

0-2
31



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

Estudio del mecanismo cinético de la
enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de
hoja de maíz (*Zea mays*) modificada con
piridoxal 5' - fosfato

T E S I S
Que para obtener el título de
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
p r e s e n t a
DULCE MARJA / LOPEZ VALENTIN



México, D. F.

1997

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).

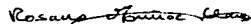
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado

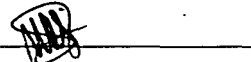
Presidente: Prof. Angelina Quintero Ruiz
Vocal: Prof. Rosario Adelaida Muñoz Clares
Secretario: Prof. Luz del Carmen Castellanos Roman
1er. Suplente: Prof. Rebecca E. Franco y Bourland
2do. Suplente: Prof. Alicia Castillo Martínez

Trabajo realizado en el laboratorio 102. Conjunto "E". Departamento de Bioquímica, Facultad de Química. U.N.A.M. Trabajo financiado por DGAPA proyecto IN-211694.

Nombre completo y firma del asesor del tema:
Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares



Nombre completo y firma del supervisor técnico:
Carlos Mújica Jiménez



Nombre completo y firma del sustentante:
Dulce María López Valentín



Tabla de contenido

TABLA DE CONTENIDO	3
AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIAS	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	11
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE PLANTAS	11
<i>Reacción catalizada y mecanismo de reacción</i>	<i>13</i>
<i>Características moleculares</i>	<i>15</i>
<i>Isoformas</i>	<i>16</i>
<i>Regulación</i>	<i>17</i>
A nivel de la cantidad de enzima	17
Luz	17
Déficit de agua	18
Disponibilidad y fuente de nitrógeno	19
A nivel de la actividad de la enzima	19
Regulación alostérica	19
Efectos homotrópicos	19
Efectos heterotrópicos	21
Modificación covalente reversible	22
<i>Mecanismo cinético de la isoenzima fotosintética de hoja de plantas C₃</i>	<i>24</i>
MODIFICACIÓN DE LA ENZIMA CON PIRIDOXAL 5'-FOSFATO	25
<i>Generalidades de modificación química</i>	<i>25</i>
<i>Estudios de modificación química de PEPC</i>	<i>26</i>
TEORÍA CINÉTICA	28
<i>Mecanismo 1</i>	<i>28</i>
<i>Mecanismo 2</i>	<i>30</i>
<i>Mecanismo 3</i>	<i>32</i>
<i>Mecanismo 4</i>	<i>35</i>
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
HIPÓTESIS	40
OBJETIVOS	41
OBJETIVO GENERAL	41
OBJETIVOS PARTICULARES	41
MATERIALES Y MÉTODOS	42
MATERIALES	42
<i>Equipo</i>	<i>42</i>

Reactivos.....	42
Materia biológica.....	43
MÉTODOS	43
Extracción y purificación de PEPC.....	43
Determinación de la concentración de proteína.....	44
Preparación del $MgCl_2$	44
Determinación de la actividad de PEPC.....	45
Determinación de la sensibilidad a Gluc-6-P.....	47
Preparación de las muestras.....	47
Esquema de la preparación de las muestras.....	49
Reacción de PEPC con PLP.....	50
Análisis de datos.....	51
RESULTADOS	53
RESPUESTA DE LA PEPC NATIVA, REDUCIDA CON $NABH_2CN$ Y MODIFICADA CON PLP Y REDUCIDA CON $NABH_2CN$ A GLUC-6-P A PH 7.3 Y 8.3	53
Figura 1.....	55
Tabla 1.....	56
Tabla 2.....	56
Figura 2.....	57
Tabla 3.....	58
Tabla 4.....	58
MECANISMO CINÉTICO DE PEPC NATIVA Y PEPC MODIFICADA	59
CINÉTICA DE SATURACIÓN DE LA PEPC NATIVA POR PEP Y Mg^{2+} LIBRES A PH 7.3	59
Figura 3.....	61
Figura 4.....	62
Tabla 5.....	63
Tabla 6.....	63
CINÉTICA DE SATURACIÓN DE LA PEPC NATIVA POR PEP Y Mg^{2+} LIBRES A PH 8.3	64
Figura 5.....	66
Figura 6.....	67
Tabla 7.....	68
Tabla 8.....	68
CINÉTICA DE SATURACIÓN DE LA PEPC MODIFICADA Y REDUCIDA POR Mg^{2+} LIBRE Y POR PEP LIBRE A PH 7.369	70
Figura 7.....	70
Figura 8.....	71
Tabla 9.....	72
Tabla 10.....	72
CINÉTICA DE SATURACIÓN POR Mg^{2+} LIBRE Y POR PEP LIBRE DE LA PEPC MODIFICADA Y REDUCIDA A PH 8.373	75
Figura 9.....	75
Figura 10.....	76
Tabla 11.....	77
Tabla 12.....	77
Tabla 13.....	78
DISCUSIÓN	79
MECANISMO CINÉTICO DE LA ENZIMA NATIVA.....	79
MECANISMO CINÉTICO DE LA ENZIMA MODIFICADA CON PLP.....	83
IMPLICACIÓN FISIOLÓGICA DEL MECANISMO CINÉTICO DE PEPC.....	85
CONCLUSIONES	88
BIBLIOGRAFÍA	88

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su amor, cariño y confianza que siempre me impulsarán para seguir adelante.

A la Dra. Rosario por la dirección de esta tesis y por su apoyo desde que la conocí.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) por haberme otorgado una beca para la realización de este trabajo.

A Carlos por enseñarme a trabajar con las enzimas y por brindarme una sonrisa siempre.

A mis compañeros de laboratorio por compartir pequeños triunfos y fracasos en la ciencia.

