



3 00581
204
Universidad Nacional
Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

Características Cinéticas y Moleculares de la
Enzima Fosfoenolpiruvato Carboxilasa en
Relación con la Regulación de su Actividad
in vivo en Hoja de Maíz

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)
P R E S E N T A E L
Maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica)
ROGELIO RODRIGUEZ SOTRES

Bajo la Asesoría de la Doctora:
ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES

MEXICO, D. F.

1990



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

Antecedentes.....	5.
1. Reacción catalizada por la PEP carboxilasa.....	5.
2. Participación de PEP carboxilasa en la ruta C ₄ ..	7.
3. Regulación de la actividad de las enzimas de la ruta C ₄	12.
3.1 Regulación de la enzima Malato deshidrogenasa (NADP).....	12.
3.2 Regulación de la enzima Piruvato ortofosfato dicinasa.....	15.
3.3 Regulación de la enzima Málica-NADP.....	15.
3.4 Regulación de la PEP carboxilasa.....	17.
4. Características moleculares de PEP carboxilasa..	20.
5. Características cinéticas de PEP carboxilasa....	27.
6. Mecanismo de la reacción catalizada por PEP carboxilasa.....	37.
7. Papel de los cationes divalentes en la reacción catalizada por PEP carboxilasa.....	39.
8. Importancia del presente estudio.....	41.
Experimental.....	44.
Artículo 1. Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase.....	51.
Artículo 2. The pH dependence of the regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by free phosphoenolpyruvate.....	53.
Discusión de resultados.....	54.
Apéndice I. Deducción algébrica de las ecuaciones cinéticas propuestas.....	76.
Apéndice II. Listado del programa para el cálculo de equilibrios químicos en mezclas complejas de metales y ligandos.....	86.
Apéndice III. Listado del programa de regresión no lineal.....	106.
Bibliografía.....	116.

ANTECEDENTES

Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa, E.C. 4.1.1.31) es una enzima ámpliamente distribuida en el reino vegetal a la que se asignan funciones metabólicas muy diversas (15, 16, 23, 50, 64, 66, 69, 105, 110, 115, 127, 129, 150, 160, 173, 178, 189, 200, 203, 219).

En las plantas con metabolismo C_4 y con metabolismo ácido crasuláceo, PEP carboxilasa participa en la asimilación fotosintética del CO_2 atmosférico ya que cataliza la reacción de captura de dióxido de carbono atmosférico (25, 73, 105, 153, 155, 202). Por esta razón, la actividad de esta enzima en hojas de plantas C_4 y CAM ha recibido una considerable atención y se han publicado numerosos estudios tanto de sus características moleculares, cinéticas y de la regulación de su actividad a corto y a largo plazo (14, 15, 17, 38, 53, 63, 67, 100, 101, 105, 120, 150, 153, 155, 186, 202, 206, 207, 218, 225).

Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de trabajos publicados sobre esta enzima, los datos sobre su comportamiento cinético parecen corresponder a una gran variedad de fenómenos no siempre fácilmente compaginables. Esta es la razón que nos movió a realizar el presente trabajo.

1. Reacción catalizada por la PEP carboxilasa.

Esta enzima cataliza una reacción de β -carboxilación sobre fosfoenolpiruvato en presencia de iones de Hg^{2+} ó de Mn^{2+} que es dependiente de bicarbonato (29, 150, 153, 174). Cabe hacer notar que es la única carboxilasa conocida dependiente de HCO_3^- que no requiere biotina como cofactor (150, 174). La reacción catalizada por esta enzima se resume en la Figura 1.

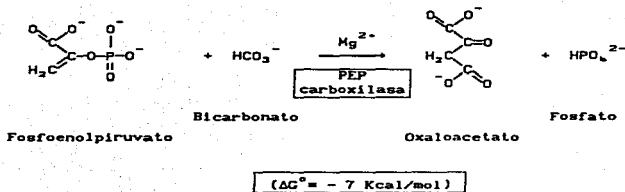


Figura 1. Esquema de la reacción química catalizada por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa). La reacción consiste en la β -carboxilación de la molécula de fosfoenolpiruvato. El bicarbonato es el donador del grupo carboxilo y la reacción se acopla a la hidrólisis del grupo α -fosfato del fosfoenolpiruvato lo que permite que la reacción tenga una energía libre estándar muy negativa.

2. Participación de PEP carboxilasa en la ruta C₄.

Como se ha mencionado anteriormente, PEP carboxilasa cumple un papel muy importante en el metabolismo de asimilación de CO₂ fotosintético en las plantas C₄ y en las plantas CAM. Este apartado se centra en una descripción del metabolismo del grupo particular de plantas C₄ a las cuales pertenece el maíz, ya que la intención de esta introducción es documentar aquellos aspectos que sean pertinentes a la discusión y comprensión de los artículos que se presentan en esta tesis.

En general, las llamadas plantas C₄, se caracterizan por poseer una ruta de fijación de CO₂ que involucra, no solo a más de un compartimento celular, sino además a dos tipos de células diferentes (44, 216). La diferenciación celular asociada a la ruta C₄ se manifiesta desde el punto de vista anatómico en una estructura de la hoja que ha sido denominada como tipo Kranz (Fig 2.). En esta estructura, las células más externas, cuya pared celular es delgada y que son capaces de realizar intercambio de gases con la atmósfera, se denominan células de mesófilo. Los cloroplastos de las células de mesófilo, no contienen las enzimas del ciclo de Calvin y por lo tanto no son capaces de fijar el CO₂ directamente. Las células que se encuentran en la parte central de la hoja, rodeando a los haces vasculares, llamadas células de la vaina vascular, poseen una pared celular muy gruesa y suberificada, por lo que se hallan bastante aisladas del intercambio de gases. Estas células se comunican con las células de mesófilo a través de unos canales que atraviesan la gruesa capa de suberina denominados Plasmodesmos. Los cloroplastos de las células de vaina vascular si contienen todas las enzimas del ciclo de Calvin y son por tanto los que se encargan de la asimilación del CO₂ en triosas fosfato y de la síntesis de almidón. Sin embargo debe recordarse que por ser las células más internas, la cantidad de luz que llega hasta ellas es poca y por esta razón parte del poder reductor requerido por sus cloroplastos para la síntesis de azúcares es importado desde los cloroplastos del mesófilo en forma de compuestos reducidos (44, 73, 109, 154, 216).

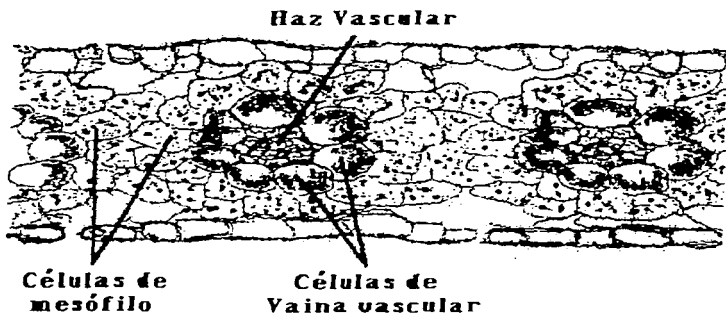


Figura 2. Corte transversal de la hoja de una planta C_4 mostrando la típica anatomía KRAUZ característica de este grupo de plantas superiores (54, 109)

A pesar del mayor costo energético que implica la existencia de rutas metabólicas y compartimentos celulares adicionales, este complejo metabolismo tiene la ventaja de poder aprovechar con mucha mayor eficiencia la luz solar para la fijación de CO₂, ya que manteniendo al ciclo de Calvin aislado del intercambio directo de gases con la atmósfera se previene la fotorrespiración. Debido a sus mayores requerimientos de energía, las plantas C₄ están adaptadas a climas con niveles elevados de irradiación solar (54, 154).

En la figura 3 se muestra un esquema de la ruta C₄ tal y como se ha propuesto que ocurre en las hojas verdes de maíz. Puede notarse que el primer paso de asimilación de CO₂ se encuentra precisamente en la reacción catalizada por la PEP carboxilasa, que se localiza en el citoplasma de las células de mesófilo. El CO₂ asimilado en ácido oxaloacético, compuesto inestable que se descarboxila fácilmente, es introducido por un intercambiador de dicarboxilatos al cloroplasto donde es reducido a malato, con el consecuente consumo de NADPH, por la enzima malato deshidrogenasa dependiente de NADP. El malato sale por medio del intercambiador de dicarboxilatos y difunde libremente hasta las células de vaina vascular, en donde es nuevamente transportado al interior del cloroplasto. Una vez allí, el malato es descarboxilado por la enzima malato deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP (enzima málica-NADP). El CO₂ liberado por esta reacción es recapturado por la ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa (RUBISCO) para alimentar el ciclo de Calvin y de esta manera, el CO₂ originalmente capturado por la PEP carboxilasa es literalmente bombeado al cloroplasto de las células de vaina vascular en donde es definitivamente fijado en compuestos reducidos. El piruvato resultante de la descarboxilación del malato regresa al cloroplasto de mesófilo en un proceso que involucra al menos un transportador activo a nivel de la membrana del cloroplasto de mesófilo. El piruvato recuperado es utilizado para la síntesis de PEP gracias a la reacción catalizada por la enzima piruvato ortofosfato dicinasa con el consumo de dos equivalentes de ATP. El PEP así sintetizado es transportado al exterior del cloroplasto, en un intercambio con fosfatos, para servir de sustrato a la PEP

carboxilasa completando el ciclo de intermediarios de la ruta C₄ (25, 44, 54, 70, 73, 109, 154, 164, 167).

La síntesis de azúcares en estas plantas, involucra varios aspectos interesantes, ya que la complejidad de la organización celular obliga a que la mayor parte de la luz sea convertida a energía química por el aparato fotosintético de los cloroplastos de mesófilo. Por esta razón, parte del ácido 3-fosfoglicérico sintetizado por la RUBISCO en las células de vaina vascular es transportado a mesófilo en donde es reducido por las enzimas del cloroplasto de estas últimas células (61, 161, 162). Este proceso evidentemente está asociado a un sistema de transportadores de mayor complejidad que el de las plantas C₃ que sólo realizan ciclo de Calvin (36, 37, 44, 47, 78, 79, 175), y además, requiere una serie de mecanismos regulatorios adicionales que son necesarios para controlar los flujos metabólicos durante la fotosíntesis (47, 73, 109). A pesar de lo anterior, estas plantas son considerablemente más productivas que las plantas C₃, gracias a que al no fotorrespirar, pueden asimilar con mayor eficiencia el CO₂ atmosférico, siempre que haya suficiente energía luminosa para este proceso (54, 154). Probablemente estas sean las razones por las cuales estas plantas han sido objeto de una considerable atención durante la última década.

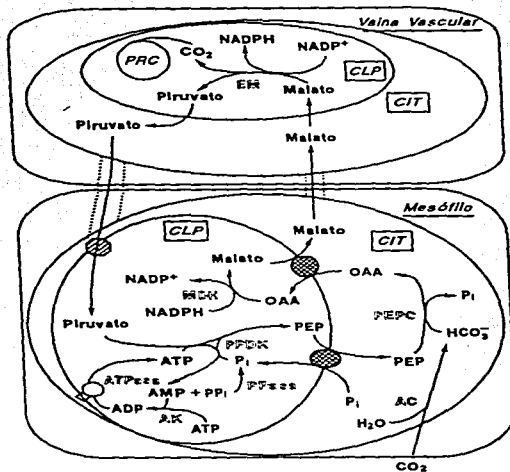


Figura 3. Esquema del metabolismo fotosintético de las plantas C₄ del tipo EM-NADP (enzima málica dependiente de NADP). A este grupo de plantas pertenece el maíz (*Zea mays*). Existen variantes de este metabolismo que difieren en el tipo de ácidos C₄ que sirven para el transporte de CO₂ hacia el interior de las células de vaina vascular y en la enzima descarboxilante; el resto del metabolismo es igual en todas las plantas C₄ (70, 73, 109, 164). Abreviaturas: PCR, ciclo de Calvin; CLP, cloroplasto; CIT, citoplasma; AC, anhidrasa carbónica; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; PPFase, piruvato ortofosfato dicinasa; MDH, malato deshidrogenasa (NADP); EM, enzima málica (NADP); Pi, fosfato inorgánico; PPi, pirofosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; OAA, oxaloacetato; ATP, ADP y AMP, nucleótidos de adenina; NADP⁺ y NADPH, fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida.

3. Regulación de la actividad de las enzimas de la ruta C₄.

De entre los diversos aspectos de la ruta C₄ que aún no han sido totalmente elucidados, uno de los que resultan más interesantes es la regulación de la actividad de sus enzimas durante los ciclos día-noche. Nos centraremos en aquellas enzimas que participan en la ruta C₄, sin abordar aspectos de la regulación del ciclo de Calvin y de la síntesis de azúcares y de almidón. Tampoco abordaremos aspectos de la regulación de la síntesis de novo de estas enzimas, ya que esto no es de interés para nuestro propósito presente, que atiende a los aspectos relacionados con la regulación metabólica de la actividad de PEP carboxilasa.

3.1 Regulación de la enzima malato deshidrogenasa (NADP).

Esta es una enzima del estroma de cloroplasto de las células de mesófilo que *in vivo* durante la noche presenta un estado inactivo, con ciertos grupos sulfhidrilo oxidados, y durante el día un estado activo, con los grupos sulfhidrilo antes mencionados reducidos. (45, 99, 114, 142).

El proceso de oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo permite la regulación por luz de la actividad *in vivo* de un número considerable de enzimas tanto cloroplásticas como citoplásmicas que sufren un cambio estructural reversible, ligado al cambio de sus características cinéticas, cuando ciertos puentes disulfuro específicos de la proteína son reducidos a sulfhidrilo (Fig. 4B, ref. 18). Se han aislado proteínas solubles llamadas tiorredoxinas tanto de especies C₃ (18, 19, 222, 223), como de especies C₄ (18, 19, 99), presentes en cloroplasto y en citoplasma, que contienen grupos sulfhidrilo de potencial redox muy negativo, siendo, por tanto, capaces de reducir *in vitro*, con cierta especificidad, los puentes disulfuro responsables del control de la actividad de varias enzimas que se conoce que están sujetas *in vivo* a este mecanismo regulatorio (18, 19, 45, 113, 149, 222, 223). Las tiorredoxinas pueden a su vez ser reducidas *in vitro* en presencia de luz, por preparaciones crudas de la enzima tiorredoxina-reductasa dependiente de ferredoxina obtenidas de organismos fotosintéticos (18, 223). Se han aislado además

sistemas membranales capaces de reducir *in vitro* en presencia de luz varias de las enzimas reguladas por oxidación-reducción de grupos sulfhidrilo (fig. 4A, ref. 1, 2, 5, 107, 134). Estos sistemas membranales llamados LEM's (Mediadores del efecto de la luz) podrían ser también operantes en la regulación *in vivo* de dichas enzimas, no habiéndose aclarado aún si ambos mecanismos operan *in vivo* simultáneamente ya sea en forma conjunta o independiente (5, 18).

La inactivación de estas enzimas durante la noche se debe a la oxidación de los grupos sulfhidrilo a puentes disulfuro mediada, en apariencia, por oxígeno (142).

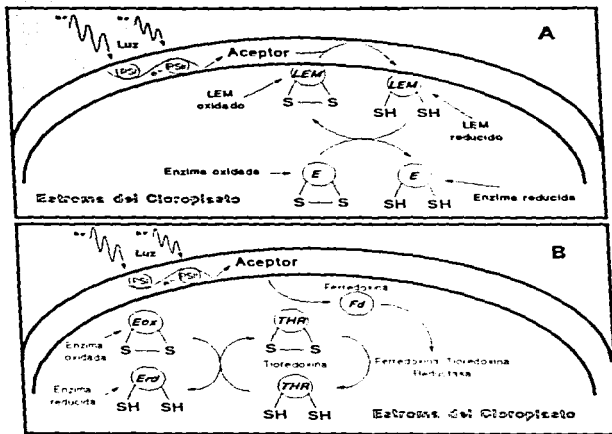


Figura 4. Esquema de los mecanismos propuestos para regulación de la actividad de enzimas que actúan modificando el estado redox de puentes disulfuro específicos de algunas proteínas. A) Sistema membranar de mediadores del efecto de la luz (LEMs) del cloroplasto propuesto por Anderson (1). B) Sistema de Thioredoxinas y Thioredoxina reductasas propuesto por Buchanan (18).

3.2 Regulación de la enzima Piruvato ortofosfato dicinasa.

Esta enzima fotosintética se regula *in vivo* por un mecanismo de fosforilación-desfosforilación. Esta proteína puede encontrarse en una forma fosforilada inactiva presente durante la noche y en una forma no fosforilada activa que está presente durante el día (6, 7, 45). Se ha identificado una proteína cinasa capaz de catalizar la fosforilación de esta enzima (20, 45, 72) que utiliza ADP como sustrato de la fosforilación (6, 7) y requiere bajas concentraciones de ATP como efector alostérico (6, 197). En este sentido esta cinasa es una enzima *sui generis*. La misma cinasa es también capaz de llevar a cabo la desfosforilación de la piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK) fosforilada, siendo esta última actividad dependiente de fosfato inorgánico (6, 7, 45, 143). Al parecer, la reacción de desfosforilación ocurre por la transferencia del grupo fosfato desde una fosfotreonina de la proteína a un fosfato libre para formar pirofosfato (6). Esta reacción de desfosforilación es inhibida por AMP y ADP (143) de donde se deduce que, posiblemente, el factor más significativo para la regulación de esta singular proteína es la carga energética. Esta conclusión se apoya también en la evidencia de que en oscuridad y en anaerobiosis hay una reactivación de la PPDK, que se ha propuesto que se debe a una sensible disminución en los niveles de AMP y ADP por falta de energía en la célula para mantener fosforilados a los nucleósidos de adenina (142).

3.3 Regulación de la enzima Málica-NADP.

Esta es una enzima del estroma de cloroplasto de vaina vascular responsable de la descarboxilación de la mayor parte del malato que proviene del mesófilo, al menos en maíz (70, 73, 152, 154, 165). Si bien esta enzima no ha sido objeto de muchos estudios, hasta la fecha no hay reportes en la literatura que indiquen que la enzima málica de plantas *C₄* sufra cambios en sus propiedades moleculares como consecuencia de los cambios en el estado de iluminación a que se somete la planta. La regulación de su actividad debe más bien realizarse mediante los cambios en la concentración de sustrato, cofactor, pH, y/o efectores que ocurran en el estroma del cloroplasto al pasar de luz a oscuridad o

viceversa.

Se ha demostrado que los cloroplastos aislados de células de vaina vascular de maíz descarboxilan ($4\text{-}^{14}\text{C}$)malato con lentitud, tanto en luz como en oscuridad, pero si se suministra un sustrato exógeno como 3-PGA, la velocidad de consumo de malato se incrementa notablemente en ambas condiciones (177). Este hecho indica que la iluminación no es el factor responsable de la regulación de la actividad de esta enzima en forma directa, sino que esta actividad se coordina con las actividades que consumen NADPH, posiblemente a través de la disponibilidad de la coenzima oxidada (70, 73, 150, 165, 167, 177). Esto no es sorprendente, en virtud de que el cloroplasto de vaina vascular es deficiente en fotosistema II y, por tanto, una parte importante del poder reductor empleado en este organelo durante fotosíntesis proviene de la descarboxilación oxidativa de malato (70, 73, 150, 167).

Por otra parte, dado que el pH afecta notablemente las propiedades cinéticas de esta enzima y teniendo en cuenta los cambios de pH que ocurren en el estroma de cloroplasto (9, 62, 195), se ha propuesto que el pH podría ser uno de los factores importantes en la modulación de la actividad de la enzima en el ciclo día-noche (70, 97, 170). Sin embargo, esta modulación no permitiría que la actividad se redujera a niveles suficientemente bajos durante el período de oscuridad, a menos que la disponibilidad de sustrato y/o cofactores se viesen sensiblemente disminuidas. Esto último es posiblemente lo que ocurre, ya que los niveles de malato total se hallan disminuidos en la hoja durante el período de oscuridad (112, 171), y además, la disponibilidad de Mg^{2+} disminuye durante la noche en el estroma del cloroplasto (9, 62, 165, 195). Ambos factores deben contribuir a mantener la actividad de esta enzima a niveles lo suficientemente bajos evitando que ocurra una descarboxilación apreciable de malato durante la noche.

Además, otros autores han propuesto, que los niveles de fructosa-1,6-bisfosfato, que es un inhibidor alostérico de esta enzima, así como los niveles de succinato que puede ser un activador o un inhibidor de esta enzima, dependiendo de la concentración de sustrato, podrían tener un efecto regulatorio de

su actividad *in vivo* (11, 12, 85, 97). Sin embargo, dado que se ha reportado que las concentraciones de fructosa-1,6-bisfosfato, así como las de otros azúcares fosfato, se incrementan durante los periodos de luz (9, 112, 195), es poco probable que el nivel de estos metabolitos sea un factor regulatorio *in vivo*. En el caso del succinato se desconoce su posible papel *in vivo*, ya que no se sabe si la concentración de este metabolito cambia como resultado de los cambios en el estado de iluminación del cloroplasto.

3.4 Regulación de la PEP carboxilasa.

A pesar de que tanto la enzima que la precede como la enzima que le sigue en la ruta C₄, PPK y MDH-NADP respectivamente, se hallan inactivas durante la noche (45), lo que a primera vista haría innecesaria la regulación por luz de la actividad de PEP carboxilasa, debe recordarse que esta enzima se encuentra localizada en el citoplasma y que el PEP es producido durante la noche vía glucólisis (35, 170) en este compartimento (39, Fig. 5). Por esta razón, la reacción catalizada por PEP carboxilasa debe encontrarse bajo un estricto control día-noche en las células de mesófilo de las plantas C₄, ya que la fijación de CO₂ se halla detenida durante la noche (49, 78, 112, 177, 205). Dado que esta enzima puede constituir hasta el 15% de la proteína total soluble de la hoja en plantas C₄ (74, 77, 204), es de esperarse que si esta actividad no fuese regulada la cantidad de oxaloacetato producido conllevaría, por un lado, a una acumulación de intermediarios del ciclo de Krebs y por otro al consumo de un sustrato rico en energía, lo que no sería de ninguna manera beneficioso para la planta (170).

En un trabajo anterior (171, 172), reportamos que la PEP carboxilasa de hoja de maíz presentaba características cinéticas diferentes en cuanto a su afinidad por PEP (172) y posiblemente por glucosa-6-P y malato (171) cuando se extraía de hojas de plantas mantenidas previamente bajo iluminación con respecto a la enzima extraída de hojas de plantas mantenidas por un periodo corto en obscuridad. Estas diferencias contribuyen a explicar la regulación de la actividad de esta enzima por la luz, al menos en forma parcial, ya que la afinidad por el sustrato PEP (total) es

mayor cuando la enzima se obtiene de plantas iluminadas. Las diferencias en las características cinéticas parecen ser consecuencia de la fosforilación de un residuo de serina de la proteína (146) por una cinasa de proteínas que ha sido identificada en los extractos crudos de la hoja de maíz (95). Se ha identificado también una fosfatasa de proteínas de tipo 2A capaz de desfosforilar a PEP carboxilasa fosforilada y que está presente en los extractos crudos de hoja de maíz (22). Por otra parte, algunos autores han propuesto que cambios en el estado de agregación de la proteína pueden ser la base de un mecanismo regulatorio de esta actividad tanto en plantas C₄ (210, 128), como en plantas CAM (147, 211, 220, 225, 226, 227). En la enzima recién extraída se ha observado un comportamiento histérico (116, 144), mismo que ha sido reproducido en preparaciones con mayor grado de pureza bajo ciertas condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura (91, 92, 103, 104.). El hecho de que la magnitud de la histéresis sea mayor en la enzima cruda extraída de plantas mantenidas en obscuridad que en extractos de plantas iluminadas ha sido interpretado como un apoyo a la participación del equilibrio dímero-tetramero en el mecanismo regulatorio de esta enzima (227).

Si bien los datos anteriores facilitan el proponer un mecanismo regulatorio para PEP carboxilasa, existen varios aspectos por aclarar, ya que no se sabe si las propiedades de la enzima con respecto a la unión de Mg^{2+} y HCO_3^- cambian como resultado de la iluminación y se ignora como varían las concentraciones de PEP, Mg^{2+} , malato (el principal inhibidor) y Glucosa-6-P (propuesto como el activador que funciona *in vivo*) en el microambiente de la enzima. Por otro lado, se desconocen los factores que estimulan o inhiben a la cinasa de proteínas que específicamente fosforila *in vivo* a la PEP carboxilasa.

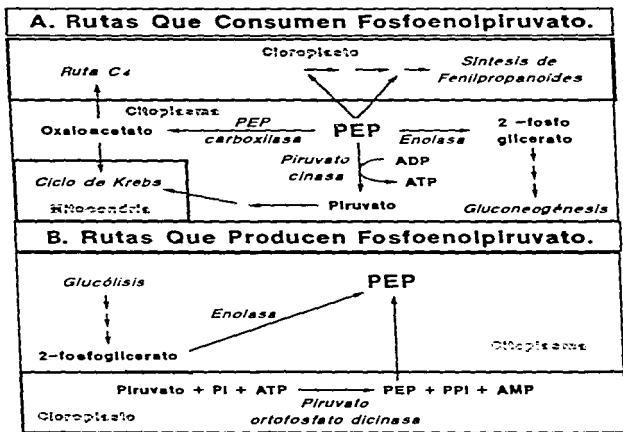


Figura 5. Esquema de las rutas metabólicas que producen (A) y consumen (B) fosfoenolpiruvato (PEP) en las células vegetales. Nótese que la poza de PEP más importante es la del citoplasma. Este esquema se basa en los datos recopilados por Davies (35) y por Dennis y Miernyk (39).

4. Características moleculares de PEP carboxilasa.

PEP carboxilasa ha sido aislada de diversas fuentes y se ha observado en todos los casos una estructura tetramérica formada de cuatro subunidades idénticas con un peso molecular de aproximadamente 400 000 daltons (150, 121, 123, 124, 133, 190, 204). El análisis de aminoácidos revela un contenido de al menos 8 cisteínas por subunidad (124) de las cuales 4 se hallan formando puentes disulfuro en la enzima activa nativa y las restantes 4 se hallan como -SH libres (84, 192, 194). Este análisis ha sido recientemente confirmado a través de la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida de la secuencia de bases del gen de esta enzima clonado a partir del genoma de maíz (88, 230), en el cual encuentran un contenido de 9 cisteínas. Genes clonados a partir de otras fuentes (32-34, 102) revelan mayor contenido de cisteínas (Tablas 1 y 2). La secuencias de las proteínas con actividad de PEP carboxilasa obtenidas hasta la fecha revelan un considerable grado de homología, como se puede notar comparando la posición de los residuos de cisteína en la cadena (Tabla 2). Se ha identificado, además, una región altamente conservada en PEP carboxilasa de varias fuentes (⁶⁰³Phe- His- Gly- Arg- Gly- Gly- Ser- Ile- Gly- Arg- Gly- Gly- Ala- ⁶¹⁸Pro) que, posiblemente, está implicada en la unión del sustrato PEP (4).

Se han identificado varios grupos esenciales para la actividad de la PEP carboxilasa: cisteínas (60, 83, 84, 119, 188, 192, 213), grupos -SH vecinales (83), histidinas (82, 210), argininas (87, 131, 176, 229) y lisinas (3, 159, 208). Sin embargo, los perfiles de Log(Km/Vmax) vs pH reportados hasta la fecha han identificado solamente a un grupo (probablemente histidina) que participa en la unión de Mg²⁺ y PEP, pero no en la catálisis (60, 124, 150, 151) y, excepto Stiborová y Levlová que reportaron la presencia de un grupo con pKa de 7.5 (193), la mayoría de los autores no detectan grupos ionizables que participen en catálisis cuyo pK se encuentre en el rango 6-9.5 (60, 124, 150, 151). Wedding et al. han reportado la presencia de dos grupos con pKa's aproximados de 6 y 8 que participan en la unión del activador glucosa- 6-fosfato (213), un grupo con pKa cercano a 6.5 que participa en la unión del inhibidor malato (214)

y un grupo con pK cercano a 10 que participa en la unión del activador AMP (176). Dado que ni glucosa-6-fosfato, ni AMP ni malato son esenciales para que se lleve a cabo la catálisis, no se puede predecir si el bloqueo de estos últimos grupos puede resultar en una inactivación de la proteína.

Una revisión más extensa de estos datos fue realizada recientemente por Andreo et al. (4). Parte de sus conclusiones acerca de la topología del sitio activo de esta proteína se resumen en la figura 8 de esta tesis (pag 40).

Tabla 1. Análisis de aminoácidos reportado para la enzima PEP carboxilasa de hoja de maíz. Para la enzima de otras fuentes se muestra solamente el contenido de cisteínas.

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

^aProteína purificada de hoja verde de maíz (194).

^bGen de la forma fotosintética de la enzima de maíz (230).

^cGen de la forma fotosintética de la enzima de sorgo (32).

^dGen de la forma fotosintética de la enzima de CAM (34).

^eGen de mantenimiento de la enzima de CAM (33).

Los números entre paréntesis indican la referencia.

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

Posición de los residuos de cisteína en la secuencia			
Maiz ^a	Sorgo Ca ^b	CAM fotosintética ^c	CAM mantenimiento ^d
51	55	10	53
183	173	192	185
	273		
	295	304	297
322	322	331	324
406	407	414	408
411	412	419	413
413	414	421	415
	490		517
	524	548	542
	674	682	676
		898	

Secuencia alrededor de las posiciones 406-419

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

^aGen de la forma fotosintética de la enzima de maíz (88), una de las cisteínas falta en la secuencia reportada. La causa de esta omisión no se menciona en el artículo.

^bGen de la forma fotosintética de la enzima de sorgo (32).

^cGen de la forma fotosintética de la enzima de CAM (34).

^dGen de mantenimiento de la enzima de una CAM (33).

^eGen de la enzima de *Escherichia coli* (88).

^fGen de la enzima de *Anacyctis nidulans* (88).

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

Se ha demostrado que esta enzima puede encontrarse en varios estados de agregación, ya que es capaz de aparecer como monómeros, dímeros o como tetrameros (91, 92, 96, 103, 104, 121, 144, 210, 217). Hasta la fecha, las evidencias experimentales más concluyentes apoyan la hipótesis de que sólo los tetrameros son activos (98), aunque algunos autores suponen que los dímeros presentan actividad basándose en resultados experimentales poco concluyentes (91, 217). La disociación es favorecida por fuerzas iónicas elevadas (121, 158, 185, 209), por pH alcalino (136, 185, 210), bajas temperaturas (104, 185, 210), el inhibidor malato (217) y evitada por la presencia de agentes tales como polietilenglicol, glicerol (121, 158, 185) y por la presencia del sustrato PEP (217).

Una de las dificultades en la purificación de esta enzima ha sido no sólo su inestabilidad frente a pH alcalino o a fuerzas iónicas elevadas, sino también su sensibilidad a proteólisis (22, 128, 147, 185) y en el caso de la forma fosforilada, la sensibilidad a fosfatasas.

Chou y Shi (24) tratando la enzima con tripsina, han demostrado que es posible obtener degradación parcial de la molécula sin pérdida de actividad. La enzima resultante, se caracteriza por una sensibilidad incrementada a glucosa-6-P y una sensibilidad disminuida a malato. Dado que glicina, glicerol y glucosa-6-P protegen a la proteína de la pérdida de actividad frente a tripsina, estos autores han propuesto que los efectores inducen diferentes conformaciones de la molécula.

Varios autores (3, 96, 208), han demostrado mediante experimentos de transferencia de energía entre reactivos fluorescentes unidos a lisinas, propiedades hidrodinámicas y estudios con reactivos entrecruzantes que la molécula forma probablemente un tetraedro en el cual los sitios activos se encuentran cerca de la interfase de la molécula (Fig 6). En este tipo de geometría se crean necesariamente dos tipos de interfaces con geometría propia. La existencia de dímeros estables en el proceso de disociación de la proteína (209, 210) apoya también la idea de que PEP carboxilasa es en realidad un dímero de dímeros, de modo que si los sitios activos se hallan de algún modo

Influenciados por las uniones subunidad-subunidad, tendremos al menos dos tipos de sitios de unión de sustratos con características propias. Con los datos existentes hasta la fecha, no es posible decidir si ambos tipos de sitios son activos o no, sin embargo, Iglesias y Andreo (82) han demostrado que de los cuatro residuos de histidina por tetrámero que se modifican por dietilpircarbonato, sólo dos son esenciales para la actividad. Esta evidencia, si bien insuficiente, podría indicar que sólo dos de los cuatro sitios presentes por tetrámero son activos.

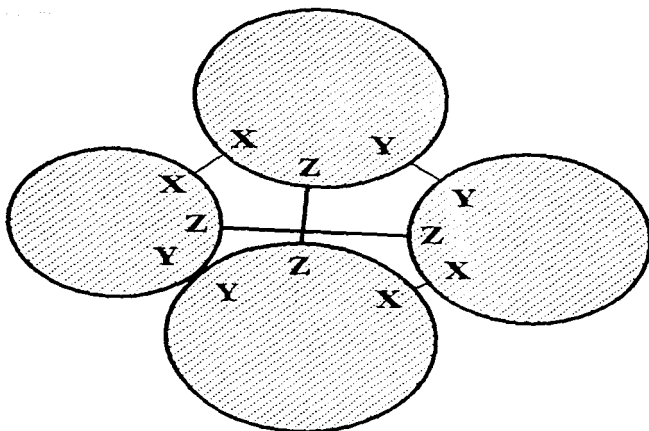


Figura 6. Geometría propuesta para la molécula tetramérica de PEP carboxilasa de acuerdo con los datos reportados hasta la fecha por diversos autores (3, 96, 185, 208, 209, 210). Los distintos tipos de zonas de contacto entre subunidades han sido representados mediante las letras X,Y,Z. los contactos Z-Z han sido representados con líneas más gruesas para hacer notar que si los contactos X-X y Y-Y se rompen se obtienen dos dímeros. Debe notarse que el hecho de que la topología de cada subunidad sea asimétrica restringe notablemente los tipos de contactos entre las subunidades para las configuraciones tetrahédricas posibles.

5. Características cinéticas de PEP carboxilasa.

De acuerdo con Ting y Osmond (203) las isoformas de PEP carboxilasa pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo con la actividad específica de los extractos crudos y según su $K_m(\text{PEP})$: a) enzimas C_3 e isoformas anapleróticas con un bajo K_m y una baja actividad específica, b) enzimas CAM con un bajo K_m y una alta actividad específica y c) enzimas C_4 con un K_m elevado y una alta actividad específica. Estas diferencias, están claramente relacionadas con el papel fisiológico que las enzimas juegan en los diferentes metabolismos de estas plantas (129, 150, 203).

En la Tabla 3, se resumen varios parámetros cinéticos reportados para esta enzima y la fuente de la que ha sido obtenidos. Se omite en esta tabla los valores reportados de la V_{max} , ya que debido a las diferencias en el grado de pureza y a que no hay uniformidad en las unidades usadas, no es posible comparar unos datos con otros. La actividad específica de la enzima purificada varía según la fuente, oscila entre 10 y 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1}$ para las preparaciones más puras tanto de las isoenzimas fotosintéticas de plantas C_4 y CAM, como de las isoformas anapleróticas y la enzima de plantas C_3 (59, 85, 98, 140, 150). Debe notarse que la enzima obtenida de tejidos no fotosintéticos ó de tejidos de plantas C_3 tiene una $K_m(\text{PEP})$ considerablemente más baja que en el caso de las C_4 (aproximadamente 0.1 mM de la C_3 frente a 1 mM de las C_4 a pH 7.0, ver Tabla 3). Esta diferencia está muy posiblemente relacionada con el hecho de que en estos tejidos la PEP carboxilasa juega un papel anaplerótico (129) y no fotosintético como es el caso en tejidos verdes de plantas C_4 (203). En el caso de las plantas CAM la $K_m(\text{PEP})$ es más parecida al de las plantas C_3 (Tabla 1).

Se han reportado diversos efectores para esta proteína, como son glucosa-6-fosfato (24, 26, 41, 76, 77, 123, 140, 171, 204, 212, 213, 224), fructosa-1,6-bisfosfato (28, 123), fosfato de carbamilo (61), fosfoacetato (61), metil-2-dihidroxiisoflavinolmetil-2-propenoato (C^{14} CH₂PEP, ref. 93), glicina (24, 123), 3-fosfoglicerato (123, 182, 224), malato (24, 41, 75-77, 171, 212, 220, 224) y aspartato (77, 224). Destacan por su posible relevancia fisiológica glucosa-6-P y glicina que son

buenos activadores y fructosa-1,6-bisfosfato y fosfato de carbamilo que son activadores más pobres, así como los inhibidores malato y aspartato.

Las características del efecto de malato, glucosa-6-P y de otros efectores de PEP carboxilasa se resumen en la tabla 4. Malato ha sido reportado como un inhibidor competitivo a pH 7.0, sin embargo a pH 8.0 se comporta como un inhibidor no competitivo y a valores intermedios de pH la inhibición presenta un patrón de tipo mixto (59). Glucosa-6-P ha sido reportado como un activador tipo K ya que afecta la $K_m(\text{PEP})$, aunque su efecto sobre la velocidad máxima no está claro, ya que hay reportes de que aumenta (204) y reportes de que no se afecta (140, 224). La $K_m(\text{HCO}_3^-)$ aparentemente no es afectada por este activador (224), en tanto que la unión del metal cofactor si se modifica en su presencia (212). El papel del cofactor metálico divalente en la unión de los activadores es aún obscuro, mientras que Stiborová y Lebllová (193) reportan que Mg^{2+} no afecta el nivel de activación observado con glucosa-6-fosfato o glicina, Wedding *et al.* (212, 219) proponen que el complejo Mg-glucosa-6-fosfato es la especie activadora. El grado de activación por glucosa-6-P o por glicina, al igual que el grado de inhibición por malato, son menores a pH 8.0 que a pH 7.0 (59, 77, 80, 86, 191, 193, 199, 213). En tanto que la inhibición por malato parece ser general (126, 201, 203, 211, 214), la activación por glucosa-6-P, por glicina y por el activador no fisiológico $\text{C}^{14}\text{CH}_2\text{PEP}$ sólo se presenta de forma clara en la PEP carboxilasa fotosintética, ya que la isoforma aislada de plantas C_3 es mucho menos sensible, en caso de serlo, a dichos efectores (93, 148, 184).

Uedam y Sugiyama así como otros autores (74, 172, 204) han reportado que la enzima de maíz presenta cooperatividad homotrópica positiva para PEP a pH 7.0. Sin embargo esta cooperatividad desaparece a pH cercano a 8.0 (77, 182, 204), o en presencia de los activadores glucosa-6-fosfato (77, 204) o 3-fosfoglicerato (182). Aunado a lo anterior, varios autores (137, 138, 141, 145, 190, 228) han demostrado la existencia de cooperatividad homotrópica negativa para la unión de Mg^{2+} a PEP carboxilasa también de maíz. Ambos comportamientos resultan

difíciles de integrar en un mecanismo molecular único ya que ambos implicarían, como una primera aproximación, múltiples sitios de unión, tanto para PEP como para Mg^{2+} , pero con interacciones sensiblemente diferentes entre los sitios para la unión de ambos ligandos. Tal conjunción de efectos no parece fácil de explicar y mucho menos desde el punto de vista fisiológico, ya que PEP carboxilasa es una enzima citoplásmica (16, 51, 105, 110, 150) y, por consiguiente, si la concentración de PEP y de Mg^{2+} aumenta en el citoplasma, los efectos de ambos ligandos se compensarían y el aumento en la actividad pudiera no ser significativo.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de Fosfonenolpiruvato carboxilasa obtenida de diversas fuentes.

Parámetro	Origen	Valor	Condiciones de Ensayo	Referencia
	Tipo y/o especie.	mM		
K _a (PEP)	<i>Hesembryantheseum</i> CAM	0.7-1.0	Luz, pH 8, 25°C, Mg 5mM ^b	
		0.2-0.3	Obscuridad, pH 8	
		0.9-1.25	Luz, pH 7.5	
		0.09-0.22	Obscuridad, pH 7.5	Ref 220 ^c
Crassula	CAM	0.42	pH 7.5 20 °C, Mg 4mM	
		0.11	Cd 0.1 mM sin Mg.	
		0.14	Mn 0.3 mM	
		0.071	Fe 0.27 mM	
		0.091	Co 0.1 mM	Referencia 145.
Maiz		0.84±0.17	Luz, pH 8.3, 30°C, Mg 10mM	
		2.08±0.08	Obscuridad.	
		1.36±0.26	Luz, glicerol ^d	
		1.16±0.15	Obscuridad.	
		6.55±0.96	Luz, pH 7.0 Sin glicerol.	
		11.80±1.13	Obscuridad.	
		10.52±0.60	Luz, glicerol.	
12.32±0.32	Obscuridad.	Referencia 172.		
Maiz (Ca)		2.6	pH 7, 22°C Mg 10mM	
		1.16	pH 8	
		1.25	pH 7.0, 15%Glicerol.	Ref 204.
Maiz		0.8	pH8.3, 30°C, Mg 10mM, Ref 119.	
Maiz		0.71	pH 8, 25°C, Mg 3mM	
		0.23	Mn 0.6mM	Referencia 93.
Maiz, Pico I		0.66	pH 8.1, T7 Mg 5mM	
Maiz, Pico II		0.52		
Maiz, Pico I		6.60	pH 7.0	
Maiz, Pico II		6.0	Referencia 190 ^e	
Sorgo, Pico I		1.66	pH 8, 25°C, Mg 10mM.	
Sorgo, Pico II		0.66	Referencia 184 ^f	
Sorgo y Maiz		1.05	pH 7.9, 25°C, Mg 5mM	
MiJo todas C4		1.22	Referencia 123.	
C4 cruda		0.75	pH 7.6, Mg 2mM, Ref 77.	
Atriplex C3		0.11	pH 8, 30°C, Mg 10mM	
Atriplex C4		0.62		
CAM		0.19		
Maiz, Hoja		0.34		
Maiz, Hoja		0.19	Etiolado	
Maiz, Raiz		0.19	Referencia 203.	
<i>Panicum</i> C4		0.22	pH 8.3, 30°C, Mg 10mM	
<i>Panicum</i> C3		0.06	pH 8.3	
<i>Panicum</i> C3-C4		0.07	pH 8.3	
<i>Panicum</i> C4		0.93	pH 7.3	
<i>Panicum</i> C3		0.16	pH 7.3	
<i>Panicum</i> C3-C4		0.24	pH 7.3	Referencia 76 ^g

. . . Continúa . . .

. . . Tabla 3. continuación . . .

		mM	
Km (PEP)	Amaranto C4	0.29	pH 8.6, 30°C, Mg 5mM Ref 86.
	Caña C4	0.25 mM	pH 8, 30°C, Mg 5mM Ref 85.
	Espinaca C3	1.1±0.3	pH 7.5, 25°C, Mn ²⁺ L → 0 ⁹ .
		0.1±0.02	Mn ²⁺ L → ∞
		1.0±0.25	Mg ²⁺ L → 0
		0.1±0.01	Mg ²⁺ L → ∞ Referencia 133.
	Papa (Raiz C4)	0.077	pH 8.5, 30°C, Mn 2 mM
		0.177	Mg 5mM Referencia 188.
	Coleoptilo de Avena	0.07	pH 7.6, 30°C, Mg 5mM, Ref 45.
		0.63-0.51	pH 7.8, 30°C, Mg 2mM, Ref 124.
Epidermis C3	0.11	pH 7.4, 30°C, Mg 6mM, Ref 41.	
Maiz Pico I.	0.1	pH 7.9, 10°C.	
Maiz Pico II.	0.047	Referencia 140 ⁹ .	
		mM	
Km(Me-PEP ⁻)	Maiz	0.0022	pH 8.5, 30°C, Mgl 95µM.
		0.0067	Mgl 456 µM
		0.0213	Mgl 2.3 mM, Referencia 141.
	Maiz	3.5±0.02	pH 7.0, 25°C, Mg 1-20 mM.
	Maiz	0.15±0.03	Mn 1-5 mM.
	Trigo C3	0.92±0.13	Mg 1-20 mM.
	Crassula CAM	0.35±0.04	Mg 1-20 mM, Referencia 215.
	Espinaca C3	0.01±.003	pH 7.5, 25°C Mg 2 mM
		0.04±0.01	Mn 2 mM. Referencia 133.
			mM
Km(PEPL)	Cacahuete C3	3.5±0.5	pH 7.5, 22°C, Mn ²⁺ L → 0 ⁹
		0.16±0.02	Mn ²⁺ L → ∞. Referencia 132.
	Crassula CAM	0.8	pH 7. T7, Mg 0 ^h
		0.16	Mg 10mM. Referencia 212.
	Maiz	6.0	pH 7.0, 30°C Mg 0
		1.50	Mg 10 mM
		1.40	pH 7.5 Mg 0
		0.81	Mg 10 mM
		2.70	pH 7.9 Mg 0
		0.57	Mg 10 mM, Referencia 59 ¹
			µM
Km(HCO ₃ ⁻)	Panicum C4	300	pH 8.3, 30°C, Mg 10, PEP 5mM
	Panicum C3	400-800	
	Panicum C3-C4	400-800	Referencia 76.
	Caña C4	100	pH 8, 30°C, Mg 5, PEP 4mM
			Referencia 85.
Espinaca C3	110±50	pH 7.5, 25°C, Mg 2, PEP 4mM	
		Referencia 133.	

