades cinéticas con respecto a los sustratos o cofactores que puedan reflejar adaptaciones metabólicas a diferencias en la capacidad C_4 en los distintos tipos fotosintéticos. Un examen de las estrategias empleadas por las plantas C_4 para adquirir los distintos componentes de la fotosíntesis C_4 durante la evolución desde la fotosíntesis C_3 muestra que se utilizaron distintos mecanismos (250), que incluyen cambios en la expresión célula específica, duplicación de genes acoplada a la adquisición de promotores fuertes para un alto nivel de expresión y la adquisición de promotores fuertes para una alta expresión de isoformas cloroplásticas específicas en una manera célula específica. En este estudio, podemos claramente demostrar la presencia de tres isoenzimas diferentes en hojas de los distintos tipos fotosintéticos de *Flaveria* (C_3, C_3-C_4, similar a C_4 y C_4), y que se expresan con diferente abundancia (Figuras 33 y 35). Estos resultados sugieren que una expresión diferencial de los genes que codifican para las EM-NADP cloroplásticas de manera tejido y célula específica estaría involucrada en la evolución de la fotosíntesis C_4 en el género *Flaveria*. Los genes que codifican para la proteínas de 62 y 64 kDa deben haber sido alterados para aumentar la expresión durante la evolución de la fotosíntesis C_4, y en el caso de la forma de 62 kDa, también es evidente que estas alteraciones incluyen un elemento para la expresión célula específica en la vaina vascular.

6.3.3. Purificación y caracterización de la EM-NADP en *F. floridana*, una especie intermedia C_3-C_4.

Se observaron tres formas de la EM-NADP en hojas de la especie C_3-C_4 *F. floridana* que se diferencian por masa molecular (62, 64 y 72 kDa) (Figura 33 calle

10) y puntos isoeléctricos nativos que varían entre 5,3 y 5,8 (Figura 35 calle 2). Mediante la técnica de separación de los protoplastos mesofílicos (1 y 2) de los de la vaina vascular y posterior medida de actividad enzimática y Western blot de las fracciones se observó que la EM-NADP se encuentra parcialmente compartamentalizada en los distintos tipos de células fotosintéticas de esta especie, obteniéndose una mayor actividad específica en la fracción correspondiente a los protoplastos de la vaina vascular y una mayor expresión de las formas de 64 y 62 kDa. En los protoplastos mesofílicos 1 se pudo medir actividad de EM-NADP, que correspondería a la actividad de la isoforma constitutiva de 72 kDa ya que es la única forma que se expresa en estas células. Por otra parte, las enzimas MDH-NADP y PEPC también presentan una compartamentalización parcial (mayoritariamente en células mesofílicas). El resultado hallado para la PEPC difiere de los resultados obtenidos para la localización de esta enzima por Reed y Chollet (244). Estos autores no hallaron compartamentalización de esta enzima en algunas especies con metabolismo intermedio mediante inmunolocalización *in situ*, aunque es posible que en especies C_3-C_4 exista una forma mayoritaria en células mesofílicas que no fuera reconocida inmunológicamente por los anticuerpos utilizados por estos investigadores. Por otra parte, la RuBisCO se localizó en todos los tipos celulares, coincidiendo con los resultados de estos autores.

La forma purificada de 62 kDa presenta propiedades cinéticas intermedias entre las enzimas málicas de plantas C_3 y C_4, donde la enzima presenta, respectivamente, funciones heterotróficas y fotosintéticas. En lo referente al estudio del efecto del pH, la enzima exhibe un máximo de actividad a pH 7,5 de manera similar a lo observado con otras enzimas de plantas C_3, CAM y la enzima no fotosintética de plantas C_4; y difiriendo con el comportamiento de la enzima de

plantas C_4 (94), cuyo máximo de actividad se encuentra cercano a 8,0. Este resultado demuestra que la enzima purificada de esta especie con metabolismo intermedio, a pesar de poseer una masa molecular similar a la de la forma C_4 y de expresarse mayoritariamente en células de la vaina vascular, posee características semejantes a las de las enzimas de plantas C_3.

La actividad enzimática depende de la presencia de un catión bivalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}). Como se describió en el capítulo 3, se han observado distintos comportamientos de la enzima frente a los cationes (94). Los estudios de actividad de la EM-NADP de 62 kDa de *F. floridana* en función de la concentración de estos cationes, al igual a los obtenidos para la enzima de trigo y para la enzima C_4 de maíz y caña de azúcar (94, 132), muestran cinéticas de saturación no hiperbólicas y coinciden con aquellos previamente descriptos indicando la existencia de dos sitios de unión diferentes con diferentes afinidades en la EM-NADP de hígado de paloma (189). Mn^{2+} fue el catión que mostró menores valores de K_m, este resultado indica que la enzima posee preferencia por este catión. Sin embargo, el rol fisiológico para Mg^{2+} o Mn^{2+} sigue siendo incierto en ausencia de datos precisos de la concentración relativa de los cationes en la célula.

Las curvas de saturación obtenidas cuando la velocidad de la reacción se estudió como función de la concentración de NADP libre fueron típicamente hiperbólicas, obteniéndose un valor bajo de K_m similar al de diferentes isoenzimas de la EM-NADP de plantas C_3 y C_4.

La enzima purificada de plantas C_4 se caracteriza generalmente por una fuerte disminución de la afinidad por el L-malato al aumentar el pH, y por una aparición de inhibición por malato a bajos valores de pH. Los resultados obtenidos con la isoforma de 62 kDa de *F. floridana* muestran una ausencia de inhibición por

este sustrato en condiciones acídicas, y poco cambio de la K_m para malato con el pH, obteniéndose un comportamiento hiperbólico cuando la velocidad inicial de reacción se estudió en función de concentraciones libres de L-malato a concentraciones saturantes de NADP y Mg^{2+}. Nuevamente, este resultado coincide con lo observado para enzimas de plantas C_3 y de tejidos no fotosintéticos de maíz, y se opone al comportamiento de plantas C_4 indicando que la enzima presenta características intermedias. El valor de K_m para L-malato es mayor para la enzima de *F. floridana* que para la enzima C_4 de maíz, pero menor que para la enzima de trigo. Este resultado también se observa para el valor de $V_{máx}$ obtenido, también intermedio a la de enzimas C_3 y C_4 (Tabla 3). En resumen, la forma purificada representa una forma enzimática no descripta hasta el presente.

De esta manera, la especie *Flaveria floridana* posee una EM-NADP con alta velocidad específica y propiedades cinéticas intermedias entre las enzimas málicas de diversas especies descriptas. Esta enzima presenta compartamentalización celular, localizándose predominantemente en las células de la vaina vascular, lo que indicaría que un ciclo parcial C_4 podría ser responsable de la baja fotorespiración que presenta esta especie.

7. RESUMEN

-Los resultados obtenidos al estudiar el posible rol fisiológico y las propiedades cinéticas y estructurales de la enzima málica dependiente de NADP purificada de trigo sugieren la existencia de una única isoforma de 72 kDa en los tejidos de esta especie C_3. Esta enzima fue purificada a homogeneidad a partir de tallos y raíces de trigo y con ella se realizaron estudios cinéticos. La enzima no presenta histéresis. Los valores obtenidos de pH óptimo coinciden con los anteriormente descriptos para otras enzimas de plantas C_3 y CAM y difieren con el comportamiento de la enzima de plantas C_4. La actividad enzimática fue absolutamente dependiente de la presencia de un catión bivalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}), mostrando cinéticas de saturación no hiperbólicas como sucede con la EM-NADP de plantas C_4. Por otra parte, las curvas de saturación obtenidas en función de la concentración de NADP y L-malato fueron hiperbólicas.