DEDICATORIAS

A mis padres Ramón Arturo e Irene por ser los mejores papas del mundo.

A mis hermanos Verónica y José Ramón por estar siempre conmigo y darme su cariño a cada momento.

A mi Tía Ana María por enseñarme a luchar y no rendirme nunca.

A Chela por su cariño y por iniciarme a la vida nocturna (en sentido figurado). ¡Gracias!

A mi Tía Licha por sus consejos y enseñarme a ser amiga.

A toda mi familia quienes de una u otra forma siempre han confiado en mí.

A Alberto quien me ha ayudado a ser mejor ser humano dándome su cariño.

A mis amigas Diana, Greta, Guadalupe, Helen, Jessica y Maribel por los momentos inolvidables que hemos vivido.

A mis compañeros de la carrera por ser parte de mi vida como estudiante.

ABREVIATURAS

ASB	Albúmina de suero bovino
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
DTT	Ditiotreitol
Gluc-6-P	Glucosa-6-fosfato
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxietil]-piperazin-N'-(2-etanosulfónico))
K_a	Constante de activación
k_{cat}	Constante catalítica
kDa	kilodalton
K_m	Constante de Michaelis-Menten
MDH	Málico deshidrogenasa
n	Número de Hill
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido
OAA	Oxaloacetato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
UI	Unidades internacionales de actividad enzimática

RESUMEN

En este trabajo se han medido las velocidades iniciales del estado estacionario de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) purificada de hoja de maíz usando varias concentraciones de Mg^{2+} y de fosfoenolpiruvato (PEP) con el fin de determinar: (1) si el sitio activo reconoce a las especies libres y (2) el orden con el que se unen a la enzima, en caso de ser reconocidos por el sitio activo. Para eliminar cualquier interferencia proveniente de la activación por PEP libre, estos estudios cinéticos se han realizado con la enzima insensibilizada al activador Gluc-6-P por modificación con piridoxal 5'-fosfato (PLP) y posterior reducción con cianoborohidruro de sodio.

Los resultados obtenidos han permitido establecer que a pH 7.3, el PEP libre y el Mg^{2+} libre no se unen a la enzima, que reconoce sólo al complejo PEP-Mg con una constante de disociación de 2.71 ± 0.04 mM. Por el contrario, a pH 8.3 las especies libres se unen al azar al sitio activo, actuando como inhibidores competitivos del verdadero sustrato, el complejo PEP-Mg, con una constante de inhibición de 0.18 mM, respectivamente.

Además la comparación de los patrones de velocidad inicial obtenidos con la enzima insensibilizada con los obtenidos con la enzima nativa (también determinados en este trabajo) nos permitió confirmar el doble papel de PEP como sustrato y activador alostérico de la enzima.

INTRODUCCIÓN

La fotosíntesis es un proceso metabólico fundamental para todos los seres vivos. La síntesis de carbohidratos a partir del CO_2 atmosférico y agua mediante la absorción de energía radiante y su conversión a potencial químico es el proceso básico implicado en el crecimiento de las plantas. Las plantas han sido convenientemente clasificadas en plantas C_3 , C_4 y CAM, en base a las diferencias del metabolismo fotosintético de asimilación del CO_2 atmosférico y según el número de carbonos de que consta la molécula que resulta como primer producto de dicha fijación. Refiriéndonos a las plantas C_3 , éstas incorporan el CO_2 de la atmósfera únicamente en forma de compuestos orgánicos en los cloroplastos mediante el ciclo de Calvin, cuyo primer producto es un compuesto de tres carbonos, el fosfoglicerato. El CO_2 en el cloroplasto se une al azúcar ribulosa 1,5-bifosfato y se generan dos moléculas de fosfoglicerato en una reacción catalizada por la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco). Por otro lado, las plantas C_4 poseen un mecanismo adicional de concentración del CO_2 en el sitio de carboxilación, conocido como ruta C_4 , el cual consiste en la carboxilación del fosfoenolpiruvato con la producción de un compuesto de cuatro carbonos, el oxaloacetato. Este compuesto se transporta al lugar donde normalmente se realiza el ciclo de Calvin, ahí se descarboxila produciendo CO_2 , y éste último se aprovecha para seguir normalmente el ciclo C_3 . Este grupo se caracteriza por un alto nivel de eficiencia de crecimiento en condiciones de alta luz y temperatura. Las bases moleculares de dichas características de las plantas C_4 estriban en la existencia de la ruta metabólica C_4 , la cual minimiza la pérdida de energía debida a la fotorrespiración, que ocurre en las plantas C_3 por la competencia del O_2 atmosférico con el CO_2 por el sitio activo de la Rubisco.

En cuanto a las plantas con metabolismo ácido de las crásuláceas (CAM), éstas siguen prácticamente el mismo mecanismo de asimilación del CO_2 que las plantas C_4 , pero adicionalmente han desarrollado la estrategia de mantener cerrados durante casi todo el día sus estomas para evitar pérdidas de agua. Estas plantas almacenan el CO_2 durante la noche fijándolo temporalmente como malato, el cual es descarboxilado durante el día siguiente para ser finalmente incorporado en compuestos orgánicos mediante el ciclo de Calvin o ciclo C_3 .

Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E.C. 4.1.1.31) es una enzima clave de la fotosíntesis en las plantas que fijan CO_2 por la ruta C_4 . Esta enzima cataliza la β -carboxilación del fosfoenolpiruvato para producir oxaloacetato y constituye la primera reacción de la ruta C_4 como CAM como la ruta C_4 .