. . . Continúa . . .

. . . Tabla 3, continuación . . .

	μM	
$\text{Km}(\text{HCO}_3^-)$	Papa (raíz C3)	383
		213
		637
	Cacahuete	310
	Maíz	27±1
	<i>Gromphrena</i>	27±1
	<i>Eleusine</i>	26-24
	<i>Panicum</i>	27±2
	Amaranto C4	170
	Maíz Pico I.	1450
Maíz Pico II	1280	
$\text{Km}(\text{Mg}^{2+})$	Espinaca C3	667±50
		79±6
		400±60
		37±2
	Papa (raíz C3)	204
		77
		26
	Cacahuete	270
		31
	Maíz	313
	Maíz	4300
		750
		540
		550
		230
	<i>Crasula</i> CAM	210
		34
		19
		9
		23
	Maíz, Pico I ⁿ	38.5
	Maíz, Pico II	26.4
	Maíz, Pico I	96
Maíz, Pico II	90	
Maíz, Pico I	380	
Maíz, Pico II	263	
Maíz, Pico I	24.4	
	52.3	
	121	
Maíz, Pico II	338	
		pH 8.5, 20°C, Mg 0.6, PEP 2mM
		Mn 0.2 mM, sin Mg
		pH 7.5, Co 0.07mM, Ref 188.
		pH 7.8, 30°C, Mg 2, PEP 2mM
		Referencia 124.
		pH 8.0, 25°C, Mg 5, PEP 0.25mM
		Referencia 10.
		pH 8.6, 30°C, Mg 5mM Ref 86
		pH 7.9, 10°C
		Referencia 149.
		Mg; pH 7.5, 25°C, PEPL+ 0 ^f
		Mg; PEPL+ α
		Mn; PEPL+ 0
		Mn; PEPL+ α, Referencia 133.
		Mg; pH 8.5, 20°C, PEP 2mM
		Mn.
		Co; Referencia 188.
		Mg; pH 7.8, 30°C, PEP 2mM
		Mn; Referencia 124.
		Mg; pH 8.3, 30°C, PEP 5mM
		Referencia 119.
		Mg; pH 7.5, 20°C, PEP 4mM
		Mn.
		Fe.
		Co.
		Cd.
		Mg.
		Mn.
		Fe.
		Co.
		Cd. Referencia 145.
		Mg 25-100μM, pH 8.1, T7, PEP?1
		Mg 100-250 μM.
		Mg 250-1000 μM.
		Mn 25-100 μM ¹ .
		Mn 100-500 μM.
		Mn 500-1000 μM.
		Mn 25-1000 μM, Ref. 190.

. . . Continúa . . .

... Tabla 3, continuación ...

		μM	
$\text{Km}(\text{Mg}^{2+})$	Maiz, PC I ^a	32	: Mg < 100 μM , pH 8.5, T ⁷ , PEP 4mM ¹
	Maiz, PC II	15	: Mg 100-500 μM .
	Maiz, PC I	50	
	Maiz, PC II	51	
	Maiz, PC I	180	: Mg > 500 μM .
	Maiz, PC II	186	
	Maiz PC I	10.2	: Mn 2.5-500 μM .
	Maiz PC II	6.76	<u>Referencia 141.</u>
	Amaranto Ca	870	: Mg pH 8.6, 30°C <u>Ref 86.</u>
	Maiz Pico I	0.032	: Mg pH 7.9, 10°C
Maiz Pico II	0.047		
Maiz Pico I	0.0102	: Mn pH 7.9, 10°C	
Maiz Pico II	0.0067	<u>Referencia 140.</u>	
		μM	
$\text{Ka}(\text{Mg}^{2+})$	Cacahuate	330±140	: Mn: pH 7.5, 22°C, PEPL → 0 ⁹
		140±40	: Mn: PEPL → ∞ . <u>Referencia 132.</u>

- ^a Plantas mantenidas en luz previamente a la extracción.
^b Estas condiciones aplican a la líneas siguientes cuando no se indique una nueva condición.
^c Aplica a los datos después de la referencia inmediata anterior.
^d Glicerol 30% en el medio de extracción. Extractos crudos desalados en todos los casos.
^e Separan dos picos extrayendo a pH 8.1 y cromatografiando en DE-32.
^f L se refiere a la concentración de la especie libre. → 0 se refiere a extrapolación a cero concentración y → ∞ a infinita concentración.
^g Medidas mediante resonancia paramagnética del electrón de Mn.
^h Medidas por los cambios en la fluorescencia intrínseca de de triptofanos. La unión de PEP es cooperativa $n_H = 2$.
ⁱ Presentan cooperatividad negativa para el metal. $n_H = 0.5-0.7$.
^j Medidas a través de la protección contra inactivación por fenilglioxal.
 n_H = número de Hill.

Tabla 4. Efectores reportados para PEP carboxilasa obtenida de diversas fuentes.

Efector	Fuente	Constante y condiciones de ensayo	Referencia.
Inhibidores			
Malato	CAM.	Ki 73-75 μ M pH 8.0. 25°C. Luz.* ^b	
		Ki 4-5 μ M pH 7.5.	
		Ki 400-900 μ M pH 8.0. Oscuridad.	
		Ki 60-86 μ M pH 7.5.	
		Ki 4-9 μ M pH 7.0	17 ^c
Cs		Afecta Km(PEP). Cap. ^d	204.
Amaranto		Iso ¹ 2.5 mM, pH 7.0. Mg 5 mM	
		Iso ¹ 10 mM, pH 8.0	86.
Sorgo		Ki 7 mM, pH 7.9. Mg 5 mM, NCmp.	
Maiz		Ki 6 mM, NCmp.	
Mijo		Ki 4.5 mM, NCmp.	123.
Crassula		Ki(unión)* 1.17 mM pH 7.0. T?	204.
Epidermis		Ki 4.5±0.3 Mx. pH 7.4. Mg 6mM	11.
Crassula	Forma	Ki nm ² I _{max} pH 6.8	
		Tetramero 2.9mM 1.4 25%	
Noche ^e		Dimero 2.1 8.7 100%	
Dia ^a		Tetramero 3.9 1.9 22%	
		Dimero 1.6 2.4 60%	226.
Crassula		Mx Kic 0.43 mM, Kics 3.3 mM pH 6.0	144.
Maiz		Ki ¹ 0.8 mM, Cmp, nm ² 2, pH 7, 30°C, Mg 5mM	
		Ki ¹ 10mM, NCmp, nm ² 4, pH 8	
		Kd ^p 1.20 mM pH 7.0	
		Kd ^p 2.65 mM pH 7.5	
		Kd ^p 8.00 mM pH 7.9	
		Mg y glucosa-6-fosfato no afectan Kd ^p	52.
Aspartato	Sorgo	Ki 10 mM, pH 7.9. Mg 5mM NCmp.	
	Maiz	Ki 12 mM, NCmp.	
	Mijo	Ki 21 mM, NCmp.	123.
	Amaranto	Iso ¹ 2 mM, pH 7.0. Mg 5 mM	
	Iso ¹ >20 mM pH 8.0	140.	
Piruvato	Sorgo	Ki 4 mM, pH 7.9. Mg 5mM Cmp.	
	Maiz	Ki 7.5 mM, Cmp.	
	Mijo	Ki 4.2 mM, Cmp.	123.
	Amaranto	Iso ¹ >20 mM pH 7, Mg 5 mM	
	Iso ¹ 5 mM pH 8	86.	

... Continúa ...

. . . Tabla 4, continuación . . .

2-P-Glicolato	Maiz Ca	Cmp. frente a PEP pH 7 y 8 Inh. Bifásica, K1 0.16 mM, K12 0.4 mM. ACmp frente a Mg	90.
	Espinaca	K1 6±0.1 µM, pH 7.5 Mn 2 mM	133.
	Maiz	K1 200 µM	90.
	Crassula	K1 0.17 mM, pH 6.0	144.
L-P-Lactato	Espinaca	K1 2±0.2 µM, pH 7.5 Mn 2 mM K1 98±15 µM, pH 7.5 Mg 2 mM	133.
	Cacahuete	K1 110±20 µM, pH 7.5. con Mn ⁺	132.
	Maiz	K1 100 µM	90.
P-malato	Maiz	K1 2600 µM	90.
Oxaloacetato	Maiz	Iso ¹ 0.25 mM pH 8.3, 30°C, Mg 10 mM NCmp frente a PEP y HCO ₃ ⁻	117.
	ATP	Avena	Se elimina aumentando Mg
Sulfito	Sorgo	K1 1 mM, pH 7.9, Mg 5mM Cmp.	
	Maiz	K1 3 mM, Cmp.	
	Hijo	K1 1.2 mM, Cmp.	123.
	Maiz,	Cmp vs. HCO ₃ ⁻ , ACmp vs. Mg NCmp vs. PEP, K1 (PCI ¹⁷) vs PEP 7.2 mM K1 vs HCO ₃ ⁻ 11.3 mM PCI y 5.7 mM PCI ^{II} pH 8.5, T7	139.
Fosfato	Crassula	K1 8.11±0.04 mM, pH 7.20°C, Mg 5, PEP 0.1mM Componente inhibitorio	131. ^a
	Activadores		
Glucose-6-P	Crassula	Ka (unión) 0.24 mM, pH 7, sin Mg, PEP ^o Ka 0.12, Mg 10 mM, nh = 1, sin PEP Ka 0.1, Mg 10, PEP 5mM nh = 1.	212.
	Maiz	Baja Km(PEP), Sube Vmax, pH 7.0 Elimina la cooperatividad	204.
	Maiz PCI	Ao.s 2.5 mM pH 8.1, 20°C, Mg 2mM, PEP 5mM Ao.s 5.2 mM pH 8.5 Ao.s 5.0 mM pH 9.0	193. ^o
	Crassula	Ka 0.28±0.1 mM, pHopt 8.1	
	Trigo	Ka 0.33±0.01 mM, pHopt 6.2	
	Maiz	Ka 0.68±0.12 mM, pHopt 6.9	213.
Glicina	Ca	Activador Fuerte, pH 7.9, Mg 5mM	123.
	Maiz	Baja Km(PEP) Sube Vmax, pH 7.0 No disminuye la Cooperatividad	204.
	Maiz PCI	Ao.s 1.0 mM pH 7.0, 20°C, Mg 2mM, PEP 5mM Ao.s 2.0 mM pH 7.5 Ao.s 3.3 mM pH 8.1 Ao.s 4.0 mM pH 8.5 Ao.s 3.3 mM pH 9.0	192. ^o

. . . Continúa . . .

. . . Tabla 4, continuación . . .

Fructosa-1.6DP	C4	Activador pobre, pH 7.9. Mg 5mM	123.
AMP	Penisetum (C3)	Activador moderado	111.
	Crassula	Ka ¹ 0.082±0.028, pH 7.0, 25°C PEP 0.12 mM, Mg 5 mM Baja Km y Vmax Ka ⁰ 0.083±0.310, pH 7.0, 25°C	176.
Acetil-P	Maiz	Ao. s 1.6 mM @ 0.5 mM PEP y 0.62 mM @ 4 mM PEP. Baja Km, sube Vmax	61.
		pH 8.0, Mg 5 mM ^h	61.
Carbamil-P	Maiz	Ka 0.3 mM, Sube Km y Vmax tiene un Componente inhibitorio Cmp Ki 0.7 mM	61.
		pH 8.0, Mg 5 mM.	61.
C ³ H ₂ PEP	Maiz	Ka 0.32 con Mg y 0.13 con Mn. Baja mucho Km, sube poco Vmax.	
	Trigo	No tiene efecto	23.
Fosfato	Crassula	Ka 0.12±0.66 mM, pH 7.20°C, Mg 5 PEP 0.1mM	131.
		Componente activador.	131.

- ^a Plantas mantenidas en luz previamente a la extracción.
^b Estas condiciones aplican a la líneas siguientes cuando no se indique una nueva condición o una nueva referencia.
^c Aplica a los datos después de la referencia inmediata anterior.
^d Cmp, Inhibidor competitivo; NCmp, No competitivo; ACmp, Acompetitivo y Mx, Mixta.
^e Medidas por los cambios en la fluorescencia intrínseca de triptofanos. La unión de glucosa-6-P es cooperativa $n_H = 1.87$.
^f Medidas mediante Resonancia paramagnética del electrón de Mn.
^g Separan dos picos extrayendo a pH 8.1 y cromatografiando en DE-32.
^h Ao. s es la concentración requerida para lograr 50% de activación.
ⁱ Iso concentración requerida para lograr 50% de inhibición.
^j Plantas mantenidas en obscuridad antes de la extracción.
^k Porcentaje de inhibición con el inhibidor saturante.
^l Medida en forma cinética.
^m Fosfato tiene un componente inhibitorio y uno activador.
ⁿ n_H es el número de HILL para la unión del ligando en cuestión.
^p Medida a través de la protección a la inactivación por fenilgloxal.

6. Mecanismo de la reacción catalizada por PEP carboxilasa.

PEP carboxilasa, como ya se mencionó anteriormente (cfr apartado 2), es la única carboxilasa hasta ahora conocida que utiliza bicarbonato como sustrato y que no requiere biotina. Maruyama et al. (124, 132), basándose fundamentalmente en datos cinéticos de intercambio isotópico y en datos de unión de sustratos realizados mediante resonancia paramagnética del electrón, proponen que la reacción se lleva a cabo por un mecanismo concertado (Fig 7A), en el cual el oxígeno ionizado del bicarbonato produce un ataque nucleofílico sobre el fosfato de PEP induciendo un reacomodo de los electrones que permite la salida del grupo fosfato de PEP y el ataque electrofílico del carbón de bicarbonato sobre el grupo enol de PEP para formar el oxaloacetato. Dicho mecanismo ha sido cuestionado por las siguientes evidencias: 1) La mayor parte de las reacciones de carboxilación dependientes de bicarbonato conocidas se llevan a cabo por la formación de un intermediario de carboxifosfato (50). 1i) Se ha demostrado que PEP carboxilasa de maíz es capaz de catalizar la descomposición de fosfato de carbamilo usando agua o bicarbonato como sustrato aceptor (61). 11i) PEP carboxilasa de *Escherichia coli* no es inhibida por DL-P-maleato, y debiese serlo de ser operante este mecanismo concertado, ya que este compuesto es un análogo del estado de transición que se requiere para que este mecanismo opere (89). 1v) La reacción de carboxilación se lleva a cabo con inversión de la configuración, lo cual no es explicado por un mecanismo concertado, en donde la configuración se conserva dado que el ataque ocurre en forma casi simultánea (68, 151).

Dadas estas evidencias el mecanismo de reacción aceptado hoy día consiste en una catálisis en dos pasos (Fig 7B): 1^o el sustrato PEP³⁻ es desfosforilado usando bicarbonato como aceptor para formar el carboxifosfato y 2^o este HCO₃⁻ activado es el donador del carboxilato que ataca al doble enlace de la forma enólica del piruvato, ayudado por la electrofilicidad del metal divalente (58, 174).

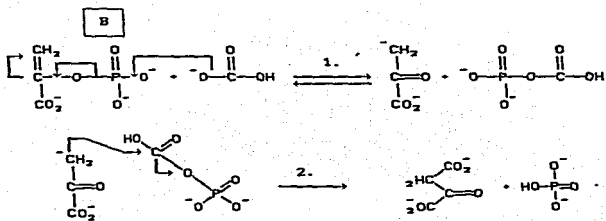
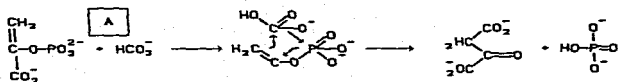


Figura 7. Mecanismos propuestos para la catálisis de la reacción de β -carboxilación que lleva a cabo PEP carboxilasa. A. Mecanismo concertado propuesto inicialmente por Maruyama *et al.* (124). B. Mecanismo en dos pasos propuesto inicialmente por O'Leary *et al.* (151).

7. Papel de los cationes divalentes en la reacción catalizada por PEP carboxilasa.

El cofactor Mg^{2+} puede ser substituido por ciertos cationes divalentes como Mn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} y Co^{2+} . Sin embargo, otros cationes divalentes resultan inhibitorios para la reacción, como es el caso de Ca^{2+} , Ba^{2+} , Be^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} , estos datos se presentan en la Tablas 3 y 5 y han sido tomados de varias fuentes (132, 141, 145, 151).

Tabla 5. Inhibición por diversos cationes divalentes de la reacción catalizada por PEP carboxilasa en presencia de Magnesio como ión activador.

Ión metálico	K_i (EI)	K_i' (EMGI) (mM)	Ref.
Be ²⁺	0.12	0.39	
Ca ²⁺	0.25	—	
Sr ²⁺	3.8	—	
Ba ²⁺	21	—	
Ni ²⁺	0.002	—	
Cu ²⁺	0.0025	0.13	
Zn ²⁺	0.0083	0.09	
Pd ²⁺	0.33	5.0	167 ^a .

^aPEP carboxilasa purificada de *Crassula argentea* (CAM).

Mediante el uso de resonancia paramagnética del electrón (EPR) y utilizando Mn^{2+} como catión, Mildvan et al. (132, Tabla 3), han obtenido fuertes evidencias en cacahuete de que PEP carboxilasa se une tanto al metal como al sustrato, pero que a su vez ambos se unen entre sí, formando un puente triple (Fig 8). Es decir, tanto Mn^{2+} como PEP^{3-} pueden unirse a la proteína en forma independiente, pero la unión se refuerza en un orden de magnitud cuando ambos ligandos se hallan unidos. Estos datos se corroboraron con datos cinéticos que muestran que las constantes de disociación (medidas cinéticamente) de Mg^{2+} y Mn^{2+} a la enzima disminuyen cuando se extrapolan a infinita concentración de PEP^{3-} con respecto a las extrapoladas a cero concentración de PEP^{3-} y viceversa (133, cfr. Tabla 3).

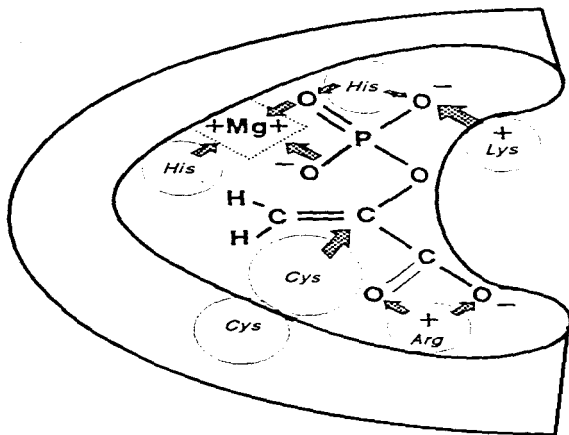


Figura 8. Esquema que muestra la formación de un puente triple E-Mg-PEP, como el que ha sido propuesto para la PEP carboxilasa (132). El esquema resume, de acuerdo con Andreo *et al.* (4), la participación de los residuos de aminoácidos que han sido reportados como esenciales para la actividad (cfr. apartado 4).

Mukerji (141, cfr. Tabla 3) encuentra que la velocidad de la reacción es aproximadamente la misma a una concentración de Mg-PEP⁻ determinada, con cierta independencia de la concentración de Mg²⁺ libre y PEP³⁻ libre usadas para lograr dicha concentración, ello indicaba que Mg-PEP⁻ era el sustrato real de la enzima. Sin embargo, en sus experimentos un aumento sustancial en la cantidad de Mg²⁺ libre se traduce en una inhibición de la enzima que en conjunto se refleja como una cooperatividad homotrópica negativa para Mg²⁺. Este autor interpreta sus datos proponiendo que Mg²⁺ libre es un regulador negativo de la enzima.

Los datos existentes en la literatura hasta el momento de comenzar el trabajo de esta tesis no dejaban en claro cuál era el sustrato real de la enzima, ya que los experimentos de unión de ligandos apoyaban el hecho de que PEP³⁻ y Mg²⁺ pudieran unirse a la proteína en forma independiente, pero los datos cinéticos antes mencionados señalaban una preferencia de la enzima por el complejo Mg-PEP⁻. Por otra parte existía la posibilidad de que el metal pudiese ejercer un efecto regulador alostérico adicional.

8. Importancia del presente estudio.

A fin de enfatizar aquellos aspectos que nos impulsaron a realizar el estudio que se presenta en esta tesis, resulta conveniente hacer hincapié sobre los siguientes aspectos del comportamiento de la enzima PEP carboxilasa que han sido ya documentados en los apartados anteriores. Por esta razón, no citaré en este apartado a los autores de los trabajos en los que se describen los diversos efectos que mencionaré, ya que el lector puede regresar al apartado correspondiente para este efecto.

1) Ciertos efectores de la enzima guardan relativamente poca homología entre sí, pero guardan el mismo grado de homología con el sustrato ya que son compuestos fosforilados. Especialmente notorio es el activador C⁵⁵H₂PEP que fue diseñado para ser un análogo del estado de transición de la enzima. Este tipo de moléculas suelen ser excelentes inhibidores de las enzimas para las que fueron diseñados, sin embargo en este caso, este análogo

resulta ser un activador. Es pues claro que esta activación reflejaría la existencia de al menos dos tipos de sitios capaces de unir PEP en la enzima, es decir, sitios catalíticos y sitios reguladores en donde se pueden unir tanto PEP como los activadores análogos de PEP.

II) De los datos anteriores y de la respuesta cooperativa de la enzima frente a PEP total a pH 7.0 se deduce que deben existir dos sitios de unión interactuantes para PEP en la molécula, ya sea que ambos sean activos o sólo uno de ellos. El hecho de que glucosa-6-fosfato elimine tal cooperatividad parece indicar que existe un sitio alosterico para este activador, al cual PEP también puede unirse cuando no está ocupado por glucosa-6-fosfato. Debe mencionarse, sin embargo, que esta última no es la única explicación posible, y que pueden proponerse mecanismos cinéticos que expliquen estos efectos partiendo de otros supuestos. Por esta razón estos efectos merecen atención adicional.

III) La cooperatividad negativa que presenta la enzima frente a Mg^{2+} tanto cuando se considera a PEP total como sustrato, como cuando se considera a $Mg\text{-PEP}^+$, parece hablar de sitios adicionales para Mg^{2+} que tienen caracter regulador. Caben por lo tanto las siguientes posibilidades: i) se trataría por tanto de una enzima que poseería sitios alostéricos para los mismos sustratos que se requieren en el sitio activo, ii) sería una enzima con varios sitios activos cooperativos que presentan diferente respuesta dependiendo del sustrato que se una, o iii) existe una explicación alternativa que agrupe conjuntamente estos comportamientos observados. Esta es la cuestión que trataremos de responder en el presente trabajo.

IV) Resulta evidente que el comportamiento de la enzima se modifica substancialmente con el pH en el rango entre 7-8, ya que, tanto el comportamiento cooperativo, como la sensibilidad a efectores, varían en algunos casos cuantitativamente y en otros incluso cualitativamente. Sin embargo, estas modificaciones substanciales no han sido del todo caracterizadas, ya que se ha identificado un sólo grupo ionizable con un pK dentro de este rango que participa en la unión de los sustratos Mg^{2+} y PEP^{3-} , pero no en catálisis.

V) Es claro que, a pesar de la gran cantidad de grupos ionizables detectados como esenciales, la ionización de dichos grupos no se observa en los perfiles de $\text{Log}(V_{\text{max}})$ y $\text{Log}(V_{\text{max}}/K_a)$ realizados hasta la fecha. Esto resulta sorprendente, ya que al menos las histidinas y las cisteínas, son susceptibles de sufrir ionización en este rango de pH. La causa de esta aparente insensibilidad al pH por parte del mecanismo de catálisis de esta proteína no ha sido aún explicada. En el segundo artículo de este trabajo nos propusimos, precisamente, profundizar en este aspecto del comportamiento de esta intrigante proteína.

EXPERIMENTAL.

Se pretende en esta parte, abundar en aquellos aspectos que no se encuentran descritos con suficiente detalle en los artículos. Por esta razón no se incluyen en esta sección todos los procedimientos empleados ni los materiales utilizados que se describen con suficiente detalle en ambos artículos.

Para el análisis de datos se utilizaron los siguientes programas de computadora:

Hoja electrónica de cálculo QUATTRO de Borland International INC.

Compilador de TURBO-PASCAL de Borland International INC.

Intérprete GWBASIC para PC de MicroSoft.

Purificación de PEP carboxilasa de hoja verde de maíz.

Las hojas de maíz cortadas se despojaron de la vaina central y se cortaron en pequeños pedazos. Durante este procedimiento, es necesario mantener las hojas en una bandeja con un poco de agua limpia para evitar que se sequen. Los trozos de hoja se colocan en un colador y se lavan con agua corriente abundante para eliminar la tierra y los insectos adheridos al material biológico en cuestión. El material lavado se seca con papel absorbente, cuidando de no dejar fragmentos del papel pegados a las hojas y se pesa en una balanza granataria.

Los trozos de hoja lavados se colocan en una vaso de licuadora (Waring Blendor), que debe haberse enfriado previamente en hielo y, se añaden de 2 a 3 volúmenes (con respecto al peso de las hojas) del medio de extracción que se describe en el primer artículo. Se muelen las hojas mediante pulsos cortos de agitación en la licuadora, procurando evitar que el material se adhiera a las paredes del vaso, para que la homogenización sea lo más completa posible. El homogenado obtenido se filtra a través de 4 capas de gasa ó de Miracloth y se recibe en un recipiente graduado con el fin de determinar el volumen obtenido, del cual se toma una alícuota para determinación de la actividad enzimática de PEP carboxilasa (los ensayos se describen en el artículo primero) y de la concentración de proteínas (ver más adelante). Este filtrado se centrifuga a 40 000 g durante 20 minutos, se determina el

volumen recuperado de sobrenadante y se toma una nueva alícuota para ensayos de actividad y proteínas. Se añade al sobrenadante suficiente polietilenglicol -6000 (PEG) para llevarlo a 15% (p:v) manteniéndolo en hielo y con agitación, se deja reposar durante 30 minutos y se centrifuga como antes. Se toman nuevamente alícuotas antes y después de centrifugar. Al sobrenadante obtenido se le lleva hasta 30% de PEG siguiendo el procedimiento anterior. Después de la centrifugación, la actividad deberá quedar en el precipitado.

El precipitado de 15-30% (p:v) PEG puede congelarse a -70°C , pero debe resuspenderse en el buffer que se senó en el artículo 1 en un lapso no mayor a 24 hrs, ya que la capacidad de la proteína para resolubilizarse se pierde gradualmente en estas condiciones. La resuspensión debe realizarse con agitación moderada por un tiempo prolongado (al menos 30 min), aún cuando la pastilla parezca totalmente resuspendida. Después de resuspender como se ha indicado, la suspensión se centrifuga para eliminar proteína insoluble y la actividad deberá permanecer en el sobrenadante.

La solución de enzima obtenida del paso anterior se pasa por una columna de hidroxapatita para pegar la proteína a esta resina. La columna de hidroxapatita deberá contener al menos 1 ml de BioGel-HTP por cada 5 mg de proteína que se tengan en la preparación de enzima. La columna deberá ser de al menos 10 cm. de largo pero de no más de 20 y se recomienda utilizar flujos de no más de 5 cm/hr. a fin de obtener una buena resolución. La cromatografía se realiza de acuerdo con lo señalado en el artículo primero y las fracciones en el pico de actividad se reúnen y se toma una alícuota para determinación de actividad específica. A las fracciones colectadas se les añade MgCl_2 hasta una concentración de 10 mM. Durante este paso se observará la formación de un precipitado blanco. A continuación se añade PEG hasta una concentración del 50% (p:v), esta suspensión se centrifuga a 80 000 g por al menos una hora. La actividad después de este paso permanece en el precipitado y debe ser resuspendida de inmediato. Si se desea guardar la enzima en este paso deberá resuspenderse en un medio A, añadirse PEG hasta 5%

(p:v) y después de centrifugar a 40 000 g 20 minutos puede congelarse a -70°C . Este último procedimiento conlleva sólo una leve pérdida de actividad. La enzima congelada de este modo es estable por algunas semanas. La congelación y descongelación repetida afectan seriamente la actividad de esta suspensión. Se recomienda que si no se ha de usar toda la suspensión junta se preparen alícuotas para descongelarlas según se requiera. La muestra obtenida se cromatografía en Sephacryl-S300, se recolecta una columna que contenga una cama de resina con 20 a 50 veces el volumen de muestra a aplicar, la longitud de la columna debe mantenerse entre 70 y 100 cm. y el flujo recomendado es de 5-15 cm/h. para una óptima resolución.

La proteína eluye como un sólo pico aproximadamente entre 0.4 y 0.5 veces el volumen de la cama ligeramente después del volumen vacío. Las fracciones obtenidas después de ser reunidas se llevan a 5% (p:v) de PEG y se determina actividad específica de la preparación. La enzima obtenida puede ser congelada a -70°C con las precauciones ya mencionadas.

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de acrilamida se realizó utilizando el sistema discontinuo descrito por Laemmli (108). La proteína obtenida demostró tener una pureza de al menos 95% mediante este criterio usando azul de Coomassie R-250 como colorante para proteínas.

La determinación de proteínas se realizó como sigue:

Para extractos y preparaciones crudas, se tomaron alícuotas de la muestra que estuviesen entre 0.2 y 0.5 unidades de absorbencia a 280 nm después de llevarse a 1 ml. Se añaden 100 μl de desoxicolato de sodio 0.15 % (p:v) y 100 μl de TCA al 72% en frío y se centrifuga a 3000 rpm por 15 min en una centrifuga refrigerada. Las pastillas de proteína se resuspenden en 200 μl de NaOH 0.1N-0.2N con agitación vigorosa y se incuban por 15-20 minutos a 80°C en una bañera de temperatura constante. A las muestras así tratadas se añaden 3 ml de solución de azul de Coomassie G-250 preparado según lo descrito por Bradford (113) o disuelto en ácido perclórico 0.6N a una concentración de 100 ppm (se requieren de 6-8 hrs de agitación para la disolución del colorante en la solución del ácido perclórico y después de esto

debe filtrarse el reactivo obtenido por papel Whatman N° 1 y luego por filtros milipore HA de 0.45 μm . esta solución es muy estable a temperatura ambiente si se conserva bien tapada). Se lee la absorbencia de las muestras a 595 nm y se determina la concentración de proteínas interpolando en una curva patrón de albúmina entre 5 y 80 μg de proteína que debe prepararse siguiendo exactamente el mismo procedimiento.

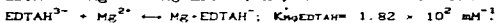
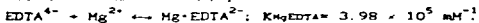
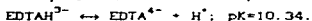
Para los experimentos cinéticos las soluciones empleadas se prepararon con agua destilada y purificada a través de un sistema NANOPURE de Barnstead. Las soluciones de MgCl_2 empleadas se prepararon de acuerdo a como se describe en el artículo 1. Para la preparación de soluciones tamponadas se utilizaron reactivos de la más alta pureza disponible. Las actividades determinadas a pH 7.0 en un medio de trietanolamina-HCl y en un medio de PIPES-trietanolamina (ver abreviaturas en el artículo primero) no fueron significativamente diferentes.

Para la determinación de las cantidades de las especies totales que deben añadirse a fin de obtener concentraciones definidas de diversas especies se utilizó un programa de computadora escrito y compilado en TURBO-PASCAL (versión 3.0). El programa está basado en dos series de ecuaciones propuestas por Storer and Cornish-Bowden (196) que pueden, por iteraciones repetidas, ajustarse para que, dadas una serie de componentes (que forman una serie de complejos definidos cuyas constantes de estabilidad globales son conocidas a la temperatura y fuerza iónica requerida), sea posible calcular la concentración de las especies libres que se forman a una concentración total dada de las especies, o bien, la concentración de las especies totales requeridas para lograr una determinada concentración de una especie libre en solución. Las opciones pueden combinarse para permitir manipular ciertos datos como concentraciones libres deseadas y ciertos otros como concentraciones totales fijas.

De esta manera además, si se conocen las constantes de disociación de H^+ de las especies en solución, se pueden convertir a constantes de estabilidad ($K_{\text{st}}=10^{\text{pK}}$) globales y es posible calcular las concentraciones de las diferentes formas iónicas de estas especies y sus respectivos complejos, siempre que la

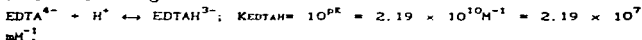
concentración de protones se incluya como una especie libre constante en los cálculos. Es decir, que el pH ($-\text{Log}[\text{H}^+]$) se incluye en los cálculos, usando el valor correspondiente al pH deseado, a fin de hacer las constantes de estabilidad independientes de pH.

Para ejemplificar lo dicho en el párrafo anterior se ha escogido el caso del EDTA para el cual las siguientes constantes de equilibrio han sido reportadas (106):



Las especies iónicas restantes no se incluyen en el cálculo, dado que sus pK son mucho más ácidos y no aparecen en concentraciones apreciables en el rango de pH a estudiar, además de que su capacidad para quelar Mg^{2+} es muy pobre, por lo cual su influencia en los cálculos puede desprejarse.

El cálculo de las constantes de estabilidad (ó constantes de formación) de estos complejos a partir de las especies libre solas y totalmente ionizadas, es decir, de las constantes de estabilidad globales (K_{MgEDTA} en este caso) se realiza como sigue:



$\text{EDTA}^{4-} + \text{Mg}^{2+} \leftrightarrow \text{Mg}\cdot\text{EDTA}^{2-}; K_{\text{MgEDTA}} = 3.98 \times 10^5 \text{ mM}^{-1}$ que no necesita modificación ya que EDTA^{4-} y Mg^{2+} son especies totalmente ionizadas.

$\text{EDTAH}^{3-} + \text{Mg}^{2+} \leftrightarrow \text{Mg}\cdot\text{EDTAH}^{-} + \text{H}^+$; esta constante (K_{MgEDTAH}) puede obtenerse como el producto de dos constantes, a saber:

$$K_{\text{MgEDTAH}} = \frac{[\text{MgEDTAH}]}{[\text{Mg}^{2+}][\text{EDTAH}^{3-}][\text{H}^+]} = \frac{[\text{MgEDTAH}]}{[\text{Mg}^{2+}][\text{EDTAH}^{3-}]} \times \frac{[\text{EDTAH}^{3-}]}{[\text{EDTA}^{4-}][\text{H}^+]} =$$

$$K_{\text{MgEDTAH}} \times K_{\text{EDTAH}} = 1.82 \times 10^2 \text{ mM}^{-1} \times 2.19 \times 10^7 \text{ mM}^{-1} = 3.98 \times 10^9 \text{ mM}^{-1}$$

El listado del programa se detalla completo en el apéndice 1.

Para la simulación de datos cinéticos se empleó la hoja electrónica de cálculo QUATTRO en la cual las velocidades iniciales fueron calculadas numéricamente de acuerdo con las

ecuaciones descritas en los apéndices de ambos artículos.

Para los ajustes numéricos de los datos simulados y los datos experimentales se empleó inicialmente un ajuste aproximado. Después se afinaron los datos mediante un programa de regresión no lineal escrito en GWBASIC de acuerdo al programa descrito por Canela (21). Las únicas modificaciones hechas a este programa consistieron en la inclusión de una rutina de inversión de una matriz por eliminación gaussiana con pivote total y en la separación de las líneas que contienen la entrada de datos y las líneas que contienen las rutinas de cálculo en dos programas separados que funcionan alternativamente. El listado de este programa se incluye en el apéndice 2. Al final del programa se incluyen varias rutinas de análisis estadístico de los datos resultantes de acuerdo con las propuestas de Reich et al. (168).

ARTÍCULO 1.

KINETIC EVIDENCE OF THE EXISTENCE OF A REGULATORY
PHOSPHOENOLPYRUVATE BINDING SITE IN MAIZE LEAF PHOSPHOENOLPYRUVATE
CARBOXYLASE.

FOR

Rogelio Rodríguez Sotres y Rosario A. Muñoz Clares.

Departamento de Bioquímica. División de Bioquímica y Farmacia,
Facultad de Química, UNAM, México D.F. 04510, México.

Publicado en Enero de 1990.
Archives of Biochemistry and Biophysics.
Vol 276, N^o 1, pp. 180-190.

Kinetic Evidence of the Existence of a Regulatory Phosphoenolpyruvate Binding Site in Maize Leaf Phosphoenolpyruvate Carboxylase

Rogelio Rodríguez-Sotres and Rosario A. Muñoz-Clares¹

Departamento Biología, Universidad Nacional y Farmacia, Facultad de Química, UNAM, México City 04510, México

Received May 9, 1979, and in revised form September 5, 1980

Phenylphosphate, a structural analog of phosphoenolpyruvate (PEP), was found to be an activator of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEP carboxylase) purified from maize leaves. This finding suggested the presence in the enzyme of a regulatory site, to which PEP could bind. We carried out kinetic studies on this enzyme using controlled concentrations of free PEP and of Mg-PEP complex and developed a theoretical kinetic model of the reaction. In summary, the main conclusions drawn from our results, and taken as assumptions of the model, were the following: (i) The affinity of the active site for the complex Mg-PEP is much higher than that for free PEP and Mg²⁺ ions, and therefore it can be considered that the close structural substrate of the PEP-catalyzed reaction is Mg-PEP. (ii) The enzyme has a regulatory site specific for free PEP, to which Mg²⁺ ions can not bind. (iii) The binding of free PEP, or an analog molecule, to this regulatory site yields a modified enzyme that has much lower apparent K_m values and apparent V_{max} values than the unmodified enzyme. No, free PEP behaves as an excellent activator of the reaction at saturating substrate concentrations, and as an inhibitor at saturating substrate concentrations. These findings may have important physiological implications on the regulation of the PEP carboxylase *in vivo* activity and, consequently, of the C₄ pathway, since increased reaction rates would be obtained when the concentration of PEP rises, even at limiting Mg²⁺ concentrations. © 1980 American Society of Plant Physiologists

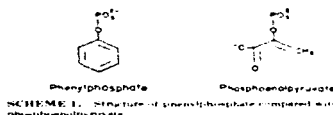
The activity of the C₄ pathway enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEP carboxylase; EC 4.1.1.31) is

¹ To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations: PEP, phosphoenolpyruvate carboxylase; PEP, phosphoenolpyruvate; U-¹⁴C-PEP, methyl-2-deuterio

increased by phosphorylated compounds such as glucose 6-phosphate (1, 2, 8, 9, 21, 42), fructose 1,6-bisphosphate (3), 3-phosphoglycerate (3, 4), carbamyl phosphate and acetyl phosphate (5), and U-¹⁴C-PEP (6), suggesting the existence of one or several regulatory sites in the enzyme molecule. On the other hand, it is known that PEP carboxylase from C₄ species shows homotropic positive cooperativity in the binding of PEP at pH 7.0 or near 7.0 (7, 8, 10). Since PEP carboxylase is a tetrameric protein (11), this cooperativity may arise from the existence of multiple interacting catalytic sites, and/or from the existence of one or several allosteric regulatory sites (different) from the active sites that can bind PEP. We favored the latter possibility, given the close structural relationship between PEP and one of the active sites called active, C-PEP. To our knowledge, most of the PEP analogs studied to date inhibit the PEP carboxylase catalyzed reaction by competing with PEP for the binding to the active site (12, 13), and therefore have been used to characterize the active site. By analogy, the study of PEP analogs with activating effects on the reaction rates may be very useful to identify and characterize a PEP-binding regulatory site. With this aim, we decided to test the effect of phenylphosphate on the reaction rates, since it is a stable compound, structurally related to PEP, and available in high purity. As can be seen in Scheme 1, both compounds have a phosphate group linked through an oxygen to a carbon atom and resonant π orbitals. We found that phenylphosphate at concentrations in the micromolar range does activate the enzyme, and we used this compound to discriminate between the active and activating site, in order to characterize the latter. In this paper we also reported the

phosphoenolpyruvate (PEP), 2-propanoate, PEP, methyl-2-deuterio-glucosylate, PEP, methyl-2-deuterio-fructose-1,6-bisphosphate, methyl-2-deuterio-acetyl phosphate, PEP, methyl-2-deuterio-fructose-1,6-bisphosphate, and methyl-2-deuterio-fructose-1,6-bisphosphate.



SCHEME 1. Structure of phenylphosphate compared with that of diphosphoenolpyruvate.

double role of PEP as substrate and modifier of the PEP carboxylase reaction and discuss the important implications that this finding has on the interpretation of previous reports, and on the understanding of the regulatory features of this enzyme.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and buffers. PEP, inactive diphosphoenolpyruvate, and H₂PO₄ diphosphate salts (except high purity diphosphoenolpyruvate) were from Isotek Laboratories. PEP (average 65% active form), diphosphoenolpyruvate (PEP) 2-methylsuccinate, and succinate diphosphoenolpyruvate (average 40% active) were purchased from Sigma Chemical Co. EDTA, ammonium salt, and phenylphosphate (diphosphate salt) were from Merck (highest purity) and from Fluka (highest purity) respectively. Other reagents (present as from Hoechst Laboratories). All other chemicals of analytical grade were from standard suppliers.

Plant material. Plants of maize (Zea mays L., cv. 14) were grown in field in soil culture in a naturally illuminated greenhouse at temperature between 20 and 30°C. Fully expanded leaves were used for the experiments.

Phosphorylation of maize leaf extracts in sucrose buffer. Leaf segments were extracted at 4°C using a Waring Blendor in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sucrose, 0.1 M NaCl, 1 mM benzimidazole, 1 mM phenylphosphate, 1 mM 2-mercaptoethanol, 2% (w/v) PEG-6000 and 10% (v/v) dithionite as reducing agent. The resulting suspension was filtered through four layers of Whatman 1 and centrifuged at 5000 g for 20 min. PEP activity was added to the supernatant and the reaction (mixing between 15 and 30 min at 25°C of the compound was allowed to be discontinued as before. The pellet of precipitated protein was resuspended in a small volume of medium A that contained 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.0, 0.2 M MgCl₂, 1 mM EDTA, 2 mM phenylphosphate and 2% (w/v) PEG-6000, to which 20 μM PEP was added. After a 30-min centrifugation at 5000 g the supernatant was diluted in medium A and a chromatin preparation (diphosphate). The column was washed with a lot of medium A containing 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, and then allowed with a 50 to 200 mM gradient of phosphate buffer of the same pH to medium A. To the fractions containing the peak of PEP carboxylase activity were added 10 μM H₂PO₄ and total MgCl₂ to give a final concentration of 10 mM. The resulting supernatant was centrifuged for 30 min at 5000 g, and the pellet of precipitated protein resuspended in medium A and applied to a column (bed of 100 μm Sepharose 4B) equilibrated with medium A. Fractions with high specific PEP carboxylase activity were pooled, stored at 25°C, and used for the experiments as reported here. This enzyme preparation was found to be about 95% pure, as determined by SDS-PAGE using a bromine blue stain as assay, and to have a specific activity of 11.3 and 10.0 μmol/min determined by the standard assay described below.