La actividad de EM-NADP fue inducida por tratamiento con celulasa, macerosima y glutatión, y este aumento fue asociado con aumentos de proteína determinado a partir de Western blots. Estos resultados sugieren que la EM-NADP de plantas C_3 podría estar involucrada en la biosíntesis de lignina relacionada con respuestas de defensa de la planta, proveyendo de NADPH a los dos pasos dependientes de NADPH de la biosíntesis de monolignol.

BC

-Las EM-NADP de maíz y de trigo se disocian en un medio acídico y a bajas temperaturas de manera secuencial siguiendo el orden T-D-M. Las entalpías para los equilibrios fueron negativas, pero el proceso total provocó un cambio de energía libre estándar positiva siendo la entropía del sistema un factor importante en ambos equilibrios.

La presencia de Mg^{2+}, NADP y L-malato modifican los equilibrios entre M, D y T dependiendo de la fuente enzimática. El catión indujo la agregación de ambas enzimas hacia la forma tetramérica, mientras que el L-malato no modificó el estado oligomérico de la EM-NADP de ambas fuentes. El NADP no cambió el estado multimérico de la enzima de maíz aunque la enzima de trigo se asoció en presencia de la coenzima. Por último, el glicerol estabilizó la forma tetramérica en ambos sistemas, mientras que un aumento en la fuerza iónica favoreció la disociación de la estructura oligomérica de la EM-NADP.

Estos resultados favorecen la idea que la EM-NADP de maíz y de trigo existiría en varios estados oligoméricos (M, D y T) *in vivo* y que este proceso de asociación-disociación podría estar mediada por la concentración de metabolitos en el medio, condiciones de luz, fuerza iónica y el pH.

-La actividad de la enzima málica dependiente de NADP fue inducida por radiación UV-B, al igual que el contenido proteico y el ARNm a casi el mismo nivel que por altos niveles de luz blanca dependiendo de la intensidad de la luz y la duración del tratamiento. El efecto de la radiación UV-B fue también eficaz cuando se administraron pequeñas dosis de UV-B seguidas por un tratamiento de oscuridad. La luz roja fue efectiva en la inducción de la EM-NADP, de manera similar a la radiación UV-B, administrada tanto en forma continua como por períodos

cortos. Nuestros resultados también muestran que luego de una exposición corta bajo luz roja lejana aplicada inmediatamente después de los pulsos de luz UV-B o roja el efecto inductivo sobre la enzima málica se reduce significativamente, y el efecto de la luz roja lejana se revierte por un pulso final con luz roja o UV-B. De esta manera proponemos que elevados niveles de EM-NADP podrían proveer a las plantas con mayor cantidad de poder reductor para reparar a la célula, y además aumentar el contenido de piruvato y NADPH para la respiración mitocondrial.

-Las especies C_3 de *Flaveria* poseen baja actividad de EM-NADP, que es principalmente atribuída a la forma de mayor masa molecular de la enzima, mientras que las especies C_4 de *Flaveria* poseen muy altas actividades de EM-NADP en hojas atribuíble a la presencia en forma mayoritaria de la isoforma de baja masa molecular. La isoforma de mayor masa molecular en las especies de *Flaveria* C_3 parece poseer una mayor K_m para el NADP que la forma de menor masa molecular de las especies de *Flaveria* C_4.

Los Western blots realizados con extractos proteicos de hojas de distintas especies C_3 muestran que la banda inmunoreactiva mayoritaria es el monómero de 72 kDa y presenta bajos niveles de las formas de menor masa molecular (62 y 64 kDa), mientras que las especies de *Flaveria* C_4 muestran una banda muy reactiva de 62 kDa de la EM-NADP, y bandas menores de 64 y 72 kDa. En las especies C_3-C_4 existen hasta tres formas monoméricas de la enzima de 62, 64 y 72 kDa, y la cantidad relativa de cada forma puede variar entre los intermediarios. En hojas de especies similares a C_4, existen dos bandas predominantes (62 y 64 kDa), estando la forma de 72 kDa presente a muy bajos niveles. En conjunto, todos estos resultados demuestran la presencia de 3 isoformas de la EM-NADP con diferentes

masas moleculares en *Flaveria*, un aumento en la expresión de la forma de 64 kDa desde las especies C_3 hasta las similares a C_4, y un aumento en la expresión de la forma de 62 kDa y una disminución de la expresión de la forma de 72 kDa desde las especies C_3 hasta las C_3-C_4, similar a C_4 y las C_4.

La EM-NADP se localiza principalmente en los cloroplastos, tanto en células mesofílicas de las plantas C_3 y en ambos tipos de células fotosintéticas en las otras especies, siendo mayoritaria la marca en células de la vaina vascular en las especies C_4. En especies intermedias, la marca mayoritaria se encontró en los cloroplastos de la vaina vascular mientras que una marca significativa también se observó en cloroplastos mesofílicos.

-Se observaron tres formas activas de la EM-NADP en hojas de la especie intermediaria C_3-C_4 *F. floridana* que se diferencian por masa molecular y puntos isoeléctricos nativos. La EM-NADP se encuentra parcialmente compartamentalizada en los distintos tipos de células fotosintéticas, obteniéndose una mayor actividad específica y una mayor expresión de las formas de 64 y 62 kDa en la fracción correspondiente a los protoplastos de la vaina vascular.

La forma purificada de 62 kDa presenta propiedades cinéticas intermedias entre las enzimas málicas de plantas C_3 y C_4. La enzima exhibe un máximo de actividad a pH 7,5 de manera similar a lo observado con otras enzimas de plantas C_3 y CAM y difiriendo con el comportamiento de la enzima de plantas C_4. La actividad enzimática depende de la presencia de un catión bivalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}). Las cinéticas de saturación obtenidas para NADP y L-malato fueron hiperbólicas, y no se observó inhibición por L-malato a pH 7,0, difiriendo al comportamiento de plantas C_4 e indicando que la enzima presenta características intermedias. En

resumen, la forma purificada representa una forma enzimática no descripta hasta el presente.

8. REFERENCIAS

1. Andreo, C. S. y Vallejos R. H. (1984) Organismos fotosintéticos. En: Fotosíntesis. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington D. C. Monografía N° 3, serie de Biología, 5-7.

2. Medrano, H., Pol, A. y Delgado, E. (1991) Mejora genética del rendimiento fotosintético: Avances y perspectivas. En: Fijación y Movilización Biológica de nutrientes. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. Vol. 1, Cap. 7, pp 149-168.

3. Buchanan, B. B. (1992) Carbon dioxide assimilation in oxygenic and anoxygenic photosynthesis. Photosynthesis Res. 33, 147-162.

4. Tabita, F. R. (1988) Molecular and cellular regulation of autotrophic carbon dioxide fixation in microorganisms. Microbiol. Rev. 52, 155-198.

5. Buchanan, B. B. y Arnon, D. I. (1990) A reverse KREBS cycle in photosynthesis: Consensus at last. Photosynthesis Res. 24, 47-53.

6. Van Niel, C. B. (1935) Photosynthesis of bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 3, 138-150.

7. Kirk, J. T. O. y Tilney-Bassett, R. A. E. (1978) Chloroplast structure. En: The plastids. Their chemistry, structure, growth and inheritance. Elsevier/North-Holland. Cap. 7, pp 127-135.

8. Cséke, C. y Buchanan, B. B. (1986) Regulation of the formation and utilization of photosynthates in leaves. Biochim. Biophys. Acta 853, 43-63.

9. ap Rees, T. (1984) Sucrose metabolism. En: Storage Carbohydrates in Vascular Plants. D.H. Lewis (ed). Cambridge University Press, Cambridge, pp 53-73.

10. Hawker, J. S. (1985) Sucrose. En: Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants. P.M. Dey y R.A. Dixon (eds). Academic Press, Nueva York, pp 1-51.