PEPC de las hojas de plantas C_4 es una enzima muy abundante altamente regulada, sujeta a control alostérico. A valores de pH cercanos a la neutralidad presenta efectos cooperativos homotrópicos y heterotrópicos por los activadores Gluc-6-P y glicina y por el inhibidor malato. Además es una enzima inducible cuyos niveles de proteína responden a factores ambientales como luz, fuente de nitrógeno y sequía o alta salinidad. Los aspectos moleculares y de regulación de esta enzima han sido ampliamente estudiados en los últimos años por numerosos laboratorios, sin embargo los estudios cinéticos son aún muy escasos. La base para la comprensión del funcionamiento de cualquier enzima es la caracterización de la cinética de la reacción que cataliza, por ello en este trabajo planteamos como objetivo avanzar en el estudio del mecanismo cinético de la PEPC de hoja de maíz (*Zea mays*) planta de tipo C_4 , dada la relevancia que tiene esta enzima en la productividad de este importante cultivo en México.

ANTECEDENTES

Fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas

La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E.C.4.1.1.31) se encuentra ampliamente distribuida en plantas, algas y bacterias. En plantas y algas se localiza exclusivamente en el citoplasma. Los estudios realizados sobre esta enzima han sido objeto de varias excelentes revisiones (O'Leary, 1982; Andreo y col., 1987; Stiborová, 1988; Podestá y col., 1990; Rajagolapan y col., 1994; Chollet y col., 1996). Por ello, en este capítulo me referiré principalmente a aquellos aspectos que son importantes para la comprensión de la naturaleza y alcance del objetivo que nos planteamos y para la discusión de los resultados obtenidos.

Se ha sugerido que en plantas superiores existen por lo menos tres isoformas diferentes de PEPC. Estas formas se relacionan con distintas rutas metabólicas y se pueden clasificar como: (1) PEPC de plantas C_3 y de tejidos no verdes de plantas C_4 y CAM, (2) PEPC fotosintética de plantas C_4 y (3) PEPC fotosintética de plantas CAM (Ting & Osmond, 1973).

En cuanto a las funciones de las diferentes isoformas de PEPC de plantas superiores se pueden agrupar en dos grandes categorías (Toh y col., 1994):

1. En hojas de plantas C_3 y en los tejidos no fotosintéticos de todo tipo de plantas PEPC está involucrada en funciones anapleróticas, que incluyen el reabastecimiento de oxaloacetato al ciclo del ácido cítrico para la síntesis de aminoácidos y porfirinas (Maxwell y col., 1984; King y col., 1986;

Rosendahl y col., 1990). Además participa en mecanismos bioquímicos para el mantenimiento del pH (Davies, 1986), la regulación de la osmolaridad, esto lo lleva a cabo indirectamente debido a las diferentes rutas metabólicas que puede llevar el malato, ya que balancea cerca del 75% del exceso de carga de los cationes inorgánicos del xilema (Israel & Jackson, 1982), la apertura y cierre de estomas (Deroche & Carrayol, 1988), la fijación de nitrógeno (Van y col., 1991), en las lanzaderas de NADPH y en la recaptura del CO_2 respirado (Van y col., 1991).

2. En hojas de plantas C_4 y CAM la isoforma predominante está asociada a la asimilación fotosintética de CO_2 . En plantas C_4 , la enzima está localizada en las células de mesófilo y cataliza el primer paso de la ruta metabólica conocida como ruta C_4 . La compartimentalización de las reacciones de fijación de CO_2 por PEPC y por Rubisco favorece la eficiencia fotosintética de estas plantas. En plantas CAM la fijación del CO_2 atmosférico ocurre durante la noche, acumulándose como malato en las vacuolas. Este mecanismo minimiza las pérdidas de agua en plantas de zonas áridas o semiáridas, en las cuales los estomas se abren sólo durante la noche (Hatch, 1987).

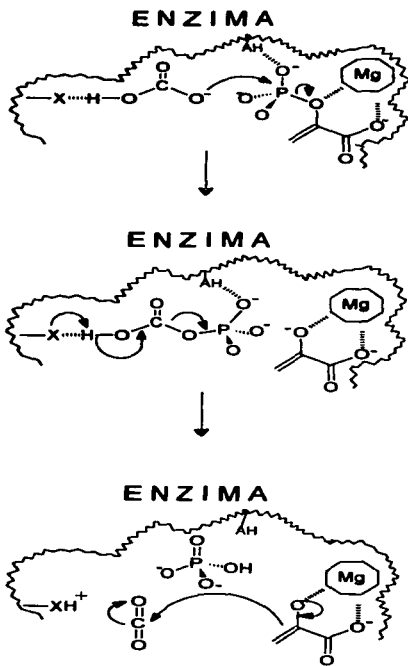
Reacción catalizada y mecanismo de reacción



La reacción catalizada por PEPC consiste (Cooper., & Wood, 1971; O'Leary & Hermes, 1987) en la β -carboxilación, a expensas del ión HCO_3^- , del PEP en presencia de un ión divalente que puede ser Mg^{2+} o Mn^{2+} . Puesto que las concentraciones *in vivo* de Mn^{2+} (O'Leary, 1982) están muy por debajo de las concentraciones requeridas para que se lleve a cabo esta reacción de carboxilación (O'Leary, 1982) mientras que las de Mg^{2+} si lo permiten, se ha llegado a la conclusión de que Mg^{2+} es el cofactor metálico usado por PEPC.

Como se muestra en el siguiente esquema, el ión metálico del sitio activo se une al oxígeno del enolato del piruvato (intermediario de la reacción) estabilizándolo, cabe mencionar que para que se lleve a cabo este mecanismo se requiere de la participación de al menos un catalizador ácido-base (X en la figura de la página siguiente).

El otro intermediario de la reacción es carboxifosfato, formado a partir del grupo fosfato del PEP y el HCO_3^- , el cual reversiblemente se descompone en CO_2 y fosfato. El CO_2 es sujeto de un ataque nucleofílico por el enolato del piruvato, produciéndose el otro producto de la reacción, oxaloacetato (Janc y col., 1992a).