Diphosphoenolpyruvate carboxylase assay. PEP carboxylase activity was measured spectrophotometrically at 30°C in a coupled enzyme as

suming inactive diphosphoenolpyruvate and measuring NADH⁺ uptake in the decarboxylation of oxaloacetate by PEP. Final 150 μM of the coupled system. The standard assay system contained in a 3 ml total volume of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.0, 0.1 M sucrose, 0.1 M NaCl, 1 mM PEP, 1 mM EDTA, 2 mM NaH₂PO₄, 0.2 mM NaHCO₃ and a unit of inactive diphosphoenolpyruvate. The initial diphosphoenolpyruvate concentration was varied as indicated by the legend. The reaction was started by the addition of the enzyme preparation. Rates in the absence of PEP were considered as blank. The assay was performed in linear range. The pH of the PEP or H₂PO₄ solutions was previously adjusted to the pH of the assay using appropriate amounts of Tris-HCl and NaOH.

For the kinetic experiments in which the concentrations of free PEP and Mg²⁺ were controlled, the total concentrations of Mg²⁺ (added as MgCl₂ and PEP) in the assay mixture were varied in order to obtain the desired concentrations of the Mg²⁺ PEP complex while holding the concentration of free PEP constant. To obtain these total concentrations the following required overall stability constants were used: PEP-Mg²⁺ (log K₁ = 2.28 ± 0.05), PEP-Mg⁺ (log K₂ = 1.07 M⁻¹), EDTA-Mg²⁺ (log K₁ = 10.24 ± 0.05), EDTA-Mg⁺ (log K₂ = 1.07 M⁻¹), H₂PO₄-Mg²⁺ (log K₁ = 1.03 M⁻¹), H₂PO₄-Mg⁺ (log K₂ = 0.25 M⁻¹), and phenylphosphate-Mg²⁺ (log K₁ = 1.03 M⁻¹) and phenylphosphate-Mg⁺ (log K₂ = 0.25 M⁻¹) from the stability constants of related phosphorylated ion pairs reported by 13 Naftali and coworkers (20). These calculations were performed using a computer program written in Turbo PASCAL, 2.0 following an algorithm described by Nourse and Cornish-Bowster (21). This program is faster than any other available BASIC program, and considerably more easy to use than the PCRTKANS version developed by 13 Naftali and coworkers (20). Since Mg²⁺ is highly hydrophobic and therefore in water, its activity is variable, we prepared the Mg²⁺ solutions of known concentration in the following procedure: maximum needed by Microsoft (22) appropriate amounts of MgCl₂ were heated at 200°C to dehydrate the salt and eliminate carbonate contaminants until a constant weight was reached. A carefully weighed amount of this powder was suspended in distilled water at 25°C. In this system water (H₂O) was almost solvent. Neutralization was considered complete after pH remained stable at a given amount of acid (that was present) was adjusted to the required volume to get the desired concentration. The total concentration was kept constant at 25°C. Similarly, other metal ions (Li⁺, Na⁺) were added to the assay medium in order to attain regularity the free Mg²⁺ concentrations at low Mg²⁺ levels and to the total concentration of heavy metal ions (that may be present). We used tetraammine Ni(II) in all the procedures, since it has been reported to be a good buffer that forms negligible complexes with the metal ions (23). In these experiments, the ionic strength of the assay was determined by the standard assay described below.

Protein determination. Protein was determined according to a modification of the method of Bradford (24) previously described (19).

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Phenylphosphate on PEP Carboxylase Activity

The effect of several phenylphosphate concentrations on the PEP carboxylase reaction rates was first studied using total PEP as variable and Mg²⁺ as constant. The conditions of Mg²⁺ and HCO₃⁻ ions usually accepted as saturating (10 and 1 mM, respectively), under the standard assay conditions described under Materials and Methods. We observed a clear activation of the enzyme by phenylphosphate, when assayed at low total PEP concentrations, while at the higher ones there was a much lower degree of activation. This, this compound has little effect on the intercepts of the double-reciprocal

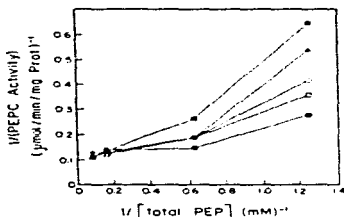


FIG. 1. Double reciprocal plot of initial velocity against total PEP concentration in the absence (■) and presence of 0.1 (●), 0.2 (○), 0.4 (□), and 1.2 (△) mM phenylphosphate. Standard assay conditions were used, except for the total PEP concentration, which was varied as indicated.

plots of initial velocity against total PEP at several fixed phenylphosphate levels (Fig. 1). Phenylphosphate appears to be the same kind of activator of PEP carboxylase as others already reported, which decrease the apparent K_m (PEP) values without modifying the V_{max} values, such as glucose 6-phosphate (24) and the nonphysiological compound (24,25) PEP-16. The shape of these curves suggests positive cooperativity for PEP in the concentration range studied, this cooperativity being less apparent as the activator concentration in the assay medium increases. Again, this effect is similar to that of glucose 6-phosphate, which has been reported to abolish the positive cooperativity in the binding of PEP observed at pH 7.0 (2, 7, 8, 40). Data from a new set of experiments, in which we used low total PEP concentrations and otherwise identical experimental conditions as before, were plotted as the reciprocal of initial velocity against the reciprocal of free phenylphosphate at several fixed total PEP concentrations (Fig. 2A). The family of curves obtained clearly confirmed the competitive nature of the activating effect of phenylphosphate with respect to PEP. An inhibitory effect was also observed at the two highest phenylphosphate concentrations (3.2 and 6.4 mM) and the lowest total PEP concentration tested (13 μ M), probably due to binding of the activator to the active site.

The structural analogy between phenylphosphate and PEP, and the finding that the degree of activation depends on the substrate concentration, decreasing as the latter increases, suggested to us the possibility of the existence in the enzyme of a regulatory site, different from

the active site, to which PEP could bind. Both sites must differ considerably in their relative affinities for PEP and/or for Mg^{2+} ions, if the activation is to have any physiological significance. It is well established that PEP carboxylase catalyzed reactions require divalent metal ions (24, 34). However, when we carried out this study the most accepted idea was that the real substrate of the reaction was the ionic free PEP (26, 27, 31). Several kinetic and binding studies demonstrated that PEP and Mg^{2+} can bind independently to the enzyme (26, 27, 33, 34), but it has been also reported that the value of the K_m for either of these two ligands is affected by changing the concentration of the other; hence they bind much more strongly at saturating concentrations of both ligands (24). So, we decided to check the hypothesis that Mg-PEP functions as substrate and that free PEP, or free PEP analog, is the activator of the PEP carboxylase-catalyzed reaction. Thus, we measured the effect of free phenylphosphate on the enzyme activity using Mg-PEP as the variable substrate at two fixed free PEP concentrations, 0.25 and 2.0 mM. The results obtained, shown as double reciprocal plots in Fig. 3, confirm the activating effect of phenylphosphate and the validity of considering Mg-PEP as the real substrate of the reaction. Good straight lines were obtained and α' was always greater than 0.99 even in the absence of phenylphosphate. Therefore, under these new experimental conditions, the enzyme shows Michaelis-Menten kinetics in a range of substrate concentration similar to that used previously when homotropic positive cooperativity was

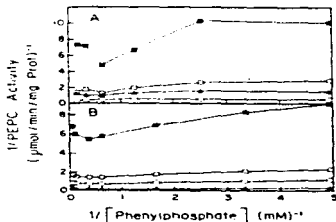


FIG. 2. Effect of phenylphosphate on the PEP carboxylase reaction at several fixed total PEP concentrations. (A) P experimental results at 13 μ M, 130 μ M, 260 μ M, and 520 μ M total PEP. Standard assay conditions were used, except for the total PEP and total phenylphosphate concentrations. (B) Theoretical curves from the model at 13 μ M, 130 μ M, 260 μ M, and 520 μ M total PEP.

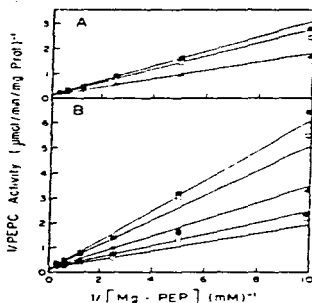


FIG. 3. Double-reciprocal plots of initial velocities against Mg-PEP concentrations: (A) free PEP concentration, 0.25 mM in the absence (—) and presence (---) of 0.25 mM and 2.0 mM free phenylphosphate; (B) free PEP concentration, 2.0 mM in the absence (—) and presence (---) of 0.25 mM and 2.0 mM free phenylphosphate. Standard error conditions were used; error bars for the free PEP, free phenylphosphate, and Mg-PEP concentrations, which were carried as indicated.

observed. In addition, the activities measured at 2.0 mM free PEP (Fig. 3B) were always higher than those at 0.25 mM free PEP (Fig. 3A), both in the absence and in the presence of phenylphosphate, showing that free PEP is in fact an activator of the enzyme. Thus, the positive cooperativity for the binding of PEP found in previous studies by us and others (1, 2, 7, 10) probably arose from the fact that when studying the reaction kinetics using total PEP as the variable substrate at high Mg^{2+} concentrations, the activating molecule, i.e., free PEP, is being increased simultaneously with the substrate, i.e., the Mg-PEP complex. Furthermore, the absence of cooperativity in the binding of Mg-PEP gives additional support to our original hypothesis that the metal-complexed form of PEP is not the activating molecule, otherwise positive cooperativity would have been observed in those experiments in which Mg-PEP was the variable substrate. Note that the concentrations of free Mg^{2+} necessarily increased with those of Mg-PEP. However, these data appear not to have any additional effect of significance on PEP carboxylase reaction, given that straight lines were obtained. Therefore, the affinity of the active site for free Mg^{2+} must be very low indeed.

The degree of activation caused by a given amount of phenylphosphate was lower at 2.0 mM free PEP than that at 0.25 mM free PEP, suggesting that both activators have additive effects and compete for the same sites as postulated by us.

Table I shows the effect of phenylphosphate on the apparent K_m (Mg-PEP) and V_{max} values. At free PEP, 0.25 mM, phenylphosphate caused a marked decrease in apparent K_m . At free PEP, 2.0 mM, this effect is less pronounced, as is to be expected since the apparent K_m value is already considerably lowered by the higher free PEP concentration. Phenylphosphate also produced a considerable decrease in the apparent V_{max} values. Free PEP has the same effect of decreasing the apparent V_{max} , as can be seen by comparing the values of this parameter at 0.25 and 2.0 mM free PEP in the absence of phenylphosphate. Therefore, both ligands behave as inhibitors of the reaction at saturating concentrations of the substrate Mg-PEP. However, we did not observe any changes in apparent V_{max} values when total PEP was used as the variable substrate. Similarly, glucose 6-phosphate and C^{14} H-PEP did not affect V_{max} values when assayed with total PEP, as mentioned above. The reason for this apparent discrepancy may well be that at saturating total PEP levels we also have saturating concentrations of Mg-PEP and of free PEP for the active and regulatory sites, respectively. Thus, the presence of the activator, phenylphosphate in our case, at the concentrations used in those experiments had no additional effect on the apparent V_{max} values. Free phenylphosphate seems to be a slightly more effective regulator of PEP carboxylase activity than free PEP, in the sense that it has a more pronounced effect on apparent K_m and V_{max} values (50% of subsaturating Mg-PEP concentrations, phenylphosphate in excess, the reaction rates more than double an equivalent concentration of free PEP

TABLE I
Effect of Phenylphosphate on the Kinetic Parameters of the PEP Carboxylase-Catalyzed Reaction Using Mg-PEP Complex as the Variable Substrate at Two Fixed Free PEP Concentrations

Free PEP (mM)	Free Phenyl (mM)	K_m Mg-PEP (mM)	V_{max} (total mg prot) ⁻¹
0.25	0.0	6.90	11.64
	0.25	1.74	7.11
	2.0	2.17	6.45
2.0	0.0	1.12	8.12
	0.25	1.05	5.91
	2.0	2.08	6.39
		V_{max} (free mg prot) ⁻¹	
	0.0	1.25	7.43
	2.0	1.33	7.43

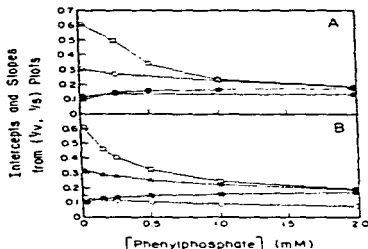


FIG. 4. (A) Replots of slopes (\square) and intercepts (\circ) from the double reciprocal plots in Fig. 1 against the free phenylphosphate concentration at 0.25 (\circ , \square) and 2.0 (\square , \circ) μ M free PEP. (B) Theoretical replot of slopes (\circ , \square) and intercepts (\square , \circ) against the free phenylphosphate concentration as predicted from the model at 0.25 (\circ , \square) and 2.0 (\square , \circ) μ M free PEP concentrations.

Replots of slopes or intercepts from these double reciprocal plots at constant free PEP against phenylphosphate concentrations were hyperbolic (Fig. 4A), as is to be expected for a nonessential activator or for a hyperbolic mixed type inhibitor, depending on which parameter is considered. As predicted, $1/\Delta$ slope, and $1/\Delta$ intercept replots give straight lines when plotted against the reciprocal of phenylphosphate concentration (Fig. 5A). However, since the effector also seems to bind to the catalytic site to some extent, and, thus, can behave as a competitive inhibitor of the reaction, a nonlinear relationship between the reciprocals of the changes in slope and the effector concentration is to be expected at higher phenylphosphate concentrations than those we used. From the secondary $1/\Delta$ intercept and $1/\Delta$ slope replots we determined a limiting apparent V_{max} value of 5.7 μ mol/min/mg protein, a limiting apparent K_m value of 0.91 mM at infinite phenylphosphate concentration, and an activation constant, K_a , of 0.25 mM. It is obvious that these values depend on the concentration of free PEP at which they were determined (0.25 mM in this case).

Effect of Free PEP on PEP Carboxylase Activity

The regulatory role of free PEP on PEP carboxylase activity was confirmed in a separate set of experiments in which we held several free PEP concentrations constant while varying the Mg:PEP concentration. Double-

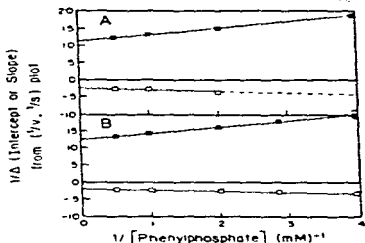


FIG. 5. Secondary replots of the $1/\Delta$ slope (B) and $1/\Delta$ intercept (A) against the reciprocal of free phenylphosphate concentrations. (A, B) Experimental results from Fig. 4A, and (B) predictions from the model discussed in the text.

reciprocal plots (Fig. 6) were linear (r^2 higher than 0.99), apparent K_m values decreased, and apparent V_{max} values slightly increased at first and then decreased as the concentration of free PEP in the assay medium was raised (Table II). Although the affinity of the active site for free

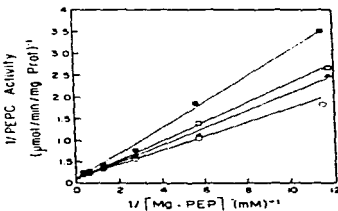


FIG. 6. Double reciprocal plots of initial velocities against Mg:PEP concentrations at the following fixed free PEP concentrations: 0.23 (\square), 0.45 (\circ), 0.91 (\triangle), and 1.70 (\diamond) μ M. Standard assay conditions were used, except for the free PEP and Mg:PEP concentrations, which were varied as indicated.

TABLE III

Effect of Free PEP on the Kinetic Parameters of the PEP Carboxylase Catalyzed Reaction Using Mg-PEP Complex as the Variable Substrate

Free PEP (mM)	K_m Mg-PEP (mM)	V_{max} (pmol/min/mg protein)
0.25	1.14	11.14
0.45	2.49	11.17
0.65	2.19	11.06
1.25	1.56	11.02

Mg²⁺ seems to be very low, as discussed above. The very high concentration of these ions needed to lower the free PEP concentration to very small values while keeping Mg-PEP level close to saturation is thought to be responsible for this latter result, since free Mg²⁺ will always be present at a high enough concentration to bind to the active site, thus, preventing the enzyme from becoming fully saturated. This problem is, as expected, encountered only when studying the effect of free PEP, and hence the differences found in this respect between free PEP and phenylphosphate (compare Tables I and II). Replots of intercepts and slopes from the double reciprocal plot against the concentration of free PEP were nonlinear (Fig. 7A and 7B). It is not possible to make secondary replots of 1/2 slope or 1/3 intercept of these last data, since free PEP always has to be present in the assay medium, thus the velocity data at zero effector concentration are necessarily lacking. Therefore, we cannot obtain the values of apparent constants as we did

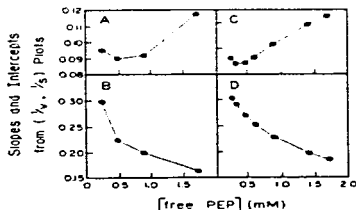


FIG. 7. Replots of slopes C and D) and intercepts (A and B) from the double reciprocal plots against free PEP concentration (A). B) is a permutational result from Fig. 6. C) D) Predictions from the model discussed in the text.

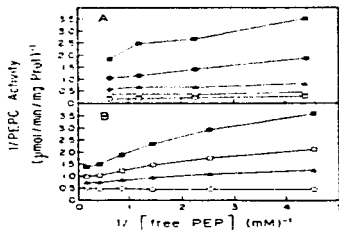


FIG. 8. Effect of free PEP on the PEP carboxylase reaction rate at several fixed Mg-PEP concentrations. (A) The same velocity data as in Fig. 6 were used. Mg-PEP concentrations are as follows: (●) 175 μ M; (○) 175 μ M; (□) 1150 μ M. (B) Predictions from the model discussed in the text at (●) 175 μ M; (○) 175 μ M; and (□) 1150 μ M Mg-PEP fixed concentrations.

before for phenylphosphate. When the data are plotted as the reciprocal of initial velocity against the reciprocal of free PEP at fixed Mg-PEP concentration (Fig. 8A) the similarity between the effect of free phenylphosphate and that of free PEP on PEP carboxylase reaction is again clear.

While this work was in progress, Wadding *et al.* (5) reported that Mg-PEP functions as the substrate of the PEP carboxylase reaction, in agreement with our results. However, they did not detect any effect of free PEP on the reaction rate, probably due to the fact that they varied the free PEP concentration in a different range from curve to curve and that they used a statistical analysis unable to reveal a slight bias. We replotted their data as double reciprocals of initial velocity against Mg-PEP concentration and found not a single straight line, but a family of them.

Reaction Model

Given the results described above, and the data available in the literature, we developed a general rapid equilibrium kinetic model for the mechanism of the reaction catalyzed by PEP carboxylase assuming that (i) the reaction is irreversible, (ii) the enzyme possesses two different types of sites, with different rate constants and different affinities for the ligands (Mg²⁺, PEP, PEP analogs, and their respective complexes), (iii) the binding of any ligand to one site modifies the binding of ligands to

the same or to a different kind of site, and (iv) even though there may be several sites of each type in the enzyme molecule, they are independent and identical, and thus kinetically indistinguishable from single sites. The enzyme is treated as a single substrate enzyme, since HCO_3^- concentrations were always kept well above saturating levels, and it was also assumed that the effector does not affect the binding of HCO_3^- on the $K_1\text{HCO}_3^-$ is independent of the concentration of the other substrate (Mg^{2+} , PEP), and (v) the effect of the ligands on the V_{max} is not due to the fact that a completely different step in the mechanism has become rate determining (35). The kinetic equations that describe the model proposed by us, and the general rate equation for the initial velocity, the hypothetical constants, and the numerical values assigned to them to fit the model to the experimental results are shown in the Appendix. The predictions from our model agree qualitatively and quantitatively well with the results of real experiments, as can be seen by comparing the experimental plots with the theoretical ones. The calculated curves could obviously be made to resemble the experimental curves more exactly by small adjustments of the kinetic constants and interaction parameters. Such adjustment would be irrelevant, since our present interest is only to devise the simplest model that can account for the main features of the reaction, not to obtain quantitative values for reaction parameters. From the numerical values assigned to the set of constants, and from our experimental results, we can make simplifications of the general model and draw the following main conclusions: (i) The affinity of the second site for Mg^{2+} is so low that it can be considered that it only binds the free regulator molecule (PEP or PEP analog), and hence this site cannot be catalytically active, (ii) therefore, the enzyme possesses a regulatory site and an active site, (iii) the affinity of the first site for sites for free PEP and Mg^{2+} is low enough compared to that for Mg-PEP, to consider the latter the preferential substrate of the reaction, and (iv) the binding of ligand to the regulatory site yields a modified enzyme which has lower K_m for Mg-PEP and lower catalytic constant than the unmodified enzyme.

Previous reports of PEP carboxylase can now be interpreted in light of the reaction mechanism that we are proposing here. Thus, as previously discussed, our model accounts (in addition not shown) for the positive homotropic cooperativity in the binding of PEP observed when total PEP is considered the variable substrate of the reaction at constant Mg^{2+} concentrations (7, 8, 10), and for the abolishment of this cooperativity when a high concentration of effector, different from PEP itself, is present during the assay (2, 7, 8, 40). Goshima *et al.* (36) found that the cooperativity in the binding of PEP increases as the fixed Mg^{2+} concentrations at which it is determined increases. Our reaction model also predicts

this result (that is due to the fact that the cooperativity is more marked in a range of relatively low free PEP concentrations, and the effect of increasing Mg^{2+} concentrations at the same total PEP concentrations is to decrease the amount of free PEP). Similarly, the negative cooperativity exhibited by Ca^{2+} -PEP carboxylase in the binding of Mg^{2+} at limited constant PEP concentration (2, 7, 8, 40, 41) is also explainable by the regulatory characteristics of PEP carboxylase described in this paper, and can be simulated by our model (not shown). In effect, as Mg^{2+} concentration increases, so does the concentration of the substrate Mg-PEP, while that of the regulator free PEP decreases. Therefore, the proportion of modified enzyme, and hence the affinity of the enzyme for Mg-PEP, becomes lower and lower as the concentration of this substrate increases, and vice versa. However, when the fixed total PEP concentration is high enough, nearly saturating concentrations of free PEP are present, and the reaction is catalyzed mainly by the modified enzyme; the appearance of negative cooperativity is thus hindered. This is why several authors did not find such cooperativity in the binding of Mg^{2+} (11). On the other hand, the model predicts that high free PEP, PEP analog, or to a much lesser extent, high Mg^{2+} ion concentrations, are inhibitors at subsaturating Mg-PEP concentrations because of the formation of nonproductive complexes through binding to the active site. Thus the free species may behave as competitive inhibitors (Fig. 2B). The concentration range of the free PEP in the assay medium used in our experiments was such that inhibition was not observed but it was observed in the experiment with phenylphosphate when we used a low enough substrate concentration (Fig. 2A). Similarly, it has been reported that high concentrations of other known activators such as glucose 6-phosphate (10), and 3-phosphoglycerate (23) which presumably bind to the active site, abolish the regulatory site and, to a certain extent, the catalytic site, as do the PEP and phenylphosphate, cause inhibition.

CONCLUDING REMARKS

As present we can only guess the physiological significance of the effect of free PEP on PEP carboxylase activity, since we do not know the concentrations of free PEP and that of the Mg-PEP complex prevalent *in vivo* under the different environmental conditions to which the plants are subjected. Presumably the most important and drastic environmental changes to which the plant is exposed are those brought about by the diurnal changes in illumination, which obviously have more important effects on the photosynthetic processes. Thus it is known that private P, dikinase and NADPH malate dehydrogenase, enzymes that precede and follow PEP carboxylase in the C_4 pathway, are light-activated (42). With respect to PEP carboxylase, the ob-

TABLE III
 Description of the Kinetic Model for the PEP Carboxylase Reaction

Enzyme species complex	Velocity constant	Overall dissociation constant	Factors present*
Part I: Enzyme species formed with S (PEP) and M (Mg ²⁺) ions			
E ₀	-	K ₁	
E ₁ S	-	K ₁ K ₂	K ₁ - 1/f ₁
E ₁ M	-	K ₁ K ₃	K ₁ - 1/f ₂
E ₁ MS	-	K ₁ K ₃ K ₄	K ₁ - 1/f ₃
E ₁ S ₂	-	K ₁ K ₂ K ₅	K ₁ - 1/f ₄
E ₁ S ₂ M	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄	K ₁ - 1/f ₅
E ₁ S ₂ M ₂	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₆	K ₁ - 1/f ₆
E ₁ S ₂ M ₂ S	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆	K ₁ - 1/f ₇
E ₁ S ₂ M ₂ S ₂	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇	K ₁ - 1/f ₈
E ₁ S ₂ M ₂ S ₂ M	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈	K ₁ - 1/f ₉
E ₁ S ₂ M ₂ S ₂ M ₂	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈ K ₉	K ₁ - 1/f ₁₀
E ₁ S ₂ M ₂ S ₂ M ₂ S	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈ K ₉ K ₁₀	K ₁ - 1/f ₁₁
E ₁ S ₂ M ₂ S ₂ M ₂ S ₂	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈ K ₉ K ₁₀ K ₁₁	K ₁ - 1/f ₁₂
Part II: Enzyme species formed with A (PEP analog), S (PEP), and M (Mg ²⁺) ions			
E ₀	-	K ₁	
E ₁ A	-	K ₁ K ₂	K ₁ - g ₁
E ₁ S	-	K ₁ K ₃	K ₁ - g ₂
E ₁ AM	-	K ₁ K ₃ K ₄	K ₁ - g ₃
E ₁ A ₂	-	K ₁ K ₂ K ₅	K ₁ - f ₁ g ₁
E ₁ A ₂ S	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₅	K ₁ - f ₂ g ₁
E ₁ A ₂ S ₂	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₅ K ₆	K ₁ - f ₃ g ₁
E ₁ A ₂ S ₂ M	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆	K ₁ - f ₄ g ₁
E ₁ A ₂ S ₂ M ₂	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇	K ₁ - f ₅ g ₁
E ₁ A ₂ S ₂ M ₂ S	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈	K ₁ - f ₆ g ₁
E ₁ A ₂ S ₂ M ₂ S ₂	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈ K ₉	K ₁ - f ₇ g ₁
E ₁ A ₂ S ₂ M ₂ S ₂ M	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈ K ₉ K ₁₀	K ₁ - f ₈ g ₁
E ₁ A ₂ S ₂ M ₂ S ₂ M ₂	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈ K ₉ K ₁₀ K ₁₁	K ₁ - f ₉ g ₁
E ₁ A ₂ S ₂ M ₂ S ₂ M ₂ S	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈ K ₉ K ₁₀ K ₁₁ K ₁₂	K ₁ - f ₁₀ g ₁
E ₁ A ₂ S ₂ M ₂ S ₂ M ₂ S ₂	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈ K ₉ K ₁₀ K ₁₁ K ₁₂ K ₁₃	K ₁ - f ₁₁ g ₁
E ₁ A ₂ S ₂ M ₂ S ₂ M ₂ S ₂ M	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈ K ₉ K ₁₀ K ₁₁ K ₁₂ K ₁₃ K ₁₄	K ₁ - f ₁₂ g ₁
E ₁ A ₂ S ₂ M ₂ S ₂ M ₂ S ₂ M ₂	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈ K ₉ K ₁₀ K ₁₁ K ₁₂ K ₁₃ K ₁₄ K ₁₅	K ₁ - f ₁₃ g ₁
E ₁ A ₂ S ₂ M ₂ S ₂ M ₂ S ₂ M ₂ S	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈ K ₉ K ₁₀ K ₁₁ K ₁₂ K ₁₃ K ₁₄ K ₁₅ K ₁₆	K ₁ - f ₁₄ g ₁
E ₁ A ₂ S ₂ M ₂ S ₂ M ₂ S ₂ M ₂ S ₂	-	K ₁ K ₂ K ₃ K ₄ K ₅ K ₆ K ₇ K ₈ K ₉ K ₁₀ K ₁₁ K ₁₂ K ₁₃ K ₁₄ K ₁₅ K ₁₆ K ₁₇	K ₁ - f ₁₅ g ₁

* Most numerical values assigned to the constants g_1 to g_{15} in the experimental results are given in Table IV. Values for the other constants were $K_1 = 5 \times 10^4$, $K_2 = 10^4$ for most, $K_3 = 10^5$ for some, $f_1 = 10^4$, $f_2 = 10^3$, $f_3 = 10^2$, $f_4 = 10^1$, $f_5 = 10^0$, and f_6 were zero; $f_7, f_8, f_9, f_{10}, f_{11}, f_{12}, f_{13}, f_{14}, f_{15}$ were equal to 1, and finally, f_{16} was equal to g_1 or g_2 , with Mg present.

ject of this study, it has recently been found that its state of activation is subjected to short-term regulation by light (43, 44-45), and that phosphorylation-dephosphorylation of the enzyme molecule mediates this regulation (44-47). However, the extent of the light-activation and dark inactivation found, although significant, is not as important as was expected.

In going from darkness to light, a marked increase in the synthesis of PEP is obtained through the light activation of pyruvate *P.* dikinase. This increase in substrate concentration would cause an increase in the reaction rate of any enzyme that follows Michaelis-Menten

kinetics. However, since Mg-PEP is the real substrate of the reaction, a concomitant increase in the availability of Mg²⁺ would be necessary to effectively increase the substrate concentration, unless the free metal ion concentration is well in excess of that of free PEP. The latter possibility seems very unlikely, given that many of the intracellular metalolites chelate metal ions. In addition, there is no indication that any increase in Mg²⁺ happens in the cytoplasm at the onset of illumination. Therefore, we think that the concentration of cytoplasmic free Mg²⁺ may be low and limiting. Thus, the increased production of PEP would mainly bring about a

TABLE IV
Description of the Interaction Factors* Considered in the Kinetic Model for the PEP Carboxylase Reaction

$f_1 = S \square S^* M \square 2P$	$f_2 = S \square M \square 0 \square 0$	$f_3 = \square S^* M \square 0 \square 0$
$f_4 = M \square S \square 0 \square 0$	$f_5 = M \square S \square 1$	$f_6 = M \square M \square 1$
$f_7 = S \square M \square 1$	$f_8 = M \square S \square M \square 1$	$f_9 = MS \square M \square 1$
$f_{10} = MS \square S \square 1$	$f_{11} = MS \square S \square M \square 1$	$g_1 = A \square A \square 2P \square 0$
$g_2 = S \square A \square 1$	$g_3 = A \square S \square 2P \square 0$	$g_4 = \square A \square M \square 0 \square 0$
$g_5 = M \square A \square 1$	$g_6 = A \square M \square 0 \square 0$	$g_7 = M \square \square A \square 1$
$g_8 = S \square A \square M \square 1$	$g_9 = A \square S \square M \square 1$	$g_{10} = MS \square \square A \square 1$
$g_{11} = MA \square S \square 1$	$g_{12} = M \square MA \square 1$	$g_{13} = MA \square M \square 1$
$g_{14} = A \square M \square A \square 1$	$g_{15} = MA \square A \square 1$	$g_{16} = MA \square \square M \square 1$
$g_{17} = MS \square A \square M \square 1$	$g_{18} = MA \square \square M \square 1$	

* We represent these interactions by arrows (\square) between the ligands that participate in them.

^b The lines represent the enzyme and the left and right sides of \square represent the first and the second site, respectively.

^c Numerical value given to the factors to fit the model to experimental results.

rise in the free PEP levels, and therefore, a quick and extensive increase in the reaction rate, even though the level of the substrate remains constant or slightly increases. In addition, the phosphorylation of the enzyme molecule induced by light must affect its sensitivity to free PEP, as found in the case of glucose 6-phosphate (41-43), which we believe binds to the same regulatory site. In the dark the production of PEP by pyruvate, *P*, dikinase is arrested, resulting in low free PEP and Mg-PEP concentrations. Consequently, the affinity of PEP carboxylase for its substrate (Mg-PEP) will be very low, which together with the low substrate concentration will result in a virtually inactive PEP carboxylase during the night. In this way both activation processes, that of pyruvate, *P*, dikinase and of PEP carboxylase, although taking place in different cellular compartments, will be synchronized.

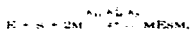
Obviously, it is necessary to carry out new experiments taking into account the mechanism of reaction reported here to confirm the last hypothesis and to properly evaluate the extent of light activation and dark inactivation of this enzyme.

APPENDIX

Mathematical Description of the Kinetic Model for the PEP Carboxylase Reaction

This is a general model for an allosteric enzyme with two different interacting sites, both able to bind S (free substrate, PEP), M (free metal cofactor, Mg^{2+}), A (free substrate analog, phenylphosphate), M-S (complex of metal and substrate, Mg-PEP), and M-A (complex of metal and substrate analog, Mg-phenylphosphate). For the sake of simplicity the model is described assuming

that both sites have identical intrinsic dissociation constants for the substrate (K_1), for the metal (K_M), and for the substrate analog (K_A). These constants are multiplied by appropriate factors that account for the differences in affinities for these ligands between the two sites. These factors, called by us affinity ratios, are f_1 , f_2 , and g_1 for Mg^{2+} , substrate, and activator, respectively. In addition they may be affected by interaction factors, which are numerical values expressing the times that a dissociation constant decreases or increases as a result of the interactions arising when more than one ligand is bound to the enzyme (see Table IV). Similarly, we have assumed that all the productive enzyme-ligand complexes have the same catalytic constant, which, when appropriate, is multiplied by a velocity factor to account for the differences in catalytic efficiency between the corresponding enzyme-ligand complex and the reference complex (ESM) (see Table III). The model considers 48 different enzyme-ligand complexes and the concentration of each can be described by the use of the corresponding overall dissociation constant (see Table III). For instance, when considering the complex MES, we introduce the overall dissociation constant $K_1^* K_M^* K_A^*$, corresponding to the equilibrium,



where K_1^* is a dimensionless number composed of the product of all affinity and interaction factors appearing when this enzyme-ligand complex is formed (Table IV), i.e., $K_1^* = f_1 f_2 f_3 f_4 f_5 f_6 f_7 f_8 f_9$, f_i being the ratio of the affinity of the first site to the affinity of the second site for the free metal; f_i being a factor that explains the additional

binding strength brought about by the simultaneous binding of S and M to the first site, f_1 and f_2 being factors which represent the interactions that appear between the metal bound to the second site and, respectively, the metal and the substrate present in the first site, and finally, f_3 , accounting for an additional change in the binding strength due to the simultaneous presence of M at the first site and MS at the second site.

The final equation obtained under the rapid equilibrium assumption in the Michaelis-Menten form is the

$$v = \frac{V_{max} [S] [M] D}{K_M K'_M S_0 + [S] [M] N_1} \quad (11)$$

$$D = \left[\frac{1}{K_M} + \frac{V_1}{K'_M} + \left(\frac{V_2}{K'_M} + \frac{V_3}{K''_M} \right) \right] + \left(\frac{V_4}{K'_M} + \frac{V_5}{K''_M} \right) + \left(\frac{V_6}{K'_M} + \frac{V_7}{K''_M} \right) + \left(\frac{V_8}{K'_M} + \frac{V_9}{K''_M} \right) \quad (13)$$

$$N_1 = \frac{1}{K_M} + \frac{1}{K'_M} + \frac{1}{K''_M} + \left(\frac{1}{K'_M} + \frac{1}{K''_M} \right) + \left(\frac{1}{K'_M} + \frac{1}{K''_M} \right) + \left(\frac{1}{K'_M} + \frac{1}{K''_M} \right) + \left(\frac{1}{K'_M} + \frac{1}{K''_M} \right) \quad (14)$$

$$N_2 = 1 + \left(1 + \frac{1}{K'_M} + \frac{1}{K''_M} \right) + \left(1 + \frac{1}{K'_M} + \frac{1}{K''_M} \right) + \left[1 + \frac{1}{K'_M} + \frac{1}{K''_M} + \left(\frac{1}{K'_M} + \frac{1}{K''_M} \right) \right] + \left[\frac{1}{K'_M} + \frac{1}{K''_M} + \frac{1}{K'_M} + \frac{1}{K''_M} + \left(\frac{1}{K'_M} + \frac{1}{K''_M} \right) \right] + \left(\frac{1}{K'_M} + \frac{1}{K''_M} \right) \quad (15)$$

where $\rho = [S]/K_M$, $\omega = [M]/K_M$, and $\alpha = [A]/K_A$.

REFERENCES

1. Camlin, J. B., Balch, C. W., and Baker, A. (1977) *Planta* 110, 95-107.
2. Huber, S. C., and Edwards, G. E. (1975) *Canad. J. Bot.* 53, 1925-1931.
3. Wong, K. F., and Evans, D. D. (1971) *Biochem. J.* 131, 451-454.
4. Selimov, E., Karabornova, G., Manova, Y., and Gavrilov, S. A. (1965) *J. Plant Physiol.* 121, 351-360.
5. Gonzalez, D. H., Iglesias, A., and Andron, C. S. (1967) *Biochem. J.* 241, 583-588.
6. Jenkins, C. L. D., Harris, R. L. N., and McFadden, H. G. (1967) *Biochem. Ind.* 12, 619-625.
7. Hoshino, S., Matsunaga, K., and Sugawara, T. (1961) *Plant Physiol.* 37, 113-118.
8. Ueda, K., and Sugawara, T. (1976) *Plant Physiol.* 57, 960-961.
9. Sotomura, M., and Lohmeyer, N. (1963) *Photosynthetica* 19, 177-182.
10. Rodriguez-Sotelo, R., and Munoz-Clares, R. A. (1967) *J. Plant Physiol.* 129, 361-369.
11. O'Leary, M. H. (1962) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 297-315.
12. Gonzalez, D. H., and Andron, C. S. (1967) *Biochemica* 27, 177-183.
13. Jenkins, C. L. D., Harris, R. L. N., and McFadden, H. G. (1967) *Biochem. Ind.* 14, 219-226.
14. Gonzalez, D. H., and Andron, C. S. (1966) *Eur. J. Biochem.* 173, 319-343.
15. Gonzalez, D. H., and Andron, C. S. (1966) *Biochem. J.* 263, 217-222.
16. Meyer, C. H., Kustin, P., and Wadding, R. T. (1966) *Plant Physiol.* 40, 325-326.
17. Wolf, F., and Hutton, C. E. (1957) *J. Biochem. Chem.* 227, 801-812.
18. Korth, N., and Sucha, L. (1968) *Handbook of Chemical Equilibria in Analytical Chemistry*, pp. 111-176. Ellis Horwood, London.
19. Segrest, E. P., and Demers, R. (1979) *Ionization Constant of Organic Acids in Aqueous Solutions*, IUPAC Chemical Data Series No. 3, p. 221. Pergamon Press, New York.
20. O'Sullivan, W. J., and Simons, J. W. (1979) in *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P., and Kaplan, N. O., Eds.), Vol. 61, pp. 284-316. Academic Press, New York.
21. Storey, A. C., and Cornish-Bowden, A. (1976) *Biochem. J.* 159, 1-5.
22. Morrison, J. F. (1976) in *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P., and Kaplan, N. O., Eds.), Vol. 61, pp. 257-266. Academic Press, New York.
23. Mikhlin, S. K. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 162, 343-351.
24. Handberg, R. S., and Greiner, C. M. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 741-746.
25. Tchen, T. T., and Vennesland, H. (1955) *J. Biol. Chem.* 215, 533-546.
26. Maruyama, H., and Lane, M. D. (1962) *Biochem. Biophys. Acta* 68, 207-214.
27. Miller, R. S., Mielhan, A. S., Chang, H. Ch., Festerday, R. L., Maruyama, H., and Lane, M. D. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 6030-6040.

26. Mukerji, H. M., Nimmak, T., and Midwan, S. S. (1974) *Arch Biochem Biophys* **143**, 376-380.
29. Mukerji, S. K. (1974) *Plant Sci Lett* **2**, 243-248.
30. Mukerji, S. K. (1977) *Arch Biochem Biophys* **162**, 343-351.
31. O'Leary, M. H., Hafe, J. E., and Slater, J. D. (1980) *Biochemistry* **20**, 7368-7374.
32. Duggleby, R. G., and Dennis, D. T. (1970) *J. Rad. Chem.* **24B**, 3745-3750.
33. Nguyen, T. T., Ngam, F. A., Jenkins, J., and Connor, S. D. (1986) *Plant Physiol* **80**, 104-107.
34. Wadding, R. T., and Black, M. K. (1986) *Plant Physiol* **87**, 443-446.
35. Wadding, R. T., Kustin, P., Meyer, C. R., and Black, M. (1984) *Plant Physiol* **80**, 976-979.
36. Frenkel, C. (1964) *J. Rad. Chem.* **23B**, 3522-3535.
37. Bradford, M. M. (1976) *Anal Biochem* **72**, 248-254.
38. Corns, J., Maw, S. L., and Radley, C. W. (1974) *Planta* **117**, 279-292.
39. Mukerji, S. K., and Ting, I. P. (1971) *Arch Biochem Biophys* **143**, 297-314.
40. Wu, M. S., Zhu, J. J., and Shi, J. S. (1980) *Acta Physiol Sin.* **6**, 37-40.
41. Hulse, S. C., and Sivasubramanian, T. (1986) *Plant Physiol* **81**, 674-677.
42. Rodriguez-Sotres, R., Lopez-Ferns, R., and Munoz-Clares, R. A. (1987) *J. Plant Physiol* **128**, 183-189.
43. Doncaster, H. D., and Longland, R. C. (1987) *Plant Physiol* **84**, 82-87.
44. Nimmak, T., McNaughton, G. A., Ferman, L., Wilkins, M. H., and Nimmak, H. G. (1987) *FEBS Lett* **213**, 19-22.
45. Guardia-Olivares, M. T., Vidal, J., Le Marchal, P., Thomas, M., Gadal, P., and Remy, R. (1986) *Nature* **70**, 769-772.
46. Jun, J. A., and Chollet, R. (1986) *Arch Biochem Biophys* **241**, 409-417.
47. Jun, J. A., and Chollet, R. (1988) *Arch Biochem Biophys* **269**, 526-535.
48. Edwards, G. E., Nakamoto, H., Barnwell, J. N., and Hatch, M. D. (1985) *Annu. Rev. Plant Physiol* **36**, 255-298.
49. Nishimura, M., and Leblond, S. (1963) *Photochem Acta* **17**, 378-385.

ARTÍCULO 2.

THE pH DEPENDENCE OF THE REGULATION OF MAIZE LEAF
PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE BY FREE PHOSPHOENOLPYRUVATE.

POR

*Rogelio Rodríguez Sotres, Hireya Rodríguez Penagos y Rosario A.
Muñoz Clarez.*

Sometido a revisión para su publicación.

The pH-dependence of the Regulation of Maize
Leaf Phosphoenolpyruvate Carboxylase by Free Phosphoenolpyruvate.

by

Rogelio Rodríguez-Sotres, Mireya Rodríguez-Penagos and
Rosario A. Muñoz-Clares¹

Departamento de Bioquímica, División de Bioquímica y Farmacia,
Facultad de Química, UNAM, 04510, México City, México

Short Title:

Kinetics of Maize Leaf Phosphoenolpyruvate Carboxylase.

Correspondence and proofs to:
Dr. R. A. Muñoz-Clares (address above).

Subject category:
Enzyme mechanisms and metabolic regulation.

Key words:
Leaf, *Zea mays* L., phosphoenolpyruvate carboxylase,
phosphoenolpyruvate regulation, pH-dependence.

¹To whom correspondence should be addressed.

ABSTRACT

We investigated the effect of free phosphoenolpyruvate (PEP) on the apparent kinetic parameters of the reaction catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxylase, purified from maize leaves, over the pH range 6.4-8.8. Steady state initial velocity studies were conducted using Mg-PEP as the variable substrate at saturating HCO_3^- and several fixed free PEP concentrations. At any of the pH tested, the data were consistent with a kinetic mechanism for this reaction in which Mg-PEP is the preferential substrate and free PEP an effector that can bind to both the regulatory and the active sites. The maxima effects of free PEP were observed at pH 7.0 and 7.3, where raising its concentration from 0.23 to 3 mM caused two- and five-fold decreases in apparent V_{max} and $K_m(\text{Mg-PEP})$, respectively, and two-fold increases in $V_{\text{max}}/K_m(\text{Mg-PEP})$. Changing the pH of the assay media from 7.0 to 7.5 brought about similar increases in these parameters at 0.23 mM free PEP, and two-fold increases in V_{max} and $V_{\text{max}}/K_m(\text{Mg-PEP})$ at 3mM free PEP. The V_{max} and V_{max}/K_m versus pH profiles showed several ionizable groups, presumably histidines and cysteines, involved in catalysis and/or binding either of the substrate or the effector. Interestingly, increasing free PEP concentrations resulted in a shift of some of the pKs observed in the physiological pH range. The possible relevance of these data in the understanding of the *in vivo* operation of this photosynthetic enzyme is here discussed.