11. Hankamer, B. y Barber, J. (1997) Structure and membrane organization of photosystem I in green plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 641-671.

12. Sauer, K. (1975) Primary events and the trapping of energy. En: Bioenergetics of Photosynthesis. Govindjee (ed). Academic Press, Nueva York, pp 116-175.

13. Witt, H. T. (1979) Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods: the central role of the electric field. Biochim. Biophys. Acta 505, 355-427.

14. Hahenel, W. (1984) Photosynthetic electron transport in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 35, 659-693.

15. Mitchell, P. (1974) A chemiosmotic molecular mechanism for proton translocating adenosine triphosphatases. FEBS Lett 43, 189-194.

16.Robinson, S. P. y Walker, D. A. (1981) Photosynthetic carbon reduction cycle. En: The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise. P. K. Stumpf y E. E. Conn (eds). Academic Press, Nueva York. Vol. 8, pp 193-236.

17.Andrews, T. J. y Lorimer, G. H. (1987) Rubisco: Structure, mechanism, and prospects for improvement. En: The Biochemistry of Plants. Hatch, M. D. y Boardman, N. K. (eds). Academis Press, San Diego. Vol. 10, pp 131-218.

18.Akazawa, T. (1979) Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase. En: Encyclopedia of Plant Physiology , New series. Gibbs, M. y Latzko, E. (eds). Springer-Verlag, Berlin. 6, 208-229.

19.Beck, E y Ziegler, P. (1989) Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 40, 95-117.

20.Lunn, J. E. y Hatch, M. D. (1995) Primary partitioning and storage of photosynthate in sucrose and starch in leaves of C_4 plants. Planta 197, 385-391.

21.Heldt, H. W. (1979) Light dependent changes of stromal H^+ and Mg^{2+} concentrations controlling CO_2 fixation. En: Photosynthesis II. Encyclopedia of Plant Physiology, New series. Gibbs, M. y Latzko, E. (eds). Springer-Verlag, Berlin. Vol. 6, pp 202-207.

22.Buchanan, B. B. (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. Annu. Rev. Plant Physiol. 31, 341-374.

23.Scheibe, R. (1991) Redox modulation of chloroplast enzymes. A common principle for individual control. Plant Physiol. 96, 1-3.

24. Portis, Jr. A. R. (1992) Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43, 415-437.

25. Salvucci, M. E. y Ogren, W. L. (1996) Insights from studies of the properties and structure of the enzyme RuBisCo Activase. Photosynth. Res. 47, 1-11.

26. Whitfield, P. R. y Bottomley, W. (1983) Organization and structure of chloroplast genes. Annu. Rev. Plant Physiol. 34, 279-310.

27. Lorimer, G. H. y Andrews, T. J. (1981) The C_2 chemo- and photorespiratory carbon oxidation cycle. En: The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. P.K. Stumpf y E.E. Conn (eds). Academic Press, Nueva York, Vol. 8, pp 329-374.

28. Lorimer, G. (1981) The carboxylation and oxygenation of ribulose 1,5-bisphosphate: the primary events in photosynthesis and photorespiration. Ann. Rev. Plant Physiol. 32, 349-383.

29. Bowes, G., Ogren, W. L. y Hageman, H. (1971). Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 716-722.

30. Husic, D. W., Husic, H. D. y Tolbert, N. E. (1987) The oxidative photosynthetic carbon cycle or C_2 cycle. CRC Crit. Rev. Plant. Sci. 5, 45-100.

31. Tolbert, N. E. (1981) Metabolic Pathways in Peroxisomes and Glyoxisomes. Ann. Rev. Plant Physiol. 50, 133-157.

32. Sharkey, T. D. (1988) Estimating the rate of photorespiration in leaves. Physiol. Plant. 73, 147-152.

33.Keys, A. J. (1986) Rubisco: its role in photorespiration. Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B. 313, 325-336.

34.Ogren, W. L. (1984) Photorespiration: pathways, regulation and modification. Ann. Rev. Plant Physiol. 35, 415-442.

35.Tolbert, N. E. (1997) The C_2 oxidative photosynthetic carbon cycle. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 1-25.

36.Hatch, M. D. (1992) C_4 photosynthesis: an unlikely process full of surprises. Plant Cell Physiol. 33, 333-342.

37.Edwards, G. E. y Huber, S. C. (1981) The C_4 Pathway. En: The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. P.K. Stumpf y E.E. Conn (eds). Academic Press, Nueva York, Vol. 8, pp 137-281.

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

39.Winter, K. (1985) Crassulacean acid metabolism. En: Photosynthetic Mechanisms and the Environment. Topics in Photosynthesis. J. Barber and N.R. Baker (eds). Elsevier, Amsterdam, Vol. 6, pp 329-387.

40.Hatch, M. D. y Osmond, C. B. (1976) Compartmentation and transport in C_4 photosynthesis. Stocking, C. R. y Harber, U. (eds). En: Encyclopedia of Plant Physiology (New Series). Springer-Verlag, New York. Vol. 3, pp144-184.

41.Hatch, M. D. (1987) C_4 Photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. Biochim. Biophys. Acta 895, 81-106.

42.Edwards, G. E. y Walker, D. A. (1983) C_3, C_4: Mechanism and Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis. Oxford: Blackwell Scientific.

43.Kawamitsu, Y., Hakoyama, S., Agata, W. y Takeda, T. (1985) Leaf interveinal distances corresponding to anatomical types in grasses. Plant Cell Physiol. 26, 589-593.

44.Laetsch, W. M. (1974) The C_4 syndrome: A structural analysis. Annu. Rev. Plant Physiol. 25, 27-52.

45.Brown, W. V. (1975) Variations in anatomy, associations and origins of Kranz tissue. Am. J. Bot. 62, 395-402.

46.Kirchanski, S. J. (1975) The ultrastructural development of the dimorphic plastids of *Zea mays* L. Am. J. Bot. 62, 695-705.

47.Evert, R. F., Eschrich, W. y Heyser, W. (1977). Distribution and structure of the plasmodesmata in mesophyll and bundle-sheath cells of Zea mays L. Planta (Berl.) 136, 77- 89.

48.Edwards, G. E. y Ku, M. S. B. (1987) Biochemistry of C_3-C_4 intermediates. En: The Biochemistry of Plants. M. D. Hatch and N. K. Boardman (eds). New York: Academic Press. Vol. 10, pp 275-325.

49.Shomer-Ilan, A., Beer, S. y Waisel, Y. (1975) *Suaeda monoica*, a C_4 plant without typical bundle sheaths. Plant Physiol. 56, 676-679.

50.Ueno, O., Samejima, M., Muto, S. y Miyachi, S. (1988) Photosynthetic characteristics of an amphibious plant, *Eleocharis vivipara*: Expression of C_4 and C_3 modes in contrasting environments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6733-6737.

51.Leegood, R. (1997) The regulation of C_4 photosynthesis. Adv. Bot. Res. 26, 251-316.

52.Hatch, M. D., Agostino, A. y Burnell, J. N. (1988) Photosynthesis in Phosphoenolpyruvate Carboxykinase-Type C_4 plants: Activity and Role of Mitochondria in Bundle Sheath Cells. Arch. Biochem. Biophys. 261, 357-367.

53.Hatch, M. D. (1979) Mechanism of C_4 Photosynthesis in *Chloris gayana*. Pool Sizes and Kinetics of $^{14}CO_2$ Incorporation into 4-carbon and 3-carbon Intermediates. Arch. Biochem. Biophys. 194,117-127.