**Mecanismo de carboxilación del PEP por PEPC adaptado de Janc y col.,
1992 a,b y c.**

Esta reacción tiene un cambio de energía libre alto, ($\Delta G^\circ = -7.2$ Kcal/mol) y es prácticamente irreversible bajo las condiciones intracelulares.

Esta enzima fue primeramente descrita por Bandurski, quien demostró que para que se lleve a cabo la reacción es necesaria la presencia de Mg^{2+} como único cofactor (Bandurski, 1955). El Mn^{2+} puede reemplazar *in vitro* al Mg^{2+} (Miziorko y col., 1974), mientras que el Co^{2+} es menos efectivo como un activador (Miziorko y col., 1974; O'Leary y col., 1981). Otros cationes como el Zn^{2+} , Hg^{2+} (O'Leary y col., 1981), Ca^{2+} (Gavalas & Manetas, 1980), Cu^{2+} y Cd^{2+} inhiben a la enzima (Nguyen y col., 1988).

Por otra parte, la PEPC es la única carboxilasa no dependiente de biotina que utiliza bicarbonato como sustrato (Knowles, 1989).

Características moleculares

La gran mayoría de las PEPC de plantas estudiadas hasta la fecha poseen una masa molecular de alrededor de 400 kDa y de alrededor de 100 kDa para la subunidad, por tanto son homotetrámeros (Ting & Osmond, 1973; Marés & Leblová, 1980). Sin embargo, se sabe que PEPC puede existir en diferentes formas oligoméricas *in vivo* (Wu & Wedding, 1985; Stiborová & Leblová, 1986; Wagner y col., 1987). La forma activa de PEPC es el homotetrámero, siendo el dímero mucho menos activo o inactivo y el monómero inactivo. La existencia de formas diméricas o monoméricas depende del pH, de la fuerza iónica (Stiborová & Leblová, 1986; Walker y col., 1986; Wagner y col., 1987), de la temperatura (Wu & Wedding, 1985; Wu & Wedding, 1987) y de la concentración de la PEPC (Willeford & Wedding, 1992). De esta manera la disociación de la enzima es promovida por

valores de pH ácidos o alcalinos (Stiborová & Lebllová, 1986; Walker y col., 1986), por fuerzas iónicas altas (Wagner y col., 1987), por bajas temperaturas, por dilución (Selenioti y col., 1987) y por ausencia de agentes reductores como el DTT (Iglesias & Andreo, 1984). Por otro lado, se ha reportado que la presencia de glicerol estabiliza la estructura nativa y por lo tanto la actividad de la proteína (Wagner col., 1987; Podestá & Andreo, 1989).

Se conoce la estructura primaria de la PEPC de diferentes tejidos de varias plantas superiores. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos indica que la mitad de la molécula de la enzima correspondiente al C-terminal es conservada y la otra mitad N-terminal, que estaría involucrada en regulación, es variable (Rajagopalan y col., 1994).

Isoformas

Inicialmente, en base a la actividad específica de la enzima en los extractos crudos y en los valores de $Km_{(PEP)}$ se sugirió que las isoformas de PEPC podrían clasificarse en cuatro grupos (Ting & Osmond, 1973):

1. PEPC de hojas de plantas C_3 con una baja $Km_{(PEP)}$ y una baja actividad específica en extractos crudos.
2. PEPC de hojas de plantas C_4 con una alta $Km_{(PEP)}$ y una actividad específica elevada en extractos crudos.
3. PEPC de hojas de plantas CAM con una baja $Km_{(PEP)}$ y una elevada actividad específica en extractos crudos.
4. PEPC de tipo no autotrófico o de tejidos no verdes con una $Km_{(PEP)}$ y actividad específica bajas.

Concretamente en maíz se han encontrado las siguientes isoformas:

1. PEPC de hoja verde con una alta $Km_{(PEP)}$ y una actividad específica elevada (Ting & Osmond, 1973).
2. PEPC de tipo no autotrófico como raíz y hoja etiolada con una $Km_{(PEP)}$ y actividad específicas bajas (Hudspeth & Grula, 1989; Schäffner & Sheen, 1992).

Regulación

PEPC de plantas es una enzima altamente regulada tanto a nivel de la cantidad de enzima existente como a nivel de su estado de activación. A continuación se describen los factores y mecanismos más importantes que intervienen en esta regulación.

A nivel de la cantidad de enzima.

Se ha reportado que la expresión del gen PEPC es regulada por varios factores ambientales, como se describe a continuación:

Luz

En hojas etioladas de sorgo, planta tipo C_4 , se observa sólo una forma de PEPC con propiedades funcionales y regulatorias correspondientes a la isoenzima de plantas C_3 . En hojas enverdecidas de esta misma planta ocurre un incremento significativo en la actividad de la PEPC, incremento que se debe a la aparición de una nueva forma de la enzima con propiedades que son típicas de la isoforma de hoja de plantas C_4 (Vidal & Gadal, 1983). Igualmente en hoja de maíz se ha

reportado que los niveles de RNAm traducible para PEPC se incrementan tras la iluminación de plántulas etioladas (Sims & Hague, 1981).

La luz ejerce también un claro efecto regulador a corto plazo sobre la PEPC de hojas. Se sabe que la iluminación de plantas mantenidas previamente en oscuridad por un breve periodo incrementa la actividad de la enzima PEPC en hojas de plantas C₃ y en las plantas C₄ (Huber y col., 1986; Nimmo y col., 1987; Wang y col., 1992; Jiao y col., 1991; Gupta y col., 1994). Este efecto no involucra cambios en la cantidad de PEPC y se discutirá más adelante en el apartado de modificación covalente postraduccional.