INTRODUCTION

It is known from *in vitro* studies that the following kinetic properties of the photosynthetic enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEP carboxylase², EC 4.1.1.31) from maize leaves are pH sensitive: 1) the K_m values for PEP decrease and the V_{max} increases as the pH increases from 7.0 to 8.0 (1); 2) the kinetics of saturation by PEP shows homotropic positive cooperativity at pH values around 7.0, while it is Michaelian at pH values around 8.0 (1,2); 3) the extent of activation by glycine (3,4) and Gluc-6-P (4-7), and of inhibition by malate (5,6,8), were lower at pH around 8.0 than at neutral pH; 4) the pattern of malate inhibition changed from competitive at pH 7.0 to non competitive at pH 8.0 (8).

However, only a few kinetic studies on the enzyme aiming to detect the ionizable groups participating in catalysis and binding of substrates have been reported to date (9-12). From these studies, it has been suggested that V_{max} was pH-independent over the range 6.5.-10 (9-11), and that group(s) of pK about 7.5, probably imidazole (10), and of pK about 8.5, probably cysteine (12), are involved in the binding of PEP and Mg^{+2} . However, these studies were performed using total PEP as the variable substrate and low, fixed concentrations of Mg^{+2} , so there were not saturating conditions throughout the pH range. Since we have recently found that maize leaf PEP carboxylase uses the complex Mg-PEP as the preferential substrate, while free PEP is an effector of this activity (13), it seems necessary to reinvestigate the effect of pH on the kinetics of this enzyme using in the initial velocity assays controlled concentrations of Mg-PEP and free PEP. Here we report a more complex pH-dependence of the PEP carboxylase activity that thought before, and discuss the possible implications of our findings for the *in vivo* regulation of this enzyme by free PEP and pH.

2
Abbreviations used: PEP carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase; PEP, phosphoenolpyruvate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; Gluc-6-P, glucose 6 phosphate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PEG, polyethylene glycol; PIPES, Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid]; SDS, sodium dodecyl sulfate.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and biochemicals

PEP (monocyclohexylammonium salt), β -NADH (disodium salt), porcine heart malic dehydrogenase, rabbit muscle lactic dehydrogenase, PEP (average molecular wt 6000), Piperazine N,N bis [2-ethanesulfonic] acid (PIPES), benzamidine-HCl, 2-mercaptoethanol, and insoluble polyvinylpyrrolidone (average molecular wt 40,000) were purchased from Sigma Chemical Co. EDTA (disodium salt) and triethanolamine free base were from Merck. Sephacryl S-300 was from Pharmacia. Hydroxylapatite Biogel (grade protein) was from BioRad Laboratories. All other chemicals of analytical grade were from standard suppliers.

PEP carboxylase extraction and purification

The enzyme was obtained from leaves of maize (*Zea mays* L. c.v. Chalqueño) grown under the conditions described previously (13). The isolation and purification procedure were reported in the same paper. The PEP carboxylase preparation obtained had a purity of at least 95% as determined by SDS-PAGE using Coomassie Brilliant Blue as stain, and had a specific activity of 10-13 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein, as determined by the standard assay described below.

PEP Carboxylase assay

During the course of enzyme purification, PEP carboxylase was determined spectrophotometrically by the standard assay at 30°C in 1-ml reaction mixture containing 100 mM triethanolamine-HCl pH 8.3, 11 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 5 mM PEP, 0.2 mM NADH, and 4 units of malic dehydrogenase. Lactic dehydrogenase was not included in these assays since during the first steps of the purification procedure the phosphatase activity does interfere with the assay. For the kinetics experiments the assay mixture was similar to the one mentioned above, except for the following: i) 0.024 units of PEP carboxylase were used in all the assays; ii) we used 100 mM triethanolamine buffer over the pH range 7.0 to 8.8, and 50 mM PIPES buffer, adjusted with triethanolamine to the desired pH, over the range 6.4 to 7.0; iii) 2 units of lactic dehydrogenase were also included in the assay media; and iv) the enzyme was assayed at several Mg-PEP and free PEP concentrations, calculated

at each pH using the reported stability constants (14) and a computer program described before (13). The ionization constants for EDTA, HCO_3^- , and PEP were expressed as overall stability constants in order to include the concentration of H^+ into the calculations. This procedure was preferred to the calculation of apparent stability constants for the metal-ligand complexes at each pH for two reasons: the same overall stability constants are used at any pH considered, and the distribution of protonated and nonprotonated metal complexes and free species for each compound at every pH are given by the program. The initial velocity studies at the different free PEP and H^+ concentrations were conducted by varying Mg-PEP concentrations over a specific range relative to each apparent K_m , when possible. At some pH values, the concentrations of total Mg required to give saturating or near saturating Mg-PEP conditions while holding a low free PEP concentration were so high that if included in the assay medium the ionic strength would have been unreasonably high and the calculations of the activity of the ionic species uncertain. Therefore, we found experimental limits to the concentrations of free PEP and Mg-PEP that could be used. Buffers agents were chosen because of their low ability to chelate metal ions (15). To rule out any effect of the buffer, the experiments at pH 7.0 were performed in duplicate using the two buffers. The pH of the solutions was checked before and after the measurements.

Protein determination

Protein was determined according to a modification of the method of Bradford (16), previously described (17).

Determination of the pH stability of PEP carboxylase

To determine the stability of the enzyme over the pH range at which the initial velocity experiments were performed, 0.024 units of PEP carboxylase were preincubated at 30° C for five minutes, the time usually required to perform the assays. In the whole reaction mixture containing 0.2 or 3 mM free PEP and in the absence of Mg^{2+} . After 5 min preincubation, the reaction was started by the addition of the appropriate amounts of total PEP and total Mg to give final concentrations of 3 mM free PEP and 3.3 mM Mg-PEP.

Data analysis

Apparent V_{max} and $K_m(\text{PEP-Mg}^-)$ values were obtained from double reciprocal plots by weighted linear regression of the experimental data. The kinetic constants thus obtained were fitted to the kinetic model for PEP carboxylase by nonlinear regression as described by Canela (18). The kinetic model used was essentially the one previously described by us (13), but it was simplified by elimination of the equilibria that represented the binding of Mg^{2+} to the regulatory site, since, as concluded in the above cited paper, these steps do not take place in the PEP carboxylase reaction. The final velocity equation obtained for the simplified model is the following:

$$v_{30} = \frac{V_{max} \cdot [\text{Mg-PEP}^-] \cdot D}{(K_M \cdot K_{PEP} \cdot K_0) \cdot N_s + [\text{Mg-PEP}^-] \cdot N_i} \quad (1)$$

Where K_M and K_{PEP} are the dissociation constants for Mg^{2+} and PEP^{3-} , respectively, and K_0 is the overall stability constant for the Mg-PEP^- complex. D , N_s and N_i are given by the following equations:

$$D = \frac{1}{K_5} + \left(\frac{V_2}{K_6} \right) \cdot \frac{[\text{PEP}]}{K_{PEP}} \quad (2)$$

$$N_s = 1 + \left[1 + \frac{1}{K_3} + \frac{1}{K_1} \cdot \frac{[\text{PEP}]}{K_{PEP}} \right] \cdot \frac{[\text{PEP}]}{K_{PEP}} \quad (3)$$

$$N_i = \frac{1}{K_5} + \frac{1}{K_7} + \left(\frac{1}{K_9} \right) \cdot \frac{[\text{PEP}]}{K_{PEP}} + \frac{K_{PEP}}{[\text{PEP}]} \quad (4)$$

The meaning of the other parameters included in these equations was given in the previous paper (13). The indexes used here are the same as before to avoid any confusions.

RESULTS AND DISCUSSION.

Effect of pH on the Regulation of PEP Carboxylase Activity by Free PEP

We have previously reported that at pH 7.0 free PEP is an effector of PEP carboxylase, decreasing apparent V_{max} and $K_m(\text{Mg-PEP})$ values (13). We now investigated whether this regulatory role of free PEP operates also at other pH values. Steady state initial velocity studies were conducted over a pH range from 6.4 to 8.8, using Mg-PEP as the variable substrate at saturating HCO_3^- and several fixed free PEP concentrations. Altogether 10 experiments were performed, each one comprising duplicate assays at seven concentrations of Mg-PEP at each of five concentrations of free PEP. All reciprocal plots were linear (r^2 higher than 0.99, data not shown) and gave patterns that intersected to the right of the ordinate and above the abscissa. Replots of the apparent V_{max} , $K_m(\text{Mg-PEP})$, and $V_{max}/K_m(\text{Mg-PEP})$ values obtained from these reciprocal plots versus free PEP concentration are shown in Fig. 1, 2 and 3, respectively. The data fit theoretical curves reasonably well. These curves were obtained by giving theoretical values to the parameters of equation (1), (2), (3) and (4) described under Materials and Methods. So, the kinetic model proposed by us for the PEP carboxylase reaction seems to apply in the whole pH range studied. That is to say, Mg-PEP is the preferential substrate of the enzyme, while free PEP is an effector of this activity. We can not conclude from our studies whether the dianionic or the trianionic forms of free PEP, or both, bind to the regulatory site of the enzyme, given that both forms are present in our assay media in a constant proportion at each pH (due to the fact that free PEP trianion and H^+ concentrations were held constant). What is definitively true is that the trianionic form is the only one that complexes with Mg^{2+} (19) forming the preferential substrate of the reaction (13). It has to be noted that in some cases, for instance at pH 6.7, free PEP decreased or increased a kinetic parameter when its concentration rose up to certain value, but had an opposite effect at concentrations above that. This result is predicted by this kinetic model, and is not difficult to understand if we consider

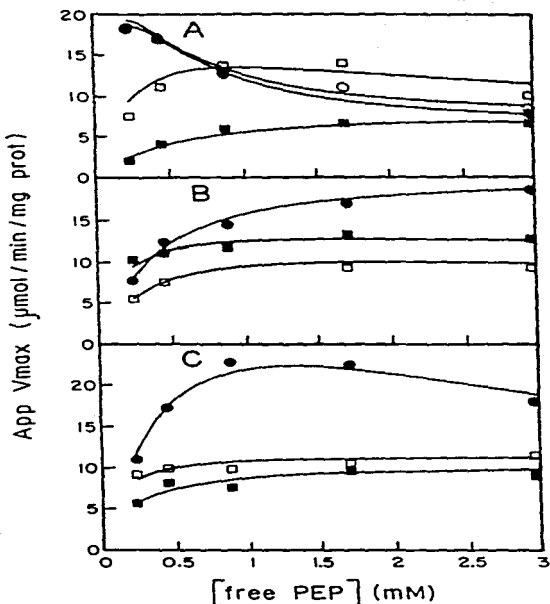


Figure 1. Effect of free PEP on V_{max} at the following pH values: A) 6.4 (■), 6.7 (□), 7.0 (●), 7.3 (○); B) 7.5 (■), 7.65 (□), 7.8 (●); C) 8.0 (■), 8.3 (□), 8.8 (●). The assay conditions were described under Materials and Methods. The points shown are the experimentally determined values, while the curves are theoretical from a fit of the data, as discussed under Materials and Methods.

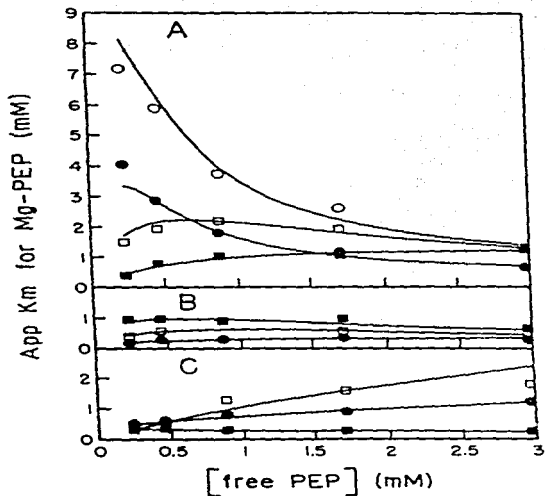


Figure 2. Effect of free PEP on $K_m(\text{Mg-PEP})$ at the following pH values: A) 6.4 (■), 6.7 (□), 7.0 (○), 7.3 (●); B) 7.5 (■), 7.65 (□), 7.8 (●); C) 8.0 (■), 8.3 (□), 8.8 (●). The points shown are the experimentally determined, while the curves are theoretical from a fit of the data, as discussed under Materials and Methods.

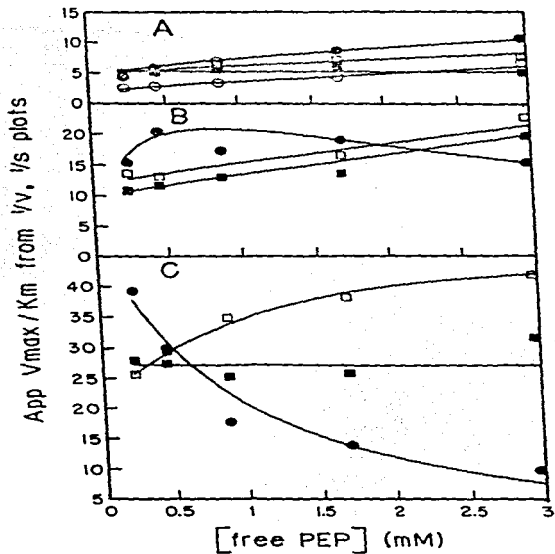


Figure 3. Effect of free PEP on $V_{max}/K_m(\text{Hg-PEP})$ at the following pH values: A) 6.4 (■), 6.7 (□), 7.0 (●), 7.3 (○); B) 7.5 (■), 7.65 (□), 7.8 (●); C) 8.0 (■), 8.3 (□), 8.8 (●). The points shown are the experimentally determined, while the curves are theoretical from a fit of the data, as discussed under Materials and Methods.

that free PEP may bind also to the active site at any pH, and so we always observe the result of the combination of some activating and some inhibiting effects. The extent of inhibition or activation would thus depend upon the concentration of the effector, the relative affinity of this effector for the regulatory and active sites at each pH, and finally upon the degree of saturation of the enzyme by its substrate, which in turn affect the binding of the effector to both sites. Thus, theoretical simulation of the effect of free PEP on the kinetic parameters may give curves of that kind.

While this manuscript was in preparation, Jawali (20) proposed a concerted sequential model for the PEP carboxylase reaction involving subunit interactions. Our experimental data can not be explained by this model, since our enzyme preparation did not show any histeretic behavior, and no positive cooperativity for Mg-PEP was observed, as it would be expected if such a concerted sequential model applies to the reaction kinetics.

The same kinetic data shown in Figs. 1, 2 and 3 are also plotted as intersects, $K_m(\text{Mg-PEP})$ and slopes versus pH in Figs. 4, 5 and 6, respectively, in order to depict better the gradual changes in these values that took place when free PEP concentration is increased in the assay medium.

As can be seen, the effect of free PEP on the kinetics of the reaction is clearly dependent on the pH of the assay in a qualitative and quantitative manner. Thus, at pH 6.4 and 6.7 and over the range from 7.5 to 8.8, the effect of raising the free PEP concentration from 0.23 to 3mM was to increase app V_{max} values, up to three times at pH 6.4, while at pH 7.0 and 7.3 this parameter decreased about two times (Figs. 1, and 4), in agreement with the previous report for pH 7.0 (13). App $K_m(\text{Mg-PEP})$ values increased as the concentration of free PEP rose, at pH 6.4 and above 7.65, while markedly decreased, more than five times, at pH 7.0 and 7.3 (Figs. 2 and 5). It has to be noted that at these two latter pHs the app values for $K_m(\text{Mg-PEP})$ are very high, particularly at the lowest free PEP concentration, where they are 4.1 mM and 7.2 mM respectively, four and seven times higher than at pH 7.5. As the free PEP concentration increases, the differences at this respect between these pH values became lower and lower. In fact, at 3 mM

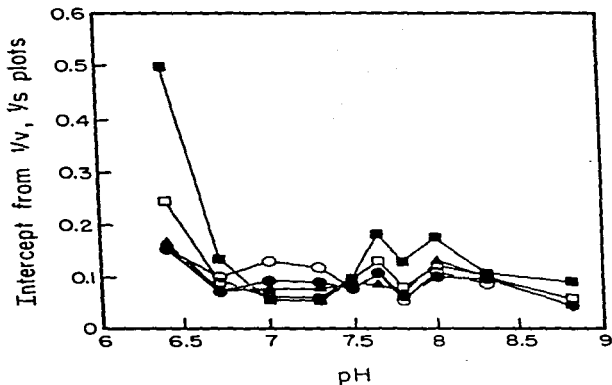


Figure 4. Effect of pH on the intercepts from double reciprocal plots at the following free PEP concentrations: 0.23 mM (■), 0.4 mM (□), 0.9 mM (▲), 1.8 mM (●) and 3 mM (○). The data are the same as those in Fig. 1.

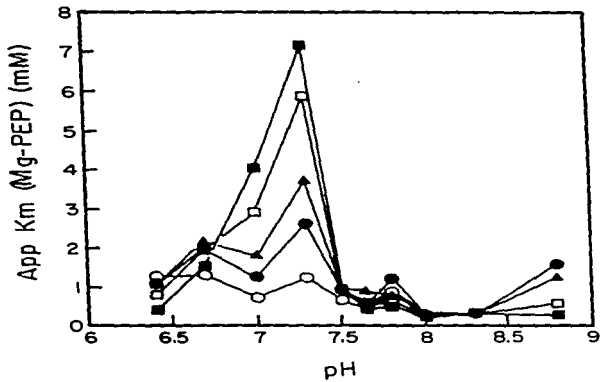


Figure 5. Effect of pH on $K_m(\text{Mg-PEP})$ from double reciprocal plots at the following free PEP concentrations: 0.23 mM (■), 0.4 mM (□), 0.9 mM (▲), 1.8 mM (●) and 3 mM (○). The data are the same as those in Fig. 2.

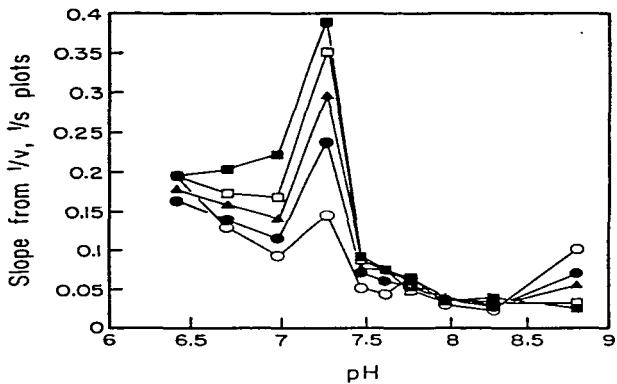


Figure 6. Effect of pH on the slopes from double reciprocal plots at the following free PEP concentrations: 0.23 mM (■), 0.4 mM (□), 0.9mM (▲), 1.8 mM (●) and 3 mM (○). The data are the same as those in Fig. 3.

free PEP little or no differences were found over the pH range 6.4-7.5. Therefore, the degree of saturation of the enzyme at a given Mg-PEP concentration is dependent on the pH and/or the free PEP concentration.

As a result of the effects just described, free PEP increased the app $V_{max}/K_m(\text{PEP-Mg})$ at any of the pH tested, except at pH 7.8, where it had a complex effect, and at pH 8.8, where it decreased this parameter. The largest increases were observed at pH 7.0 and 7.3, more than two times, and the smallest at pH 6.4 and 8.0, where the increases were almost negligible (Figs. 3 and 6).

In summary, at the physiological pHs 7.0 and 7.3 the effect of free PEP on the carboxylase kinetics was significantly different than at any other of the pH values tested, not only quantitatively but also qualitatively. This fact may be relevant to the *in vivo* regulation of this enzyme by this effector and/or by pH.

In addition, the great differences in the $K_m(\text{Mg-PEP})$ values found between pH 7.0 and 7.5 may well have physiological significance in the short-term regulation of PEP carboxylase by light. It is known that the activity of this cytoplasmic enzyme is modulated by the diurnal changes in its environment brought about by the light-dark cycles (6,17,21-24). To our knowledge, there is no direct evidence of changes in the cytoplasmic pH of maize mesophyll cells following illumination. However, it is likely that such changes take place, as it happens in other photosynthetic cells, in which light induces alkalization of the cytoplasm of about 0.5 units of pH (25-27). If this were the case, our findings give experimental support to the hypothesis that changes in both factors, free PEP concentration and cytoplasmic pH, may contribute to bring about the necessary light-activation and dark-inactivation of maize PEP carboxylase, since, at 0.23 mM free PEP, the observed decreases in $K_m(\text{Mg-PEP})$ brought about by an increase of 0.5 units in the physiological range of pH, i.e. from 7.0 to 7.5, are similar to those brought about by an increase in free PEP concentration from 0.23 to 3 mM. On the other hand, it is most likely that the light-induced phosphorylation of this enzyme (28-30) affects its sensitivity to free PEP. Although the enzyme used in this work was obtained from plants subjected to natural illumination in a greenhouse for at least three hours before the

extraction, no care was taken to preserve the phosphorylated day-form during the purification procedure. Because of that, we have now undertaken the kinetic study of the day- and night-form in order to better understand the role that these two factors may play in the short-term regulation of PEP carboxylase by light. It is interesting to note that the homotropic positive cooperativity for total PEP found in maize leaf PEP carboxylase by several authors at pH 7.0, and not at pH 8.0 (1,2), may be explained by the very different sensitivity of the enzyme to free PEP at these two pH values described here. Thus, at pH 7.0 sigmoidal saturation curves will be observed if total PEP is varied at fixed Mg^{2+} concentrations, as a result of the simultaneous increase in both substrate (Mg-PEP) and activator (free PEP) concentrations. However, at pH 8.0 the same increase in effector concentration would have little effect on the kinetics of the reaction, and therefore Michaelian kinetics will be observed. To exemplify this point, we made simulations of the kinetic behavior of PEP carboxylase at pH 7.0 and 8.0 considering the kinetic parameters obtained from our experimental data and the same assay conditions reported by Uedan and Sugiyama (1), i.e., total PEP as the variable substrate in a concentration range from 0.05 to 7 mM and a fixed concentration of 10 mM total Mg^{2+} . A comparison of the kinetic constants obtained by this simulation to the reported ones is given in Table 1.

TABLE I

Comparison between the reported and the calculated Kinetic parameters for maize leaf PEP

	pH	Hill Coefficient	K_m (PEP)	V_{max}
			(mM)	(units)
Reported	7.0	1.80	2.60	80.6
	8.0	1.20	1.16	193.6 (2.40)
			(mM)	($\frac{\text{units}}{\text{mg prot}}$)
Calculated	7.0	1.70	1.60	7.5
	8.0	1.01	1.09	10.4 (1.40)

(*) Values taken from Uedam and Sugiyama (1)

(†) Since these values are expressed in different units, the ratio of V_{max} at pH 8.0 to that at pH 7.0 is given within parenthesis.

(‡) Data calculated using the total PEP and total Mg concentrations reported by (1) and the kinetic constants determined by fitting our experimental data to the kinetic model proposed by us.

The data in the literature concerning the pH dependence of the activation of the enzyme by Gluc-6-P (4-6), and the inhibition by malate (5,6,8) may be explained in a similar way. Both effects were reported to be higher at pH 7.0 than at pH 8.0. In the first case, this is to be expected if Gluc-6-P binds to the same regulatory site as does free PEP, as we postulated before (13). In the second, since malate has been reported to be an inhibitor of the PEP carboxylase reaction competitive with PEP, the differences

In $K_m(\text{Mg-PEP})$ found between these two pHs and the fact that the Mg-PEP concentration present at pH 8.0 is much higher than at pH 7.0 when fixed total PEP and Mg concentrations are used in the assays may account for the decreased sensitivity to this inhibitor at pH 8.0. The same reasoning applies for the observed change in the type of inhibition by malate (8), since, at a given inhibitor concentration, the competitive inhibitory effect is more important at low substrate concentrations, while the noncompetitive one is independent on this factor(31). It is most likely that malate be a mixed type inhibitor of PEP carboxylase at any pH, although the competitive component of this inhibition is more important than the noncompetitive one. Detailed kinetic studies using Mg-PEP as the reaction substrate, instead of total PEP as used in the above cited papers, are required to confirm these hypothesis.

pH Dependence of the Apparent V_{max} values of PEP Carboxylase.

In an attempt to characterize the ionizable groups involved in catalysis in the modified form of the enzyme, i.e., the form to which free PEP is bound to the regulatory site, and in the unmodified form, we plot the log of app V_{max} determined at the lowest and highest free PEP concentrations used in this study versus pH (Fig. 7). Unfortunately, we do not know the proportions of modified and unmodified enzyme at these two free PEP concentrations at the different pH values, since we could not determine by initial velocity studies the apparent affinity constant of the regulatory site for free PEP, and, therefore, the pH-dependence of this constant. In addition, we cannot study the pure enzyme species, i.e., the unmodified and the modified forms, since the assays cannot be performed in the absence of the effector, and it is not possible to saturate the regulatory site without causing some inhibition by the binding of the effector to the active site. So, what we always have is a mixture of both forms, presumably in different proportions depending of the pH, even if the same free PEP concentration is considered. Using nonlinear regression (18) we did calculate the kinetic parameters that describe the behavior of these two forms of the enzyme. But in order to be confident of these calculated parameters much more experimental points are required. Unfortunately, we could not use

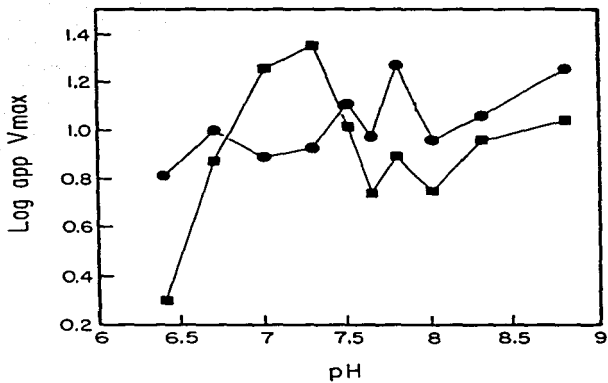


Figure 7. Log V_{max} versus pH profile at 0.23mM (■) and 3 mM (●) free PEP concentrations. The experimental data are the same as those in Fig. 1.

a greater substrate and effector concentration range, due to the experimental limitations discussed before. However, the fact that the effector-induced changes in the kinetic parameters followed clear patterns and were gradual, allows us to infer the ionization state of each enzyme form.

As shown in Fig. 7, it is clear that at least seven pKs are apparent in the form of the enzyme predominant at the lowest free PEP concentration. The first one belongs to two groups that must be protonated (slope +2); the second, to two groups required in their unprotonated form (slope -2), and so on. Given the shape of these curves, it is very difficult to establish precise values for the pKs, even by least-squares fit, and so to deduce the chemical nature of the groups involved, although tentatively histidines and cysteines may be considered.

Over the pH range 7.5-8.8, the differences between the 0.23 and the 3mM free PEP in the pH profiles seem to be quantitative rather than qualitative. However, significant differences were found over the pH range 6.7-7.5. Two consecutive peaks with slopes +1 and -1 appeared at 3.0 mM free PEP, instead of the single peak with slopes +2 and -2 that was observed in the 0.23 mM free PEP profile. It seems as if two of the groups that contributed to the bell-shape curve of this latter profile shifted their pKs in the presence of 3mM free PEP, likely as a consequence of the possible conformational change induced by this ligand, so the original peak resolved in two. The groups involved in these changes, presumably histidines, may be responsible for the decreases in v_{max} observed at pH 7.0 and 7.3 when free PEP is increased, and for the reversal of these effects at pH 7.5. Therefore, they may play an important role in the regulation of the carboxylase activity by free PEP at the physiological pH. The possibility exists that the same group is required in different ionization state for two steps of the reaction, and in that case only one ionizable group may exist, although two pKs are observed (32). Of course, this may apply as well to some of the other pKs observed.

The slopes lower than unity observed in some cases must be due to the presence of the two forms of the enzyme, the modified and unmodified, and to the fact that only one of them exhibits the ionizable group at these particular pHs.

Our results contrast with those of O'Leary et al (9), Iglesias and Andreo (10), and Podestá and Andreo (11), who reported that V_{max} was pH independent over a pH range from 6.0 to 10.0. These discrepancies are not surprising, since the studies cited above were performed at fixed low total Mg concentrations, 0.5 mM (9) and 5 mM (10,11), and total PEP as variable substrate, instead of Mg-PEP. Therefore, the effector concentration was varied simultaneously to the substrate in each determination, and the substrate was well below saturating concentrations at some pH values.

pH Dependence of the Apparent V_{max}/K_m (Mg-PEP) Values

The pH profiles of the log app V_{max}/K_m values obtained at the lowest and highest free PEP concentrations used in this study are shown in Fig. 8. These profiles are also very complex, and so there is considerable uncertainty in the determination of the pKs of the ionizable groups involved. At 3 mM free PEP, the line drawn to connect the experimental data exhibits first a peak with slope lower than 1, likely due to the presence of the modified and unmodified forms as discussed above, and of -1 at both sides of the maximum. Then, two consecutive bell-shape curves with maxima at pH 7.65 and 8.3 and slopes of +2 and -1 at the sides of these maxima. Therefore, eight ionizable groups seems to be involved in substrate binding over the whole pH-range studied. At 0.25 mM free PEP the same number of ionizable groups were detected, but this profile shows the following differences with respect to the former one: i) a slope 0 was observed between pH 6.4 and 7.0, so the first peak of the 3.0 mM free PEP profile is absent here; ii) the slope of the line between pH 7.3 and 7.5 is +3, compared to the +2 value observed in the 3 mM free PEP profile; iii) at higher pH values, the two bell shape curves are not clearly defined, instead appears a shoulder, as a probable consequence of closely overlapping ionizations, and iv) the group of apparent pK around 8, probably cysteine, observed in the 3mM free PEP profile was not present here. The physiological significance of these two latter changes is doubtful. More interesting are the differences found between the two profiles over the pH range 6.4-7.5, just described. It appears that in the conformational state of the

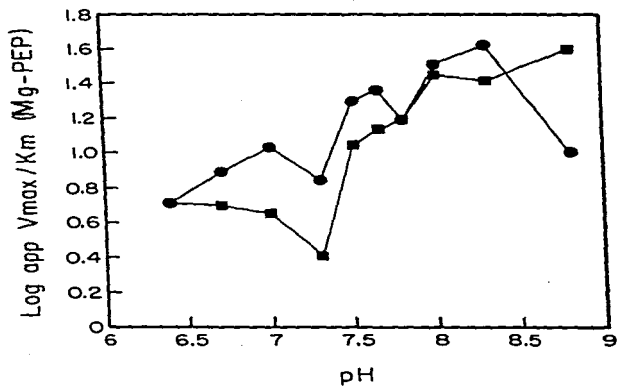


Figure 8. Log $V_{max}/K_m(\text{Mg-PEP})$ versus pH profile at 0.23 mM (■) and 3 mM (●) free PEP concentrations. The experimental data are the same as those in Fig. 3.

modified form, one of the three ionizable groups observed between 7.3 and 7.5 at the lowest free PEP concentration shifts its pK toward a lower pH, probably due to a change in its environment. This perturbation in the pK of this group may be responsible for the decreases in $K_m(\text{Mg-PEP})$ brought about by free PEP in the pH range 6.7-7.5, and so be of great relevance in the physiological regulation of PEP carboxylase by free PEP and/or pH. This group, probably histidine, may well be the same as one of the two residues detected in the V_{max} profile with similar behavior, and if so, it would participate in catalysis and binding. The effect of pH on the PEP carboxylase reaction is very complex, since in addition to the usual effects on initial velocities through changes in V_{max} and K_m , analogous changes in the affinity of the enzyme for the effector molecule (free PEP in this case) are also possible. So, we must point out that our results do not allow us to definitively conclude whether the groups detected in the pH profiles are participating in catalysis and/or binding of the substrate Mg-PEP, or are involved in the binding of the effector free PEP. In order to discriminate between these possibilities the pH-dependence of the affinity constant of free PEP for the regulatory site must be determined. Although PEP has a pK of 6.35 (19), this pK does not show up in the $V_{max}/K_m(\text{Mg-PEP})$ profile, since we calculated at each of the pH values tested the exact amount of the complexed and free species (see Materials and Methods).

Effect of free PEP on the pH stability of PEP carboxylase

Further complication in the interpretation of the data from different pH values may arise from the dependence of the enzyme aggregation state on pH and enzyme concentration. Thus, it has been reported that pH values above 8.0 and below 7.0 favors the dissociation of maize PEP carboxylase (33). Because of that, we tested the stability of the enzyme over the pH range used in the kinetic studies by preincubating enzyme-aliquots under the conditions described in Material and Methods. When compared with the controls, which were not preincubated, on preincubation we found some activity loss of approximately 10-20% over the pH range 6.4-7.3. This inactivation increased as the pH became more

alkaline, reaching up to 60% at pH 8.3 and above. No significant different results were observed for these experiments when 0.23 or 3.0 mM free PEP were used. Since the preincubations were done in the absence of the protective effect of the substrate Mg-PEP, it is to be expected that the activity loss in the whole assay media is considerably lower. In fact, the progress curves of the reaction were always linear, except at the lowest Mg-PEP concentrations used (0.1 and 0.14 mM) at pH 8.8 and 6.4, where we detected some degree of inactivation. Due to this inactivation, we could not carry out kinetics studies at higher or lower pH values than those included in this report.

CONCLUDING REMARKS.

Given the complexities of the kinetic model that seems to apply to this catalyzed reaction, it is difficult to assess the identity of the particular steps, and/or the rate or binding constants affected by pH changes based only on initial velocity studies. Despite of these limitations we believe that our findings, concerning the effect of pH and free PEP on the kinetic parameters of PEP carboxylase, will be useful in the understanding of the mechanisms of regulation of this enzyme when more precise data about its microenvironmental conditions become available.

REFERENCES

1. Uedan, K., and Sugiyama, T. (1976) *Plant Physiol.* 57, 906-910.
2. Hayakawa, S., Matsunaga, K., and Sugiyama, T. (1981) *Plant Physiol.* 67, 133-138.
3. Stiborova, M., and Leblova, S. (1983) *Photosynthetica* 17, 386-390.
4. Stiborova, M., and Leblova, S. (1985) *Photosynthetica* 19, 177-182.
5. Huber, S.C., and Edwards, G.E. (1975) *Can. J. Bot.* 53, 1925-1933.
6. Huber, S.C., and Sugiyama, T. (1986) *Plant Physiol.* 81, 674-677.
7. Wedding, R.T., Black, M.K., and Meyer, C.R. (1989) *Plant Physiol.* 90, 648-652.
8. Gonzalez, D.H., Iglesias, A.A., and Andreo, C.S. (1984) *J. Plant Physiol* 116, 425-434.
9. O'Leary, M.H., Rife, J.E., and Slater, J.D. (1981) *Biochemistry* 20, 7308-7314.
10. Iglesias, A.A., and Andreo, C.S. (1983) *Biochem. Biophys. Acta* 742, 9-17.
11. Podesta, F.E., and Andreo, C.S. (1989) *Plant Physiol.* 90, 427-433.
12. Stiborova, M., and Leblova, S. (1983) *Physiol. Veg.* 21, 935-942.
13. Rodriguez-Sotres, R., and Muñoz-Clares, R.A. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 276, 180-190.
14. Manchester, K.I. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 630, 225-231.
15. O'Sullivan, W.J., and Smithers, G.W. (1979) *In Methods in Enzymology* (Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., Eds.), Vol. 63, pp. 294-336. Academic Press, New York.
16. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
17. Rodriguez-Sotres, R., and Muñoz-Clares, R.A. (1987), *J. Plant Physiol.* 128, 361-369.
18. Canela, E.I. (1984) *Int. J. Bio-Med. Comp.* 15, 121-130.
19. Wold, F., and Ballou, C. (1957) *J. Biochem. Chem.* 227, 301-312.

20. Jawali, N. (1990) Arch. Biochem. Biophys. 277, 69-73. 21. 21.
21. Huber, S.C., Sugiyama, T., and Akazawa, T. (1986) Plant Physiol. 82, 550-554.
22. Rodríguez-Sotres, R., López-Pozos, R., and Muñoz-Clares, R.A. (1987) J. Plant Physiol. 129, 191-199.
23. Doncaster, H.D., and Leegood, R.C. (1987) Plant Physiol. 84, 82-87.
24. Falkner, G., and Horner, F. (1976) Plant Physiol. 58, 717-718.
25. Raven, J.A., and Smith, F.A. (1980) J. Exp. Bot. 31, 1357-1369.
26. Reid, R.J., and Smith, F.A. (1988) J. Exp. Bot. 39, 1421-1432.
27. Nimmo, G.A., McNaughton, G.A.L., Fewson, C.A., Wilkins, M.B., and Nimmo, H.G. (1987) FEBS Lett. 213, (1), 18-22.
28. Jiao, J-A, and Chollet, R. (1988) Arch. Biochem. Biophys. 261, 409-417.
29. Jiao, J-A, and Chollet, R. (1989) Arch. Biochem. Biophys. 269, 526-535.
30. Terada, K., Kai, T., Okumo, S., Fujisawa, H., and Izui, K. (1990) FEBS Lett. 259, 241-244.
31. Segel, I.H. (1975) in Enzyme Kinetics, pp. 100-226. Wiley-Interscience, New York.
32. Cornish-Bowden, A. (1976) Biochem. J. 153, 455-461.
33. Stiborova, M., and Leblova, S. (1986) FEBS Lett. 205, 32-34.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La presente discusión tiene el propósito de abundar sobre aquellos aspectos que por razones de extensión no se tocaron con suficiente detalle en la discusión de los artículos correspondientes. A fin de conjuntar las ideas que se proponen en ambos artículos se realizará una discusión conjunta de ellos. Sin embargo, se tratará dentro de lo posible de mantener el mismo orden de exposición para hacer más sencilla la lectura de ambos escritos en conjunto. Para facilitar la lectura de este texto y evitar al lector la necesidad de releer continuamente fragmentos de la discusión de resultados de los artículos al momento de revisar esta discusión, se han incluido las ideas que fueron propuestas en el artículo original dentro de este mismo texto.

En el artículo 1 se intenta demostrar la validez de un modelo cinético para la reacción catalizada por PEP carboxilasa, a fin de explicar algunas de las observaciones experimentales publicadas con anterioridad y que ya se han mencionado en los antecedentes.

Como una herramienta para caracterizar el sitio activador de PEP carboxilasa hemos elegido utilizar un análogo estructural de PEP que comparte con esta molécula el grupo fosfato y los orbitales resonantes π . Esta molécula, el fenilfosfato, se muestra en el esquema 1 del artículo 1.

Efecto de fenilfosfato sobre la actividad de PEP carboxilasa.

El efecto de esta molécula sobre la reacción catalizada por PEP carboxilasa se muestra en la figura 1 (artículo 1). Puede observarse que fenilfosfato es capaz de activar la reacción a concentraciones tan bajas como 100 μM y su efecto activador modifica la pendiente de las curvas en la gráfica de dobles recíprocos,⁸ pero no altera significativamente el valor de los interceptos. En este sentido fenilfosfato es un activador del tipo de los ya reportados como glucosa -6-fosfato y $\text{C}^{18}\text{O}_2\text{PEP}$ (93, 140). Por otro lado se puede observar que la enzima presenta una clara cooperatividad positiva a pH 7.0 y que dicha cooperatividad disminuye substancialmente a medida que la concentración del activador aumenta. En este sentido, fenilfosfato también semeja lo

reportado para el caso de glucosa -6-fosfato (74, 77, 204, 230).

Dado que se trata de una enzima oligomérica que presenta cooperatividad homotrópica positiva, $n_H=2$, (74, 172, 204) y considerando la analogía estructural que fenilfosfato guarda con PEP, se plantean al menos dos posibilidades: 1) La enzima posee al menos dos sitios activos interdependientes de manera que la unión del sustrato a uno de ellos facilita la unión del sustrato al(los) sitio(s) restante(s). A concentraciones bajas de sustrato, si el análogo del sustrato se une a un sitio vacío induce el mismo cambio conformacional y activa a la enzima. A concentraciones altas de PEP, en cambio, los sitios activos están saturados y la presencia del análogo inhibe la reacción por competencia con el sustrato. 11) Existe un sitio alostérico activador para fenilfosfato, glucosa- 6-fosfato y otras moléculas similares, diferente del sitio activo, al cual también PEP puede entrar. La activación nuevamente se manifestaría sólo a bajas concentraciones de PEP, porque a concentraciones elevadas de este sustrato el sitio alostérico se hallaría saturado. La inhibición observada se presentaría si fenilfosfato y glucosa- 6-fosfato fuesen además capaces de competir con PEP^{3-} por el sitio activo.

En ambos casos las hipótesis anteriores implican una competencia entre PEP y fenilfosfato tanto a nivel de la activación, como a nivel de catálisis. Para comprobar si dicho fenómeno existía realizamos medidas de la actividad de la enzima a diferentes niveles de concentración de sustrato y variando la concentración de fenilfosfato (figura 2A, artículo 1). A las concentraciones más altas de PEP (800 μM), fenilfosfato no produce cambios apreciables en la actividad de la enzima, sin embargo, a las concentraciones más bajas del sustrato (13 y 100 μM), el activador produce un incremento notable en la actividad. A las concentraciones más altas de activador se observa, en cambio, un efecto inhibitorio de esta molécula. Los datos anteriores indican que fenilfosfato es realmente capaz de competir con PEP por los varios sitios presentes en la molécula de enzima.

Al contrario de lo que sucede con el sustrato, PEP carboxilasa presenta cooperatividad negativa frente al cofactor de la reacción, Mg^{2+} (137, 138, 141, 145, 190, 228). De haber sitios

activos interactuantes, lo anterior significaría que la unión de un ligando tendría un efecto opuesto a la unión del otro y un aumento en la concentración de ambos no representaría una ganancia importante con respecto al comportamiento hiperbólico convencional. Dado que ambos ligandos son necesarios para la catálisis, la pregunta que surge es ¿Qué significado fisiológico podría tener para la planta esta conjunción de efectos encontrados? Por esta razón nos pareció más lógica la segunda posibilidad, es decir, que la enzima poseyera un sitio regulador alostérico al cual PEP pudiese unirse.

Cuando este estudio se realizó, la idea más aceptada era que el sustrato real de esta enzima era el PEP^{3-} libre. Aunque, tanto los estudios cinéticos (133) como de los uniones de ligandos (132) demostraban que PEP^{3-} y Mg^{2+} podían unirse a la proteína en forma aislada, la unión se reforzaba notablemente cuando ambos se encontraban unidos. Este último hecho hacía razonable suponer que el sustrato preferente de la enzima era el complejo Mg-PEP^- y no las especies libres PEP^{3-} y Mg^{2+} . Además, debido a que fenilfosfato tiene una baja afinidad por Mg^{2+} , era lógico suponer que la molécula activadora era la especie libre, tanto de fenilfosfato como de PEP, quedando sin aclararse el papel del Mg^{2+} libre en caso de que pudiese unirse al sitio regulador.

Tal como se menciona en el artículo 1, la afinidad por PEP y/o por Mg^{2+} de este sitio regulador debe diferir substancialmente de la del sitio catalítico por estos ligandos, si el fenómeno ha de tener algún significado fisiológico, en virtud de que si la afinidad de ambos sitios es similar, la existencia de estos sitios no estaría acompañada de cambios en la sensibilidad de la proteína a sus sustratos y no representaría ventajas para la planta. Por otro lado, las diferencias en afinidad de ambos sitios se traducirían en los fenómenos de cooperatividad (74, 139, 138, 141, 145, 172, 190, 204, 228), que se han mencionado anteriormente.