54.Burnell, J. N. y Hatch, M. D. (1988) Photosynthesis in Phosphoenolpyruvate Carboxykinase-Type C_4 plants: Pathways of C_4 Acid Decarboxylation in Bundle Sheath Cells of *Urochloa panicoides*. Arch. Biochem. Biophys. 260,187-199.

55.Walker, R. P. A. U., Acheson, R. M. A. U., Tecsi, L. I. A. U y Leegood, R. C. (1997) Phosphoenolpyruvate carboxikinase in C_4 plants. Its role and regulation. Aust. J. Plant Physiol. 24, 459-476.

56.Hague, D. R., Uhler, M. y Collins, P. D. (1983) Cloning of cDNA for pyruvate, Pi dikinase from maize leaves. Nucl. Acids Res. 11, 4853-4865.

57.Nelson, T., Harpster, M., Mayfield, S. P. y Taylor, W. C. (1984) Light-regulated gene expression during maize leaf development. J. Cell Biol. 98, 558-564.

58.Sheen, J. y Bogorad, L. (1987) Differential expression of the C_4 pathway genes in mesophyll and bundle sheath cells of greening maize leaves. J. Biol. Chem. 262, 11726-11730.

59.Langdale, J. A., Rothermel, B. A. y Nelson, T. (1988) Cellular patterns of photosynthetic gene expression in developing maize leaves. Gen. Develop. 2, 106-115.

60.Leegood, R. C. y von Caemmerer, S. (1988) The relationship between contents of photosynthetic intermediates and the rate of photosynthetic carbon assimilation in leaves of *Amaranthus edulis*. Planta 174, 253-262.

61.González, D. H., Iglesias, A. A. y Andreo, C. S. (1984) On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity from maize leaves by L-malate. Effect of pH. J. Plant Physiol. 116, 425-434.

62.Jiao, J. A. y Chollet, R. (1988) Ligth/dark regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by *in vivo* phosphorylation. Arch. Biochem. Biophys. 261, 409-417.

63.Bakrim, N., Prioul, J. L., Deleens, E., Rocher, J. P., Arrió-Dupont, M., Vidal, J., Gadal, P. y Chollet, R. (1993) Regulatory phosphorylation of C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase. Plant Physiol. 101, 891-897.

64.Iglesias, A. A. y Andreo, C. S. (1984) On the molecular mechanism of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activation by thiol compounds. Plant Physiol. 75, 983-987.

65.Jacquot, J. P., Gadal, P., Nishisawa, A. N., Yee, B. C., Crawford, N. A. Y Buchanan, B. B. (1984) Enzyme regulation in C_4 photosynthesis: mechanism of activation of NADP malate dehydrogenase by reduced thioredoxin. Arch. Biochem. Biophys. 228, 170-178.

66.Burnell, J. N. y Hatch, M. D. (1985) Light-dark regulation of leaf pyruvate Pi dikinase. Trends Biochem. Sci. 115, 288-291.

67.Hull, M. R., Long, S. P. y Raines, C. P. (1990) The effects of low temperatures in activities of carbon metabolism enzymes in *Zea mays* L. seedlings. En: Current research in photosynthesis. Kluwer Acad. Publ, Dordrecht. Vol 4, pp 675-678.

68.Nelson, T. y Langdale, J. A. (1989) Patterns of leaf development in C_4 plants. The Plant Cell. 1, 3-13.

69.Mayfield, S. P. y Taylor, W.C. (1984) The appearance of photosynthetic proteins in developing maize leaves. Planta. 161, 481-186.

70.Martineau, B. y Taylor, W. C. (1985) Photosynthetic gene expression and cellular differentiation in developing maize leaves. Plant Physiol. 78, 399-404.

71.Langdale, J. A., Metzler, M. C. y Nelson, T. (1987) The argentia mutation delays normal development in photosynthetic cell-types in *Zea mays*. Dev. Biol. 122, 243-255.

72.Langdale, J. A., Zelitch, I., Miller, E. y Nelson, T. (1988) Cell position and light influence C_4 versus C_3 patterns of photosynthetic gene expression in maize. EMBO J. 7, 3643-3651.

73.Schaffner, A. y Sheen, J. (1991) Maize rbcS promoter activity depends on sequence elements not found in dicot rbcS promoters. Plant Cell 3, 997-1012.

74.Aoyagi, K. y Nakamoto, H. (1985) Pyruvate, Pi dikinase in bundle sheath strands as well as in mesophyll cells in maize leaves. Plant Physiol. 78, 661-664.

75.Nelson, T. y Langdale, J. A. (1992) Developmental Genetics of C_4 Photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43, 25-47.

76.Langdale, J. A. y Nelson, T. (1991) Spatial regulation of photosynthetic development in C_4 plants. Trends in Genet. 7, 191-196.

77. Monson, R. K. y Moore, B. D. (1989) On the significance of C_3-C_4 intermediate photosynthesis. Plant Cell Environ. 12, 689-699.

78. Raghavendra, A. S. (1980) Characteristic of plant species intermediate between C_3 and C_4 pathways of photosynthesis: Their focus of mechanism and evolution of C_4 syndrome. Photosynthetica 14, 271-183.

79. Monson, R. K., Edwards, G. E. y Ku, M. S. B. (1984) C_3-C_4 intermediate photosynthesis in plants. BioSci 34, 563-574.

80. Rawsthorne, S. (1992) C_3-C_4 intermediate photosynthesis: linking physiology to gene expression. Plant J. 2, 267-274.

81. Ku, M. S. B., Monson, R. K., Littlejohn, R. O., Nakamoto, H., Fisher, D. B. y Edwards, G. E. (1983) Photosynthetic characteristics of C_3-C_4 intermediate *Flaveria* species. I. Leaf anatomy, photosynthetic responses to O_2 and CO_2, and activities of key enzymes in the C_3 and C_4 pathways. Plant Physiol. 71, 944-948.

82. Ku, M. S. B., Wu, J., Dai, Z., Scott, R. A., Chu, C. y Edwards, G.E. (1991) Photosynthetic and photorespiratory characteristics of *Flaveria* species. Plant Physiol 96, 518-528.

83. Kluge, M. (1983) The role of PEPC in C_4 photosynthesis and Crassulacean Acid Metabolism. Physiol. Veg. 5, 817-825.

84. Ting, I. P. (1985) Crassulacean Acid Metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 36, 448-453.

85. Iglesias, A. A., González, D. H. y Andreo, C. S. (1987) Crassulacean Acid Metabolism: a pathway for photosynthetic CO_2 fixation in arid habitats. Biochem. Educ. 15, 111-115.

86.Leegood, R. C. y Osmond, C. B. (1992) The flux of metabolites in C_4 and CAM plants. En: Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. D.T. Dennis and D.H. Turpin (eds), Longman Scientific and Technical, Essex, Inglaterra, pp 274-298.

87.Osmond, C. B. y Holtum, J. A. M. (1981) Crassulacean acid metabolism. En: The Biochemistry of Plants. M.D. Hatch, N.K. Boardman (eds), Academic Press, Nueva York. Vol 8, 283-328.

88.Troughton, J. H. (1979) d-^{13}C as an indicator of carboxylation reactions. En: Enc. Plant Physiol. 6, 140-149.

89.Spampinato, C. P. y Andreo, C. S. (1995) Kinetic mechanism of NADP-malic enzyme from maize leaves. Photosynth. Res. 43, 1-9.

90.Schimerlik, M. I. y Cleland, W. W. (1977) Inhibition and alternate-substrate studies on the mechanism of malic enzyme. Biochemistry 16, 565-570.

91.Walker, D. A. (1962) Pyruvate carboxylation and plant metabolism. Biol. Rev. 37, 215-256.

92.Frenkel, R. (1975). Regulation and physiological function of malic enzymes. Curr. Topic Cell Regul. 9, 157-181.