Déficit de agua

Se ha reportado que la actividad de PEPC se incrementa en nódulos de alfalfa sometidos a estrés de agua severo, siendo la PEPC al parecer la única enzima de nódulo cuya actividad se incrementa en estas condiciones (Irigoyen y col., 1992). Por otro lado se ha observado que el cambio del metabolismo C₃ a CAM en la planta facultativa CAM, *Mesembryanthemum crystallinum*, provocado por estrés de agua, va acompañado de un incremento en la actividad de la PEPC y de un aumento en la cantidad del RNAm de esta enzima (Pipenbrock & Schmitt, 1991; Brulfert y col., 1993).

Recientemente en nuestro laboratorio se ha encontrado que la actividad y la proteína PEPC presentan un incremento en hoja de maíz sometidas a estrés hídrico por tratamiento con polietilenglicol (M. Rodríguez Penagos y R. A. Muñoz Clares, manuscrito en preparación).

Disponibilidad y fuente de nitrógeno

Uno de los procesos metabólicos de mayor importancia en los que participa la PEPC es el de la síntesis de aminoácidos. Por ello, no es sorprendente que la fuente nitrogenada a la que tiene acceso la planta afecte la actividad de la PEPC.

Así la glutamina en plantas de trigo estimula la fosforilación de la PEPC e incrementa la cantidad de RNAm de esta enzima (Manh y col., 1993).

Igualmente, cuando hojas de maíz crecidas en ausencia de nitrógeno son suplementadas con nitrato, amonio o glutamina se incrementan los niveles de RNAm y de proteína de PEPC, (Sugiharto y col., 1990; Sugiharto y col., 1992). La inducción de la isoforma C₄ de PEPC por nitrato, amonio o glutamina está de acuerdo con la elevada eficiencia de uso del nitrógeno que presentan las plantas C₄ (Hatch, 1987).

A nivel de la actividad de la enzima

Regulación alostérica:

Efectos homotrópicos

Como se ha mencionado anteriormente, la isoforma fotosintética de PEPC de hoja de plantas C₄ es una enzima alostérica que a valores de pH cercanos a la neutralidad presenta efectos homotrópicos. Sin embargo, a la fecha existen pocos estudios sobre el mecanismo subyacente a estos efectos aun cuando se han propuesto los modelos siguientes:

Modelo de asociación-disociación oligomérica (Podestá & Andreo, 1989; Willeford y col., 1990):

Este modelo plantea que la enzima PEPC de maíz puede ser regulada *in vivo* vía un equilibrio dímero-tetramero, donde la forma tetramérica es la forma totalmente activa y de mayor afinidad por el sustrato. El modelo se basa en las siguientes observaciones:

- ◆ La enzima diluida en solución es una mezcla de dímeros y tetrameros (Wagner y col., 1987; Willeford y col., 1990).
- ◆ PEP desplaza el equilibrio hacia la forma tetramérica, lo cual explicaría la cooperatividad positiva mostrada en las cinéticas de saturación por PEP (Uedan & Sugiyama, 1976; Hayakawa y col., 1981; Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1987).
- ◆ Gluc-6-P también favorece la forma tetramérica, lo que explicaría la pérdida de cooperatividad y el aumento de la afinidad por PEP en la presencia de Gluc-6-P (Coombs y col., 1973; Marés & Leblová, 1980; Stiborová & Leblová, 1985).
- ◆ Malato favorece la disociación del tetramero en dímero, lo que es consistente con la disminución de la afinidad por el sustrato y el aumento de la cooperatividad para PEPC en la presencia de malato (González y col., 1984; Wu & Wedding, 1985).
- ◆ En presencia de glicerol la actividad de PEPC aumenta se elimina la cooperatividad positiva para el sustrato y sólo se presenta la forma tetramérica (Podestá y Andreo, 1989).

Modelo concertado (Jawali, 1990) de acuerdo con Monod-Wyman-Changeux (Monod y col., 1965):

- ◆ Este modelo plantea que en la presencia de Mg^{2+} la enzima se encuentra en una forma relajada (forma R). Esta forma R se convierte fundamentalmente en una forma tensa (forma T) cuando se une PEP. Este modelo está basado en la forma hiperbólica de unión de Mg^{2+} en ausencia de dicho ligando, que es cooperativa, en presencia de 2-fosfoglicolato, análogo del sustrato PEP.

Efectos heterotrópicos

Se han descrito diversos metabolitos efectores de la actividad de PEPC. Por su posible relevancia fisiológica destacan Gluc-6-P (Stiborová & Leblová, 1985) como activador y malato y aspartato como inhibidores (Huber & Edwards, 1975; Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1987). El efecto de estos componentes es más pronunciado a valores de pH neutro.

El principal efecto de Gluc-6-P es disminuir considerablemente la K_m para el sustrato. Además aumenta ligeramente la V_{max} . Otro efecto importante de Gluc-6-P es eliminar la cooperatividad positiva por el sustrato que PEPC de hojas de maíz de plantas C_4 presentan a pH 7 (Uedan & Sugiyama, 1976; Stiborová & Leblová, 1985).

Se han reportado otros activadores que por resultados de estudios cinéticos se presume se unen al sitio alostérico para Gluc-6-P. De estos, algunos son de posible relevancia fisiológica como la fructosa-1,6-bisfosfato (Marès & Leblová, 1980), el fosfato de carbamilo y el acetilfosfato (González y col., 1987) y el 3-fosfoglicerato (Guidici-Ortoni y col., 1988), y otros compuestos no fisiológicos como el fenilfosfato (Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990) y el metil-2-(hidroxifosfinoilmetil)-2-propenoato (Jenkins y col., 1986), que son análogos del sustrato PEP.