Para demostrar la validez de tal hipótesis variamos la concentración de Mg-PEP^- manteniendo la concentración de PEP^{3-} libre a un nivel constante y analizamos nuevamente el efecto de fenilfosfato sobre la reacción en estas condiciones. La figura 3 (artículo 1) muestra resultados que apoyan la hipótesis propuesta,

ya que las líneas son rectas ($r^2 > 0.99$) aún en ausencia del activador a las dos concentraciones de PEP^{3-} libre probadas 0.25 y 2.0 mM. Ello significa no sólo que Mg-PEP^- es efectivamente el sustrato de la reacción, sino que además, los sitios activos de la enzima son independientes. El patrón de líneas que se intersectan a la derecha del eje de las ordenadas indica que este compuesto se comporta como un activador no esencial a bajas concentraciones de Mg-PEP^- y como un inhibidor a concentraciones elevadas de sustrato. Siguiendo la nomenclatura de Segel (180), quien considera condiciones de rápido equilibrio, se trataría de una molécula que afecta en forma positiva a la unión de sustrato ($\alpha < 1$) y en forma negativa a la catálisis ($\beta < 1$, Fig 9). Adicionalmente, se observa que la actividad de PEP carboxilasa a casi cualquier concentración de Mg-PEP^- es mayor en presencia de 2 mM PEP^{3-} libre que en presencia de 0.25 mM. Así pues la cooperatividad positiva para PEP total observada por otros autores (26, 74, 77, 172, 193, 204), así como por nosotros mismos, puede ser debida al hecho de que al aumentar la concentración de PEP total en la mezcla de reacción, a una concentración de Mg^{2+} fija, se están incrementando simultáneamente las concentraciones del activador PEP^{3-} libre y del sustrato Mg-PEP^- .

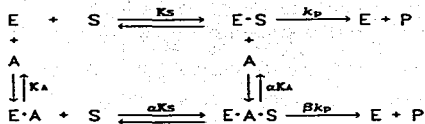
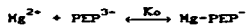


Figura 9. Mecanismo cinético para un activador no esencial o para un inhibidor mixto, la naturaleza activadora o inhibitoria de la molécula A con respecto a la unión del sustrato S dependerá del valor del parámetro α . Para $\alpha > 1$ se tratará de un inhibidor. La catálisis se verá afectada según el valor del parámetro β . Para $\beta < 1$ se tratará de un inhibidor (180).



$$[Mg^{2+}] = \left[\frac{1}{K_o \cdot [PEP^{3-}]} \right] \cdot [Mg-PEP^{-}]$$

Esquema 2. Equilibrio de la formación del complejo de PEP^{3-} con Mg^{2+} mostrando la relación entre las concentraciones de Mg^{2+} y $Mg-PEP^{-}$. Cuando PEP^{3-} se mantiene constante la expresión dentro del paréntesis es constante por lo que las concentraciones de Mg^{2+} y $Mg-PEP^{-}$ varían en forma proporcional.

Las observaciones anteriores también confirman el que la molécula activadora no es el complejo $Mg-PEP^-$, en virtud de que si esto ocurriese, debería observarse cooperatividad positiva para $Mg-PEP^-$ en lugar de la cinética michaeliana encontrada. Por otro lado, el ión Mg^{2+} libre, no parece tener efecto sobre la reacción, ya que cuando se incrementan las concentraciones del complejo, a concentración de PEP^{3-} libre constante, necesariamente se está incrementando la concentración de Mg^{2+} libre en forma proporcional (ver esquema 2). Puesto que ello no modifica la linealidad de la gráfica de dobles recíprocos no debe existir un sitio activador para el Mg^{2+} libre, y este no se debe unir al sitio activo en forma apreciable a las concentraciones empleadas, ya que de otro modo, competiría con el complejo $Mg-PEP^-$ por el sitio activo produciendo inhibición. Dado que las concentraciones de Mg^{2+} empleadas llegaron a niveles de hasta 80 mM total, la afinidad del sitio activo por Mg^{2+} libre debe ser realmente baja.

El efecto de fenilfosfato, de acuerdo con lo esperado, es mucho menos pronunciado a 2 mM PEP^{3-} libre que a 0.25 mM, como se puede observar en la Tabla 1 (artículo 1), ya que a 0.25 mM PEP^{3-} libre la disminución en $K_m(Mg-PEP^-)$ y en V_{max} es menos acusada para la misma concentración de fenilfosfato. Nótese además que el valor de estos parámetros es menor a 2 mM PEP^{3-} libre que a 0.25 mM PEP^{3-} , señalando que el efecto de PEP^{3-} libre es similar al de fenilfosfato.

En la misma tabla (Tabla 1, artículo 1) puede observarse que fenilfosfato 1 mM a una concentración de PEP^{3-} libre de 0.25 mM, tiene un efecto casi igual de pronunciado sobre $K_m(PEP)$ y V_{max} que un incremento de 1.75 mM en la concentración de PEP^{3-} libre, de donde se sigue que fenilfosfato es un mejor activador que PEP para esta enzima.

Los regráficos de pendiente e intercepto obtenidos para los datos de la figura 3 (artículo 1) se muestran en la figura 4 (artículo 1) y son claramente hiperbólicos. Este es un comportamiento típico de un activador no esencial o inhibidor mixto (180). Los regráficos apropiados (1/ Δ intercepto y 1/ Δ pendiente vs. 1/{activador}) para una concentración de PEP^{3-} 0.25 mM se muestran en la figura 5 (artículo 1) y son, como era de

esperarse, lineales. De estos regráficos obtuvimos los valores límite a concentración infinita de fenilfosfato de $5.7 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot para la V_{max} y 0.91 mM para la $K_{\text{m}}(\text{Mg-PEP}^-)$ y una constante aparente de 0.23 mM para el activador. Debe aclararse que estos valores son dependientes de la concentración de fenilfosfato a la que se realizó la determinación.

Los regráficos de la fig. 5 (artículo 1) probablemente muestren desviaciones de la linealidad a concentraciones más altas del activador debido a la unión del análogo al sitio activo.

Efecto de PEP^{3-} sobre la actividad de PEP carboxilasa.

A fin de analizar en más detalle el efecto regulador de PEP^{3-} libre sobre la actividad de PEP carboxilasa, la actividad de la enzima en función de la concentración de Mg-PEP^- fue determinada a varios niveles de PEP^{3-} libre constantes. Los resultados de tal experimento se resumen en la figura 6 (artículo 1), en donde se observa que la actividad de PEP carboxilasa aumenta conforme se elevan los niveles de PEP^{3-} libre, como ya se había mostrado antes. El efecto de este regulador sobre los parámetros $K_{\text{m}}(\text{Mg-PEP}^-)$ y V_{max} se muestra en la tabla 2. (artículo 1). La disminución de $K_{\text{m}}(\text{Mg-PEP}^-)$ es similar a lo observado con fenilfosfato, pero los valores de V_{max} sufren un ligero incremento y luego disminuyen.

Aún cuando la concentración de Mg^{2+} es proporcional a la concentración de Mg-PEP^- , lo cual significa que los datos en las gráficas anteriores pueden regrificarse frente a la concentración de Mg^{2+} libre, este mecanismo no es explicable en términos del modelo para una reacción bisustrato ordenada o de equilibrio rápido con unión de sustratos al azar, dado que, en estos mecanismos las rectas se cortan necesariamente a la izquierda del eje de las ordenadas y no, como sucede en nuestro caso, del lado derecho el mismo. Por otro lado, en ningún caso, se puede explicar la aparición de cooperatividad positiva para un sustrato total mediante los puros mecanismos bisustrato ordenado o de equilibrio rápido con unión de sustratos secuencial al azar.

El complejo efecto de PEP^{3-} libre sobre el valor de la V_{max} , aún cuando parece ser inesperado, es explicable, ya que, mantener

una concentración de PEP^- libre baja y alcanzar una concentración saturante de Mg-PEP^- implica elevar notablemente la concentración de Mg^{2+} . Es decir, conforme la concentración de PEP^{2-} libre baja, el factor de proporcionalidad entre Mg^{2+} y Mg-PEP^- se eleva en forma hiperbólica (ver la expresión entre paréntesis en el esquema 2), en consecuencia la concentración de Mg^{2+} requerida para mantener una concentración dada de Mg-PEP^- es cada vez mayor. Ahora bien, aún a pesar de que la afinidad del sitio activo por Mg^{2+} sea considerablemente baja, a niveles bajos de PEP^{2-} libre la cantidad de Mg^{2+} libre será suficiente para competir con Mg-PEP^- por el sitio activo haciendo que sea cada vez más difícil el saturar este con el sustrato Mg-PEP^- , por lo que se observará una menor V_{max} aparente. Este efecto además apoya la conclusión de que esta reacción no procede a través de un mecanismo bisustrato convencional en el que las especies libres se unen a la enzima en forma separada, ya que si este fuera el caso, Mg^{2+} libre, al ser un sustrato, no debería producir la inhibición observada. Por otro lado, se podría postular que Mg-PEP^- es una especie inhibidora, pero esto resultaría muy cuestionable, en virtud de que i) los estudios de Mildvan *et al* (132) y de Mizioro *et al* (133) demuestran que el complejo Mg-PEP^- existe como tal unido a la enzima en el complejo ternario (Fig 8 en antecedentes) y ii) siendo la afinidad de PEP^{2-} por el Mg^{2+} libre bastante alta y la disponibilidad de Mg^{2+} en la célula limitada, la inhibición de PEP carboxilasa por la presencia del complejo Mg-PEP^- en el citoplasma tendría un efecto nocivo para la célula vegetal en función de los requerimientos fisiológicos de las plantas C4 propuestos hasta la fecha.

En apoyo a lo anterior, la competencia entre Mg^{2+} libre y Mg-PEP^- explica también, en parte, la cooperatividad negativa para Mg^{2+} que ha sido descrita (141), ya que a una concentración fija de PEP total, los aumentos en la concentración de Mg^{2+} total se reflejarán en un aumento simultáneo en las concentraciones de Mg^{2+} libre y de Mg-PEP^- . Aún suponiendo que la disminución de PEP^{2-} libre no tuviese un efecto importante sobre la enzima, esto generaría competencia entre las especies de Mg , lo que se traduce en una cooperatividad negativa aparente y, a concentraciones

elevadas de Mg total, en una inhibición por exceso de sustrato (la cual también hemos observado, resultados sin publicar). El efecto adicional que tiene la disminución de la concentración de PEP^{3-} libre que acompaña a los aumentos en la cantidad de Mg^{2+} libre y Mg-PEP^- contribuiría a hacer la cooperatividad negativa más pronunciada.

Como se aclara en el artículo, en este caso las constantes aparentes no pueden deducirse a través de los regráfico de $1/\Delta$ vs $1/[\text{PEP}^{3-}]$, puesto que las velocidades a concentración cero del activador no pueden medirse porque el activador y el sustrato se encuentran siempre en estricto equilibrio químico. Sin embargo, los regráficos para pendientes (B) y para interceptos (A) se muestran en la figura 7 (artículo 1). La similitud entre el efecto para las pendientes de PEP^{3-} y fenilfosfato es evidente. El complejo efecto de PEP^{3-} libre con respecto a los interceptos ya se ha explicado. En el caso de fenilfosfato este efecto no se observa porque la concentración de fenilfosfato puede variarse independientemente de la del sustrato Mg-PEP^- .

Nuestros resultados en apariencia contrastan con aquellos presentados por Wedding et al. (215), quienes, mediante análisis por regresión no lineal, ajustan a una sola curva de Michaelis-Menten el conjunto total de datos obtenidos en tres experimentos realizados a tres valores de concentración de Mg^{2+} libre constante y a concentración de PEP total variable. Sin embargo, estos autores no fueron capaces de detectar un sesgo ligero en los ajustes y en sus gráficas, primero porque no realizaron un análisis estadístico completo de los datos obtenidos mediante regresión no lineal y segundo porque cuando grafican frente a la concentración de Mg-PEP^- señalan los puntos empleando un sólo tipo de símbolos, independientemente de la concentración de Mg^{2+} libre correspondiente a cada grupo de determinaciones, haciendo imposible apreciar por simple inspección el sesgo presente en sus ajustes. Cuando nosotros retomamos sus datos y los graficamos en dobles recíprocos encontramos no sólo una recta, sino una familia de rectas. El mismo tipo de efecto fué reportado con anterioridad por Mukerji (141), quien en un experimento similar encuentra que las gráficas de inverso de velocidad contra

1/[Mg-PEP] son lineales a pH 7.0, pero a diferentes niveles de concentración de Mg^{2+} libre poseen diferentes pendientes. Lo reportado por Mukerji coincide con lo reportado por Weeding et al., siempre que se consideren las diferencias ya mencionadas en los datos presentados por el último autor. Haciendo un breve paréntesis este caso advierte sobre la necesidad de hacer un análisis estadístico adecuado de los datos obtenidos mediante regresión no lineal para detectar posible sesgo, tendencias u otras perturbaciones numéricas que reflejen una posible inconsistencia entre el modelo empleado y los datos obtenidos (168). Esta observación nos parece pertinente en vista de la creciente popularidad que este tipo de análisis ha adquirido con el cada vez mayor desarrollo de las ciencias computacionales.

Mukerji (141) explica la cooperatividad negativa que se menciona en el párrafo anterior proponiendo que Mg^{2+} es un regulador negativo de la PEP carboxilasa, como mencionamos anteriormente. Sin embargo, sus datos son igualmente explicables si se supone que PEP^{3-} libre es un regulador positivo de la enzima, lo que además, en concordancia con nuestros datos, explica el efecto activador de fenilfosfato y la competencia entre esta última molécula y PEP^{3-} libre. La constante de estabilidad del complejo $Mg-PEP^{3-}$ es pequeña ($180 M^{-1}$), lo que garantiza la existencia de cantidades apreciable de PEP^{3-} libre aún a concentraciones muy elevadas de Mg^{2+} libre.

Modelo propuesto para la reacción catalizada por PEP carboxilasa.

A fin de explicar las peculiaridades del comportamiento cinético de PEP carboxilasa hemos propuesto en este primer artículo un modelo cinético bastante general. La razón por la que consideramos conveniente hacer este modelo suficientemente general, es la de explorar todos las posibles alternativas que puedan explicar el comportamiento de la enzima, ya que un modelo particular podría pasar por alto explicaciones alternativas a los comportamientos observados y llevarnos a conclusiones parciales. Debido a la complejidad del modelo cinético propuesto, éste sólo se analizó bajo el supuesto de equilibrio rápido y, por otro lado, no fue posible calcular valores numéricos para las constantes

involucradas, dada la imposibilidad de llevar a cabo un número suficiente de experimentos independientes.

Por las razones anteriores propusimos un modelo en el cual consideramos una molécula enzimática capaz de unir sustrato libre (S), metal libre (M) y efector (A) a dos sitios interactuantes que inicialmente fueron supuestos como activos. Gracias a las características de las ecuaciones algebraicas derivadas bajo el supuesto de equilibrio rápido, la propiedades de estos sitios pueden ser modificadas a manera de suprimir la actividad catalítica o la unión de uno ó más ligandos mediante la selección de las constantes apropiadas. Una descripción completa del modelo se da en el apéndice del primer artículo en tanto que una descripción detallada de la deducción algebraica de las ecuaciones se incluye en el Apéndice 1 de esta tesis.

Los supuestos sobre los que se basa el modelo y que han sido enumeradas en el artículo 1 son los siguientes:

- I) La reacción es irreversible, $\Delta G = -6$ to -8 Kcal/mol (150).
- II) La enzima posee dos tipos de sitios que pueden unir a los ligandos Mg^{2+} , PEP^{3-} , análogo de PEP y a sus respectivos complejos. La unión de PEP^{3-} o su análogo a un sitio es mutuamente excluyente. La unión de ligandos ocurre bajo un mecanismo al azar.
- III) La unión de un ligando a un sitio modifica la afinidad de la enzima por los ligandos que puedan unirse después.
- IV) Aún cuando pueden existir más de un sitio de cada tipo en la molécula de tetrámero, se consideró que los sitios eran independientes e idénticos y por lo tanto indistinguibles desde un punto de vista cinético.
- V) La unión de HCO_3^- a la enzima es independiente de la unión de los demás ligandos y su Km no es afectada por la presencia de otros ligandos en la enzima.
- VI) El efecto de los ligandos en la V_{max} no es debido a que un paso completamente diferente del proceso catalítico se haya vuelto limitante.

Como se puede observar en las figuras 2, 4, 7 y 8 del artículo 1, dado el conjunto de constantes empleadas para el modelo, las ecuaciones cinéticas propuestas se ajustan a los

datos, no sólo cualitativamente, sino también cuantitativamente. La coincidencia entre las curvas teóricas y los puntos experimentales puede mejorarse mediante pequeños ajustes en las constantes empleadas. Sin embargo, debido a la gran cantidad de parámetros implicados este tipo de ajuste carece de precisión desde el punto de vista estadístico, a menos que se cuente con un gran número de puntos experimentales. La obtención de valores numéricos para los parámetros está más allá de las pretensiones de este trabajo, ya que el interés del mismo consiste en desarrollar un modelo, tan simple como sea posible, que permita explicar el comportamiento cinético de PEP carboxilasa. A pesar de ello, de los valores numéricos que se asignaron a las constantes se pueden sacar varias conclusiones generales acerca de las características de la enzima. i) La afinidad del segundo sitio por Mg^{2+} es tan baja que puede considerarse que sólomente se une PEP^{3-} o el análogo y por tanto, este sitio no es catalíticamente activo pudiendo ser considerado como un sitio regulador. ii) La unión de PEP^{3-} y Mg^{2+} al primer sitio es mucho más débil que la unión de $Mg-PEP^{-}$ y por esta razón puede considerarse que $Mg-PEP^{-}$ es el sustrato preferencial de la enzima. iii) la unión de PEP^{3-} o del análogo al sitio regulador produce un incremento en la $K_m(Mg-PEP^{-})$ y una disminución en la constante catalítica de la enzima. vi) Existen dos formas de la enzima, la forma modificada con PEP^{3-} libre unido y la forma no modificada.

Con las anteriores conclusiones como postulados, se desarrolló un modelo simplificado que sirvió de base para el análisis de los datos que se presentan en el artículo 2. La deducción detallada de la ecuación cinética para el modelo simplificado que se muestra en este segundo artículo se encuentra a continuación de la deducción de la ecuación para el modelo general en el apéndice 1.

Uno de los aspectos interesantes de este modelo es la gran cantidad de datos de la literatura que pueden ser explicados mediante el mismo. La cooperatividad positiva reportada por varios autores (74, 77, 172, 204) cuando PEP total es usado como sustrato variable se produce debido a que al incrementar la concentración de PEP a una concentración de Mg total constante se están incrementando simultáneamente la concentración de $Mg-PEP^{-}$ y la

concentración de PEP^{3-} libre, es decir, la cantidad de sustrato disponible aumenta al mismo tiempo que la proporción de enzima activada también aumenta. La desaparición de la cooperatividad homotrópica positiva a concentraciones altas del activador glucosa-6-fosfato (77, 204) puede así mismo ser explicada si se supone que ese compuesto se une al mismo sitio que PEP^{3-} libre. En presencia de una cantidad saturante de glucosa-6-fosfato la proporción de enzima activada sería aproximadamente constante y el incremento en la concentración de PEP^{3-} no tiene un efecto adicional eliminando así la cooperatividad positiva. El hecho de que la cooperatividad positiva sea más pronunciada a concentraciones mayores de Mg^{2+} (27) es explicable debido a que en estas condiciones la concentración de PEP^{3-} es menor para la misma cantidad de Mg-PEP^+ y por lo tanto nos desplazamos hacia regiones más bajas de la curva de saturación del sitio regulador por PEP^{3-} , lo que se manifiesta en una mayor respuesta de la enzima, ya que entre más alejada de la saturación por PEP^{3-} del sitio regulador más cerca se estará de la zona en donde la respuesta a la concentración del ligando es lineal. Estos efectos fueron simulados también con el modelo propuesto y, aún cuando estas simulaciones no se muestran en el artículo, se menciona que la coincidencia con los datos reportados es notable.

La cooperatividad negativa para el metal (137, 138, 141, 145, 190, 228), también puede ser explicada por el modelo, en virtud de que, a concentración constante de PEP total, los incrementos en la concentración de Mg^{2+} total producen un aumento en la cantidad de complejo Mg-PEP^+ formado, pero una disminución en la cantidad de PEP^{3-} libre. Como ya discutimos anteriormente, esto trae como consecuencia que se obtenga una menor actividad que la esperada para una enzima michaeliana y, por tanto, se genera cooperatividad negativa. Esta cooperatividad negativa aparente para el metal no debe presentarse cuando la concentración de PEP total sea lo suficientemente alta para saturar el sitio regulador, aún a concentraciones de Mg^{2+} total elevadas. Es decir, cuando la enzima presente en el medio de ensayo sea la forma activada por PEP^{3-} libre. Como se ha mencionado en el artículo 1, esta es posiblemente la razón por la cual varios autores no la

encontraron.

El modelo también permite explicar el hecho de que a concentraciones elevadas de PEP^{3-} libre, análogos de PEP ó, en menor proporción, Mg^{2+} libre se observe una inhibición por exceso de sustrato, ya que en estas condiciones la especie libre está en condiciones de competir con el sustrato Mg-PEP^- por el sitio activo, produciendo así inhibición (Figura 2B, artículo 1). Este efecto es reportado por nosotros para fenilfosfato (Figura 2A, artículo 1) y ha sido reportado anteriormente para otros efectores como glucosa-6-fosfato (172) y 3-fosfoglicerato (141), que pensamos deben unirse al mismo sitio regulador.

Así pues, el presente modelo muestra la necesidad de controlar las concentraciones de Mg-PEP^- y PEP^{3-} libre en los ensayos cinéticos de PEP carboxilasa. Sin embargo, en la gran mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se ha considerado a PEP total como sustrato variable, y, por tanto, las conclusiones que puedan derivarse de dichos experimentos estarán influenciadas por la respuesta de la enzima a a los cambios en la concentración de su sustrato Mg-PEP^- y por el efecto regulador de PEP^{3-} libre. De entre los muchos estudios que faltan por reevaluar, el efecto de pH sobre la actividad de esta proteína nos pareció el más interesante, en vista de la importancia que este estudio tiene desde el punto de vista de la caracterización de la PEP carboxilasa, dado que se ha propuesto la participación de esta enzima en la regulación del pH intracelular (23, 64, 110,) y tomando en consideración la posibilidad de que PEP carboxilasa pudiese ser modulada *in vivo* a través de los cambios en el pH citoplásmico que pudieran acompañar a los cambios en el estado de iluminación de la planta, como se ha descrito para el caso de algas fotosintéticas (46, 166, 169).

En el artículo 2 se describe la respuesta de la reacción catalizada por esta enzima a la concentración de PEP^{3-} libre y a la concentración del sustrato Mg-PEP^- en el rango de pH 6.4-8.8. El estudio resulta un tanto ambicioso, ya que la complejidad del modelo propuesto para PEP carboxilasa, aunado al hecho de que la concentración del sustrato Mg-PEP^- y del activador PEP^{3-} libre estén ligados por una constante de equilibrio, hacen de la

manipulación experimental un aspecto difícil en este tipo de estudios.

Para describir el comportamiento de la enzima frente al pH, en el artículo 2 se muestra la respuesta de V_{max} y K_m frente a la variación en la concentración del activador PEP^{3-} libre a varios valores de pH dentro del rango mencionado (fig. 1 2 y 3) y se observa que las líneas trazadas en las gráficas se ajustan cualitativa y cuantitativamente a los puntos experimentales. En estas gráficas las líneas trazadas han sido calculadas con la ayuda de la ecuación cinética para el modelo propuesto. Para este propósito a cada valor de pH investigado se realizó un ajuste por regresión no lineal del conjunto de valores de velocidad inicial asociados a la concentraciones respectivas de PEP^{3-} libre y de $Mg-PEP^-$ empleadas en cada medida (como se describe en la sección Experimental). Los valores de las constantes que resultan de cada ajuste varían de un pH a otro, pero los mismos valores de las constantes fueron empleados para todas las simulaciones realizadas al pH respectivo. Una vez que se obtuvo el ajuste numérico al modelo de los datos experimentales a un pH definido se realizaron pruebas estadísticas para valores extremos, sesgo, tendencias y falta de información. Las pruebas resultaron negativas en todos los casos, excepto para el análisis de falta de información que resultó negativo para las pruebas más laxas, pero positivo para las pruebas más rigurosas. Este resultado deriva de la complejidad propia del modelo y se refleja en los amplios valores de incertidumbre para las constantes reportados por el programa.

Como se ha mencionado en este segundo artículo, el modelo es capaz de explicar el comportamiento de esta proteína en todo el rango de pH estudiado, como se puede constatar al observar los ajustes obtenidos. Es evidente que la respuesta de la proteína al incremento en la concentración de PEP^{3-} libre cambia substancialmente a valores de pH por encima de 7.5. En tanto que a valores de pH cercanos a 7.0 la enzima responde a la unión de PEP^{3-} libre al sitio regulador con un aumento en la afinidad por $Mg-PEP^-$ y una disminución en la V_{max} , a valores de pH cercanos a 8.0 la enzima responde con incrementos en el valor de ambos parámetros, originándose patrones de velocidad inicial que se

intersectan a la izquierda del eje de las ordenadas, mas apreciables en el caso de V_{max} que en el caso de $K_m(Mg-PEP^3-)$. A estos valores de pH el comportamiento de la enzima es muy similar al de las enzimas que catalizan reacciones bisustrato ordenadas o reacciones al azar en equilibrio rápido, ya que, como se ha mencionado anteriormente, este mecanismo predice el que las curvas se corten a la izquierda del eje de las ordenadas en las gráficas de dobles recíprocos. El modelo propuesto por nosotros también puede explicar este comportamiento, siempre que la constante de disociación para PEP^3- libre al sitio regulador (K_a) sea suficientemente baja como para mantener este último saturado ó suficientemente alta para que no se forme una porporción importante de enzima modificada, en cuyo caso, una sóla forma enzimática estaría presente en el medio de ensayo a este pH y a las concentraciones de PEP^3- libre empleadas. La razón por la cual no se utilizaron concentraciones de PEP^3- libre más bajas que 0.23 mM ha sido mencionada anteriormente. A la vista de estos datos resulta muy interesante que glucosa-6-fosfato y glicina seon activadores muy pobres a valores de pH cercanos a 8.0 (86, 193, 213), indicando que aún cuando el sitio regulador es funcional a este pH, es posible que la cantidad de PEP^3- libre en el medio de ensayo sea suficiente para mantener el sitio regulador de la enzima cerca de la saturación, si bien no es la única explicación posible.

Efecto del pH sobre la regulación de PEP carboxilasa por PEP libre.

En las figuras 1,2, y 3 del artículo 2 se muestra la respuesta de PEP carboxilasa a concentraciones crecientes de PEP^3- libre para los valores de pH estudiados. Al igual que antes la líneas dibujadas fueron trazadas utilizando la ecuación cinética propuesta para esta reacción, empleando a cada pH el conjunto apropiado de valores para las constantes obtenido según se describió anteriormente. Estos resultados confirman la validez del mecanismo cinético propuesto en el artículo 1, ya que dicho modelo es aplicable en todo el rango de pH estudiado.

Como se ha discutido en el artículo 2, el sustrato

preferencial de la enzima es Mg-PEP^- a todos los valores de pH estudiados, en tanto que tanto PEP^{3-} como PEP^{H^2} podrían ser las especies activadoras. Cabe notar que el pK_a de ionización para el tercer protón del fosfoenopiruvato es 6.4, por lo que a pH 7.3 la especie predominante será PEP^{3-} y es a este pH que se observan los cambios más dramáticos en la respuesta de la enzima frente a las variaciones de concentración de estas especies. Este dato parece indicar que PEP^{3-} libre es la especie importante, aún cuando la participación del dianión no se puede descartar.

Es importante resaltar que a pesar de que el comportamiento frente a pH de los parámetros obtenidos experimentalmente puede parecer sorprendente, la respuesta observada es predicha por el modelo. Un ejemplo de esto son los cambios en los valores de V_{max} , que aumentan a casi todos los valores de pH como respuesta al aumento en la concentración de PEP^{3-} libre, pero disminuyen a los pHs 7.3 y 7.0. La naturaleza de estos efectos justifica el empleo de un modelo tan complicado como el que se propuso en el primer artículo.

En el segundo artículo se menciona además el modelo concertado propuesto por Jawali (199) y se mencionan las razones por las que pensamos que su modelo no es aplicable al caso de PEP carboxilasa. Por un lado, nosotros no observamos el comportamiento histerético con la preparación de enzima pura que reporta este autor, lo que es probable que se deba a diferencias en el proceso de purificación de la enzima. De cualquier modo, los cambios observados por nosotros, no son achacables a fenómenos de histeresis. Por otro lado, el modelo propuesto por Jawali generaría una respuesta de cooperatividad positiva para Mg-PEP^- , cosa que nosotros no observamos en los gráficos de dobles recíprocos frente a Mg-PEP^- , como se puede comprobar observando los resultados de la Figura 3 del artículo 1.

A fin de analizar el efecto de pH sobre los parámetros cinéticos de esta enzima, regraficamos los datos de las figuras 1, 2 y 3 del artículo 2 en las figuras 4, 5 y 6. Estos datos se presentan tratando de que sean lo menos repetitivos posibles y de que faciliten el análisis del efecto de pH. En estas figuras (4, 5 y 6, artículo 2), se observa de inmediato que la respuesta más

dramática a la variación en la concentración de PEP^{3-} libre ocurre a los pHs 7.0 y 7.3 y son especialmente notables los cambios en el valor de $K_{\text{mapp}}(\text{Mg-PEP}^{3-})$, lo que se refleja en cambios en el valor de la pendiente. Suponemos que estos cambios son de relevancia fisiológica, ya que son rangos de pH que creemos fisiológicos y porque pensamos que la enzima no se encuentra saturada *in vivo* por su sustrato Mg-PEP^{3-} (171). A concentraciones saturantes, los incrementos en la concentración del regulador no tendrían un efecto activador, sino que por el contrario producirían inhibición a pH 7.0 y 7.3, dado el descenso que PEP^{3-} libre produce en el valor de V_{max} a estos valores de pH. Por otro lado, es interesante que cambios en el valor de $K_{\text{m}}(\text{Mg-PEP}^{3-})$, similares a los que ocurren como resultado del incremento en la concentración de PEP^{3-} libre, pueden ocurrir con un incremento de pH de 7.3 a 7.5. Por esta razón proponemos que incrementos en el pH del citoplasma en este rango, tales como los que ocurren en algas fotosintéticas durante el periodo de iluminación (46, 166, 169), pueden producir un incremento en la actividad de esta proteína a concentraciones subsaturantes de Mg-PEP^{3-} y, de esta manera, el pH y el nivel de PEP^{3-} libre pueden en conjunto contribuir a la regulación fina de la actividad de esta proteína *in vivo*.

El efecto conjunto del pH y la concentración de PEP^{3-} libre a concentraciones subsaturantes de Mg-PEP^{3-} puede analizarse comparando el valor de la constante de pseudo primer orden de la reacción ($V_{\text{max}}/K_{\text{m}}(\text{Mg-PEP}^{3-})$) que se muestra en la figura 3 (181). Así, un incremento en la concentración de PEP^{3-} libre de 0.23 a 3 mM produciría un aumento de aproximadamente dos veces en la constante de pseudo primer orden a pH 7.0 o 7.3 y un aumento de poco más de 1.5 veces a pH 7.5. Por su parte, un incremento de pH de 7.3 a 7.5 se traduciría en un aumento de más de cuatro veces en este valor a una concentración de PEP^{3-} libre de 0.23 mM y en un incremento de poco más de tres veces a 3 mM de PEP^{3-} libre. Finalmente, un aumento de la concentración de PEP^{3-} de 0.23 a 3 mM aunado al incremento en el pH de 7.3 a 7.5 provoca un aumento de casi 8 veces en el valor de este parámetro.

Las figuras 7 y 8 del artículo 2 contienen información que resume la respuesta de la V_{max} y de la constante de pseudo primer

orden de la reacción ($V_{max}/K_m(\text{Mg-PEP}^-)$) en función del pH. En el artículo se discute con detalle la información disponible sobre los posibles grupos implicados en catálisis (fig 7, artículo 1) y en la unión de Mg-PEP^- (fig 8, artículo 2), sin embargo, como allí mismo se menciona, no es posible dar valores de pK_a para estos grupos y por tanto no es posible identificar su naturaleza química con precisión. Lo anterior se debe principalmente a que en ambas curvas se observan siempre las contribuciones de las dos formas de la enzima implicadas, la forma modificada (con PEP^{3-} libre unido al sitio regulador) y la forma basal de la misma (con el sitio regulador sin ligandos unidos).

A pesar de las limitaciones que se presentan al momento de interpretar los perfiles de pH, es posible proponer que los grupos participantes son posiblemente histidinas y cisteínas, en virtud del rango de pH en el que se observan los cambios descritos. Es notorio que cuando PEP^{3-} libre se une al sitio regulador, se modifican sensiblemente los perfiles, señalando la presencia de algunos grupos cuyo pK_a se desplaza, o bien, desaparece, es decir, que el grupo deja de ser ionizable en la enzima modificada. En otras palabras, la unión de PEP^{3-} libre al sitio regulador de la proteína afecta sensiblemente el comportamiento de ciertos grupos relacionados con catálisis (fig 7, artículo 2) y grupos implicados en la unión del sustrato Mg-PEP^- (fig 8, artículo 2), esto indica que la unión de PEP^{3-} libre a la enzima genera cambios conformacionales que afectan la estructura del sitio activo.

De nuevo, las variaciones más notables se observan en el rango de pH de 7.0 a 7.3, lo cual indica que los grupos implicados más probables sean histidinas y/o cisteínas. Esto último está de acuerdo con la estructura del sitio activo propuesta por Andreo et al. (4) y que se muestra en la Figura 8 en la sección de antecedentes.

El efecto de PEP^{3-} libre en la estabilidad de la enzima no será discutido aquí debido a que ha sido discutido suficientemente en el artículo 2. Sólo nos parece pertinente mencionar que debido a que las curvas de progreso de la reacción obtenidas durante el curso de los ensayos fueron lineales, excepto a los pH's más extremos y a bajas concentraciones de Mg-PEP^- , pensamos que

nuestros resultados no están influidos de una manera determinante por la inestabilidad de la enzima en el medio de ensayo.

Implicaciones sobre la regulación por luz de PEP carboxilasa en plantas C₄.

En virtud de que la regulación por luz de esta enzima en el ciclo día-noche en plantas C₄ es uno de los aspectos que han despertado más interés en este campo en los últimos años, nos pareció pertinente discutir la posible relevancia de los datos presentados en estos dos artículos en la regulación a corto plazo de esta enzima.

Durante la noche, la ruta C₄ se encuentra detenida (49, 112, 205), ya que las enzimas piruvato ortofosfato dicinasa y malato deshidrogenasa dependiente de NADP del cloroplasto de mesófilo se encuentran inactivas (ver antecedentes). Sin embargo, la glucólisis está activa y por tanto hay producción de PEP en el citoplasma. En estas condiciones los niveles de PEP deben ser bajos dado que la carga energética de la célula es baja y por tanto, la enzima piruvato cinasa compete activamente por este sustrato. Durante este período PEP carboxilasa se encuentra desfosforilada y su afinidad por PEP es baja, el pH citoplásmico, es probablemente cercano a la neutralidad, como ha sido reportado en algas fotosintéticas (46, 166, 169) y, por ende, la enzima es muy sensible a PEP³⁻ libre y a glucosa-6-fosfato, pero los niveles de ambos metabolitos son bajos debido a su consumo por las enzimas de glucólisis. La actividad de PEP carboxilasa durante este período está probablemente limitada a su función anaplerótica de relleno del ciclo de Krebs y quizá a la regulación del pH citoplásmico.

Con el inicio del día, la enzima piruvato ortofosfato dicinasa es reactivada y la producción de PEP se incrementa. Curiosamente durante estos momentos iniciales, el piruvato producido por la enzima piruvato cinasa a partir de glicólisis es empleado nuevamente para la síntesis de PEP en el cloroplasto. Estas actividades en conjunto, podrían constituir una lanzadera de ATP desde el cloroplasto hacia citoplasma y elevar en consecuencia la carga energética de este compartimento celular y, al retener el piruvato producido por glucólisis, aumentar el nivel de esqueletos

C₃ disponibles para el ciclo C₄. Al elevarse la carga energética, la piruvato cinasa es inhibida por el ATP y los niveles de PEP se incrementan. Por otra parte, la afinidad por PEP de la PEP carboxilasa aumenta al fosforilarse la proteína y además, con el incremento en los niveles de PEP³⁻ libre la actividad de la enzima se incrementa para ajustarse a las necesidades de la ruta C₄. Conforme transcurre el día, la asimilación de luz por el cloroplasto podría estar acompañada de cambios de pH en el citoplasma y estos a su vez mantendrían a PEP carboxilasa activa independientemente de los niveles de PEP³⁻ libre, tal vez limitada solamente por la disponibilidad de Mg²⁺ libre y de HCO₃⁻. Es probable que si la disponibilidad de HCO₃⁻ y/o de Mg²⁺ libre es inferior a la producción de PEP³⁻ libre por la ruta C₄, al acumularse este último, se produciría una inhibición de la actividad de esta enzima, lo que mantendría los flujos metabólicos dentro de los límites requeridos por la planta, ya que como se ha discutido antes, niveles elevados de este metabolito tendrían un efecto inhibitor sobre la enzima, especialmente a valores de pH cercanos a 7.5.

Con el atardecer, la actividad de asimilación de energía por parte de los fotosistemas del cloroplasto se ve limitada y, así, el pH y los niveles de PEP sintetizado vía C₄ disminuyen, la enzima respondería a ambos factores modulando su actividad gradualmente hasta que, con la disminución de la carga energética, la piruvato cinasa se reactiva y la PEP carboxilasa se desfosforila regresando a las condiciones de obscuridad. Durante esta última fase, los intermediarios de la ruta C₄, como piruvato, se acumularían, lo que podría servir para reiniciar la actividad metabólica de la mitocondria. Por su parte, la actividad residual de PEP carboxilasa contribuiría a elevar los niveles de intermediarios del ciclo de Krebs, ya que la enzima málico deshidrogenasa-NADP de cloroplasto se inactiva por oxidación de sus grupos -SH y el oxaloacético producido por PEP carboxilasa, al no ser capturado por el cloroplasto, puede ser utilizado por la mitocondria.

Este mecanismo, aún cuando incluye una gran cantidad de elementos inciertos, es en apariencia bastante plausible ya que está de acuerdo con las observaciones que han sido reportadas por los varios investigadores que han abordado el problema. Sin embargo, plantea varias preguntas, tales como el valor del pH del citoplasma y los cambios en los niveles de metabolitos que puedan ocurrir como resultado de la iluminación de las hojas de plantas C_4 , sólo por mencionar algunas.

APÉNDICE I. DEDUCCIÓN ALGÉBRICA DE LAS ECUACIONES CINÉTICAS QUE SE REPORTAN EN LOS ARTÍCULOS 1 Y 2.

Se incluyen aquí las traducciones al castellano de los documentos anexos a los manuscritos originales que se adjuntaron a los manuscritos cuando estos últimos fueron sometidos a publicación. Estos anexos no fueron publicados, ya que su finalidad era simplificar el trabajo de los revisores, pero se incluyen en esta tesis a fin de facilitar la comprensión y lectura de la misma.

Descripción matemática del modelo cinético general descrito en el apéndice del artículo 1.