93.Hsu, R. Y. (1982) Pigeon liver malic enzyme. Mol. Cell Biochem 43, 3-26.

94.Edwards, G. E. y Andreo, C. S. (1992) NADP-malic enzyme from plants. Phytochemistry 31, 1845-1857.

95.Kanai, R. y Edwards, G. E. (1973) Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. Plant Physiol. 51, 1133-1137.

96. Maurino, V. G., Drincovich, M. F., Casati, P., Andreo, C. S., Edwards, G. E., Ku, M. S. B., Gupta, S. K. y Franceschi, V. R. (1997) NADP-malic enzyme: immunolocalization in different tissues of the C_4 plant maize and the C_3 plant wheat. J. Exp. Bot. 308, 799-811.

97. Collins, P. D. y Hague, D. R. (1983) Light-stimulated synthesis of NADP-malic enzyme in leaves of maize. J. Biol. Chem. 258, 4012-4018.

98. Maurino, V. G., Drincovich, M. F. y Andreo, C. S. (1996) NADP-malic enzyme isoforms in maize leaves. Biochem. Mol. Biol. Int. 38, 239-250.

99. Schnarrenberger, C., Gross, D., Burkhard C. y Herbert, M. (1980) Cell organelles from Crassulacean Acid Metabolism (CAM) plants II. Compartmentation of enzymes of the Crassulacean Acid Metabolism. Planta 147, 477-484.

100. Winter, K., Foster, J. G., Edwards, G. E. y Holtum, J. A. (1982) Intracellular localization of enzymes of carbon metabolism in Mesembryanthemum crystallinum exhibiting C_3 photosynthetic characteristics or performing Crassulacean Acid Metabolism. Plant Physiol. 69, 300-307.

101. Tomaszewska, B. Schramn, R. W. y Cywinska, A. (1982) Kinetic properties of the citoplasmic NADP-malic enzyme from *Lupinus luteus L.* leaves. Preliminary observations. Acta Physiol. Plant. 4, 59-72.

102. Tomaszewska, B. Schramn, R. W., Kokot, A. y Mazurowa H. (1983) Isolation and characterization of NADP-malic enzyme from *Lupinus luteus* leaves. Physiol. Plant. 59, 641-646.

103. Walter, M. H., Grima-Pettenatti, J, y Feuillet, C. (1994) Characterization of a bean (*Phaseolus vulgaris* L.) malic-enzyme gene. Eur. J. Biochem. 224, 999-1009.

104.van Doorsselaere, J., Villarroel, R., van Montagu, M. e Inzé D. (1991) Nucleotide sequence of a cDNA encoding malic enzyme from poplar. Plant Physiol. 96, 1385-1386.

105. Goodenough, P. W, Prosser, I. M. y Young, K. (1985) NADP linked malic enzyme and malate metabolism in aging tomato fruit. Phytochemistry 24, 1157-1162.

106. Franke, K. E. y Adams, D. O. (1992) Inhibition of malic enzyme from grape berries by sulfhydryl reagents and oxalic acid. Am. J. Enol. Vitiv. 43, 153-158.

107. Grover, S. D., Canellas, P. F. y Wedding, R. T. (1981) Purification of NADP malic enzyme from potatoes and investigation of some physiological and kinetics properties. Arch. Biochem. Biophys. 209, 396-407.

108. El-Shora, H. M. y ap Rees, T. (1991) Intracellular location of NADP-linked malic enzyme in C_3 plants. Planta 185, 362-367.

109. Kang, F. y Rawsthorne, S. (1994) Starch and fatty acid synthesis in plastids from developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus L.*) The Plant Journal 6, 795-805.

110. Lipka, B., Steinmüller, K., Rosche, E., Börsch, D. y Westhoff, P. (1994) The C_3 plant *Flaveria pringlei* contains a plastidic NADP-malic enzyme which is orthologous to the C_4 isoform of the plant *F. trinervia*. Plant Mol. Biol. 26, 1775-1783.

111. Smith, R. G., Gauthier, D. A., Dennis, D. T. y Turpin, D. H. (1992) Malate- and pyruvate-dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor endosperm. Plant Physiol. 98, 1233-1238.

112. Walter, M. H., Grima-Pettenati, J., Grand, C., Boudet, A. M. y Lamb, C. J. (1988) Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a molecular marker specific for lignin synthesis: cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5546-5550.

113. Walter, M. H., Grima-Pettenati, J., Grand, C., Boudet, A. M. y Lamb, C. J. (1990) Extensive sequence similarity of the bean CAD4 "cinnamyl-alcohol dehydrogenase" to a maize malic enzyme. Plant Mol. Biol. 15, 525-526.

114. Schaaf, J., Walter, M. H. y Hess, D. (1995) Primary Metabolism in Plant Defense. Regulation of a bean malic enzyme gene promoter in transgenic tobacco by developmental and environmental cues. Plant Physiol. 108, 949-960.

115. Walter, M. H. (1992) Regulation of lignification in defense. En: Plant Gene Research: Genes involved in plant defense. T. Boller y F. Meins (eds) Springer, Vienna. pp 327-352.

116. Schuch, W., Knight, M., Bird, A. y Grima-Pettenati, J. (1990) Modulation of plant gene expression. En: Genetics Engineering in Crop Plants. G. W. Lycett, Grierson, D. (eds) Butterworths, Boston. pp 221-230.

117. Grima-Pettenati, J., Chriqui, D., Sarni-Manchado, P. y Prinsen, E. (1989) Stimulation of lignification in neoformed calli induced by *Agrobacterium rhizogenes* on bean hypocotyls. Plant Sci. 61, 179-188.

QC

118. Martinoia, E. y Rentsch, D. (1994) Malate compartmentation-responses to a complex metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 447-467.

119. Kirkby, E. A. y Knight, A. H. (1977) Influence of the level of nitrate nutrition on ion uptake and assimilation, organic acid accumulation, and cation-anion balance in whole tomato plants. Plant Physiol. 94, 349-353.

120. Tesis de la Doctora Verónica G. Maurino (1997) Isoformas de la enzima málica dependiente de NADP. Regulación de la expresión en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos de plantas C_3 y C_4. Universidad Nacional de Rosario.

121. Davies, D. D. (1986) The fine control of cytosolic pH. Physiol. Plant. 67, 702-706.

122. Saitou, K., Agata, W., Asakura, M. y Kubota, F. (1992) Structural and kinetics properties of NADP-malic enzyme from inducible Crassulacean Acid Metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L.. Plant Cell Physiol. 33, 595-600.

123. Fathi, M. y Schnarrenberger, C. (1990) Purification by immunoabsorption and immunochemical properties of NADP-dependent malic enzymes from leaves of C_3, C_4, and Crassulacean Acid Metabolism plants. Plant Physiol. 92, 710-717.

124. Iglesias, A. A. y Andreo, C. S. (1990) Kinetic and structural properties of NADP-malic enzyme from sugar cane leaves. Plant Physiol. 92, 66-72.

125. Asami, S., Inoue, K., Matsumoto, K., Murachi, A. y Akasawa, T. (1979) NADP-malic enzyme from maize leaf: Purification and properties. Arch. Biochem. Biophys. 194, 503-510.

126. Saitou, K., Agata, W., Masui. Y., Asakura, M. y Kubota, F. (1994) Isoforms of NADP-malic enzyme from *Mesembryanthemum crystallinum* L. that are involved

in C_3 photosynthesis and Crassulacean Acid Metabolism. Plant Cell Physiol. 38,1165-1171.

127. Rothermel, B. A. y Nelson, T. (1989) Primary structure of the maize NADP-dependent malic enzyme. J. Biol. Chem. 264, 19587-19592.