Glicina activa la PEPC de plantas C_4 monocotiledóneas aparentemente por incrementar la V_{max} sin afectar la K_m , independientemente del pH del ensayo. Sin embargo, este compuesto no afecta la enzima de plantas C_4 dicotiledóneas o de las plantas C_3 o CAM (Nishikido & Takanashi 1973; Stiborová & Leblová, 1985). Glicina se une a un sitio alostérico diferente al de Gluc-6-P (Gillinta & Grover, 1995). Además de glicina se ha reportado que otros aminoácidos activan a la enzima PEPC de hoja de maíz (Bandarian y col., 1992). A diferencia de la enzima de maíz, la enzima de plantas CAM no es activada por aminoácidos (Bandarian y col., 1992).

Malato y aspartato inhiben a PEPC incrementando la K_m aparente para PEP sin alterar la V_{max} (González y col., 1987), además, malato produce inhibición competitiva y no competitiva dependiendo del pH del ensayo (González y col., 1984). Gluc-6-P produce una disminución del efecto inhibitorio de malato (González y col., 1987).

El efecto inhibitorio de malato parece ser general para todos los tipos de PEPC, mientras que la activación por Gluc-6-P se presenta principalmente sobre las formas fotosintéticas. Las isoformas aisladas de plantas C_3 (Tarczynski & Outlaw, 1993) y de tejidos no fotosintéticos son en general menos sensibles a Gluc-6-P (Schuller y col., 1990).

Modificación covalente reversible.

Estudios realizados con hojas verdes de plantas C_4 , C_3 y CAM tratadas por períodos cortos de iluminación y oscuridad indican que la luz está involucrada en la regulación a corto plazo de la actividad de esta enzima (Karabourniotis y col., 1983; Wu & Wedding, 1985; Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1987; Jiao & Chollet, 1988; Duff & Chollet, 1995; Duff y col., 1995). Esta regulación se lleva a cabo por

fosforilación y defosforilación del grupo hidroxilo de la serina-15 en PEPC de maíz (Jiao & Chollet, 1989) y de la serina-8 en el caso de la enzima de sorgo (Lepiniec y col., 1994). Existe en dos formas interconvertibles: la forma fosforilada y la forma no fosforilada difieren en sus propiedades cinéticas. La enzima fosforilada presenta una actividad catalítica mayor a concentraciones subsaturantes de sustrato que la forma no fosforilada, (Jiao & Chollet, 1988; Duff & Chollet, 1995) y la afinidad aparente de PEPC para ambos efectores alostéricos malato y Gluc-6-P cambian dramáticamente e inversamente cuando la enzima es fosforilada (Duff y col., 1995), de manera que se incrementa la afinidad por el activador Gluc-6-P y disminuye la afinidad por el inhibidor malato (Huber & Edwards, 1975). Bajo condiciones fisiológicas ello resulta en un incremento notable de la actividad como consecuencia de la fosforilación (Doncaster & Leegood, 1987).

La fosforilación de PEPC es catalizada por una PEPC-cinasa no dependiente de Ca^{2+} (Carter y col., 1991; Jiao y col., 1991; McNaughton y col., 1991) y la defosforilación por una proteína fosfatasa tipo A2 (McNaughton y col., 1991).

En plantas C_3 y C_4 la forma fosforilada está presente en el día (Jiao & Chollet, 1991; Jiao y col., 1991; Duff & Chollet, 1995), mientras que en plantas CAM dicha forma prevalece durante la noche (Nimmo y col., 1986).

Recientemente se ha reportado que la actividad de la enzima de nódulo es regulada también a corto plazo por fosforilación. En este caso los fotosintatos que recibe el nódulo de la planta actúan como señal para producir la fosforilación (Chollet y col., 1996).

Mecanismo cinético de la isoenzima fotosintética de hoja de plantas C₄

El mecanismo cinético de la PEPC de *Zea mays* se ha determinado mediante patrones de velocidad inicial. Se ha encontrado un patrón de "equilibrio ordenado" cuando la concentración de PEP total varía a diferentes concentraciones fijas de Mg^{2+} total manteniendo la concentración de bicarbonato constante y saturante. Este patrón indica que la unión de Mg^{2+} está al equilibrio y precede a la unión del PEP (Janc y col., 1992a).

La afinidad del sitio activo de la enzima por el complejo PEP-Mg es mucho mayor que por el PEP o Mg^{2+} libres, por lo cual se considera que el complejo es el sustrato preferencial (Wedding y col., 1988; Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990).

Por otra parte, PEP libre se comporta como un activador de la enzima de hoja de maíz, por lo que se ha propuesto que existe un sitio alostérico regulatorio que fija PEP libre y el cual no puede unir Mg^{2+} (Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990).

Se obtuvieron igualmente los patrones de velocidad inicial variando el bicarbonato y el PEP a una concentración fija de Mg^{2+} , o bicarbonato y el Mg^{2+} a una concentración fija de PEP. Los patrones intersecantes obtenidos son consistentes con la adición secuencial de PEP y bicarbonato después de que el Mg^{2+} se ha unido. El orden relativo de adición del bicarbonato y PEP no pudo ser determinado en estos estudios.

Estos resultados parecen no estar de acuerdo con lo mencionado anteriormente sobre el complejo PEP-Mg, que se ha propuesto es la forma preferencial del sustrato (Wedding y col., 1988; Meyer y col., 1990; Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990). Los autores justifican esta discrepancia argumentando que el alto grado de

sinergismo en la unión de PEP al complejo Enzima-Mg²⁺, hace parecer que el complejo PEP-Mg es el que se une a la enzima. Sin embargo, mientras está claro que el Mg²⁺ y el Mn²⁺ son capaces de unirse a la PEPC en ausencia de PEP (Janc y col., 1992a), también existe evidencia experimental que sugiere la unión de PEP al sitio activo de la enzima en ausencia de Mg²⁺ (Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990).