El conjunto de constantes de disociación globales y los correspondientes cocientes de velocidad definidos en el apéndice del artículo 1 permiten una descripción completa del modelo. Un esquema de todos los equilibrios contemplados por el modelo se da en la figura 10 de este apéndice, la nomenclatura de las constantes se simplificó en esta figura por razones de claridad, pero, el propósito de la misma es sólo el de facilitar al lector la revisión de todas las posibles especies enzimáticas que deben incluirse. Cada complejo enzima-ligandos puede expresarse como una función algebraica de la concentración de enzima libre y de las concentraciones normalizadas de los ligando que participan en la formación del complejo, i.e:

$$[E_s M_n A_r] = [E] \cdot [S]^p \cdot [M]^q \cdot [A]^r / (K_s K_p^p K_M^q K_A^r)$$

Donde K_s , K_M y K_A tienen el significado que se les ha asignado en el apéndice del artículo 1 y K_n representa la constante adimensional que se da en la tabla 4 de dicho apéndice. Entonces, utilizando las definiciones de las concentraciones normalizadas de los ligandos s , m y a que se han dado antes, en el apéndice del artículo 1, la expresión anterior se convierte en:

$$[E_s M_n A_r] = (s^p \cdot m^q \cdot a^r / K_n) \cdot [E]$$

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores se puede proceder a escribir la ecuación de velocidad, del sistema en equilibrio rápido, si se consideran todas las especies que pueden ser catalíticamente activas en el modelo:

$$v_0 = k_p ([ESM] + v_1[MS E] + v_2[SEMS] + v_3[MS E S] + v_4[MESM] + v_5[MS E M] + 2 \cdot v_6[MS E S M] + v_7[AESM] + v_8[MS E A] + v_9[MS E A M] + v_{10}[MA E S M])$$

Cuando expresamos esta ecuación en términos de la concentración de enzima libre y factorizamos $[E]$ obtenemos:

$$v_0 = k_p \cdot [E] \cdot \left\{ \frac{1}{K_s} \cdot s \cdot m + \frac{v_1}{K_5} \cdot s \cdot m + \frac{v_2}{K_9} \cdot s^2 \cdot m + \frac{v_3}{K_{10}} \cdot s^2 \cdot m + \frac{v_4}{K_{11}} \cdot s \cdot m^2 + \frac{v_5}{K_{12}} \cdot s \cdot m^2 + 2 \cdot \frac{v_6}{K_{13}} \cdot s^2 \cdot m^2 + \frac{v_7}{K_{27}} \cdot s \cdot m \cdot a + \frac{v_8}{K_{29}} \cdot s \cdot m \cdot a + \frac{v_9}{K_{31}} \cdot s \cdot m^2 \cdot a + \frac{v_{10}}{K_{32}} \cdot s \cdot m^2 \cdot a \right\}$$

Puede notarse que el factor $s \cdot m$ aparece en todos los términos, así pues, al agrupar estos términos la ecuación resultante es:

$$u_0 = k_p \cdot [E] \cdot s \cdot m \cdot \left[\frac{1}{K_5} + \frac{V_1}{K_6} + \left(\frac{V_2}{K_9} + \frac{V_3}{K_{10}} \right) \cdot s + \left(\frac{V_4}{K_{11}} + \frac{V_5}{K_{12}} \right) \cdot m \right. \\ \left. + \left(\frac{V_7}{K_{27}} + \frac{V_8}{K_{29}} \right) \cdot a + \left(\frac{V_9}{K_{31}} + \frac{V_{10}}{K_{32}} \right) \cdot a \cdot m + 2 \cdot \frac{V_6}{K_{13}} \cdot s \cdot m \right]$$

El factor dentro de los paréntesis cuadrados es igual al factor denominado D en el apéndice del artículo 1 (Ecuación 3), la expresión puede escribirse, entonces, como:

$$u_0 = k_p \cdot [E] \cdot s \cdot m \cdot D \quad (1)$$

Como siguiente paso, escribimos ahora la ecuación de balance de masas para la enzima total, que incluye todas las posibles complejos enzima-ligandos que pueden formarse (ver Fig 10):

$$[E]_t = [E] + [ES] + [EM] + [SE] + [ME] + [SEM] + [MES] + [SES] + \\ [MEM] + [AE] + [EA] + [AEA] + [EAM] + [MAE] + [AEM] + [MEA] + \\ [AEMA] + [MAEA] + [MAEM] + [MEAM] + [MAEAM] + [AES] + [SEF] + \\ [MAES] + [SEAM] + [SEMS] + [MES] + [MESM] + [MSEM] + [MSESM] + \\ [AESM] + [MSEAM] + [MSEAM] + [MAESM].$$

Nótese que los últimos 10 términos de la ecuación anterior corresponden a los complejos productivos y, por tanto, han sido incluidos en la ecuación de velocidad ya deducida. Ahora, como antes, escribimos los términos en función de las concentraciones normalizadas de los ligandos y de la concentración de enzima libre para llegar a:

$$[E]_t = [E] \cdot \left(1 + s + m + a + \frac{s}{K_3} + \frac{m}{K_4} + \frac{s \cdot m}{K_7} + \frac{s \cdot m}{K_8} + \frac{s^2}{K_1} + \right. \\ \frac{m^2}{K_2} + \frac{a}{K_{14}} + \frac{a^2}{K_{15}} + \frac{m \cdot a}{K_{16}} + \frac{m \cdot a}{K_{17}} + \frac{m \cdot a}{K_{18}} + \frac{m \cdot a}{K_{19}} + \frac{m \cdot a^2}{K_{20}} + \\ \frac{m \cdot a^2}{K_{21}} + \frac{m^2 \cdot a}{K_{22}} + \frac{m^2 \cdot a}{K_{23}} + \frac{m^2 \cdot a^2}{K_{24}} + \frac{s \cdot a}{K_{25}} + \frac{s \cdot a}{K_{26}} + \frac{s \cdot m \cdot a}{K_{28}} + \\ \frac{s \cdot m \cdot a}{K_{30}} + \frac{s \cdot m}{K_5} + \frac{s \cdot m}{K_6} + \frac{s^2 \cdot m}{K_9} + \frac{s^2 \cdot m}{K_{10}} + \frac{s \cdot m^2}{K_{11}} + \frac{s \cdot m^2}{K_{12}} + \frac{s^2 \cdot m^2}{K_{13}} + \\ \left. \frac{s \cdot m \cdot a}{K_{27}} + \frac{s \cdot m \cdot a}{K_{29}} + \frac{s \cdot m^2 \cdot a}{K_{31}} + \frac{s \cdot m^2 \cdot a}{K_{32}} \right)$$

Esta expresión tan larga puede simplificarse observando que algunos términos contienen el factor $s \cdot m$ y otros no. Separemos estos términos en dos expresiones y llamemos a un conjunto de términos grupo(1) y al otro grupo(2); dichos conjuntos son:

$$\text{Grupo(1)} = \left(1 + s + m + a + \frac{s}{K_3} + \frac{m}{K_4} + \frac{s^2}{K_1} + \frac{m^2}{K_2} + \frac{a}{K_{14}} + \frac{a^2}{K_{15}} \right. \\ \left. + \frac{m \cdot a}{K_{16}} + \frac{m \cdot a}{K_{17}} + \frac{m \cdot a}{K_{18}} + \frac{m \cdot a}{K_{19}} + \frac{m \cdot a^2}{K_{20}} + \frac{m \cdot a^2}{K_{21}} + \frac{m^2 a}{K_{22}} + \frac{m^2 a}{K_{23}} \right. \\ \left. + \frac{m^2 a^2}{K_{24}} + \frac{s \cdot a}{K_{25}} + \frac{s \cdot a}{K_{26}} \right) \\ \text{Grupo(2)} = \left(\frac{s \cdot m}{K_7} + \frac{s \cdot m}{K_8} + \frac{s \cdot m \cdot a}{K_{28}} + \frac{s \cdot m \cdot a}{K_{30}} + \frac{s \cdot m}{K_5} + \frac{s \cdot m}{K_6} + \right. \\ \left. \frac{s^2 m}{K_9} + \frac{s^2 m}{K_{10}} + \frac{s \cdot m^2}{K_{11}} + \frac{s \cdot m^2}{K_{12}} + \frac{s^2 m^2}{K_{13}} + \frac{s \cdot m \cdot a}{K_{27}} + \frac{s \cdot m \cdot a}{K_{29}} \right. \\ \left. + \frac{s \cdot m^2 a}{K_{31}} + \frac{s \cdot m^2 a}{K_{32}} \right)$$

Estas expresiones después de ser reagrupadas y factorizadas se transforman en las siguientes:

$$\text{Grupo(1)} = 1 + \left(1 + \frac{1}{K_{14}} + \frac{1}{K_{15}} \cdot a \right) \cdot a + \left(1 + \frac{1}{K_4} + \frac{1}{K_2} \cdot m \right) \cdot m + \\ \left[1 + \frac{1}{K_3} + \frac{1}{K_1} \cdot s + \left(\frac{1}{K_{25}} + \frac{1}{K_{26}} \right) \cdot a \right] \cdot s + \left[\frac{1}{K_{16}} + \frac{1}{K_{17}} + \frac{1}{K_{18}} \right. \\ \left. + \frac{1}{K_{19}} + \left(\frac{1}{K_{20}} + \frac{1}{K_{21}} \right) \cdot a + \left(\frac{1}{K_{22}} + \frac{1}{K_{23}} \right) \cdot m + \frac{1}{K_2} \cdot a \cdot m \right] \cdot a \cdot m \\ \text{Grupo(2)} = s \cdot m \cdot \left\{ \frac{1}{K_5} + \frac{1}{K_6} + \frac{1}{K_7} + \frac{1}{K_8} + \left(\frac{1}{K_9} + \frac{1}{K_{10}} + \frac{1}{K_{11}} \cdot m \right) \cdot s \right. \\ \left. + \left[\frac{1}{K_{27}} + \frac{1}{K_{28}} + \frac{1}{K_{29}} + \frac{1}{K_{30}} + \left(\frac{1}{K_{31}} + \frac{1}{K_{32}} \right) \cdot m \right] \cdot a + \left(\frac{1}{K_{11}} + \frac{1}{K_{12}} \right) \cdot m \right\}$$

Finalmente, comparando estas expresiones con las que se dan en el apéndice del artículo 1 como N_i y N_s (Ecuaciones 4 y 5), las expresiones anteriores pueden escribirse como: Grupo(1) = N_s y Grupo(2) = $N_i \cdot s \cdot m$. Sustituyendo estas expresiones en la ecuación original para la concentración total de enzima obtenemos:

$$[E]_t = [E] \cdot (N_s + N_i \cdot s \cdot m) \quad (2)$$

La ecuación final de velocidad inicial puede deducirse simplemente dividiendo la expresión obtenida para la velocidad (ecuación 1) sobre la expresión de la concentración total de enzima (ecuación 2) de lo que resulta:

$$\frac{v_0}{[E]_t} = \frac{K_p \cdot [E] \cdot s \cdot m \cdot D}{[E] \cdot (N_s + N_i \cdot s \cdot m)}$$

En esta ecuación final, podemos substituir nuevamente las concentraciones normalizadas s y m por su significado original y simplificar la concentración de enzima libre en el cociente del lado derecho. Teniendo además en cuenta que $k_p \cdot [E]_t$ es igual a V_{max} y multiplicando denominador y numerador de el cociente del lado derecho por la unidad escrita como $(K_M \cdot K_S) / (K_M \cdot K_S)$ nos queda la que se presenta en el apéndice del artículo 1 como ecuación 1.

$$u_0 = \frac{V_{max} \cdot D \cdot \frac{[S]}{K_S} \cdot \frac{[M]}{K_M}}{N_S + N_I \cdot \frac{[S]}{K_S} \cdot \frac{[M]}{K_M}} = \frac{V_{max} \cdot D \cdot [S] \cdot [M]}{N_S \cdot K_S \cdot K_M + N_I \cdot [S] \cdot [M]}$$

Descripción matemática del modelo cinético simplificado para PEP carboxilasa que se presenta en el artículo 2.

Este es un modelo particular para una enzima alostérica con dos sitios diferentes e interactuantes, capaces de unir PEP^{2-} (sustrato libre), pero sólo uno de ellos capaz de unir Mg^{2+} (cofactor metálico divalente libre) y $Mg-PEP^{2-}$ (complejo metal-sustrato).

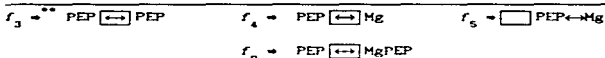
Por razones de simplicidad, asumimos que ambos sitios tienen constantes de disociación intersecas para el sustrato (K_{12}) que, cuando es apropiado, se multiplican por un factor que representa la diferencia en afinidades para PEP^{2-} que pueda existir entre ambos sitios. Este factor, llamado por nosotros cociente de afinidades, es f_2 . Adicionalmente, estas constantes pueden estar afectadas por factores de interacción, que son valores numéricos que expresan en número de veces que una constante aumenta o disminuye como resultado de las interacciones que surgen cuando más de un ligando está unido a la enzima (tabla 7.).

De manera similar, asumimos que todos los complejos productivos tienen la misma constante catalítica, la cual, cuando es apropiado, se multiplica por un factor que expresa las diferencias en eficiencia catalítica que existen entre los diferentes complejos productivos y el complejo de referencia (E_{SA}) (v. tabla 6). Este modelo consta de 9 complejos enzima-ligandos y la concentración de cada uno puede ser descrito por la constante de disociación global correspondiente (tabla 6), tal como se hizo para el caso del modelo general (apéndice del artículo 1). Un esquema completo de los equilibrios incluidos en el modelo se presenta en la figura 11.

TABLA 6. Descripción del modelo cinético para la reacción catalizada por la enzima PEP carboxilasa de maíz. Especies enzimáticas que se forman por la unión de PEP^{2-} y Mg^{2+} a la enzima.

Complejos Enzima-ligandos	Constante catalítica	Constante de Disociación global	Producto de Factores
EPEP	-	K_S	-
EMg	-	K_H	-
PEPEPEP	-	$K_1 K_S^2$	$K_1 = f_2 f_3$
PEPE	-	$K_3 K_S$	$K_3 = f_2$
EMgPEP	k_p	$K_5 K_S K_H$	$K_5 = f_5$
PEPEMg	-	$K_7 K_S K_H$	$K_7 = f_2 f_4$
PEPEMgPEP	$v_2 k_p$	$K_9 K_S^2 K_H$	$K_9 = f_2 f_3 f_4 f_5 f_9$

TABLE 7. Descripción de los factores de interacción considerados en el modelo cinético para la reacción catalizada por PEP carboxilasa de maíz.



() Representamos estas interacciones con flechas entre los ligandos que participan de esta interacción (\rightleftharpoons).

() El cuadrado representa a la enzima y los lados derecho e izquierdo de la misma representan el sitio catalítico y el sitio regulador respectivamente.

Al igual que antes las constantes de disociación globales de la tabla 6, permiten expresar la concentración de cualquier complejo como una función de la enzima libre y la concentración normalizada de los ligando que participan en su formación, i.e:

$$[EPEP_Mg_0] = [E] \cdot [PEP]^2 \cdot [Mg]^2 / (K_n K_{PEP}^2 K_{Mg}^2)$$

En donde K_{PEP} y K_{Mg} tienen el mismo significado que se les asigna en el artículo 2 y K_n representa la constante adimensional dada en la tabla 8, así pues, tomando los valores de las concentraciones normalizadas $s = [PEP]/K_{PEP}$ y $m = [Mg]/K_{Mg}$ empleadas en el primer artículo la expresión previa se convierte en: we can write the previous expression as:

$$[EPEP_Mg_0] = (s^2 \cdot m^2 / K_n) \cdot [E]$$

Procedemos como antes escribiendo la ecuación de velocidad que contiene los complejos productivos (en este caso sólo dos): $v_0 = k_p ([ESM] + v_1 [SEMS])$

Cuando expresamos esta ecuación en términos de las constantes y concentraciones normalizadas correspondientes, después de factorizar $[E]$, obtenemos:

$$v_0 = k_p \cdot [E] \cdot \left[\frac{1}{K_5} \cdot s \cdot m + \frac{V_2}{K_9} \cdot s^2 \cdot m \right]$$

Nuevamente el factor $s \cdot m$, puede ser factorizado resultando:

$$v_0 = k_p \cdot [E] \cdot s \cdot m \cdot \left[\frac{1}{K_5} + \frac{V_2}{K_9} \cdot s \right]$$

El factor entre paréntesis ha sido denominado D en el artículo 2, sólo que s ha sido substituido por su significado original, i.e:

$$D = \frac{1}{K_5} + \left(\frac{V_2}{K_9} \right) \cdot \frac{[PEP]}{K_{PEP}} \quad (3)$$

La expresión puede escribirse como:

$$v_0 = k_p \cdot [E] \cdot s \cdot m \cdot D = k_p \cdot [E] \cdot \frac{[Mg] [PEP]}{K_{Mg} \cdot K_{PEP}} \cdot D \quad (4)$$

Ahora, la expresión para la concentración total de enzima es:

$$[E]_t = [E] + [EMgPEP] + [EPEP] + [EMg] + [PEPE] + [PEPEMg] + [PEPEPEP] + [PEPEMgPEP]$$

Que pueden substituirse como antes para dar:

$$[E]_t = [E] \cdot \left(1 + s + m + \frac{s}{K_2} + \frac{s \cdot m}{K_7} + \frac{s^2}{K_1} + \frac{s \cdot m}{K_5} + \frac{s^2 m}{K_9} \right)$$

Nuevamente observamos una serie de términos conteniendo el factor $s \cdot m$ y, además, otros que contienen el factor s , sólo un término, el término m no puede ser agrupado en ninguna de estas categorías, sin embargo, considerando la constante de estabilidad del complejo Mg_2-PEP definida por:

$$K_0 = \frac{[Mg_2-PEP]}{[Mg] \cdot [PEP]} \quad (5)$$

Se substituye el término $m = [Mg]/K_0 = [Mg_2-PEP]/K_0 \cdot K_0 \cdot [PEP]$ y substituyendo también los términos que contienen $m \cdot s = [Mg] \cdot [PEP]/K_0 \cdot KPEP = [Mg_2-PEP]/K_0 \cdot K_0 \cdot KPEP$ y $s = [PEP]/KPEP$, nos queda finalmente:

$$[E]_t = [E] \cdot \left[1 + \frac{[PEP]}{KPEP} + \frac{[Mg_2-PEP]}{K_0 \cdot K_0 \cdot [PEP]} + \frac{[PEP] \cdot \frac{1}{K_2}}{KPEP} + \frac{[Mg_2-PEP]}{K_0 \cdot K_0 \cdot KPEP} \cdot \frac{1}{K_7} + \left(\frac{[PEP]}{KPEP} \right)^2 \cdot \frac{1}{K_1} + \frac{[Mg_2-PEP]}{K_0 \cdot K_0 \cdot KPEP} \cdot \frac{1}{K_5} + \frac{[Mg_2-PEP]}{K_0 \cdot K_0 \cdot KPEP} \cdot \frac{[PEP] \cdot \frac{1}{K_9}}{KPEP} \right]$$

Expresión que se puede factorizar, quedando:

$$[E]_t = [E] \cdot \left[1 + \frac{[PEP]}{KPEP} \left(1 + \frac{1}{K_2} + \frac{[PEP] \cdot \frac{1}{K_9}}{KPEP} \right) + \frac{[Mg_2-PEP]}{K_0 \cdot K_0 \cdot KPEP} \cdot \left(\frac{KPEP}{[PEP]} + \frac{1}{K_7} + \frac{1}{K_5} + \frac{[PEP] \cdot \frac{1}{K_9}}{KPEP} \right) \right]$$

Cuando esta última expresión se compara con:

$$N_s = 1 + \left(1 + \frac{1}{K_2} + \frac{1}{K_1} \cdot \frac{[S]}{K_5} \right) \cdot \frac{[S]}{K_5} \quad (6)$$

$$N_i = \frac{1}{K_5} + \frac{1}{K_7} + \left(\frac{1}{K_9} \right) \cdot \frac{[S]}{K_5} + \frac{K_s}{[S]} \quad (7)$$

Que aparecen en el artículo como ecuaciones 4 y 5. Con esta simbología la ecuación de la concentración total de enzima queda:

$$[E]_t = [E] \cdot \left(N_s + N_i \cdot \frac{[Mg_2-PEP]}{K_0 \cdot K_0 \cdot KPEP} \right) \quad (8)$$

La ecuación final se obtiene dividiendo la ecuación de la velocidad de reacción (4) entre esta última (8), para dar:

$$\frac{v_0}{[E]_t} = \frac{k_p \cdot [E] \cdot s \cdot m \cdot D}{[E] \cdot \left(N_s + N_i \cdot \frac{[Mg-PEP]}{K_o \cdot K_{K_2} \cdot K_{PEP}} \right)} = \frac{k_p \cdot [E] \cdot \frac{[Mg-PEP]}{K_o \cdot K_{K_2} \cdot K_{PEP}} \cdot D}{[E] \cdot \left(N_s + N_i \cdot \frac{[Mg-PEP]}{K_o \cdot K_{K_2} \cdot K_{PEP}} \right)}$$

Repetiendo los pasos que se siguieron antes para el modelo general, es decir, substituyendo $k_p \cdot [E]_t = V_{max}$, eliminando la concentración de enzima libre del lado derecho y multiplicando este miembro por la unidad escrita como $(K_o K_{K_2} K_{PEP}) / (K_o K_{K_2} K_{PEP})$, obtenemos:

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot D \cdot [Mg-PEP]}{N_s \cdot K_o \cdot K_{K_2} \cdot K_{PEP} + N_i \cdot [Mg-PEP]} \quad (9)$$

Que es la ecuación de velocidad que se presenta en el artículo 2, en su forma de dobles recíprocos se convierte en:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_{K_2} \cdot K_{PEP} \cdot K_o \cdot N_s}{V_{max} \cdot D} \cdot \frac{1}{[S-H]} + \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{N_i}{D} \quad (10)$$

En donde D es el denominador de los factores de pendiente e intercepto (ecuación 1 del segundo artículo), N_i es el numerador del factor de intercepto (ecuación 5, artículo 2), N_s es el numerador del factor de pendiente (ecuación 4, artículo 2), V_{max} es la velocidad máxima del complejo $[MgPEP]$ y K_o , K_{K_2} y K_{PEP} tienen el significado ya descrito para estas constantes.

Apéndice II. Programa empleado para el cálculo de las concentraciones de especies libres en soluciones conteniendo mezclas complejas en equilibrios múltiples.

Este programa ha sido escrito para ser compilada con un compilador de TURBO PASCAL versión 3.0 de Borland International. Algunas características en el uso de las direcciones de los puertos de salida no permiten que sea directamente transportado a versiones posteriores. Las frases escritas entre corchetes {} son comentarios y pueden ser omitidos para la compilación. El listado se ha probado y se encontró libre de errores de sintaxis y de lógica.

Listado del programa:

```

Program CalculoComplejoMetalLigando;

const
  Windows      = 4;
  MaxWinLn     = 25;
  Wtab         : array[1..Windows,1..5] of Integer
                = (( 2, 2, 79, 9, 1), { X0,Y0,X1,Y1,LineNo }
                  ( 2, 11, 79, 20, 1),
                  ( 2, 22, 79, 23, 1),
                  ( 2, 4, 79, 22, 1)
                  ); {Arreglo de posiciones de ventanas usadas}
  TeclaValida  : Set of Char = [#13,#32..#43,#45..#46,#48..#57,#63..#93,#97..#123,
                                #125..#254];
  NumValido    : Set of Char = {'0'..'9','.',',','E','e','+','-','.'};
  EnteroValido : Set of Char = {'0'..'9','.',',','.'};
  MaxComponente = 10; {Número máximo de especies libres
                       manejadas}
  MinComponente = 2; {Número mínimo de especies posibles}
  MinNoZeroConc = 1e-15; {Concentración más baja posible}
  MaxLonNombre  = 40; {Longitud máxima de un nombre}
  MaxLonMsg     = 77; {Longitud máxima de un mensaje}
  LonPeqMsg     = 20; {Longitud de pequeños mensajes}
  BackSpace     = #8; {Códigos ASCII de las teclas indicadas}
  CarReturn    = #13;
  Escape        = #27;
  Espacio       = #32;
  Alp           = #12;
  No            = 'N'; {Respuestas de si }
  No            = 'N'; {o no para comparación}
  MaxError      = 5E-5; {Magnitud máxima del error permisible}
  MaxItera      = 500; {número máximo de iteraciones permisible}
  PaginaVideo   = 22; {Longitud útil de una página de video}
  PaginaPapel   = 55; {Longitud util de una página de papel}
  TamDirec     = 4; {Número de Bytes para variables de dirección}

type {Tipos de:}
  Dispositivo=(Impresora,Pantalla); {Salida de datos a usar}
  String255 = String[255]; {cadena de 255 caracteres}
  IntVector = Array[0..MaxComponente] of Integer; {Vector entero}
  IntMatrix = Array[0..MaxComponente] of IntVector; {Matrix

```

```

    entera)
ReVector   = Array[0..MaxComponente] of Real; (Vector Real)
ReMatrix   = Array[0..MaxComponente] of ReVector; (Matriz Real)
Encabezado = String[MaxLonNombre]; (Nombres)
Msg        = String[MaxLonMsg]; (Mensajes)
PecMsg     = String[LonPecMsg]; (Mensajes Breves)
Ventana    = 0..Windows; (Posición de ventana)
WinLn      = 0..MaxWinLn; (Número de líneas en la ventana)
Heading    = Array[0..MaxComponente] of Encabezado; (Vector de
  Nombres)
GrupoChar  = Set of Char; (conjuntos de caracteres)
RangoEsp   = 0..10; (Número para las especies)
Bandera    = Array[0 .. MaxComponente] of Boolean; (Etiqueta
  binaria)
Direc      = Array[1..2] of Integer; (Dirección de puertos)

var
ActualPuerto: Dispositivo; (Salida actual)
1.
NumComponente.    (No de componentes)
Alpha[I,J]: IntMatrix; (Factor de Peso, i.e. No de Moléculas o
  Iones de Componente I en el complejo J)
NumComplejo: Integer; (No de Complejos)
LinMax      : Byte; (No Máximo de líneas en el dispositivo
  de salida)
pH          : Real; (pH deseado)
Answer.     : Char; (Captura de respuestas de una letra)
Ch          : Char; (Captura de respuestas de una letra)
EstequiGiven,
ConstWriten,
VideoMode   : Boolean; (Etiquetas de eventos ocurridos)
Alpha[I,J]: IntMatrix; (Factor de Peso, i.e. No de Moléculas o
  Iones de Componente I en el complejo J)
ConcDada.   : Integer; (Almacena los Datos iniciales
  inalterados para repetir las
  lecturas)
ConcTotal.  : Integer; (Concentraciones totales)
ConcLibre.  : Integer; (Concentraciones Libres de componentes)
ConstEst.   : Integer; (Constantes de Estabilidad)
ConcAnt.    : Integer; (Valor de Conc. Libre en la iteracion
  anterior)
ConcComplejo: ReVector; (Concentración del Complejo Iesimo)
MarcaConst : Bandera; (Marca Como Concentracion libre
  constante)

Buffer1,
Buffer2,    (Variables de Almacenamiento de Cadenas)
XHed.      (Nombres de los Complejos)
AHed       : Heading; (Nombres de las especies)
LetreroNombre: Encabezado; (Captura de datos intermedia)
LonActual,
ActualWin. (Ventana que est operativa)
Sumatoria,
NumIteracion: Integer; (Número de iteraciones ocurriendo)
PtroSal    : Direc; (Dirección del puerto de salida)

```

```

Procedure ReverseVideo(Indica: Char);
(Procedimiento que permite cambiar el modo de video a video
inverso y viceversa, según lo señale la variable Indica);
Begin

```

```

If Indica = Si Then
Begin
VideoMode:=False;
TextColor(8);
TextBackGround(7);
end
Else
Begin
VideoMode:=True;
TextColor(7);
TextBackGround(8);
end;
End; {ReverseVideo}

```

```

Procedure Frame(WindowFrame: Integer);
{Procedimiento que dibuja un marco para una ventana}
var

```

```

1.
UpperLeftX,
UpperLeftY,
LowerRightX,
LowerRightY,
Xpos,
Ypos : Integer;

Begin
Xpos:=WhereX;
Ypos:=WhereY;
Window(1,1,80,25);
ReverseVideo(No);
UpperLeftX:=Wtab[WindowFrame,1]-1;
UpperLeftY:=Wtab[WindowFrame,2]-1;
LowerRightX:=Wtab[WindowFrame,3]+1;
LowerRightY:=Wtab[WindowFrame,4]+1;
GotoXY(UpperLeftX, UpperLeftY); Write(chr(218));
for 1:=UpperLeftX+1 to LowerRightX-1 do Write(chr(196));
Write(chr(191));
for 1:=UpperLeftY+1 to LowerRightY-1 do
begin
GotoXY(UpperLeftX, 1); Write(chr(179));
GotoXY(LowerRightX, 1); Write(chr(179));
end;
GotoXY(UpperLeftX, LowerRightY);
Write(chr(192));
for 1:=UpperLeftX+1 to LowerRightX-1 do Write(chr(196));
Write(chr(217));
GotoXY(Xpos, Ypos);
end { Frame };

```

```

Procedure SelectWindow(Win: Integer);
{Procedimiento que selecciona la ventana a usar}
begin
LowVideo;
Window(1,1,80,25);
Window(Wtab[Win,1], Wtab[Win,2], Wtab[Win,3], Wtab[Win,4]);

```

```

    NormaVideo;
end { SelectWindow };

Procedure RestoreWindow;

Begin
ReverseVideo(No);
ActualWin:=0;
Window(1,1,80,25);
ClrScr;
End: {RestoreWindow}

Procedure GetWindow(WinNo:Ventana;
                    Lines:WinLn);
{Procedimiento para abrir e inicializar la ventana WinNo y limpiar
las líneas requeridas por Lines}
Var
I
: WinLn;

begin
IF (Lines<0) Then
Lines:=0;
IF (Lines > (Wtab[WinNo,4]-Wtab[WinNo,2]+1)) Then
Lines:= (Wtab[WinNo,4]-Wtab[WinNo,2]+1);
IF (WinNo < 0) OR (WinNo > Windows) Then
WinNo := 0;
IF WinNo > 0 Then
Begin
SelectWindow(WinNo); {Se selecciona la ventana indicada}
GotoXY(1,1);
IF Lines>0 Then
For I:= 1 to Lines Do DelLine;
GotoXY(1, Wtab[WinNo,4]-Wtab[WinNo,2]+1);
Wtab[WinNo,5]:=Wtab[WinNo,5]-Lines;
end; { IF }
end; { Window2 }

Function Warn(Aviso:Msg;
              WinNo:Ventana) : Char;
{Función que muestra el mensaje Aviso en la línea 25 en video
inverso y retorna a la ventana WinNo. después de capturar una
respuesta de una letra}
Var
Xpos.
Ypos : Integer;

Begin
Xpos:=WhereX;
Ypos:=WhereY;
Window(1,1,80,25);
ReverseVideo(No);
GotoXY(1,25);
ClrEol;
Write(con,Aviso);
Repeat
Read(Kbd,Ch);

```

```

Until (UpCase(Ch) in ['S'. 'N']) OR ((Ch = Escape) AND
      Not(KeyPressed));
If UpCase(Ch) in ['S', Escape] Then
  Warn:= Escape
ELSE
  Warn:= Escape;
GotoXY(1,25);
ClrEol;
Write(con,' ':79);
GetWindow(WinNo,0);
GotoXY(Xpos,Ypos);
End; (Warn)

```

Procedure EscribeInstruccion:

```

Procedure FormatoInstruccion(Indicacion,
                             Explicacion:PeqMsg);
{Procedimiento para escribir dos mensajes breves en modos de video
contrastantes}

```

```

Begin
ReverseVideo(S1);
Write(Con,Indicacion);
ReverseVideo(No);
Write(Con,Explicacion);
End; {FormatoInstruccion}

Begin
GotoXY(1,WhereY);
FormatoInstruccion(#24+#25+#27,' cursor ');
FormatoInstruccion('Home',' Primer ');
FormatoInstruccion('End',' ultimo ');
FormatoInstruccion('Del',' Borra dato ');
FormatoInstruccion(#17+#196+#217,' dato sig. ');
FormatoInstruccion('ESC',' HECHO ');
End; { EscribeInstruccion}

```

Procedure LeerNombre(NumEspecie: Integer;

```

  Message1,
  Message2,
  Nombre : PeqMsg;
  Palabra : Encabezado;
  Esp1,
  Esp2 : Integer);

```

{Procedimiento que lee una lista de nombres que se capturan en Palabra}

```

Var
  K,
  J : Integer;
  Especie:PeqMsg;

```

```

Begin
  Str(NumEspecie, Especie);
  Especie:=Concat(Mensaje1, ' ', Especie, ' ', Nombre);
  ReverseVideo(E1);
  GotoXY(1, NumEspecie+1);
  Write(con, Mensaje2, Esp1, Especie, Esp2, '');
  IF 77-Esp1-Esp2 >= LonActual Then
    J:=LonActual
  ELSE
    J:=77-Esp1-Esp2;
  For K:=1 to J Do
    Write(con, '2');
  GotoXY(((Esp1+Esp2*2) mod 70), WhereY);
  ReverseVideo(No);
  Write(Con, Palabra:Length(Palabra));
End;
  (LeerNombre)

```

```

Procedure ProcesaTecla(TeclaPermitida:GrupoChar;
  Var Palabra :Heading;
  Buffer :Heading;
  Mensaje1,
  Mensaje2 :PeqMsg;
  N,
  Esp1,
  Esp2 :Integer);
Var
  I,
  NumEspecie :Integer;
  Nombre:PeqMsg;

```

{Procedimiento que captura y filtra teclas provenientes del dispositivo estandar de entrada cuando el número de datos requerido ha sido dado permite regresar mediante la tecla ESCAPE. Los datos capturados se almacenan en la variable Palabra y cada retorno de carro o teclas de función de movimiento de cursor cambia de posición en el vector}

```

Begin
  GetWindow(ActualWin+1,0);
  GotoXY(1,1);
  EscribeInstruccion;
  GetWindow(ActualWin, 10);
  NumEspecie:=0;
  Repeat
    Nombre:= Copy(Buffer[NumEspecie],1,12);
    LeerNombre(NumEspecie,
      Mensaje1, Mensaje2, Nombre, Palabra[NumEspecie]
      , Esp1, Esp2);
  Repeat
    Read(Kbd, Answer);
  Until (Answer in TeclaPermitida+[CarReturn, Escape]);
  If (Answer=Escape) AND KeyPressed Then
    Begin
      Read(Kbd, Answer);
      Case Upcase(Answer) of
        'P':Begin
          Answer:=CarReturn;

```

```

End;
'H':Begin
  IF (NumEspecie>=1) Then
    NumEspecie:=NumEspecie-2
  ELSE
    NumEspecie:= N-1;
    Answer:=CarReturn;
  End;
'I':Begin
  NumEspecie:=N;
  Answer:=CarReturn;
End;
'Q':Begin
  NumEspecie:=N-1;
  Answer:=CarReturn;
End;
'K':Begin ($R-)
  LetreroNombre:=Palabra[NumEspecie];
  IF Length(LetreroNombre) > 0 Then
    Begin
      LetreroNombre[0]:=
        Pred(LetreroNombre[0]);
      Palabra[NumEspecie]:=LetreroNombre;
      GotoXY(WhereX-1,WhereY);
      Write(con,'1');
      GotoXY(WhereX-1,WhereY);
    End;
  End; ($R+)
'S':Begin
  For I:= 1 to Length
    (Palabra[NumEspecie]) do
    Begin
      GotoXY(WhereX-1,WhereY);
      Write(con,'1');
      GotoXY(WhereX-1,WhereY);
    End;
    Palabra[NumEspecie]:='';
  End;
  End; (Case)
End
ELSE IF (Answer <> CarReturn) AND (Answer <> Escape)
Then
  Begin
    IF Length(Palabra[NumEspecie]) >= LonActual
    Then
      Begin
        For I:= 1 to Length(Palabra[NumEspecie]) do
          Begin
            GotoXY(WhereX-1,WhereY);
            Write(con,'1');
            GotoXY(WhereX-1,WhereY);
          End;
          Palabra[NumEspecie]:='';
        End;
        Palabra[NumEspecie]:=
          Concat(Palabra[NumEspecie],Answer);
        Write(Con,Answer);
      End;
    End;
  End;

```



```

Until Answer in [CarReturn,Escape]:
IF Answer=CarReturn Then
    NumEspecie:=Succ(NumEspecie) mod (N+1)
ELSE
    Answer:= Warn('( Ya estn bien sus datos ? . . .
                (S/N)' ,ActualWin);
Until Answer = Escape;
End; {ProcesaTecla}

Procedure InitialReading;
{Procedimiento que captura los datos de inicialización del
programa tales como número de componentes y de complejos.
etc. . . }

Var
I.
Error : Integer;

Begin
ActualWin:=2;
Frame(ActualWin);
GetWindow(ActualWin-1,10);
Write(con, 'ENTRADA DE DATOS':46);
GetWindow(ActualWin,10);
ReverseVideo(S1);
Write(con,
'Número de Componentes (de ':30,
MinComponente:2,' a ':3,MaxComponente:2,' ) = ');
ReverseVideo(No);
Repeat
GotoXY(45,WhereY);
ClrEol;
Read(NumComponente);
NumComponente:=NumComponente-1;
until (NumComponente<=(MaxComponente-1)) AND
(NumComponente>=(MinComponente-1));
GotoXY(1,WhereY);
ClrEol;
ReverseVideo(S1);
Write(con,
'Número de Complejos (de ':30,
MinComponente-1:2,' a ':3,MaxComponente:2,' ) = ');
ReverseVideo(No);
Repeat
GotoXY(45,WhereY);
ClrEol;
Read(NumComplejo);
NumComplejo:=NumComplejo-1;
until (NumComplejo<=(MaxComponente-1)) AND
(NumComplejo>=(MinComponente-2));
RestoreWindow;
ClrScr;
End; {InitialReading}

```

```

Procedure PasaValores(CadenaNumerica :Heading;

```

```

Var
    Números      :ReVector;
Var
    Error        :Integer;
    TamArreglo   :Integer;
{Los datos en CadenaNumerica se almacenan en la variable Números,
en caso de error se devuelve cero y la posición de ocurrencia del
error almacenada en Error}

```

```

Var
I.
K.
J      : Integer;
CadenaSucia.
CadenaLimpia: Encabezado;
Ch1    : PeqMsg;
Ch2    : PeqMsg;

Begin
    For K:= 0 to TamArreglo do
        Begin
            CadenaSucia:=CadenaNumerica[K];
            CadenaLimpia:='';
            I:=1;
            Repeat
                IF (CadenaSucia[I] in NumValido) then
                    CadenaLimpia:=Concat(CadenaLimpia,CadenaSucia[I]);
                    I:=Succ(I);
            Until (I > Length(CadenaNumerica[K]));
            CadenaNumerica[K]:=CadenaLimpia;
        End;
        I:=-1;
        Error:=0;
        Repeat
            I:=Succ(I);
            Val(CadenaNumerica[I],Números[I],Error);
            Until (Error <> 0) OR (I >= TamArreglo);
            IF (Error <> 0) Then
                Begin
                    Str(I,Ch1);
                    Str(Error,Ch2);
                    Answer := Warn(Concat(' ',CadenaNumerica[I],
                        ' Error:Dato #',Ch1,'Char #',Ch2,
                        ' (Repetir? (S/N)')
                        ,ActualWin);
                End;
            IF Answer <> Escape Then
                Begin
                    RestoreWindow;
                    ReverseVideo(No);
                    GotoXY(5,10);
                    Write(con,'Programa Abortado por incompatibilidad de
                    datos');
                    Halt;
                End;
            End;
        End;
    End;
    {PasaValores}

```

```

Procedure ReadNombre(Aviso1:PeqMsg;
                    Var   HHed:Heading;
                          TamArreglo:Integer);
(Procedimiento que lee nombre cortos y los almacena en la
variable HHed, cuando HHed contiene datos estos aparecen al
usuario para edición, si se presiona una tecla de letra nueva el
dato es borrado, si se presiona sólo enter o tecla de movimiento
de cursor, el dato se conserva)

```

```

Var

```

```

I,
Error :Integer;

```

```

Begin

```

```

  RestoreWindow;
  ActualWin:=2;
  LonActual:=12;
  Frame(ActualWin);
  GetWindow(ActualWin-1,10);
  WriteLn(con,'ENTRADA DE DATOS':46);
  Write(con,'Nombres de ',Aviso1);
  For I:= 0 to TamArreglo Do
    Begin
      Buffer2[I]:=' ';
      Buffer1[I]:='';
    End;
  ProcesaTecla(TeclaValida,Buffer1,Buffer2,Aviso1,'Nombre',
              TamArreglo,9,36);
  HHed:=Buffer1;
  RestoreWindow;
End: {ReadNombreEspecie}

```

```

Procedure ReadConc(Aviso1:PeqMsg;
                  HHed:Heading;
                  Var   DatosNumericos:ReVector;
                        TamArreglo:Integer);

```

```

(Procedimiento que lee una serie de cadenas numéricas, las
transforma a números y almacena estos valores en la variable
DatosNumericos)

```

```

Var

```

```

I,
Error :Integer;

```

```

Begin

```

```

  RestoreWindow;
  ActualWin:=2;
  LonActual:=16;

```

```

Frame(ActualWin);
GetWindow(ActualWin-1,2);
WriteLn(con, 'ENTRADA DE DATOS':46);
Write(con, 'Valores de ',Aviso1);
GetWindow(ActualWin,10);
Repeat
For I:=0 to TamArreglo do
IF DatosNumericos[I] <> 0 Then
  Str(DatosNumericos[I]:16,Buffer1[I])
ELSE
  Buffer1[I]:='';
ProcesaTecla(NumValido,Buffer1,HHed,'la especie ', 'Conc. de
',TamArreglo,9,36);
PasaValores(Buffer1,DatosNumericos,Error,TamArreglo);
Until Error = 0;
RestoreWindow;
End; {ReadConcTotal}

```

Procedura ReadEstequi;

{Procedimiento para la lectura de los datos a ser almacenados en la matriz de estequiometria de los complejos, marca además con una etiqueta de TRUE, aquellas concentraciones que deberan manejarse como concentraciones libres fijas y no como concentraciones totales fijas}

```

Var
I,
J,
Error : Integer;
Mensaje1:PqMsg;
AlfaParcial:ReVector;

```

Begin

```

FillChar(MarcaConst,SizeOf(MarcaConst),FALSE);
Answer:=Warn(
'Desea mantener constante alguna concentración Libre?
... (S/N)'
,ActualWin);
IF (Answer =Escape) Then
Begin
RestoreWindow;
ActualWin:=3;
Frame(ActualWin);
GetWindow(ActualWin-2,10);
WriteLn(con, 'ENTRADA DE DATOS':46);
GetWindow(ActualWin-1,10);
For I:=0 to NumComponente Do
Begin
WriteLn(con);
Write(con,I);
ReverseVideo[S1];
Write(con,AHed[I]);
ReverseVideo[No];
End; {For}
GetWindow(ActualWin,2);
WriteLn(con,
' 0..9 = Seleccion T = Mantener Todas B = Borrar

```

```

    todas F = terminar'
    );
ReverseVideo(S1);
Repeat
Repeat
Read(Kbd, Answer);
Answer:=UpCase(Answer);
Until (Answer in ['O'..'9','T','B','F'.Escapel]) AND
Not(KeyPressed);
Case Answer of
'O'..'9':Begin
Val(Answer,I,Error);
MarcaConst[1]:=TRUE;
Write(con,1);
GotoXY(WhereX+2,WhereY);
End;
'B' :Begin
For I:=0 to NumComponente Do
MarcaConst[1]:=FALSE;
ReverseVideo(No);
GotoXY(1,WhereY);
ClrEol;
ReverseVideo(S1);
End;
'T' :Begin
For I:= 0 to NumComponente Do
Begin
MarcaConst[1]:=TRUE;
Write(con,1);
GotoXY(WhereX+2,WhereY);
End;
End; (Case)
Until Answer in ['F'.Escapel];
End; (IF)
RestoreWindow;
IF Not(EstequiGiven) Then
Begin
WriteLn(con,'ENTRADA DE DATOS':46);
Write(con,'Estequiometria de Complejos');
ActualWin:=2;
LonActual:=3;
Frame(AcualWin+2);
FillChar(Alpha,SizeOf(Alpha),0);
GotoXY(3,5);
Write(con,
'Para cada especie escriba el numero de Moleculas de dicha
especie que');
GotoXY(3,6);
Write(con,
'participan en la formacion de los complejos. ');
GotoXY(3,7);
Write(con,
'Utilice ESC para saltar a la siguiente especie. Revise bien
sus datos');s');
GetWindow(AcualWin,10);
For I:=0 to NumComponente DO {1}
Begin

```

```

Repeat
ClrScr;
Mensaje1 :=Concat('Cuantos ',Copy(Alled[1],1,10));
For J:=0 to NumComplejo do
Buffer1[J]:='0';
ProcesaTecla(EnteroValido,Buffer1,XHed,' Contiene ',
Mensaje1.NumComplejo,18,20);
PasaValores(Buffer1,AlfaParcial,Error,NumComplejo);
Until Error =0;
For J:=0 to NumComplejo DO
Alpha[1,J]:=Trunc(AlfaParcial[J]);
end; {FOR 1}
RestoreWindow;
EstequiGiven:=TRUE;
End; {IF not(estequiGiven)}
End; {ReadEstequi}

```

Procedure CorregirConstEst;

```

Var
Xpos,
Ypos,
I,
J,
Error : Integer;
pKa,
pHmedida,
ConstCorregida: Real;

```

{Procedimiento para la corrección de las constantes de estabilidad capturadas según condiciones de pH, sólo se aborda si es exigido}

Procedure LeerNumero(Var Dato:Real);
{Lee un número real del teclado y lo valida}

```

Begin
Xpos:=WhereX;
Ypos:=WhereY;
($I-)
Repeat
GotoXY(Xpos,Ypos);
Read(Dato);
Error:=IOResult;
Until Error = 0;
($I+)
End; {LeerNumero}

```

```

Begin
RestoreWindow;
ActualWin:=2;
GetWindow(ActualWin-1,2);
Writeln(con, 'ENTRADA DE DATOS: ':46);
Write(con, 'Correccl"n de Constantes de Estabilidad por pH');
I:=0;
J:=0;
Repeat
GetWindow(ActualWin,10);

```

```

ReverseVideo(S1);
WriteLn(con, 'Complejo ', I, ', ', XMed{1});
ReverseVideo(No);
Answer:=Warn('Corregir este Dato? . . . (S/N)', ActualWin);
IF Answer = Escape Then
Begin
  ClrScr;
  Write('pKa del Ligando = ');
  LeerNumero(pKa);
  GotoXY(1, WhereY);
  ClrEol;
  Write(con, 'pH al que se determin' la constante aparente =
    ');
  LeerNumero(pHmedida);
  ConstCorregida:=ConstEst{1}*
    ((1+EXP(LN(10)*
      (pKa-pHmedida)))/(1+EXP(LN(10)*(pKa-pH))));
  ClrScr;
  WriteLn(con, 'Constante Corregida a pH ', pH:4:2, ' =
    ', ConstCorregida);
  WriteLn(con, 'pKa = ', pKa:3:2, ' pH al que se midió =
    ', pHmedida:3:2);
  Answer:=Warn('Están estos datos bien? . . .
    (S/N)', ActualWin);
  IF Answer <> Escape Then
  I:=I-1
  Else
    ConstEst{1}:=ConstCorregida;
End; {IF}
I:=Succ(I);
Until I > NumComplejo;
End; {Corregir Const Est}

```

Procedure ReadConstEst;

```

Var
  I,
  Error : Integer;

```

Procedimiento de captura de las constantes de estabilidad a emplear, de nuevo, si las constantes ya han sido dadas, la variable global de almacenamiento las contiene, el dato sólo es borrado si el usuario oprime una tecla de número, lo cual señala que desea modificar el dato)

```

Begin
  ActualWin:=2;
  LonActual:=16;
  Frame(ActualWin);
  GetWindow(ActualWin-1.1);
  Write(con, 'ENTRADA DE DATOS':46);
  GetWindow(ActualWin.2);
  ReverseVideo(S1);
  Repeat
  For I:=0 to NumComplejo do

```

```

IF ConstEst[I] <> 0 then
  Str(ConstEst[I]:16, Buffer1[I])
ELSE
  Buffer1[I]:='';
  ProcesaTecla(NusValido, Buffer1, XHed, 'Complejo', 'Const.Est',
              NumComplejo, 9, 36);
  PasaValores(Buffer1, ConstEst, Error, NumComplejo);
  Until Error = 0;
  Answer:=Warn('Desea Corregir Las Constantes para pH? ...
              (S/N)'
              .ActualWin);
  IF Answer=Escape Then
  Begin
    GetWindow(ActualWin, 10);
    ReverseVideo(S1);
    Write(con, 'pH deseado = ');
    ReverseVideo(Wo);
    GotoXY(WhereX-2, WhereY);
    Read(pH);
    WriteLn;
    ReverseVideo(S1);
    CorregirConstEst;
  End;
  RestoreWindow;
End; {ReadConstEst}