128. Boersh, D. y Westhoff, P. (1990) Primary structure of NADP-dependent malic enzyme in the dicotyledonous C_4 plant *Flaveria trinerva*. FEBS Lett. 273, 111-115.

129. Thorniley, M. S. y Dalziel, K. (1988) NADP-linked malic enzyme. Purification from maize leaves, Mr and subunit composition. Biochem. J. 254, 229-233.

130. Iglesias, A. A. y Andreo, C. S. (1990) NADP-dependent malate dehydrogenase (decarboxylating) from sugar cane leaves. Kinetics properties of different oligomeric structures. Eur. J. Biochem. 192, 729-733.

131. Iglesias, A. A. y Andreo, C. S. (1992) Hysteretic properties of NADP-malic enzyme from sugar cane leaves. Photosynthesis Res. 31, 89-97.

132. Drincovich, M. F., Iglesias, A. A. y Andreo, C. S. (1991) Interaction of divalent metal ions with NADP-malic enzyme from maize leaves. Physiol. Plant. 81, 462-466.

133. Das, S., Sood, D. R., Sawhney, S. K. y Singh, R. (1986). Properties of NADP-malic enzyme from pod walls of chickpea (*Cicer arietinum*). Physiol. Plant. 68, 308-314.

134. Drincovich, M. F., Andreo, C. S. e Iglesias, A. A. (1990) Calcium ion interaction with NADP-malic enzyme from maize leaves. Plant Physiol. Biochem. 28, 43-48.

135. Davies, D. D. y Patil, K. D. (1974) Regulation of malic enzyme of *Solanum tuberosum* by metabolites. Biochem. J. 137, 45-53.

RC

136. Dubery, I. A. y Schabort, J. C. (1981) Purification and characterization of the NADP-linked malate dehydrogenase (decarboxylating) from *Mangifera indica*. Biochim. Biophys. Acta 662, 102-110.

137. Possner, H. R., Ruffner, H. R. y Rast, D. M. (1981) Isolation and Biochemical Characterization of Grape Malic Enzyme. Planta 151, 549-554.

138. Drouet, A. G. y Hartmann, C. J. R. (1977) Activity of pear fruit malic enzyme, its regulation by metabolites. Phytochemistry 16, 505-508.

139. Garnier-Dardart, J. y Queiroz, O. (1974) Malic enzyme in the leaves of *Bryophyllum Daigremontianum*. Phytochemistry 13, 1695-1702.

140. Davies, D. D., Nascimento, K. H. y Patil, K. D. (1974) The distribution and properties of NADP malic enzyme in flowering plants. Phytochemistry 13, 2417-2425.

141. Cannata, J. J. B., Frasch, A. C. C., Cataldi de Flombaum, M. A., Segura, E. L. y Cazzulo, J. J. (1979) Two forms of malic enzyme with different regulatory properties in *Trypanosoma cruzy*. Biochem J. 184, 409-419.

142. Holaday, A. S. y Lowder, G. W. (1989) Effect of pH on the kinetic parameters of NADP-malic enzyme from a C_4 *Flaveria* (Asteraceae) specie. Plant Physiol. 90, 401-405.

143. Bhagwat, A. S. y Sane, P. V. (1977) Studies on enzymes of C_4 pathway: Part IV - Comparative study of inhibitors of malic enzyme isolated from CAM, C_4 & C_3 plants. Indian J Exp Biol. 15, 1013-1015.

144. Pupillo, P. y Bossi, P. (1979) Two forms of NADP-dependent malic enzyme in expanding maize leaves. Planta 144, 283-289.

RC

145. Johnson, H. S. y Hatch, M. D. (1970) Properties and regulation of leaf nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-malate dehydrogenase and malic enzyme in plants with the C_4-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Biochem. J. 119, 273-280.

146. Coombs, J., Baldry, C. W. y Bucke, C. (1973) The C_4 pathway in *Pennisetum purpureum*. II. Malate dehydrogenase and malic enzyme. Planta 110, 109-120.

147. Jawali, N. y Bhagwat, A. S. (1987) Presence of essential histidine residues in NADP-malic enzyme from *Zea mays*. Phytochemistry 26, 1859-1862.

148. Rao, S. R., Kamath, B. G. y Bhagwat, A. S. (1991) Chemical modification of the functional arginine residue(s) of malic enzyme from *Zea mays*. Phytochemistry 30, 431-435.

149. Drincovich M.F. y Andreo C.S. (1991) A study on the inactivation of NADP-malic enzyme from maize leaves with bromopyruvate. Phytochemistry 31, 1883-1888.

150. Drincovich, M. F., Spampinato, C. P. y Andreo, C. S. (1992) Evidence for the existence of two essential and proximal cysteinyl residues in NADP malic enzyme from maize leaves. Plant Physiol. 100, 2035-2040.

151. Drincovich, M. F. y Andreo, C. S. (1995) NADP-malic enzyme from maize leaves : a fluorescence study. Biochem. Mol. Biol. Int. 36, 1287-1297.

152. Drincovich, M. F. y Andreo, C. S. (1994) Redox regulation of maize NADP malic enzyme by thiol-disulfide interchange. Effect of reduced thioredoxin on activity. Biochem. Biophys. Acta 1206, 10-16.

QC

153.Spampinato, C. P., Paneth, P., O´Leary, M. y Andreo, C. S. (1991) Analogues of NADP as inhibitors and coenzymes for NADP-malic enzyme from maize leaves. Photosynth. Res. 28, 69-76.

154.Spampinato, C. P., Colombo, S. L. y Andreo, C. S. (1994) Interaction of analogues of substrate with NADP-malic enzyme from maize leaves. Photosynth. Res. 39, 67-73.

155.Fushimi, T., Umeda, M., Shimazaki, T., Kato, A., Toriyama, K. y Uchimiya, H. (1994) Nucleotide sequence of rice cDNA similar to maize NADP-dependent malic enzyme. Plant Mol. Biol. 24, 965-967.

156.Franke, K. E., Adams, D. O. (1995) Cloning of a Full-Length cDNA for Malic Enzyme (EC 1.1.1.40) from Grape Berries. Plant Physiol. 107, 1009-1010.

157.Cushman, J. C. (1992) Characterization and expression of a NADP-malic enzyme cDNA induced by salt stress from the facultative crassulacean acid metabolism plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. Eur. J. Biochem. 208, 259-266.

158.Keegstra, K., Olson, L. J. y Theg, S. M. (1989) Chloroplastics precursors and their transport across the envelope membrane. Annu. Rev. Plant Physiol. 40, 471-501.

159.von Heijne, G., Steppuhn, J. y Herrmann, R. G. (1989) Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. Eur. J. Biochem. 180, 535-545.

160.Wolter, F. P., Fritz, C. C., Willmitzer, L. y Schell, J. (1988) rbcS genes in Solanum tuberosum: Conservation of transit peptide and exon shuffling during evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 846-850.

QC

161. Wierenga, R. K., Terpstra, P. y Hol, W. G. J. (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding BAB-fold in proteins using aminoacid sequence fingerprint. J. Mol. Biol. 187, 101-107.

162. Rajeevan, M. S., Bassett, C. L. y Hughes, D. W. (1991) Isolation and characterization of cDNA clones for NADP-malic enzyme from leaves of Flaveria: transcript abundance distinguishes C_3, C_3-C_4 and C_4 photosynthetic types. Plant Mol. Biol. 17, 371-383.

163. Raghavendra, A. S. , Yin, Z. H. y Heber, D. W. (1993) Light dependent changes in leaves of C_4 plants. Planta 189, 278-287.

164. Yin, Z. H., Heber, D. W. y Raghavendra, A. S. (1993) Light-induced pH changes in leaves of C_4 plants. Planta 189, 267-277.