Los estudios cinéticos sobre PEPC reportados hasta la fecha, por tanto, son contradictorios y no permiten establecer en forma clara el mecanismo cinético de esta enzima.

Modificación de la enzima con piridoxal 5'-fosfato

Generalidades de modificación química

El principio de la aplicación de las técnicas de modificación química para el estudio de los mecanismos enzimáticos es muy simple. Si un aminoácido involucrado en la actividad catalítica es modificado químicamente, la enzima puede ser inactivada (Price & Stevens, 1982), o si lo está en la unión de un efector alostérico o en la transmisión del cambio conformacional inducido por este efector, la enzima puede ser insensibilizada frente al efector (Price & Stevens, 1982).

La modificación química ha constituido por esto una excelente herramienta en la elucidación de las propiedades enzimáticas. Los estudios de modificación química son utilizados para conocer la naturaleza de los residuos del sitio activo y para

diferenciar aquellos aminoácidos que participan en la actividad catalítica de aquellos que son importantes en la unión del sustrato.

Otros aspectos de catálisis enzimática que han sido estudiados a través de la modificación química incluyen la especificidad por el sustrato, la cooperatividad entre subunidades, la ionización de grupos funcionales y los diferentes estados conformacionales que puede presentar una enzima.

Tradicionalmente los estudios de modificación química preceden a la cristalización de proteínas y análisis con rayos X, o bien a los de mutagénesis dirigida, que pueden ser utilizados para confirmar y complementar los datos obtenidos por los medios químicos (Kaiser y col., 1985).

Estudios de modificación química de PEPC

La utilización de una variedad de reactivos selectivos de grupo para la modificación química de la PEPC ha indicado la presencia de residuos de cisteínas (Wedding y col., 1989), histidinas (Iglesias & Andreo, 1983), argininas (Iglesias y col., 1984) y lisinas (Podestá y col., 1986; Wagner y col., 1988) que son esenciales para la actividad enzimática.

El PLP ha sido ampliamente utilizado como un modificador de proteínas debido a su alta especificidad reactiva sobre los grupos amino primarios.

La PEPC purificada de hojas de maíz es inactivada reversiblemente por incubación con PLP en la oscuridad. Las propiedades espectrales de la enzima modificada antes y después de su reducción con borohidruro de sodio sugieren que la pérdida de la actividad enzimática es debida a la formación de una base de Schiff entre el PLP y los residuos de lisina de la carboxilasa y que la completa inactivación

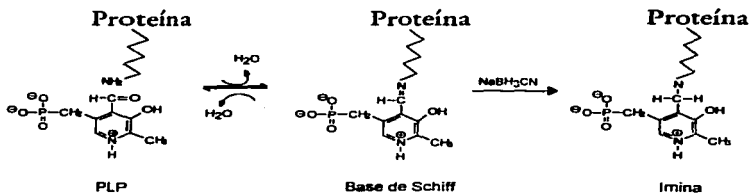
está correlacionada con la modificación de cuatro lisinas por homotetrámero (Podestá y col., 1986).

La presencia de PEP y Mg^{2+} previenen completamente la inactivación y modificación de lisinas (Podestá y col., 1986; Jiao y col., 1990).

Se ha propuesto un mecanismo reversible de dos pasos para la reacción de los restos de lisina con el PLP, mecanismo que involucra la formación de una base de Schiff seguida de la formación de una imina debida a la reducción con $NaBH_4$ (reacción irreversible) como se muestra en el esquema.

Análisis espectrales de la enzima modificada con PLP muestran una absorción máxima a 432 y 327 nm, antes y después de la reducción con $NaBH_4$, respectivamente, sugiriendo que los grupos ϵ -amino de residuos de lisina son los grupos reactivos de la enzima (Podestá y col., 1986).

Una característica común de las enzimas que son inactivadas por PLP es que contienen sitios alostéricos o de unión que normalmente unen compuestos organofosforados (en este caso PLP modifica al sitio alostérico para Gluc-6-P).



Esquema de la reacción del PLP con grupos lisina de proteínas.

Teoría cinética

Las enzimas que catalizan reacciones en las que interviene un metal como cofactor pueden seguir diferentes mecanismos cinéticos, cada uno de ellos distinguible por medio de estudios de velocidad inicial:

Mecanismo 1

Si sólo se une a la enzima el complejo sustrato-metal tenemos un mecanismo en que la velocidad de la reacción depende exclusivamente de la concentración de este complejo y las especies libres PEP y Mg^{2+} no tienen ningún efecto sobre esta velocidad.



Esquema 1: Mecanismo en el que el sitio activo de la enzima une solamente al complejo sustrato-metal.

En el Esquema 1, S es el sustrato, M es el metal, K_0 es la constante de disociación del complejo sustrato-metal (S-M), K_{SM} es la constante de Michaelis para el complejo S-M y K_{cat} es la constante catalítica de la reacción.

La ecuación de velocidad en ausencia de productos que corresponde a este mecanismo es:

$$v = \frac{V_{max} [S - M]}{K_{SM} + [S - M]} \quad (1)$$

Puesto que,

$$[SM] = \frac{[S][M]}{K_0} \quad (2)$$

podemos escribir la ecuación (1) en función de la concentración de las especies libres:

$$v = \frac{V_{max} \frac{[S][M]}{K_0}}{K_{SM} + \frac{[S][M]}{K_0}} \quad (3)$$

A $[S]$ variable y $[M]$ fijo variable:

$$v = \frac{V_{max} [S]}{\frac{K_{SM}K_0}{[M]} + [S]} \quad (4)$$

La ecuación (4) es la misma para el caso en que $[M]$ es variable y $[S]$ fijo variable, sólo que sustituyendo $[S]$ por $[M]$ y viceversa. Esta ecuación predice que V_{max} es independiente de la concentración del sustrato fijo variable y por tanto que las líneas en una gráfica de dobles recíprocos deben cortarse en el eje de las ordenadas. También predice que los valores aparentes de K_m serán iguales para cualquiera de las especies siempre que lo sea el valor de la concentración del sustrato fijo variable.