```

```

Procedure Iteration ( NumComponente,
                    NumComplejo : Integer;
                    Var
                      ISUM,
                      NumItera : Integer);

```

```

Var
  I,
  J,
  K,
  l : Integer;
  V : Real;
  WV : ReVector;

```

{Retina central de cálculo que permite ajustar la concentraciones por iteraciones sucesivas según Storer and Cornish-Bowden}

```

Begin
  For I:=0 to NumComponente Do {3}
  Begin
    WV[I]:=0;
    For J:= 0 to NumComplejo Do {2}
    Begin
      V:=1;
      IF Alpha[I, J] > 0 Then
      Begin
        FOR K:= 0 to NumComponente Do
        Begin
          l:=1;
          While l<=Alpha[K, J] Do
          Begin
            V:=V*ConcLibre[K];
          End;
        End;
      End;
    End;
  End;

```

{100}


```

        l:=l+1;
      end;
    end;
    VV[1]:=VV[1] + Alpha[1,J]*ConstEst[J]*V;
  end;
  end; (FOR 2)
  IF MarcaConst[1] Then
    ConcTotal[1]:=ConcLibre[1]+VV[1]
  ELSE
    ConcLibre[1]:=
      ConcTotal[1]*ConcLibre[1]/(ConcLibre[1]+VV[1]);
  end; (FOR 3)
  ISum:=1;
  FOR I:=0 to NumComponente Do (4)
  Begin
    IF MarcaConst[1] Then
      V:=ConcTotal[1]
    Else
      V:=ConcLibre[1];
    IF (Abs((ConcAnt[1]-V)/V) <= MaxError) Then
      ISum:=ISum + 1;
    end;
    NumItera := NumItera + 1;
  end; (Iteracion)

```

Procedure CalculaConcComplejo;

```

Var
  J,
  l,
  K : Integer;
  Sigma : Real;

```

{Procedimiento que calcula las concentraciones de los complejos existentes una vez que las concentraciones libres y totales han sido equilibradas globalmente}

```

Begin
  For J:=0 To NumComplejo Do
  Begin
    Sigma:=1;
    For K:= 0 to NumComponente Do
    Begin
      l:=1;
      While l <= Alpha[K,J] Do
      Begin
        Sigma := Sigma *ConcLibre[K];
        l:=l+1;
      end;
      end;
      ConcComplejo[J]:=ConstEst[J]*Sigma;
    end; (For)
  end; (CalculoConcComplejo)

```

Procedure DispositivoSalida(Puerto:Dispositivo);

{Procedimiento de redireccionamiento de salida, según el dispositivo de impresión deseado}

```
Begin
  IF (ActualPuerto=Pantalla) AND (Puerto = Impresora) Then
    Begin
      Move(ConOutPtr,PtrSal,TamDirec);
      Move(LstOutPtr,ConOutPtr,TamDirec);
      LinMax:=PaginaPapel;
      ActualPuerto:=Impresora;
    End
  Else IF (ActualPuerto = Impresora) AND (Puerto = Pantalla)
  Then
    Begin
      Move(ConOutPtr,LstOutPtr,TamDirec);
      Move(PtroSal,ConOutPtr,TamDirec);
      LinMax:=PaginaVideo;
      ActualPuerto:=Pantalla;
    End;
  End;
  (DispositivoSalida)
```

```
Procedure Escribe(Num:real;
  A,B:Byte;
  FindeLinea:Boolean);
```

{Procedimiento que da formato al dato de salida, si el número es menor a un cierto valor, lo da en notación exponencial. Si el número es razonablemente grande lo da en notación normal con B decimales}

```
Begin
  IF (Abs(Num) > 0.001) AND (Abs(Num) <1E5) Then
    Write(Num:A:B)
  ELSE
    Write(Num:A);
  IF FindeLinea Then
    WriteLn;
end (Escribe);
```

```
Function Espera(Pregunta:Msg;PosibleRespuesta:GrupoChar):Char;
```

{Procedimiento de captura de respuestas de una letra, la cual debe estar dentro de Grupo de caracteres}

```
Var
  Xpos,
  Ypos : Integer;
  Ch:Char;
  ViejaSalida:Dispositivo;

Begin
  If ActualPuerto = Impresora Then
    Begin
      DispositivoSalida(Pantalla);
      ViejaSalida:=Impresora;
    End
  Else
    ViejaSalida:=ActualPuerto;
  Xpos:=WhereX;
```

```

Ypos:=WhereY;
GotoXY(1,25);
ReverseVideo(S1);
ClrEol;
Write(Pregunta:79);
Repeat
  Read(Kbd,Ch);
  Ch:=Ucase(Ch);
  Until (Ch in PosibleRespuesta + [Escape]) AND NOT(KeyPressed);
ReverseVideo(No);
GotoXY(1,25);
ClrEol;
GotoXY(Xpos,Ypos);
IF ViejaSalida <> ActualPuerto Then
  DispositivoSalida(ViejaSalida);
  Espera:=Ch;
End; (Espera)

```

```

Procedure Salida1;
{Procedimiento de salida de datos calculados a pantalla ó
impresora, según sea el dispositivo de salida actual}

```

```

Var
  J,
  I : Integer;
  CH1 : Char;

Begin
  RestoreWindow;
  GotoXY(2,10);
  Repeat
    IF Not(ConstWritten) AND (ActualPuerto = Impresora) Then
      Begin
        WriteLn('Constantes de Estabilidad Empleadas':58);
        WriteLn('Valores dados a pH ':52,pH:4:2);
        WriteLn;
        For I:=0 to NumComplejo Do
          WriteLn('Complejo ':15,XIed[I] = '.ConstEst[I]);
        ConstWritten:=True;
      End;
      WriteLn;
      WriteLn('Concentraciones de Las Especies y Complejos':61);
      WriteLn;
      IF NumComponente > NumComplejo Then
        J:=NumComponente
      Else
        J:=NumComplejo;
      For I:=0 to J Do
        Begin
          IF I <= NumComponente Then
            Begin
              Write(Copy(Ahed[1],1,12):12,' ':2);
              Escribe(ConcLibre[1],13,7,False);
            End;
          End;
        End;
      End;
    End;
  End;

```

```

Write(' Lib ':6);
Escribe(ConcTotal[I],13,7,False);
Write(' Tot ':5);
End;
Else
Begin
Write(' ':51);
End;
IF I <= NumComplejo Then
Begin
Write(Copy(Xhed[I],1,12):12,' ':2);
Escribe(ConcComplejo[I],13,7,True);
End
Else
WriteLn;
End;
Ch1:=Espera(
*(Impair, ver Datos, dar otras Conc. o Finalizar ?
*(1/D/C/F)',
*['I','D','C','F']);
Case Ch1 of
'D':IF ActualPuerto = Impresora Then
DispositivoSalida(Pantalla);
'I':IF ActualPuerto = Pantalla Then
DispositivoSalida(Impresora);
'C':Begin
Answer:=Escape;
Ch1:=Escape;
End;
'F':Answer:= ' ';
End; (Case)
Until Ch1 in ['F',Escape];
DispositivoSalida(Pantalla);
End; (Salida 1)
{Cuerpo del programa principal}
BEGIN
RestoreWindow;
ActualPuerto:=Pantalla;
InitialReading;
ReadNombre('Especie ',Ahed,NumComponente);
ReadNombre('Complejo ',Xhed,NumComplejo);
EstequiGiven:=False;
FillChar(ConstEst,SizeOf(constEst),0);
Repeat
ReadEstequi;
ReadConstEst;
ConstWritten:=False;
FillChar(ConcDada,SizeOf(ConcDada),0);
Repeat
ReadConc('Concentracion Total',Ahed,ConcDada,NumComponente);
ConcLibre:=ConcDada;
ConcTotal:=ConcDada;
NumIteracion:=0;
Sumatoria:=0;
RestoreWindow;
GotoXY(10,12);
Write(con,'Calculando . . . Por favor espere');

```

```

GotoXY(10,13);
Write(con,"Buscando Convergencia a ",MaxError," de
error");
GotoXY(10,14);
Write(con,"Numero de Iteracion: ");
Repeat
  For I:= 0 to NumComponente Do
    IF MarcaConst[I] Then
      ConcAnt[I]:=ConcTotal[I]
    ELSE
      ConcAnt[I]:=ConcLibre[I];
    GotoXY(32,14);
    Write(con,NumIteracion);
    Iteration(NumComponente,NumComplejo,Sumatoria,NumIteracion);
  Until (Sumatoria = NumComponente) OR (NumIteracion >=
MaxItera);
  IF Sumatoria = NumComponente Then
    Begin
      CalculaConcComplejo;
      Salida;
      DispositivoSalida(Pantalla);
    End
  ELSE
    Begin
      WriteLn;
      WriteLn('No Hay Convergencia en ',MaxItera-1,
Iteraciones . . .');
      Answer:=Warn('Desea dar nuevas concentraciones? . . .
(S/N)')
      .ActualWin);
    End; {IF-THEN-ELSE}
  Until Answer <> Escape;
  Answer:=Warn('Desea Utilizar otros valores de las constantes?
. . .(S/N)')
  .ActualWin);
  Until Answer <> Escape;
RestoreWindow;
GotoXY(15,12);
DispositivoSalida(pantalla);
ReverseVideo(No);
Write(con,"FIN DEL PROGRAMA . . . Gracias");
GotoXY(1,25);
END. {Programa}

```

Apéndice III. Programa de regresión no lineal empleado en los ajustes numéricos.

Este programa ha sido escrito para ser ejecutado por un intérprete GWBASIC de MicroSoft. Debido al uso de algunas instrucciones, como CHAIN MERGE, no puede ser compilado en forma directa. El programa es similar a una reportado por Canela (Ref 18 artículo 2) pero modificado a fin de correr en máquinas PC compatibles y en formas más aables. Una serie de rutinas de análisis estadístico has sido incluidas al final para mejorar la calidad de la información proporcionada por el programa. Estas rutinas han sido escritas basándose en la pruebas recomendadas por Reich et al. (168)

El programa se divide en dos partes, una fase inicial que permite escribir la función deseada. Esta parte puede ser substituido por un programa alternativo que contiene ya la función deseada, que puede modificarse para funcionar con otras ecuaciones y que no requiere que el usuario de al programa los datos relacionados con la forma de la ecuación y los tipos de parámetros que deben ajustarse, por contenerlos dentro del listado.

La segunda parte contiene la rutina de entrada de datos y las rutinas de ajuste y de análisis estadístico.

Las pruebas estadísticas que se realizan incluyen:

- a) Error total e intervalos de confianza de los parámetros.
- b) dispersión de residuales.
- c) Prueba para detectar sesgo.
- d) Prueba para detectar tendencias.
- e) Prueba de condicionamiento de la matriz de información (o Jacobiano) de la ecuación (el cual se calcula por aproximación numérica). Esta prueba permite determinar si la información contenida en los datos es suficiente para definir con exactitud los parámetros de la ecuación y está estrechamente ligada al cálculo de los intervalos de confianza.

La segunda parte contiene la rutina de entrada de datos y las rutinas de ajuste y de análisis estadístico.

Parte 1.1. Programa de inicialización para que es usuario escriba su ecuación.

El usuario debe escribir su ecuación en lenguaje BASIC. El directorio debe contener el archivo explicativo EXPLICA.TXT que se describe inmediatamente a continuación del programa. La numeración de las líneas debe conservarse estrictamente. Aun cuando algunas líneas ocupan más de un renglón en este listado, no deben incluirse retornos de carro al escribirlas.

```
100 KEY OFF
110 SHELL "TYPE EXPLICA.TXT"
120 LOCATE 25,1: SHELL "PAUSE"
130 CLS: LOCATE 10,7: PRINT "ESCRIBA A CONTINUACION SU FUNCION EN
    BASIC A PARTIR DEL SIGNO ="
140 LOCATE 17,11: PRINT "RECUERDE QUE LA FUNCION NO DEBE EXCEDER
    256 CARACTERES"
150 KEY 2: CHR$(13): "RUN 200" + CHR$(13): LOCATE 19,15: PRINT "REVISE
    CUIDADOSAMENTE LA SINTASIS DE SU FUNCION"
160 LOCATE 21,11: PRINT "YA QUE TECLEO Y REVISO SU FUNCION PARA
    CONTINUAR TECLEE": LOCATE 23,32: PRINT "**** F-2 ****"
170 LOCATE 24,11: KEY 1, "FILES" + CHR$(13)
180 PRINT "PARA VER ECUACIONES YA ECRITAS PRESIONE **** F1 ****"
190 LOCATE 12,1: EDIT 660
200 KEY 2, "RUN 200" + CHR$(13): CHAIN MERGE "NONLIN.BAS", 100
```

660 DEF FNA=

Parte 1.2. Esta parte es alternativa a la anterior, es decir se corre una u la otra, no ambas. En este programa se ha escrito la ecuación de Hill, sin embargo puede escribirse cualquier otra ecuación y salvarse en un archivo de BASIC diferente. Las líneas que deben modificarse son:

- 20. Comentario.
- 130. Número de parámetro de la ecuación.
- 200. Nombres de los parámetros. Variables OON1\$(1) a OON1\$(PAR) seguidas de igual y el nombre del parámetro entre comillas, cada definición separada de la siguiente por dos puntos.
- 210. Número de sustratos.
- 230. Nombres de los sustratos, variables ESENS(1) a ESENS(NoSus), NoSus se dió en la línea 210, la sintaxis es la misma que en la línea 200.
- 240. Número de inhibidores y/o activadores.
- 270. Nombres de los inhibidores y/o activadores en las variables EINN\$(1) a EINN\$(NoInh) NoInh se da en la línea 240, suprimir REM y las palabras en minúscula y substituir por los nombres con la misma sintaxis que en la línea 200.

La ecuación debe escribirse en lenguaje BASIC en la línea 660 a partir del signo igual.

Los números de línea deben respetarse y todas las líneas deber escribirse. Las líneas que no caben en un renglón deben escribirse continuas sin retornos de carro, BASIC permite hasta 256 caracteres por línea.

Pueden hacerse tantos programas de este tipo como ecuaciones se requieran, con tal de que se graben en archivos de diferente nombre. Cuando este programa se ejecuta se realiza el ajuste de acuerdo con la ecuación escrita en la línea 660. Si comete algún error en la sintaxis obtendrá un error del tipo:

Syntax error in 1220 . . .

En caso de que aparezca este mensaje revise cuidadosamente la sintaxis de su función.

```
10 REM Este programa sirve para hacer regresion no lineal de
   datos
20 REM segun la ecuacion de Hill en su forma no logaritmica.
125 UNAVEZ=1
130 PAR=4
140 NOP2=PAR*2+1 :KEY 9,"GOTO 1030"+CHR$(13) :KEY 10,"GOTO
100"+CHR$(13)
150 DEFDBL J,A,B,D,E,O
160 DIM JOT1(NUMPUN,PAR), JOT2(PAR,NUMPUN), ESE3(PAR,PAR),
BE1(PAR,NUMPUN), OQ1(PAR,1)
170 DIM ERE1(NUMPUN,1), ERE2(1,NUMPUN), DE1(PAR,PAR),
EYE1(NUMPUN), ECAL(NUMPUN), DOBLUO(NUMPUN), DOBLUZ(NUMPUN),
DOBLU3(NUMPUN)
180 DIM OO(PAR), OO1(PAR,1), OO2(PAR,1), OO3(PAR,1),
AAD1(PAR,PAR), AAD3(PAR,PAR)
190 DIM A(PAR,NOP2),EX(PAR,PAR),C(PAR),OON1$(PAR)
200 OON1$(1)="Vmax":OON1$(2)="Ks":OON1$(3)="h"
210 AJCS="1"
220 NOSUS=VAL(AJCS):DIM ESE(NOSUS,NUMPUN),DS(NOSUS),ESENS(NOSUS)
230 ESENS(1)="Sus"
```

```

240 AJCS="0"
250 NOINH=VAL(AJCS):DIM EIN(NOINH,NUMPUN),DI(NOINH).EINNS(NOSUS)
260 IF NOINH=0 THEN GOTO 280
270 REM poner aqui los nombres de inhibidores EINNS(1)="
280 CHAIN MERGE "NONLIN.BAS".100,ALL
660 DEF FNA=00(1)/(00(2)/DS(1))*00(3)-1

```

Parte 2. Texto explicativo que deberá estar contenido en el archivo EXPLICA.TXT. Las líneas comprendidas entre los separadores siguientes son 24 y se recomienda teclar todas, aún la líneas en blanco. Si se desea se puede modificar el contenido y la apariencia de este texto, con tal de que sea informativo para el usuario, claro y que conste de un máximo de 24 líneas.

PROGRAMA DE REGRESION NO LINEAL

Este programa sirve para ajustar un conjunto de datos a una función que deber definirse en lenguaje BASIC. Use para ello los símbolos:
 + "suma" ; - "resta" ; * "producto" ; / "cociente" ;
 ^ "exponenciación"; () "signos de agrupación" (los paréntesis no ejecutan ninguna operación por sí mismos y por lo tanto deberán estar precedidos de los operadores correspondientes cuando se requiera; cada paréntesis abierto deber corresponder a un paréntesis cerrado, pudiendose anidar varios paréntesis unos dentro de otros).

Más adelante se le pedir que defina su función. Utilice para ello las variables siguientes: OO(1), OO(2), OO(3) . . . OO(N) son los valores de parámetros tales como: Km, Vmax, KI, etc . . . DS(1), DS(2) . . . DS(N) son concentraciones de sustratos DI(1), DI(2) . . . DI(N) son concentraciones de inhibidores (los activadores son manejados como inhibidores también por este programa).

-SE RECOMIENDA ESCRIBIR LA FUNCION EN UN PAPEL ANTES DE INTENTAR TICLEARLA EN LA COMPUTADORA!

Parte 3. El siguiente listado es el cuerpo principal del programa. Deberá escribirse respetando la numeración de las líneas y usando retorno de carro sólo al final de cada línea numerada, si usa retornos de carro en partes intermedias de una línea BASIC considerará lo que escriba a continuación como una nueva orden y el resultado es prácticamente impredecible.

Requerirá tener la impresora lista al momento de la salida de datos.

Después de escribirse con GWBASIC deberá grabarse en un archivo llamado NONLIN.BAS que deberá encontrarse en el mismo directorio que las partes anteriores. En nombre no debe ser modificado y el archivo deberá grabarse con la opción A del BASIC.
 I. e:

SAVE "NONLIN.BAS".A

De no hacerse así se obtendrá el siguiente error en la ejecución del programa 1:

Bad file mode in 280 . . .

```
100 CLS:LOCATE 10,8:PRINT "***** REGRESION NO LINEAL.
    CINETICA ENZIMATICA *****"
110 PRINT :PRINT :PRINT "
-----"
120 PRINT :INPUT "( CUANTOS DATOS DE VELOCIDAD SON ":NUMPUN
124 IF (NUMPUN>NUMPUN2) AND (UNAVEZ=1) THEN UNAVEZ=0:PRINT
    "DEMASIADOS PUNTOS.
REINICIO PARA REDIMENSIONAR MATRICES":RUN 100
125 IF UNAVEZ=1 THEN UNAVEZ=0:GOTO 280
130 PRINT :INPUT "( CUANTOS PARAMETROS TIENE TU ECUACION ?":PAR
140 NOPS=PAR*2-1:KEY 9,"GOTO 1030"-CHR$(13):KEY 10,"GOTO
    100"-CHR$(13)
150 DEFDL J,A,B,D,E,O
155 NUMPUN2=NUMPUN + INT(NUMPUN*.4)
160 DIM JOT1(NUMPUN2,PAR), JOT2(PAR,NUMPUN2), ESE3(PAR,PAR),
    BE1(PAR,NUMPUN2), OQ1(PAR,1), CINF(PAR), CSUP(PAR)
170 DIM ERE1(NUMPUN2,1), EREZ(1,NUMPUN2), DE1(PAR,PAR),
    EYE1(NUMPUN2), ECAL(NUMPUN2), DOBLUO(NUMPUN2),
    DOBLU2(NUMPUN2), DOBLU3(NUMPUN2)
180 DIM OO(PAR), OO1(PAR,1), OO2(PAR,1), OO3(PAR,1),
    AAD1(PAR,PAR), AAD3(PAR,PAR)
190 DIM A(PAR,NOP2),EX(PAR,PAR),C(PAR),OONIS$(PAR)
200 FOR I= 1 TO PAR:PRINT "¿ NOMBRE DEL PARAMETRO # ":I;" ?
    ":INPUT OONIS(I):NEXT I
210 PRINT :INPUT "¿ CUANTOS SUBSTRATOS TIENE TU ECUACION ":AJCS
220 NOSUS=VAL(AJCS):DIM ESE(NOSUS,NUMPUN),DS(NOSUS),ESENS(NOSUS)
230 FOR I= 1 TO NOSUS:PRINT "¿NOMBRE DEL SUSTRATO # ":I;" ? ":
    INPUT ESRHS(I):NEXT I
240 INPUT "¿ CUANTOS INHIBIDORES TIENE TU ECUACION ":AJCS
250 NOINH=VAL(AJCS):DIM EIN(NOINH,NUMPUN),DI(NOINH),EINNS(NOSUS)
260 IF NOINH=0 THEN GOTO 280
270 FOR I=1 TO NOSUS:PRINT "¿NOMBRE DEL INHIBIDOR # ":I;" ? ":
    INPUT EIINS(I):NEXT I
280 CLS:LOCATE 10,1:PRINT "¿ QUE TIPO DE PONDERACION DESEA USAR ?
    ":
290 PRINT TAB(4);"PESOS PROPORCIONADOS POR EL USUARIO (1)"
300 PRINT TAB(4);"VARIANZA CONSTANTE (2)"
310 PRINT TAB(4);"PESOS INTERMEDIOS ENTRE 2 Y 4 (3)"
320 PRINT TAB(4);"PESOS DE ERROR RELATIVO (4)"
325 PRINT TAB(4);"PESOS POR DIFERENCIAS DE RESPUESTA (5)"
330 PRINT :PRINT TAB(4);"SELECCIONE LA OPCION DESEADA TEGCLEANDO EL
    NUMERO ENTRE PARENTESIS "
340 RS=INKEYS:BECK = VAL(RS):IF BECK<1 OR BECK>5 THEN GOTO 340
350 DOBLU9=BECK/2 - 1
360 PRINT :PRINT TAB(4);"REGRESION NO-LINEAL SIMPLE (A)"
370 PRINT TAB(4);"REGRESION NO-LINEAL ROBUSTA (B)"
380 PRINT :PRINT TAB(4);"PRESIONE LA LETRA DE LA OPCION DESEADA"
390 CECS=INKEYS:IF CECS<>"A" AND CECS<>"a" AND CECS<>"B" AND
    CECS<>"b" THEN GOTO 390
400 CLS:LOCATE 10,10:PRINT "INTRODUZCA LOS VALORES ESTIMADOS PARA
    LOS PARAMETROS"
410 FOR I=1 TO PAR:PRINT I:". ":OONIS(I):" = ":INPUT
    OO(I,1):DO(I)=OO1(I,1):PRINT "COTA INF " :INPUT
    CINF(I):PRINT "COTA SUP = ":INPUT CSUP(I):NEXT I
420 PRINT "LOS ESTIMADOS PARA LOS PARAMETROS SON:"
```

```

430 PRINT :PRINT TAB(4);"BUENOS (1)":PRINT TAB(4);"REGULARES
(2)":PRINT TAB(4);"MALOS (3)":PRINT :PRINT TAB(4);"RESPONDA
CON EL NUMERO DE LA OPCION MAS ADECUADA"
440 RS=INKEYS:ESE9=VAL(RS):IF ESE9<1 OR ESE9>3 THEN GOTO 440
450 ESE=10*(-3+(ESES-1)*3)
460 CLS:PRINT "ENTRADA DE DATOS. INTRODUZCA LOS DATOS POR
GRUPOS:PRINT :PRINT "EN CADA GRUPO SE LE PEDIRA REVISAR LOS
DATOS SI OBSERVA ALGUN ERROR RESPONDA CON EL SIMBOLO &,EN
CASO CONTRARIO PRESIONE CUALQUIER OTRA TECLA"
470 PRINT :PRINT "PRESIONE CUALQUIER TECLA PARA CONTINUAR .
"
480 RS=INKEYS:IF RS="" THEN GOTO 480
490 FOR I= 1 TO NUMPUN:CLS:LOCATE 5,1:PRINT "DATO NUMERO ":I
500 INPUT "VELOCIDAD INICIAL = ":EYE1(I):ECAL(I)=EYE1(I)
510 IF BECK=1 THEN INPUT "EL PESO PARA ESTE VALOR ES =":DOBLU3(I)
520 FOR L=1 TO NOSUS:PRINT
530 PRINT TAB(4);"SUSTRATO # ";L;" ( ";ESENS(L);" ) = ": INPUT
ESE(L,1):NEXT L
540 IF NOINH=0 THEN GOTO 570
550 FOR L= 1 TO NOINH:PRINT
560 PRINT TAB(4);"INHIBIDOR # ";L;" ( ";EINNS(L);" ) = ": INPUT
EIN(L,1):NEXT
570 PRINT :PRINT "PUNTO NO ";I:PRINT "VELOCIDAD INICIAL = ":
EYE1(I)
580 FOR L= 1 TO NOSUS:PRINT "SUSTRATO NO ";L;" ( ";ESENS(L);" ) =
":ESE(L,1):NEXT L
590 IF NOINH=0 THEN GOTO 610
600 FOR L=1 TO NOINH:PRINT "INHIBIDOR NO ";L;" ( ";EINNS(L);" ) =
":EIE(L,1):NEXT L
610 IF BECK=1 THEN PRINT "PESO PARA ESTOS VALORES =":DOBLU3(I)
620 PRINT :PRINT "( ESTAN ESTOS DATOS BIEN ? DE NO SER ASI
CONTESTE &, PARA CONTINUAR OPRIMA
CUALQUIER OTRA TECLA . . ."
630 RS=INKEYS:IF RS="" THEN GOTO 630
640 IF RS="&" THEN GOTO 500
649 NEXT I
650 IF BECK <> 5 THEN GOTO 656
651 EW=ABS(EYE1(1)-EYE1(2))
652 FOR I=2 TO NUMPUN-1:IF EW<ABS(EYE1(I+1)-EYE1(I)) THEN
EW=ABS(EYE1(I+1)-EYE1(I))
653 NEXT I
654 DOBLU3(I) = (EW/(EYE1(2) - EYE1(1)))^2:DOBLU3(NUMPUN) =
(EW/(EYE1(NUMPUN)- EYE1(NUMPUN-1)))^2
655 FOR I=2 TO NUMPUN-1:DOBLU3(I) = ((EW/(EYE1(I+1) - EYE1(I)))^2
+ (EW/(EYE1(I) - EYE1(I-1)))^2)/2:NEXT I
656 PRINT
670 AA=1:AA9=1:TE=0
680 GOSUB A200
690 EE1=SQR(DERO1/(NUMPUN-PAR))
700 TE=TE+1
710 IF TE<50 THEN GOTO 740
720 CLS:PRINT "DESPUES DE 50 ITERACIONES NO HAY CONVERGENCIA"
730 GOTO 1180
740 PRINT :PRINT :PRINT TAB(10);"ITERACION = ":TE
750 FOR I=1 TO PAR
760 PRINT TAB(12);OON1$(I);" = ":OO1(I,1)
770 NEXT I
780 PRINT :PRINT "ERROR = ":EE1

```

```

790 GOSUB 1310
800 IF AA=0 THEN 970
810 IF AA<=.000000001* THEN AA=1
820 FOR I=1 TO PAR:OO2(I,1)=OO1(I,1)-OO1(I,1)
821 IF OO2(I,1)<CINF(I) THEN OO2(I,1)=CINF(I)
823 IF OO2(I,1)>CSUP(I) THEN OO2(I,1)=CSUP(I)
824 OO1(I,1)=OO2(I,1):NEXT I
830 GOSUB 1200
840 EE2=SQR(DIFRO1/(NUMPUN-PAR))
850 IF EE2>EE1 THEN 930
860 EME7=0
870 FOR I=1 TO PAR:EME7=EME7-ABS(OO1(I,1)/OO1(I,1)):NEXT I
880 IF EME7<.0001 THEN 990
890 FOR I=1 TO PAR:OO1(I,1)=OO2(I,1):NEXT I
900 EE1=EE2
910 IF EME>=.000001 THEN EME=EME/10
920 GOTO 700
930 IF EME<=1000000! THEN EME=EME*10
940 FOR I=1 TO PAR:OO1(I)=OO1(I,1):NEXT I
950 GOSUB 1200
960 GOTO 790
970 CLS:PRINT "NO HAY CONVERGENCIA. ITERACIONES = ";TE
980 GOTO 1000
990 CLS:LOCATE 2,10:PRINT "VALORES FINALES"
1000 PRINT "Valor de F de tablas, F("; NUMPUN; ", "; NUMPUN-PAR;
" 1)"= "; INPUT EE2;
1005 LOCATE 1,25:PRINT "PREPARE SU IMPRESORA, PRESIONE ESPACIO .
. ."
1006 RS= INKEYS: IF NOT(RS=" ") THEN GOTO 1090
1010 DEF FNAM(I,L)=ESE3(I,L)
1020 N=PAR:GOSUB 2040
1030 FOR I=1 TO PAR :LPRINT
1040 IF EX(I,1)<0 THEN EX(I,1)=-1*EX(I,1)
1050 LPRINT " PARAMETRO "I:" ( ";OONIS(I);" ) = ";OO2(I,1);"
~/- ";EE2*SQR(EX(I,1))
1060 NEXT I
1070 LPRINT:LPRINT "***** ERROR TOTAL = ";EE1
1080 LOCATE 24,15:PRINT "PRESIONE CUALQUIER TECLA PARA CONTINUAR .
."
1090 RS= INKEYS: IF RS="" THEN GOTO 1090
1100 GOSUB 1190
1110 FOR I=1 TO NUMPUN
1120 LPRINT I; TAB(8); EYE1(I); TAB(27); ECAL(I); TAB(56);
ECAL(I)-EYE1(I)
1130 H=H+1: IF H=20 THEN GOSUB 1150
1140 NEXT I:GOTO 1175
1150 PRINT "PARA CONTINUAR PRESIONE CUALQUIER TECLA . . . "
1160 RS=INKEYS: IF RS="" THEN GOTO 1150
1170 GOSUB 1190:RETURN
1175 PRINT "¿DESEA IMPRIMIR ANALISIS ESTADISTICO DE SUS DATOS? . .
(S/N)": UNAVEZ=1: RS=INKEY: IF (RS="S") OR (RS="s") GOTO
2300.
1176 PRINT:PRINT "PARA VOLVER A VER LOS RESULTADOS FINALES
PRESIONE * F-9 **":PRINT "PARA VOLVER A CORRER EL PROGRAMA
PARA LA MISMA ECUACION CON OTROS DATOS PRESIONE * F-10 **"
1180 END
1190 CLS: LPRINT "DATO #";TAB(11); "VELOCIDAD": TAB(30);
"VELOCIDAD"; TAB(60); "DIFERENCIA": LPRINT

```

```

TAB(9): "EXPERIMENTAL.":TAB(30): "CALCULADA":LPRINT:H=0: RETURN
1200 REM SUBROUTINA ERRORES Y RESIDUALES *****
*****>
1210 FOR I= 1 TO NUMPUN:GOSUB 1740
1220 ECAL(I)=FNA
1230 NEXT I
1240 GOSUB 1790
1250 DERO1=0
1260 FOR I=1 TO NUMPUN
1270 ERE1(I,1) = (ECAL(I)- EYE1(I))* DOBLUO(I): EREZ(1,I)=
ERE1(I,1):DERO1= DERO1+ ERE1(I,1)*2
1280 NEXT I
1290 RETURN
1300 REM SUBROUTINA GRADIENTE *****
*****>
1310 FOR JX=1 TO PAR
1320 FOR I= 1 TO NUMPUN
1330 GOSUB 1740
1340 O9=OO(JX):DYS=OO(JX)/100:OO(JX)=OO(JX)+DYS
1350 DY3 =(FNA)
1360 OO(JX)=O9-DYS
1370 DY3=DY3 -(FNA)
1380 OO(JX)=O9
1390 JOT1(I,JX)=DY3*DOBLUO(I)/(2*DYS)
1400 NEXT I:NEXT JX
1410 FOR I= 1 TO PAR: FOR JX= 1 TO NUMPUN: JOT2(I,JX)=JOT1(JX,I):
NEXT JX: NEXT I
1420 IF EME< 1000000! THEN GOTO 1480
1430 AA=AA*.2
1440 FOR K=1 TO PAR:OO1(K,1)=0:FOR ITN=1 TO NUMPUN
1450 OO1(K,1)=OO1(K,1)+JOT2(K,ITN)*ERE1(ITN,1):NEXT ITN:NEXT K
1460 IF AA<-.000000001! THEN AA9=0
1470 GOTO 1730
1480 FOR K=1 TO PAR: FOR H=1 TO PAR:ESE3(K,H)=0
1490 FOR ITN=1 TO NUMPUN: ESE3(K,H)= ESE3(K,H)+ JOT2(K,ITN)*
JOT1(ITN,H)
1500 NEXT ITN:DE1(K,H)=0
1510 IF K=H THEN DE1(K,H)=1/SQR(ESE3(K,H))
1520 NEXT H:NEXT K
1530 DEF FNFMB(I,JX)=ESE3(I,JX)
1540 GOSUB 1560
1550 GOTO 1620
1560 FOR K=1 TO PAR:FOR H=1 TO PAR:AAD3(K,H)=0
1570 FOR ITN=1 TO PAR: AAD3(K,H)= AAD3(K,H)+DE1(K,ITN)*
FNFMB(ITN,H): NEXT ITN
1580 NEXT H:NEXT K
1590 FOR K=1 TO PAR:FOR H=1 TO PAR:AAD1(K,H)=0
1600 FOR ITN=1 TO PAR: AAD1(K,H)= AAD1(K,H)+ AAD3(K,ITN)*
DE1(ITN,H): NEXT ITN
1610 NEXT H:NEXT K:RETURN
1620 FOR I=1 TO PAR:AAD1(I,1)=AAD1(I,1) + EME:NEXT I
1630 DEF FNAM(I,JX)=AAD1(I,JX)
1640 N=PAR:GOSUB 2040
1650 DEF FNFEM(I,JX)=EX(I,JX)
1660 GOSUB 1560
1670 FOR K=1 TO PAR:FOR H=1 TO NUMPUN:BE1(K,H)=0
1680 FOR ITN=1 TO PAR: BE1(K,H)= BE1(K,H)+ AAD1(K,ITN)*
JOT2(ITN,H): NEXT ITN

```

```

1690 NEXT H:NEXT K
1700 FOR K=1 TO PAR:OQ1(K,1)=0
1710 FOR ITN=1 TO NUMPUN: OQ1(K,1)= OQ1(K,1)+ BE1(K,ITN)*
ERE1(ITN,1): NEXT ITN
1720 NEXT K
1730 RETURN
1740 REM SUBRRUTINA DE DEFINICION *****
*****>
1750 FOR L=1 TO NOSUS:DS(L)=ESE(L,1):NEXT L
1760 IF NOINH=0 THEN GOTO 1780
1770 FOR L=1 TO NOINH:DI(L)=EIN(L,1):NEXT L
1780 RETURN
1790 REM SUB RUTINA DE PESADO *****
*****>
1800 IF (BECZ<>1) AND (BECZ<=4) THEN GOTO 1830
1810 FOR I=1 TO NUMPUN:DOBLUO(I)=DOBLU3(I):NEXT I
1820 GOTO 1850
1830 FOR I=1 TO NUMPUN:DOBLUO(I)=(1/ABS(ECAL(I)))^DOBLU9
1840 DOBLU3(I)=DOBLUO(I):NEXT I
1850 IF CECS="A" OR CECS="a" THEN GOTO 1990
1860 CE=0
1870 FOR I=1 TO NUMPUN
1880 CE=CE+ABS((ECAL(I))-EYE1(I))*DOBLU3(I))
1890 NEXT I
1900 IF CE=0 THEN GOTO 1990
1910 CE=CE/NUMPUN
1920 FOR I=1 TO NUMPUN
1930 DOBLU2(I)=ABS(DOBLU3(I))*(ECAL(I)-EYE1(I))/(6*CE)
1940 NEXT I
1950 FOR I=1 TO NUMPUN
1960 IF DOBLU2(I)^2>1 THEN DOBLUO(I)=3:GOTO 1980
1970 DOBLUO(I)=DOBLU3(I)^(1-DOBLU2(I)^2)
1980 NEXT I
1990 DOBLU8=0
2000 FOR I=1 TO NUMPUN:DOBLU8=DOBLU8+DOBLUO(I):NEXT I
2010 FOR I= 1 TO NUMPUN: DOBLUO(I)=DOBLUO(I)*NUMPUN/DOBLU8:NEXT I
2020 RETURN
2030 REM SUBRRUTINA DE INVERSION DE UNA MATRIZ. ELIMINACION
GAUSIANA CON PIVOTE TOTAL.
2040 FOR R= 1 TO N:FOR S=1 TO
N:EX(R,S)=O:A(R,S)=FNAM(R,S):A(R,S+N-1)=0
2050 IF R=S THEN A(R,S+N-1)=1
2060 NEXT S:C(R)=R:NEXT R
2070 FOR Z=1 TO N-1:EW=0:FOR R=Z TO N:FOR S=Z TO N
2080 IF ABS(A(R,S))>EW THEN LET U=R:V=S:EW=ABS(A(R,S))
2090 NEXT S:NEXT R
2100 IF U=Z THEN GOTO 2120
2110 FOR S=Z TO 2*N-1:EP=A(U,S):A(U,S)=A(Z,S):A(Z,S)=EP:NEXT S
2120 IF C=Z THEN GOTO 2150
2130 FOR R=1 TO N:EP=A(R,V):A(R,V)=A(R,Z):A(R,Z)=EP:NEXT R
2140 P=C(V):C(V)=C(Z):C(Z)=P
2150 FOR R=Z+1 TO N:EP = A(R,Z)/A(Z,Z)
2160 FOR S= Z+1 TO 2*N+1:A(R,S)=A(R,S)-EP*A(Z,S):NEXT S
2170 NEXT R:NEXT Z
2180 FOR Z=1 TO N:FOR R=N TO 1 STEP -1:EP=A(R,Z+N+1)
2190 IF R= N THEN GOTO 2210
2200 FOR S=R+1 TO N:EP=EP-A(R,S)*EX(Z,C(S)):NEXT S
2210 EX(Z,C(R))=EP/A(R,R)

```

```

2220 NEXT R:NEXT Z
2230 RETURN
2290 RM analisis estadistico del ajuste.2300 OSCURES = 0:OSUMRES
    =0
2310 FOR I = 1 TO NUMPUN
2315 DOBLUJ(I)= (ECAL(I)-EYE1(I))*DOBLUO(I)
2320 OSUMRES = OSUMRES + DOBLUJ(I)
2330 OSCURES = OSCURES + DOBLUJ(I)^2
2340 NEXT I
2350 OMEDRES=OSUMRES/NUMPUN
2360 ODESRES = SQR((OSCURES-OMEDRES*OSUMRES)/(NUMPUN-1)): OSUMRES
    = 0: OSCURES=0
2370 LPRINT"Experimental <Velocidad> Calculada Diferencias
    <Residuos> Normalizados "
2380 FOR I=1 TO NUMPUN
2390 DOBLU2(I) = (DOBLUJ(I)-OMEDRES)/ODESRES
2400 OSUMRES = OSUMRES + DOBLU2(I):OSCURES=OSCURES + DOBLU2(I)^2
2410 LPRINTUSING "#####"---
    ":EYE1(I):ECAL(I):(EYE1(I)-ECAL(I)):DOBLU2(I):
2420 IF (4*SQR(ABS((NUMPUN-PAR)*EE1^2-DOBLUJ(I)^2)/(NUMPUN-1))) <
    ABS(DOBLU2(I)) THEN LPRINT "" ELSE LPRINT
2425 NEXT I
2430 OMEDX =OSUMRES/NUMPUN: OMEDY= SQR((OSCURES- OMEDRES*
    OSUMRES)/( NUMPUN-1))
2432 LPRINT "Residuos Normalizados:Media+/-S.D.=>": OMEDX: "+/-":
    OMEDY
2435 OMEDX = ABS(OSUMRES)/SQR(NUMPUN)
2440 LPRINT "Los puntos con * han sido considerados 'OUTLIERS'"
2450 LPRINT "prueba de 'BIAS' T1 = ":OMEDX:" (para alfa=0.99,
    T1<=2.58)"
2460 IF (OMEDX >= 2.58) THEN LPRINT "si existe 'BIAS'" ELSE
    LPRINT "no se detecta 'BIAS'"
2470 OSUMRES=0:OSCURES=0:OMEDRES =0:ODESRES=0:OXYRES=0
2480 FOR I=1 TO NUMPUN
2490 OSCUSUS=0
2500 FOR L=1 TO NOSUS
2510 OSCUSUS = OSCUSUS + ESE(L,I)*ESE(L,I)
2520 NEXT L
2530 OSCUSUS = SQR(OSCUSUS)
2540 OSUMRES = OSUMRES + DOBLU2(I)
2550 OSCURES = OSCURES + DOBLU2(I)*DOBLU2(I)
2560 OXYRES = OXYRES + DOBLU2(I)*OSCUSUS
2570 OMEDRES = OMEDRES + OSCUSUS
2580 ODESRES = ODESRES + OSCUSUS*OSCUSUS
2590 NEXT I
2600 OMEDX = OSUMRES/NUMPUN
2610 OSCURES = SQR((OSCURES - OSUMRES*OMEDX)/(NUMPUN-1))
2620 OMEDY = OMEDRES/NUMPUN
2630 ODESRES = SQR((ODESRES - OMEDRES*OMEDY)/(NUMPUN-1))
2640 OXYRES = (OXYRES -
    NUMPUN*OMEDX*OMEDY)/(NUMPUN*OSCURES*ODESRES):LPRINT
    "R entre ligandos y errores":OXYRES
2650 OXYRES = (OXYRES*SQR(NUMPUN-3))/SQR(1-OXYRES*OXYRES))
2660 LPRINT "prueba de 'TRENDS' T2 = ":ABS(OXYRES):" G.L. =
    ": (NUMPUN-PAR)
2670 LPRINT "T2 debe ser menor que la 't-de student' para el
    alfa deseada"
2675 LPRINT "Prueba de uniformidad de informacion en el

```

```

JACOBIANO:":LPRINT"Los siguientes cocientes de segundas
derivadas no estan bien condicionados"
2677 FOR I = 1 TO PAR:OO(I)=0:NEXT I
2680 FOR I = 1 TO PAR-1
2690 FOR L = I+1 TO PAR
2700 IF ((ABS(ESE3(I,I)/ESE3(L,L))) > 1000) OR ((ABS(
ESE3(I,I)/ESE3(L,L) )) < 0.001) THEN OO(I)=OO(I)+1:
OO(L)=OO(L)+1: LPRINT"J("I:");J("L:L:") ";
2710 NEXT L:LPRINT" "
2720 NEXT I
2730 LPRINT"Porcentaje de deficiencias por parámetro en el
JACOBIANO"
2740 FOR I=1 TO PAR
2750 LPRINT"Parámetro      *":I:"      (":OO(I):")
":OO(I)*100/(PAR*(PAR-1)):" %"
2760 NEXT I
1165 PRINT :PRINT "PARA VOLVER A VER LOS RESULTADOS FINALES
PRESIONE * F-9 *":PRINT "PARA VOLVER A CORRER EL PROGRAMA
PARA LA MISMA ECUACION CON OTROS DATOS PRESIONE * F-10 *".
2780 END

```

BIBLIOGRAFIA.