165. Asami, S., Inoue, K. y Akasawa, T. (1979) NADP-malic enzyme from maize leaves: regulatory properties. Arch. Biochem. Biophys. 196, 581-587.

166. Hatch, M. D. (1978) En: Current Topics In Cellular regulation B.L. Horecker and E.R. Stadtman (eds). Academic Press, Nueva York. Vol. 14, pp 1-27.

167. Podestá, F. E., Iglesias, A. A. y Andreo, C. S. (1990). Oligomeric enzymes in the C_4 pathway of photosynthesis. Photosynth. Res. 26, 161-170.

168. Van Etten, J. L., Freer, S. N. y McCune, M. (1987) Presence of a major (storage?) protein in dormant spores of the fungus *Botryodiplodia theobromae*. J. Bacterol. 138, 650-652.

169. Penefsky, H. S. (1977) Reversible Binding of Pi by Beef Heart Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. J. Biol. Chem. 252, 2891-2899.

RC

170.Iglesias, A. A. y Andreo, C.S. (1989). Purification of NADP-malic enzyme and phosphoenolpyruvate carboxylase from sugar cane leaves. Plant Cell Physiol. 30, 399-406.

171.Scheibe, R., Fickenscher, K. y Ashton, A. R. (1986) Studies on the mechanism of the reductive activation of NADP-malate dehydrogenase by thioredoxin m and low-molecular-weight tiols. Biochem. Biophys. Acta 870, 191-197.

172.Brooks, S. P. J. (1992) A simple computer program with statistical tests for the analysis of enzyme kinetics. Biotechniques 13, 906-911.

173.Sedmak, J. J. y Grossberg, S. E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue g 250. Anal. Biochem. 79, 544-552.

174.Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

175.Kirschenbaum, D. (1977) Molar absortivity and A_{1cm} 1% values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. Anal. Biochem. 81, 220-246.

176.Whatley, F. R. y Arnon, D. I. (1963) Photosynthetic phosphorylation in plants. Methods in Enzymology. 6, 308-313.

177.Plaxton, W. C. (1989) Molecular and immunological characterization of plastid and cytosolic pyruvate kinase isozymes from castor-oil-plant endosperm and leaf. Eur. J. Biochem. 181, 443-451.

178.Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

RC

179. Smith, B. R. (1984) En Methods in Molecular Biology. Proteins. Vol.1, J. M. Walker (ed). Humana Press, Clifton, New Jersey.

180. Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann. New York Acad. Sci. 121, 404-427.

181. Willeford, K. O. y Wedding, R. T. (1987) Evidence for a multiple subunit composition of plant malic enzyme. J. Biol. Chem. 262, 8423-8429.

182. Burnette W. N. (1981) "Western Blotting". Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. Anal. Biochem. 112, 195-203.

183. CaJacob, C. A., Frey, P. A., Hainfeld, J. F., Wall, J. S. and Yang, H. (1985) *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex and component enzymes measured by scanning transmission electron microscopy. Biochemistry 24, 2425-2431.

184. Birnboin, H. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513.

185. Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.

186. Wadsworth, G. J., Redinbaugh, M. G. y Scandalios, J. G. (1988) A procedure for the small scale isolation of plant RNA suitable for RNA blot analysis. Anal. Biochem. 172, 279-283.

187. Moore, B. D., Monson, R. K., Ku, M. S. B. y Edwards, G. E. (1988) Activities of principal photosynthetic and photorespiration enzymes in leaf mesophyll and

BC

bundle sheath protoplasts from the C_3-C_4 intermediate *Flaveria ramosissima*. Plant Cell Physiol. 29, 999-1006.

188. Scagliarini, S., Pupillo, P. y Valenti, V. (1988) Isoforms of NADP-dependent malic enzyme of the greening maize leaf. J. Exp. Bot. 39, 1109-1119.

189. Hsu, R. Y., Mildvan, A. S., Chang, G-G y Fung, C-H (1976). Mechanism of malic enzyme from pigeon liver. Magnetic resonance and kinetic studies of the role of Mn^{2+}. J. Biol. Chem. 251, 6574-6583.

190. Barber, M. S. y Ride, J. P. (1988) A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors for the response. Physiol. Mol. Plant Pathol. 32, 185-197.

191. Alscher, R. G. (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. Physiol. Plant. 77, 457-464.

192. Wingate, V. P. M., Lawton, M. A. y Lamb, C. J. (1988) Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. Plant Physiol. 87, 206-210.

193. Whetten, R. y Sederoff, R. (1995) Lignin biosynthesis. Plant Cell 7, 1001-1013.

194. Pryke, J. A. y ap Rees, T. (1977). The pentose phosphate pathway as a source of NADPH for lignin synthesis. Phytochemistry 16, 557-560.

195. Fabregat, I., Revilla, E. y Machado, A. (1987) The NADPH consumption regulates the NADPH producing pathways (pentose phosphate cycle and malic enzyme) in rat adipocytes. Mol. Cell Biochem. 174, 77-81.

BC

196.Baker, P. J., Thomas, D. H., Barton, C. H., Rice, D. W., Bailey, E. (1987). Cristalization of NADP-malic enzyme from of pigeon liver. J. Mol. Biol. 193, 233-235.

197.Nevaldine, B. H., Bassel, A. R., Hsu, R. Y. (1974). Reversible dissociation of the catalytically active subunits of pigeon liver malic enzyme. Biochem. Bioph. Acta 336, 283-293.

198.Chang, G., Huang, T., Chang, T. (1988) Reversible dissociation of the catalytically active subunits of pigeon liver malic enzyme. Biochem. J. 254, 123-130.

199.Huang, T., Chang, G. (1992). Characterization of the tetramer-dimer-monomer equilibrium of the enzymatically active subunits of pigeon liver malic enzyme. Biochemistry 31, 12658-12664.

200.Iglesias, A. A., Spampinato, C. P. y Andreo, C. S. (1991) NADP-malic enzyme from sugar cane leaves: structural properties studied by thermal inactivation. Arch. Biochem. Biophys. 290, 272-276.

201.Timasheff, S. N. (1992) Solvent effects on protein stability. Curr. Opin. Struc. Biol. 2, 35-39.

202.Aune, K. C. y Timasheff, S. N. (1971) Dimerization of a chymotrypsin.II Ionic strength and temperature dependence. Biochemistry 10, 1617-1622.

203.Grover, S. D. y Wedding, R. T. (1984) Modulation of the activity of NAD malic enzyme from *Solanum tuberosum* by changes in the oligomeric state. Arch. Biochem. Biophys. 234, 418-425.

204. Podestá, F. E. y Andreo, C. S. (1989) Maize leaf P-enolpyruvate carboxylase: oligomeric state and activity in the presence of glycerol. Plant Physiol. 90, 427-433.

205. Wagner, R., Gonzalez, D. H., Podestá, F. E. y Andreo, C. S. (1987) Changes in the quaternary structure of P-enolpyruvate carboxylase induced by ionic strength affect its catalytic activity. Eur. J. Biochem. 164, 661-666.

206. Bjorn, L. O. (1994) Introduction. En Photomorphogenesis in Plants, Segunda edición. Editado por Kendrick, R.E. y Kronenberg, G.H.M. 3-25. Kluwer Academic, Boston.

207. Smith, H. (1994) Sensing the light environment: the functions of the phytochrome pathway. En Photomorphogenesis in Plants, Segunda edición. Editado por Kendrick, R.E. y Kronenberg, G.H.M. pp. 377-414. Kluwer Academic, Boston.

208. Thompson, W. F. y White, M. J. (1991) Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 423-466.

209.von Arnim, A. y Deng, X. W. (1996) Light control of seedling development. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 215-243.

210. Butler, W. L., Norris, K. H., Siegelman, H. W. y Hendricks, S. B. (1959) Detection assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 45, 1703-1708.