1. Anderson, L.E. 1979. Interaction between photochemistry and activity of enzymes. Ed. Photosynthesis IV. Photosynthetic carbon metabolism and related processes. Encyclopaedia of Plant Physiology, ed. M. Gibbs y E. Latzko. 6:271-281. Springer, New York.
2. Anderson, L.E., Ng, T.C.L. y Park, K.E.Y. 1974. Inactivation of pea leaf chloroplastic and cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase by light and DIT. *Plant. Physiol.* 53:835-849.
3. Andreo, C.S., Iglesias, A.A., Podestá, E. y Wagner, R. 1986. Chemical modification of the Phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves and its conformation in isotropic solution. Studies via triplet lifetime and rotational diffusion using eosin isothiocyanate as label. *Biochim. Biophys. Acta.* 870:292-301.
4. Andreo, C.S., González, D.H. e Iglesias, A.A. 1987. Higher plant Phosphoenolpyruvate carboxylase. Structure and regulation. *FEBS Lett.* 213(1):1-8.
5. Akaaba, L.M. y Anderson, L.E. 1981. Light modulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase by photosynthetic electron flow in pea chloroplasts. *Plant. Physiol.* 67:197-200.
6. Ashton, A.R., Burnell, J.N. y Hatch, M.D. 1984. Regulation of C₄ photosynthesis: inactivation of pyruvate, P_i dikinase by ADP-dependent phosphorylation and activation by phosphorolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 230(2):492-505.
7. Ashton, R.D. y Hatch, M.D. 1983. Regulation of C₄ photosynthesis: regulation of pyruvate, P_i dikinase by ADP-dependent phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 115(1):53-60.
8. Bandurski, R.S., y Greiner, C.M. 1953. Enzymic-synthesis of oxaloacetate from phosphoryl-enolpyruvate and CO₂. *J. Biol. Chem.* 204. 781-786.
9. Bassham, J.A. 1977. The reductive pentose cycle and its regulation. Ed. Encyclopaedia of Plant Physiology, New Series, ed. M. Gibbs y E. Latzko. 6:9-31. Springer, New York.
10. Baue, H. An efficient method for the determination of the Km values for HCO₃⁻ of Phosphoenolpyruvate carboxylase. *Planta* 169:356-360.
11. Bhagwat, A.S., Mitra, J. y Sane, P.V. 1977. Studies on enzymes of C₄ pathway: Part III. -regulation of malic enzyme of Zea mays by Fructose-1,6-diphosphate and other metabolites. *Indian. J. Exp. Biol.* 15:1008-1012.

12. Bhagwat, A.S. y Sane, P.V. 1977. Studies on enzymes of C₄ pathway: Part IV - comparative study of inhibitors of malic enzyme isolated from CAM, C₄ and C₃ plants. *Indian J. Exp. Biol.* 15:1013-1015.
13. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
14. Brulfert, J., Arracaba, M.C. y Guerrier, O. 1979. Changes in the isoenzymatic pattern of phosphoenolpyruvate carboxylase. An early step in photoperiodic control of Crassulacean acid metabolism level. *Planta* 146:129-133.
15. Brulfert, J. y Glöckl, S. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a control point for photoperiodism in Crassulacean acid metabolism. *Physiol. Veg.* 21(5):987-995.
16. Brulfert, J., Kluge, M. y Queiroz, O. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase a key-enzyme in plants. *Physiol. Veg.* 21(5):803-804.
17. Brulfert, J., Müller, D., Kluge, M. y Queiroz, O. 1982. Photoperiodism and Crassulacean acid metabolism I. Immunological and kinetic evidences for different patterns of Phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in photoperiodically inducible and non-inducible Crassulacean acid metabolism. *Planta* 154:326-331.
18. Buchanann, B.B. 1980. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 31:341-374.
19. Buchanann, B.B., Wołosluk, R.A. y Schurmann, P. 1979. Thioredoxin and enzyme regulation. *Trends. Biochem. Sci.* 4:93-96.
20. Burnell, J.N. y Hatch, M.D. 1983. Dark-light regulation of pyruvate, P_i dikinase in C₄ plant: evidence that the same protein catalyzes activation and inactivation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111(1):288-293.
21. Canela, E.I. 1984. A free derivative program for non-linear regression analysis of enzyme kinetics to be used on small computers. *Int. J. Bio-Med. Comp.* 15:121-130.
22. Carter, P.J., Nimmo, H.G., Fewson, C.A. y Wilkings, M.B. 1990. *Bryophyllum fedtschenkoi* protein phosphatase type 2A can dephosphorylate Phosphoenolpyruvate carboxylase. *FEBS Lett.* 263(2):233-236.
23. Cerana, R., Mathew, Y. y Kurdjian, A. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and the regulation of intracellular pH in plant cells. *Physiol. Veg.* 21(5):875-881.
24. Chou, Q. y Shi, J.-N., 1984. Structural features of C₄ Phosphoenolpyruvate carboxylase. *Chinese J. Biochem. Biophys.* 20(1):47-56.

25. Coombs, J. 1979. Enzymes of C₄ metabolism. *En. Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series*, ed. M. Gibbs y E. Latzko. 6:251-262. Springer, New York.
26. Coombs, J., Baldry, C.W. y Bucke, C. 1973. C₄-pathway in *Pennisetum purpureum*. I. Allosteric nature of Phosphoenolpyruvate carboxylase. *Planta* 110:95-107.
27. Coombs, J., Maw, S.L. y Baldry, C.W. 1974. Metabolic regulation in C₄ photosynthesis. I. Phosphoenolpyruvate carboxylase and energy charge. *Planta*. 117:279-292.
28. Coombs, S.J., Maw, S.L. y Baldry, C.W. 1975. Metabolic regulation and C₄ photosynthesis: The inorganic carbon substrate for PEP carboxylase. *Plant Sci. Lett.* 4:97-102.
29. Cooper, T.G. y Wood, A.G. 1971. The carboxylation of phosphoenolpyruvate and Pyruvate. The active species of CO₂ utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 246:5488-5490.
30. Cornish-Bowden, A. 1976. Estimation of the dissociation constants of enzyme-substrate complexes from steady-state measurements. *Biochem. J.* 153:455-461.
31. Coruzzi, G., Broglio, R., Edwards, C. y Chua, N. -H. 1984. Tissue-specific and light-regulates expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *EMBO J.* 3(8):1671-1679.
32. Cretin, C., Keyer, E., Tagu, D., Lepiniec, I., Vidal, J. y Gadal, P. 1990. Complete cDNA sequence of sorghum Phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C₄ photosynthesis. *Nucleic Acids Res.* 18(3):658.
33. Cushman, J.C. y Bohnert, H.J. 1989. Nucleotide sequence of the PpC2 gene encoding a housekeeping isoform of Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Nucleic Acids Res.* 17(16):6743-6746.
34. Cushman, J.C. y Bohnert, H.J. 1989. Nucleotide sequence of the gene encoding a CAM specific isoform of Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Nucleic Acids Res.* 17(16):6745-6746.
35. Davies, D.D. 1979. The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 30:131-158.
36. Day, D.A. y Hatch, M.D. 1981. Dicarboxylate transport in maize mesophyll chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 211(2):738-742.
37. Day, D.A. y Hatch, M.D. 1981. Transport of 3-phosphoglyceric acid, phosphoenolpyruvate, and inorganic phosphate in maize mesophyll chloroplasts, and the effect of 3-phosphoglyceric acid on malate and phosphoenolpyruvate production. *Arch. Biochem. Biophys.* 211(2):743-749.

38. Deleens, E. y Brulfert, J. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase capacity and establishment of autotrophy in maize seedlings. *Physiol. Veg.* 21(5):827-834.
39. Dennis, D.T. y Miernyk, J.A. 1982. Compartmentation of non-photosynthetic carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 33:27-50.
40. Doncaster, D.H. y Leegood, R.C. 1987. Regulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in maize leaves. *Plant Physiol.* 84:82-87.
41. Donkin, M.E., Taffs, J. y Martin, E.S. 1982. A study of the *in-vitro* regulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase from the epidermis of *Commelina communis* by malate and glucose-6-phosphate. *Planta.* 155:416-422.
42. Duggleby, R.G., y Dennis, D.T. 1970. Nicotinamide Adenine dinucleotide-specific isocitrate dehydrogenase from higher plants. The requirement from free and metal complexed isocitrate. *J. Biol. Chem.* 245:3745-3750.
43. Echeverria, C., Vidal, J., LeMarechal, P., Blulfert, J., Rangeva, R. y Gadal, P. 1988. The phosphorylation of sorghum leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase is a Ca^{2+} -Calmodulin dependent process. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 155(2):835-840.
44. Edwards, G.E. y Huber, S.C. 1981. The C_4 pathway. *En: The biochemistry of plants*, ed. M.D. Hatch y N.K. Boardman. 8:237-281. Academic Press, New York.
45. Edwards, G.E., Nakamoto, H., Burnell, J.N. y Hatch, M.D. 1985. Pyruvate, P_i, dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C_4 photosynthesis: properties and mechanism of light/dark regulation. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 36:255-286.
46. Falkner, G. y Horner, F. 1976. pH changes in the cytoplasm of the blue green alga *Anacystis nidulans* caused by light-dependent proton flux in the thylakoid space. *Plant Physiol.* 58:717-718.
47. Flugge, U.F., Stitt, M.S. y Heldt, H.W. 1985. Light-driven uptake of pyruvate into mesophyll chloroplasts from maize. *FEBS Lett.* 183(2):335-339.
48. Frieden, C. 1964. Treatment of enzyme kinetic data I. The effect of modifiers on kinetic parameters on single substrate enzymes. *J. Biol. Chem.* 239:3522-3535.
49. Furbank, R.T. y Walker, D.A. 1985. Photosynthetic induction in C_4 leaves. An investigation using infra-red gas analysis and chlorophyll a fluorescence. *Planta.* 163:75-83.
50. Gadal, P. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen fixation. *Physiol. Veg.* 21(5):1069-1074.

51. Gadal, P., Ferrot-Rachenmann, C. y Vidal, J. 1983. Immunochemical visualization of Phosphoenolpyruvate carboxylase in higher plants. *Physiol. Veg.* 21:1055-1062.
52. Gavalas, N.A., Caravatas, S. y Manetas, Y. 1982. Factors affecting a fast and reversible inactivation of photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase. *Photosynthetica.* 16(1):49-58.
53. Goatly, M.B., Coombs, J. y Smith, H. 1975. Development of C₄ photosynthesis in sugar cane: change in properties of phosphoenolpyruvate carboxylase during greening. *Planta.* 125:15-24.
54. Good, M.E. y Bell, D.H. 1980. Photosynthesis, plant productivity and crop yield. *Enl: The biology of crop productivity.* ed. P.S. Carlson. pp.3-51. Academic Press, New York.
55. González, D.H. y Andreo, C.S. 1988. Carboxylation and dephosphorylation of phosphoenol-3-fluoropyruvate by maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 253:217-222.
56. González, D.H. y Andreo, C.S. 1988. Identification of 2-enolbutyrate as the product of the reaction of maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase with (Z)- and (E)-2-phosphoenolbutyrate. Evidence from NMR and kinetic methods. *Biochem.* 27:177-183.
57. González, D.H. y Andreo, C.S. 1988. Stereoselectivity of the interaction of E and Z-2-phosphoenolbutyrate with maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase. *Eur. J. Biochem.* 173:339-343.
58. González, D.H. y Andreo, C.S. 1989. The use of substrate analogs to study the active-site structure and mechanism of PEP carboxylase. *Trends Biochem. Sci.* 14:24-27.
59. González, D.H., Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. 1984. On the regulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase activities from maize leaves by L-malate. Effect of pH. *J. Plant Physiol.* 116:425-434.
60. González, D.H., Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. 1986. Active-site directed inhibition of Phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by bromopyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.* 245(1):179-186.
61. González, D.H., Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. 1987. Interaction of acetyl phosphate and carbamyl phosphate with plant Phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 241:543-548.
62. Graham, D. y Walker, D.A. 1962. Some effects of light on the interconversion of metabolites in green leaves. *Biochem. J.* 82:554-560.

63. Graham, D., Hatch, M.D., Slack, C.R. y Salle, R.M. 1970. Light-induced formation of enzymes of the C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis in detached leaves. *Phytochem.* 9:521-532.
64. Guern, J., Mathieu, Y. y Kurdjian, A. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and the regulation of intracellular pH in plant cells. *Physiol. Veg.* 21(5):855-866.
65. Guidici-Orticoni, M.-T., Vidal, J. Le Maréchal, P., Thomas, M., Gadal, P., AND Rémy, R. 1988. *In vivo* phosphorylation of sorghum leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochimie.* 70, 769-772.
66. Guy, R.D., Vanlenberghe, G.C. y Trupin, D.H. 1989. Significance of Phosphoenolpyruvate carboxylase during ammonium assimilation. *Plant Physiol.* 89:1150-1157.
67. Hague, D.R. y Sims, T.L. 1980. Evidence for light-stimulated synthesis of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of maize. *Plant Physiol.* 66:505-509.
68. Hansen, D.E. y Knowles, J.R. 1982. The stereochemical course of phosphorus of the reaction catalyzed by Phosphoenolpyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 257(24):14795-14798.
69. Haschke, H.P. y Lutttge, J. 1975. Stoichiometric correlation of malate accumulation with auxin-dependent K⁺-H⁺ exchange and growth in *Avena* coleoptile segments. *Plant. Physiol.* 56:696-698.
70. Hatch, M.D. 1978. Regulation of enzymes of C₄ metabolism. *En: Current topics in cellular regulation.* 14:1-27. Academic press. U.S.A.
71. Hatch, M.D. 1979. Mechanism of C₄ photosynthesis in *Chloris gayana*: pool sizes and kinetics of 14-CO₂ incorporation into 4-carbon and 3-carbon intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.* 194(1):117-127.
72. Hatch, M.D. y Burnell, J.N. 1983. Regulation of C₄ photosynthesis: stability and other characteristics of the ATP-ADP-dependent inactivation of pyruvate, P_i dikinase in maize chloroplast extracts. *Aust. J. Plant. Physiol.* 10:179-186.
73. Hatch, M.D. y Osmond, C.B. 1976. Compartmentation and transport in C₄ photosynthesis. *En: Encyclopaedia of Plant Physiology.* New Series. ed. M. Gibbs y E. Latzko. 3:144-184. Springer. New York.
74. Hayakawa, S., Matsunaga, K. y Sugiyama, T. 1981. Light induction of phosphoenolpyruvate carboxylase in etiolated maize leaf tissue. *Plant. Physiol.* 67:133-138.
75. Hill, B.C. y Baun, A.W. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity from *Avena* coleoptile tissue. Regulation by H⁺ and Malate. *Can. J. Bot.* 56:404-407.

76. Holaday, A.S. y Clanton, C.B. 1981. Comparative characterization of Phosphoenolpyruvate carboxylase in Ca, Ca and Ca-Ca intermediate *Panicum* species. *Plant Physiol.* 67:330-334.
77. Huber, H. y Edwards, G.E. 1975. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase of C4 plants by malate and aspartate. *Can. J. Bot.* 53:1925-1923.
78. Huber, S.C. y Edwards, G.E. 1975. Light-dependent CO₂ fixation by mesophyll cells, protoplasts and protoplast extracts of *Digitaria sanguinalis*. *Plant. Physiol.* 55:835-844.
79. Huber, S.C. y Edwards, G.E. 1977. Transport in C4 mesophyll chloroplasts: evidence for an exchange of inorganic phosphate and phosphoenolpyruvate. *Biochim. Biophys. Acta.* 462:603-612.
80. Huber, S.C. y Sugiyama, T. 1986. Changes in sensitivity to effectors of maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase during light/dark transitions. *Plant Physiol.* 81:674-677.
81. Huber, S.C., Sugiyama, T. y Akazawa, T. 1986. Light modulation of maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 82:550-554.
82. Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. 1983. The presence of essential histidine residues in Phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* 749:9-17.
83. Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. 1984. Involvement of the thiol groups in the activity of Phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Photosyn. Res.* 5:215-226.
84. 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.
85. Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. 1989. Purification of NADP-Malic enzyme and PEP carboxylase from sugar cane leaves. *Plant. Cell Physiol.* 30(3):399-405.
86. Iglesias, A.A., González, D.H. y Andreo, C.S. 1980. Purification and kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Amaranthus viridis* L. leaves. *Planta* 168:239-244.
87. Iglesias, A.A., González, D.H. y Andreo, C.S. 1984. Inactivation of Phosphoenolpyruvate carboxylase by modification with phenylglyoxal. *Biochim. Biophys. Acta.* 788:41-47.
88. Izui, K., Ishijima, S., Yamaguchi, Y., Katagiri, F., Murata, T., Shigesada, K., Sugiyama, T. y Katsuki, H. 1986. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding active Phosphoenolpyruvate carboxylase of the C4-pathway from maize. *Nucleic Acids Res.* 14(4):1615-1629.

89. Izui, K., Matzuda, Y., Kameshita, I., Katsuki, H. y Woods, A.E. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Inhibition by various analogs and homologs of Phosphoenolpyruvate. *J. Biochem.* 94:1789-1789.
90. Jawali, N. y Bhagvat, A.S. 1987. Inhibition of Phosphoenolpyruvate carboxylase from maize by 2-phosphoglycolate. *Photosyn. Res.* 11:153-159.
91. Jawali, N. 1990. The dimeric form of Phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize: Physical and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 277(1):61-68.
92. Jawali, N. 1990. Hysteretic nature of Phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize. *Arch. Biochem. Biophys.* 277(1):69-73.
93. Jenkins, C.L.D., Harris, R.N.L. y McFadden, H.G. 1986. Activation of maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase by the non-physiological substrate analogue methyl -2-dihydroxyphosphinoylmethyl -2-propenoate. *Biochem. Int.* 12(4):619-625.
94. Jiao, J., y Chollet, R. 1988. Light/dark regulation of maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase by *in vivo* phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 261:409-417.
95. Jiao, J.-A. y Chollet, R. 1989. Regulatory seryl-phosphorylation of a C₄ Phosphoenolpyruvate carboxylase by a soluble protein kinase from maize leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 269(2):526-535.
96. Jiao, J.-A. y Shi, J. 1987. Studies on the symmetry of quaternary structure of Phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum leaves. *Scientia Sinica (series B)* 30:1060-1069.
97. 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 C₄ dicarboxylic acid pathway. *Biochem. J.* 119:273-280.
98. Jones, R., Wilkings, M.D., Coggins, J.R., Fewson, C.A. y Malcolm, A.D.B. 1978. Phosphoenolpyruvate carboxylase from the crassulacean plant *Bryophyllum fedtschenkoi* Haet et Perrier. *Biochem. J.* 175:391-406.
99. Kagawa, T. y Hatch, M.D. 1977. Regulation of C₄ photosynthesis: characterization of a protein factor mediating the activation and inactivation of NADP-malate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 184:290-297.
100. Karabourniotis, G., Manetas, Y. y Gavalas, N.A. 1983. Photoregulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Salsola soda* L. and other C₄ plants. *Plant. Physiol.* 73:735-739.
101. Karabourniotis, G., Manetas, Y. y Gavalas, N.A. 1985. Detecting photoactivation of Phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄ plants. An effect of pH. *Plant. Physiol.* 77:300-302.

102. Kawamura, T., Shigesada, K., Yanagisawa, S. y Izui, K. 1990. Phosphoenolpyruvate carboxylase prevalent in maize roots: Isolation of a cDNA clone and tissue for analysis of the gene and protein. *J. Biochem.* 107:165-168.
103. Kleczkowski, L.A. y Edwards, G.E. 1989. Hysteretic aspects in assay of PEP carboxylase. *Plant Physiol.* 89: suppl 484, p. 81.
104. Kleczkowski, L.A. y Edwards, G.E. 1989. Hysteresis and reversible cold inactivation of maize Phosphoenolpyruvate carboxylase. *Z. Naturforsch.* 45c:42-46.
105. Kluge, M. 1983. The role of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄-photosynthesis and Crassulacean acid metabolism. *Physiol. Veg.* 21(5):817-825.
106. Koltrý, S., y Suřha, L. 1985. Handbook of Chemical Equilibria in Analytical Chemistry, pp.111,176. Ellis Horwood, Ltd. London.
107. Krachru, R.B. y Anderson, L.E. 1975. Inactivation of pea leaf phosphofructokinase by light and DTT. *Plant Physiol.* 55:199-202.
108. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
109. Laetsch, W.M. 1974. The C₄ syndrome: A structural analysis. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25:27-52.
110. Latzko, E. y Kelly, G.J. 1983. The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. *Physiol. Veg.* 21(5):805-815.
111. Lavergne, D. y Champigni, M.-L. 1983. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Penisetum americanum* by adenine nucleotides and energy charge. *Physiol. Veg.* 21(5):1021-1029.
112. Leegood, R.C. y Furbank, R.T. 1984. Carbon metabolism and gas exchange in leaves of *Zea mays* L. Changes in CO₂ fixation, chlorophyll fluorescence and metabolite levels during photosynthetic induction. *Planta* 162:450-456.
113. Leegood, R.C. y Walker, P.A. 1982. Regulation of Fructose-1,6-bisphosphatase activity in leaves. *Planta.* 156:449-456.
114. Leegood, R.C. y Walker, D.A. 1983. Modulation of NADP-malate dehydrogenase activity in maize mesophyll chloroplasts. *Plant Physiol.* 71:513-518.
115. Levi, C., Perchorowics, J.T. y Gibbs, M. 1978. Malate synthesis by dark carbon dioxide fixation in leaves. *Plant. Physiol.* 61:477-480.

116. López-Pozos, R., Rodríguez-Sotres, R. y Muñoz-Clares, R.A. 1990. Hysteretic properties of maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase in crude desalted extracts. Effects of metabolites and light. *J. Plant Physiol.* in press.
117. Lowe, J. y Slack, C.R. 1971. Inhibition of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by oxaloacetate. *Biochim. Biophys. Acta.* 235:207-209.
118. Manchester, K.L. 1980. Determination of magnesium and potassium binding constant to Phosphoenolpyruvate, 2- and 3-phosphoglycerate and a number of other anions. *Biochim. Biophys. Acta.* 630:225-231.
119. Manetas, Y y Gavalas, N.A. 1982. Evidence for essential sulphhydryl group(s) in photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase: protection by substrate, metal substrate and glucose-6-phosphate against p-chloromercuribenzoate inhibition. *Photosynthetica.* 16(1):59-66.
120. Manetas, Y. y Gavalas, N.A. 1983. Post-translational regulation of C₄ and CAM phosphoenolpyruvate carboxylase. *Physiol. Veg.* 21(5):911-917.
121. Manetas, Y. Petropoulou, Y y Karabourniotis, G. 1986. Compatible solutes and their effects on Phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄-halophytes. *Plant, Cell and Environment.* 9:145-151.
122. Mathieu, Y. 1982. pH Dependence of Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Acer pseudoplatanus* cell suspensions. *Plant Sci. Lett.* 28:111-119.
123. Mareš, J. y Leblová, S. 1980. Phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of maize, sorghum and millet. *Photosynthetica.* 14(1):25-31.
124. Maruyama, H., Easterday, R.L., Chang, H.-C. y Lane, M.D. 1966. The enzymatic carboxylation of Phosphoenolpyruvate. I. Purification and properties of Phosphoenolpyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 241(10):2405-2412.
125. Maruyama, H. y Lane, M.D. 1962. Purification and properties of Phosphoenolpyruvate carboxylase from the germinating Peanut cotyledons. *Biochim. Biophys. Acta.* 65:207-218.
126. Matsuoka, M. y Hata, S. 1987. Comparative studies of Phosphoenolpyruvate carboxylase from C₃ and C₄. *Plant Physiol.* 85:947-951.
127. McClure, P.R., Coker III, G.T. y Sheubert, K.R. 1983. Carbon dioxide fixation in roots and nodules of *Alnus glutinosa*. I. Role of Phosphoenolpyruvate carboxylase and carbamyl phosphate synthetase in dark CO₂ fixation, citrulline synthesis and N₂ fixation. *Plant Physiol.* 71:652-657.

128. McNaughton, G.A., Fewson, C.A., Wilkings, S.M.B. y Nimmo, H.G. 1989. Purification, oligomerization state and malate sensitivity of maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 261:349-355.
129. Melzer, E. y O'Leary, M.H. 1987. Anapleurotic CO₂ Fixation by Phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. *Plant Physiol.* 84:58-60.
130. Meyer, C.R., Rustin, P. y Wedding, R.T. 1988. A simple and accurate spectrophotometric assay for Phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *Plant Physiol.* 86:605-606.
131. Meyer, C.R., Rustin, P. y Wedding, R.T. 1989. A kinetic study of the effects of phosphate and organic phosphate on the activity of Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*. *Arch. Biochem. Biophys.* 271(1):84-97.
132. Miller, R.S., Mildvan, A.S., Chang, H.-C., Easterday, R.L., Maruyama, H. y Lane, M.D. 1968. The enzymatic carboxylation of Phosphoenolpyruvate. IV. The binding of manganese and substrates by phosphoenolpyruvate carboxylase and Phosphoenolpyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 243(22):6030-6040.
133. Miziorko, H.M., Novak, T. y Mildvan, A.S. 1974. Spinach leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase: Purification properties and kinetic studies. *Arch. Biochem. Biophys.* 163:378-389.
134. Mohamed, A.H. y Anderson, L.E. 1981. Extraction of chloroplast Light Effect Mediators and reconstitution of light activation of NADP-linked malate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 209(2):606-612.
135. Morrison, J.F. 1979. Approaches to kinetic studies on metal-activated enzymes. *Enz. Methods in Enzymology* (Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., eds.) Vol. 63, pp. 257-294. Academic Press, New York.
136. Mujica-Jiménez, C. 1990. Estudios sobre la actividad a pH alcalino de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz. Tesis para obtener el título de Biólogo. F. Ciencias. UNAM. Ciudad Universitaria, México D.F.
137. Mukerji, S.K. y Ting, I.P. 1971. Phosphoenolpyruvate carboxylase isoenzymes. Separation and properties of three forms from cotton leaf tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* 143:297-317.
138. Mukerji, S.K. 1974. Corn leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase activation by magnesium ions. *Plant Sci. Lett.* 2:243-248.
139. Mukerji, S.K. 1977. Corn Leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase. Inhibition of CO₂ fixation by SO₃²⁻ and activation by glucose-6-phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 182:360-365.

140. Mukerji, S.K., 1977. Corn leaf Phosphoenolpyruvate carboxylases. Purification and properties of two isoenzymes. Arch. Biochem. Biophys. 182:343-351.
141. Mukerji, S.K., 1977. Corn Leaf Phosphoenolpyruvate carboxylases. The effect of divalent cations on activity. Arch. Biochem. Biophys. 182:352-359.
142. Nakamoto, H. y Edwards, G.E. 1983. Influence of oxygen and temperature on the dark inactivation of pyruvate, Pi, dikinase and NADP-malate dehydrogenase in maize. Plant. Physiol. 71:568-575.
143. Nakamoto, H. y Sugiyama, T. 1982. Partial characterization of the *in vitro* activation of inactive pyruvate, Pi, dikinase from darkened maize leaves. Plant. Physiol. 69:749-753.
144. Ngam-Ek, A., Seery, T.A.P., Amls, E.J. y Grover, S.D. 1989. Malate-induced hysteresis of Phosphoenolpyruvate carboxylase from *crassula argentea* Plant Physiol. 91(3):954-960.
145. Nguyen, T.T., Ngam-ek, A., Jenkins, J. y Scott, D.G. 1988. Metal ion interactions with Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea* and *Zea mays*. Plant Physiol. 86:104-107.
146. Nimmo, G.A. McNaughton, G.A.A., Fewson, C.A., Wilkins, M.B. y Nimmo, H.G. 1987. Changes in the kinetic properties and phosphorylation state of Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Zea mays* leaves in response to light and dark. FEBS Lett. 213(1):18-22.
147. Nimmo, G.A., Nimmo, H.G., Hamilton, I.D., Fewson, C.A. y Wilkins, M.B. 1986. Purification of the phosphorylated night form and dephosphorylated day form of Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Bryophyllum fedtschenkoi*. Biochem. J. 239:213-230.
148. Nishikido, T. y Takanashi, H. 1973. Glycine activation of PEP carboxylase from monocotyledoneus C₄ plants. Biochem. Biophys. Res. Comm. 53(1):126-133.
149. Nishizawa, A.N. y Buchanann, B.B. 1981. Enzyme regulation in C₄ photosynthesis. Purification and properties of Thioredoxin-linked fructose biphosphatase and sedoheptulose biphosphatase from corn leaves. J. Biol. Chem. 256(12):6119-6126.
150. O'Leary, M.H. 1982. Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's view. Ann. Rev. Plant Physiol. 33:297-315.
151. O'Leary, M.H., Rife, J.E. y Slater, J.D. 1981. Kinetic and isotope effect studies of maize Phosphoenolpyruvate carboxylase. Biochemistry 20:7308-7314.
152. Oshugi, R. y Murata, T. 1980. Leaf anatomy post-illumination CO₂ burst and NADP-malic enzyme activity of *Panicum dichotomiflorum*. Plant. Cell. Physiol. 21(7):1329-1333.

153. Osmond, C.B. 1978. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29: 379-414.
154. Osmond, C.B., Björkman, O. y Anderson, D.J. 1980. Productivity and environment. *Ed.* Physiological processes in Plant Ecology. Toward a Synthesis with *Atriplex*. Ed. Osmond, C.B., Björkman, O. y Anderson, D.J. pp 379-459. Springer-Verlag, Heidelberg, New York, 1980.
155. Osmond, C.B. y Hultine, J.A.M. 1981. Crassulacean acid metabolism. *Ed.* The Biochemistry of Plants. ed. P.F. Stumpf y E.E. Conn. 8: 283-328. Academic Press, New York.
156. O'Sullivan, W.J. y Smithers, G.W. 1979. Stability constants for biologically important Metal-ligand complexes. *Ed.* Methods in Enzymology (Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., eds.) Vol. 63. pp. 294-336, Academic Press, New York.
157. Pays, A.A.G, Jones, R., Wilkings, M.B., Fewson, C.A. Y Malcolm, A.B.D. 1980. Kinetic analysis of effectors of Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Bryophyllum fedtschenkoi*. *Arch. Biochem. Biophys.* 614: 151-162.
158. Podestá, F.E. y Andreo, C.S. 1989. Maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase. Oligomeric state and activity in the presence of glycerol. *Plant Physiol.* 90: 427-433.
159. Podestá, E., Iglesias, A.A. y Andreo, C.S. 1986. Modification of an essential amino group of Phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by pyridoxal phosphate and by pyridoxal phosphate-sensitized photooxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 546-553.
160. Popp, M., Osmond, C.B., Summons, R.E. 1982. Pathway of malic acid synthesis in response to ion uptake in wheat and lupin roots: evidence from fixation of ^{14}C and ^{13}C . *Plant. Physiol.* 69: 1289-1292.
161. Preiss, J. 1982. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 451-454.
162. Preiss, J. 1984. Starch, sucrose biosynthesis and partition of carbon in plants are regulated by orthophosphate and triose-phosphates. *Trends Biochem. Sci.* 9: 24-27.
163. Queiroz, O. 1979. CAM: Rhythms of enzyme capacity and activity as adaptive mechanisms. *Ed.* Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. ed. H. Gibbs y E. Latzko. 6: 126-139. Springer, New York.
164. Rathman, C.K.M. 1978. C₄-Photosynthesis: The pathway of carbon in bundle sheath cells. *Sci. Prog. Oxf.* 65: 409-435.

165. Rathman, C.K. y Edwards, G.E. 1977. C₄ acid decarboxylation an CO₂ donation to photosynthesis in bundle sheath strands and chloroplasts from species representing three groups of C₄ plants. Arch. Biochem. Biophys. 182:1-13.
166. Raven, J.A. y Smith, F.A. 1980. Intracellular pH regulation in the giant celled marine alga *Chara domingensis*. J. Exp. Bot. 31:1357-1369.
167. Ray, T.B. y Black, C.C. 1979. The C₄ pathway and its regulation. En: Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series. ed. M. Gibbs. y E. Latzko. 6:77-99. Springer. New York.
168. Reich, J.G., Wangerman, G., Falck, M y Rhode, K. 1972. A general strategy for parameter estimation from isosteric and allosteric-kinetic data and binding measurements. Eur. J. Biochem. 26:368-379.
169. Reid, R.J. y Smith, F.A. 1988. Measurements of the cytoplasmic pH of *Chara corallina* using double barreled pH microelectrodes. J. Exp. Bot. 39:1421-1432.
170. Rodríguez-Sotres, R. 1986. Estudios sobre la regulación de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Facultad de Química. UNAM. México D.F.
171. Rodríguez-Sotres, R., López-Pozos, R. y Muñoz-Clares, R.A. 1987. Further studies of the short-term regulation of maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase by light. J. Plant Physiol. 129:191-199.
172. Rodríguez-Sotres, R. y Muñoz-Clares, R.A. 1987. Short-term regulation of maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase by light. J. Plant Physiol. 128:361-369.
173. Romani, G., Marrè, M. T. y Marrè, E. 1983. Effects of permeant weak acids on dark CO₂ fixation and malate level in maize root segments. Physiol. Veg. 21(5):867-873.
174. Rubio, V. 1986. Enzymatic HCO₃⁻ fixation: A common mechanism for all enzymes involved? Biosci. Rep. 6(4):335-347.
175. Rumpho, M.E. y Edwards, G.E. 1984. Inhibition of 3-phosphoglycerate-dependent O₂ evolution by phosphoenolpyruvate in C₄ mesophyll chloroplasts of *Digitaria sanguinalis* (L.) scop. Plant. Physiol. 76:711-718.
176. Rustin, P., Meyer, C.R. y Wedding, R.T. 1988. Identification of substrate and effector binding sites of Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*. J. Biol. Chem. 263(33):17611-17614.
177. Samejima, M. y Miyachi, S. 1978. Photosynthetic and light enhanced dark fixation of carbon-14 dioxide from the ambient atmosphere and 14-C-bicarbonate infiltrates though vascular bundles in maize leaves. Plant. Cell. Physiol. 19:907-916.

178. Schnabl, H. 1983. The key role of phosphoenolpyruvate carboxylase during the volume change of guard cell protoplasts. *Physiol. Veg.* 21(5):955-962.
179. Segel, I.H. 1975. Competitive Inhibition. Simple intersecting linear competitive inhibition. *Enz. Enzyme Kinetics*, pp. 100-226. Willey-Interscience, New York.
180. Segel, I.H. 1975. Hyperbolic mixed-type inhibition. *System C5. Enz. Enzyme Kinetics*, pp.189-192. Willey-Interscience, New York.
181. Segel, I.H. 1975. First-order kinetics. *Enz. Enzyme Kinetics*, pp. 41-43. Willey-Interscience, New York.
182. Selenioti, E., Karabourniotis, G., Manetas, Y. y Gavalas, N.A. 1985. Modulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase by 3-phosphoglycerate: Probable physiological significance for C₄-photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 121:353-360.
183. Serjeant, E.P., y Dempsey, B. 1979. Ionisation Constant of Organic Acids in Aqueous Solutions IUPAC Chemical Data Series No. 3. p. 221 Pergamon Press, New York.
184. Shi, J.-N., Wu, M.-X. y Cha, J.-J. 1979. Studies on plant Phosphoenolpyruvate carboxylase. I. Separation and properties of PEP carboxylase isozymes. *Acta Phytophysiol. Sin.* 5(3):225-234.
185. Shi, J.-N., Wu, M.-X. y Jiao, J. A. 1988. Structure and regulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum leaves. *Acta Phytophysiol. Sin.* 14(3):308-312.
186. Sims, T.L. y Hague, D.R. 1981. Light-stimulated increase of translatable mRNA for PEP carboxylase in leaves of maize. *J. Biol. Chem.* 256:8252-8257.
187. Slack, C.R., Hatch, M.D. y Goodchild, D.C. 1969. Distribution of enzymes in maize leaves in relation to the C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem. J.* 114:489-498.
188. Smith, T.E. 1968. Partial purification and characterization of potato Phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:178-188.
189. Smith, C.E. y A.W. Bown. 1981. The regulation of oat coleoptile Phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme activities by H⁺ and Metabolites. Kinetic evidence for and against a metabolic pH-stat. *Can. J. Bot.* 59:1397-1404.
190. Stiborová, M. y Leblová, S. 1983. Isolation and partial characterization of two Phosphoenolpyruvate carboxylase from maize (*Zea mays L.*). *Photosynthetica.* 17(3):379-385.
191. Stiborová, M. y Leblová, S. 1983. Regulation of maize (*Zea mays L.*) Phosphoenolpyruvate carboxylase by effectors. *Photosynthetica.* 17(3):386-390.

192. Stiborová, M. y Leblová, S. 1983. The role of cystein SH groups in the phosphoenolpyruvate carboxylase molecule of maize. *Physiol. Veg.* 21(5):935-942.
193. Stiborová, M. y Leblová, S. 1985. Activation of maize (*Zea mays* L.) Phosphoenolpyruvate carboxylase by glucose-6-phosphate and glycine. Effects of pH and Mg^{2+} . *Photosynthetica.* 19(2):177-182.
194. Stiborová, M. y Leblová, S. 1986. Structure of Phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *FEBS Lett.* 205(1):32-34.
195. Stitt, M. Wirts, W. y Heldt, H.W. 1980. Metabolite levels during induction in the chloroplast and extra-chloroplast compartments of spinach protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 593:85-102.
196. Storer, A.C. y Cornish-Bowden, A. 1976. Concentration of $Mg-ADP^{2-}$ and other ions in solution. Calculation of the true concentrations of species present in mixtures of associating ions. *Biochem. J.* 159:1-5.
197. Sugiyama, T. y Hatch, M.D. 1981. Regulation of C₄ photosynthesis: inactivation of pyruvate, Pi, dikinase in leaf and chloroplast extracts in relation to dark-light regulation *in vivo*. *Plant. Cell. Physiol.* 22(1):115-126.
198. Tchen, T.T. y Vennesland, B. 1955. Enzymatic carbon dioxide fixation into oxalacetate in wheat germ. *J. Biol. Chem.* 213:533-546.
199. Terada, K., Kai, T., Okuno, S., Fujiyawa, H. y Izui, K. 1990. Maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation of Ser¹⁵ with a mammalian cyclic AMP-dependent protein kinase diminishes sensitivity to inhibition by malate. *FEBS Lett.* 259(2):241-244.
200. Thorpe, N. 1983. The role of phosphoenolpyruvate carboxylase in the guard cell of *Commelina cyanea*. *Plant. Sci. Lett.* 30:331-338.
201. Ting, I.P. 1968. CO₂ metabolism in corn roots. III. Inhibition of P-enolpyruvate carboxylase by L-malate. *Plant Physiol.* 43:1919-1924.
202. Ting, I.P. 1985. Crassulacean acid metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 36:595-622.
203. Ting, I.P. y Osmond, C.B. 1973. Multiple forms of plant phosphoenolpyruvate carboxylase associated with different metabolic pathways. *Plant. Physiol.* 51:448-453.
204. Uedam, K. y Sugiyama, T. 1976. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiol.* 57:906-910.

205. Usuda, H. y Edwards, G.E. 1984. Is photosynthesis during the induction period in maize limited by the availability of intracellular carbon dioxide ? *Plant. Sci. Lett.* 37:41-45.
206. Vidal, J., Cretin, C. y Gadal, P. 1983. The mechanism of photocontrol of phosphoenolpyruvate carboxylase in sorghum leaves. *Physiol. Veg.* 21(5):977-986.
207. Vidal, J. Godbillon, G. y Gadal, P. 1983. Influence of light on phosphoenolpyruvate carboxylase in sorghum leaves II. Immunochemical study. *Physiol.Plant.* 57:124-128.
208. Wagner, R., González, D.H., Podestá, E. y Andreo, C.S. 1988. Proximity between fluorescent probes attached to four essential lysyl residues in Phosphoenolpyruvate carboxylase. A resonance energy transfer study. *Eur. J. Biochem.* 173:561-568.
209. Wagner, R., Podestá, E., González, D.H. y Andreo, C.S. 1987. Changes in the quaternary structure of Phosphoenolpyruvate carboxylase induced by ionic strength affect its catalytic activity. *Eur. J. Biochem.* 164:661-666.
210. Walker, G.F. Ku, M.S.B. y Edwards, G.E. 1986. Catalytic activity of maize leaf Phosphoenolpyruvate carboxylase in relation to oligomerization. *Plant Physiol.* 80:848-855.
211. Wedding, R.T. y Black, M.K. 1986. Malate Inhibition of Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula*. *Plant Physiol.* 82:985-990.
212. Wedding, R.T. y Black, M.K. 1988. Role of Magnesium in the binding of substrate and effectors to Phosphoenolpyruvate carboxylase from a CAM plant. *Plant Physiol.* 87:443-446.
213. Wedding, R.T., Black, M.K. y Meyer, C.R. 1989. Activation of higher plant Phosphoenolpyruvate carboxylase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 90:648-652.
214. Wedding, R.T., Black, M.K. y Meyer, C.R. 1990. Inhibition of Phosphoenolpyruvate carboxylase by malate. *Plant Physiol.* 92:456-461.
215. Wedding, R.T., Rustin, R. Meyer, C.R. y Black, M.K. 1988. Kinetic studies of the form of substrate bound to Phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 88:976-979.
216. Welkie, G.W. y Coldwell, M. 1970. Leaf anatomy of species in some dicotyledonian families as related to the C₃ or C₄ pathways of carbon fixation. *Can. J. Bot.* 48:2135-2146.
217. Willeferd, K.O., Wu, M.-X., Meyer, C.R. and Wedding, R.T. 1990. The role of oligomerization in the regulation of maize Phosphoenolpyruvate carboxylase activity. Influence of Mg-PEP and malate on the oligomerization equilibrium of PEP carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 168(2):778-785.

218. von Willerdt, D.J. y von Willert, K. 1979. Light modulation of the activity of the phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants in the Mesembryanthaceae. Z. Pflanzenphysiol. 95:43-49.
219. Willaer, C.M. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and stomatal operation. Physiol. Veg. 21(5):943-953.
220. Winter, K. 1982. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in rapidly prepared desalted leaf extracts of the Crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. Planta. 154:296-308.
221. Wold, F. y Ballow, C.E. 1957. Studies on the enzyme enolase. I. Equilibrium studies. J. Biol. Chem. 227:301-312.
222. Wolosluk, R.A. y Buchanann, B.B. 1978. Activation of chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the ferredoxin/thioredoxin system. Pant. Physiol. 61:669-671.
223. Wolosluk, R.A., Buchanann, B.B. y Crawford, N.A. 1977. Regulation of NADP-malate dehydrogenase by the light-activated ferredoxin/thioredoxin system of chloroplast. FEBS Lett. 81(2):253-258.
224. Wong, K.F. y D.D. Davies. 1972. Regulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Zea mays* by metabolites. Biochem. J. 131:451-458.
225. Wu, M.-X. y Wedding, R.T. 1985. Diurnal regulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula*. Plant Physiol. 77:667-675.
226. Wu, M.-X., y Wedding, R.T. 1985. Diurnal regulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula* by interconversion of oligomeric forms. Arch. Biochem. Biophys. 240:655-662.
227. Wu, M.-X., y Wedding, R.T. 1987. Regulation of Phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*. Further evidence on the dimer-tetramer interconversion. Plant Physiol. 84:1080-1083.
228. Wu, M.-X., Zha, J.-J y Shi, J.N. 1980. Studies on plant Phosphoenolpyruvate carboxylase. II. Metabolites regulation and oleate inhibition of PEP carboxylase from sorghum leaves. Acta Phytophysiol. Sin. 6:37-45.

229. Wu, M.X., Zha, J.-J. y Shi, J.N. 1981. Studies on plant Phosphoenolpyruvate carboxylase . IV. Modification of functional arginyl residues in PEP carboxylase of sorghum leaves with butanedione. Acta Phytophysiol. Sin. 7(1):33-41.
230. Yanagisawa, S., Izui, K., Yamaguchi, Y., Shigesada, K. y Katsuki, H. 1988. Further analysis of cDNA clones from maize Phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C₄-photosynthesis. Nucleotide sequence of entire open reading frame and evidence for polyadenylation of mRNA at multiple sites *in vivo*. FEBS Lett. 229(1):107-110.
231. Ziegler, I. 1974. Malate dehydrogenase in *Zea mays*. Properties and inhibition by sulfite. Biochim. Biophys. Acta. 364:28-37.