211.Borthwick, H. A., Hendricks, S. B., Parker, M. W., Toole, E. H. y Toole, V. K. (1952) A reversible photoreaction controlling seed germination. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 38, 662-666.

212.Rüdiger, W. (1987) Phytocrome: the chromophore and photoconversion. Photobiochem. Photobiophys. 49 (Suppl.), 217-227.

213.Grossman, A., Bartlett, S. y Chua, N. H. (1980). Energy-dependent uptake of citolasmically-synthesized polypeptides by chloroplasts. Nature 285, 625-628.

214.Furuya, M. (1989) Molecular properties and biogenesis of phytochrome I and II. Adv. Biophys. 25, 133-167.

215.Cashmore, A. R. (1997) The cryptochrome family of photoreceptors. Plant Cell Environ. 20, 764-767.

216.Ahmad, M y Cashmore, A. R. (1993) HY 4 gene of A. thaliana encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. Nature 366, 162-166.

217.Lin, C., Ahmad, M., Chan, J. y Cashmore, A. R. (1996) CRY2: A second member of the Arabidopsis cryptochrome gene family. Plant Physiol. 110, 1047.

218.Sancar, A. (1994) Structure and function of DNA photolyase. Biochemistry 33, 2-9.

219.Terzaghi, W. B. y Cashmore, A. R. (1995) Light-regulated transcription. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46, 445-474.

220.Fiscus, E. L. y Booker, F. L. (1995) Is increased UV-B a threat to crop photosynthesis and productivity? Photosynthesis Res. 43, 81-92.

BC

221. Jordan, B. R., He, J., Chow, W. S. y Anderson, J. M. (1992) Changes in mRNA levels and polypeptide subunits of Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in response to supplementary ultraviolet-B radiation. Plant Cell Environ. 15, 91-98.

222. Strid, A., Chow, W. S. y Anderson, J. M. (1994) UV-B damage and protection at the molecular level in plants. Photosynthesis Res. 39, 475-489.

223. Conconi, A., Smerdon, M. J., Howe, G. A. y Ryan, C. A. (1996) The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. Nature 383, 826-829.

224. Cen, Y. y Bornman, J. F. (1990) The response of bean plants to UV-B radiation under different irradiances of background visible light. J. Exp. Bot. 41, 1489-1495.

225. Caldwell, M. M., Teramura, A. H. y Tevini, M. (1989) The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. Trends in Ecology and Evolution 4, 363-367.

226. Teramura, A. H. y Sullivan, J. H. (1994) Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. Photosynthesis Res. 39, 463-473.

227. Lois, R., Dietrich, A., Hahlbrook, K. y Schultz, W. (1989) A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: Structure, regulation and identification of elicitor and light responsive *cis*-acting elements. EMBO J. 8, 1641-1648.

228. Wellman, E. (1971) Phytochrome mediated flavone glycoside synthesis in cell suspension of *Petroselinum hortense* with ultraviolet light. Planta 101, 283-286.

229. Duell-Ptaff, N. y Wellman, E. (1982) Involvement of phytocrome and a blue light photoreceptor in UV-B induced flavonoid synthesis in parsley (*Petroselinum hortense* Hoffn.) cell suspension cultures. Planta 156, 213-217.

230. Beggs, C. J., Stolzer-Jehle, A. y Wellman, E. (1985) Isoflavonoid formation as an indicator of UV stress in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. Plant Physiol. 79, 630-634.

231. Kubaseck, W. L., Shirley, B. W., McKillop, A., Goodman, H. M., Briggs, W. y Ausubel, F. M. (1992) Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating Arabidopsis seedlings. The Plant Cell 4, 1229-1236.

232. Lercari, B., Sodi, F. y Fastami, C. (1982) Phytocrome-mediated induction of phenylalanine ammonia-lyase in the cotyledons of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants. Planta 156, 546-552.

233. Thomas, B. y Dickinson, H. G. (1979) Evidence of two photoreceptors controlling growth in de-etiolated seedlings. Planta 146, 545-550.

234. Young, J. C., Liscum, E. y Hangarter. R. P. (1992) Spectral dependence of light-inhibited hypocotyl elongation in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis*: Evidence for a UV-A photosensor. Planta 188, 106-114.

235. Mohr, H. (1972) Lectures on Photomorphogenesis. Springer-Verlag, New York.

236. Ohl, S., Hahlbrock, K. y Schäfer, E. (1989) A stable blue-light-derived signal modulates ultraviolet-light-induced activation of the chalcone-synthase gene in cultured parsley cells. Planta 177, 228-236.

237. Drumm, H. y Mohr, H. (1978) The mode of interaction between blue (UV) photoreceptor and phytochrome in anthocyanin formation of the *Sorghum* seedling. Photochem. Photobiol. 33, 391-398.

QC

238. Kunkel, T., Neuhaus, G., Batschauer, A., Chua, N. H. y Schäfer, E. (1996) Functional analysis of yeast derived phytochrome A and B-phycocyanobilin adducts. Plant Journal 10, 625-636.

239. Marshall, J. S., Stubbs, J. D. y Taylor, W. C. (1996) Two genes encode highly similar chloroplastic NADP-malic enzymes in *Flaveria*. Plant Physiol. 111, 1251-1261.

240. Monson, R. K., Moore, B. D., Ku, M. S. B. y Edwards, G.E. (1986) Co-function of C_3 and C_4-photosynthetic pathways in C_3, C_4 and C_3-C_4 *Flaveria* species. Planta 168, 493-502.

241. Moore, B. D., Ku, M. S. B. y Edwards, G.E. (1987) C_4 photosynthesis and light dependent accumulation of inorganic carbon in leaves of C_3-C_4 and C_4 *Flaveria* species. Aust. J. Plant Physiol. 14, 657-668.

242. Powell, A. M. (1978) Systematics of *Flaveria* (Flaveriinae-Asteraceae). Ann. Missouri Bot. Garden 65, 591-636.

243. Moore, B. D., Ku, M. S. B. y Edwards, G. E. (1989) Expression of C_4-like photosynthesis in several species of *Flaveria*. Plant Cell Environ. 12, 541-549.

244. Reed, J. E. y Chollet, R. (1985) Immunofluorescent localization of phophoenolpyruvate carboxylase and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase proteins in leaves of C_3, C_4 and C_3-C_4 intermediate *Flaveria* species. Planta 165, 439-445.

245. Cameron, R. G., Bassett, C. L., Bouton, J. H. y Brown, R. H. (1989) Transfer of C_4 photosynthetic characters through hybridization of *Flaveria* species. Plant Physiol. 90, 1538-1545.

246. Cameron, R. G. y Bassett, C. L. (1988) Inheritance of C_4 enzymes associated with carbon fixation in *Flaveria* species. Plant Physiol. 88, 532-536.

247. Moore, B., Ku, M. S. B. y Edwards, G. E. (1984) Isolation of leaf bundle sheath protoplasts from C_4 dicot species and intracellular location of selected enzymes. Plant Sci. Lett. 35, 127-138.

248. Meister, M., Agostino, A. y Hatch, M. D. (1996) The roles of malate and aspartate in C_4 photosynthetic metabolism of *Flaveria bidentis* (L.). Planta 199, 262-269.

249. Marshall, J. S., Stubbs, J. D., Chitty, J. A., Surin, B. y Taylor, W. C. (1997) Expression of the C_4 *Me1* gene from *Flaveria bidentis* requires an interaction between 5' and 3' sequences. Plant Cell 9, 1515-1525.

250. Ku, M. S. B., Kano-Murakami, Y. y Matsuoka, M. (1996) Evolution and expression of C_4 photosynthesis genes. Plant Physiol. 111, 949-957.