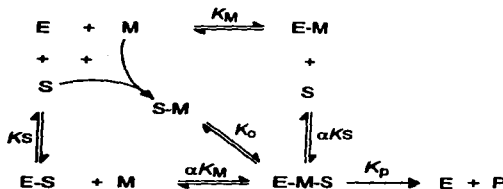
El regráfico de las pendientes de las líneas de las gráficas de dobles recíprocos versus el inverso de la concentración del sustrato fijo variable debe ser una línea recta que pasa por el origen y tiene una pendiente m definida por la ecuación (5):

$$m = \frac{K_0 K_{SM}}{V_{max}} \quad (5)$$

Por tanto, a partir del valor de esta pendiente puede calcularse K_{SM} , provisto que se conozca K_0 .

Mecanismo 2

El sitio activo de la enzima une al azar tanto a las especies libres como al complejo sustrato-metal.



Esquema 2: Mecanismo en el que el sitio activo de la enzima une al azar a las especies libres.

K_M y K_S son las constantes de disociación para el metal y el sustrato, respectivamente, de los complejos binarios que forman con la enzima libre y αK_M y αK_S son las constantes de disociación del metal y del sustrato del complejo E-S-M, respectivamente.

La ecuación de velocidad inicial correspondiente a este mecanismo bajo el supuesto de equilibrio rápido es:

$$v = \frac{V_{max} [S][M]}{\alpha K_S K_M + [S] \alpha K_M + [M] \alpha K_S + [S][M]} \quad (6)$$

ó si se considera que $\alpha K_S K_M = K_0 K_{SM}$

$$v = \frac{V_{max} [S][M]}{K_0 K_{SM} + [S] K_0 \frac{K_{SM}}{K_S} + \frac{[M] K_0 K_{SM}}{K_M} + [S][M]} \quad (7)$$

Cuando $[M]$ es variable y $[S]$ fijo variable la ecuación (7) puede escribirse como:

$$v = \frac{V_{max} [M][S] (\alpha K_S + [S])}{\alpha K_M (K_S + [S]) + [M]} \quad (8)$$

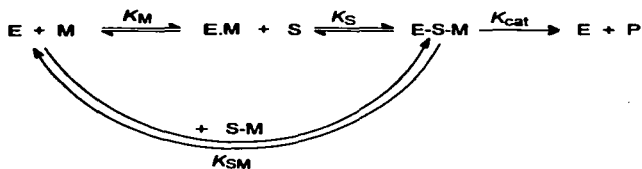
La ecuación (8) es simétrica para $[S]$ variable y $[M]$ fijo variable. Por tanto, las líneas de las gráficas de dobles recíprocos de este mecanismo se cortaran a la izquierda del eje de ordenadas (eje $1/v$) cualquiera que sea el sustrato variable.

Además, los regráficos tanto de las pendientes como de interseptos versus el inverso de la concentración del sustrato fijo variable son líneas rectas que no pasan por el origen.

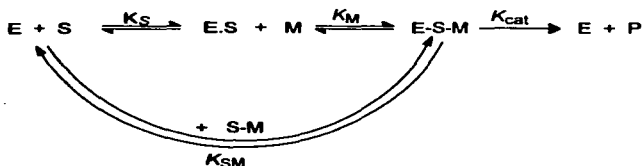
Mecanismo 3

El sitio activo de la enzima une tanto al complejo sustrato-metal como a las especies libres, pero a éstas en forma ordenada como lo muestra el siguiente esquema:

a)



b)



Esquema 3: Mecanismos en los que el sitio activo de la enzima une a las especies libres en forma ordenada.

La ecuación de velocidad en ausencia de productos correspondiente al mecanismo 3a (deducida como en los casos anteriores para equilibrio rápido) es:

$$v = \frac{V_{max} [M][S]}{K_M K_S + [M]K_S + [S]K_M} \quad (9)$$

Si $[M]$ es variable y $[S]$ fijo variable, la ecuación (9) puede escribirse:

$$v = \frac{\frac{V_{max} [M]}{1 + \frac{K_S}{[S]}}}{\frac{K_M K_S}{[S] \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right) + [M]}} \quad (10)$$

Si $[S]$ es variable y $[M]$ fijo variable, la ecuación (10) puede escribirse:

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_S \left(1 + \frac{K_M}{[M]}\right) + [S]} \quad (11)$$

Por tanto, las líneas de una gráfica del inverso de la velocidad inicial versus el inverso de la concentración del segundo sustrato, es decir el sustrato que no puede unirse a la forma libre de la enzima, interseccionarán en el eje de ordenadas, mientras que las líneas de una gráfica del inverso de la velocidad inicial versus el inverso de la concentración del primer sustrato, aquel que se une a la enzima libre, interseccionarán a la izquierda del eje de ordenadas.

De la ecuación (10) se puede deducir que el gráfico de las pendientes de las líneas de la correspondiente gráfica de dobles recíprocos versus el inverso de $[S]$ es una línea recta que pasa por el origen. La ecuación (11), en cambio, predice que el regráfico de las pendientes de las líneas de la correspondiente gráfica de dobles recíprocos versus el inverso de $[M]$ es una línea recta que no pasa por el origen.

En este mecanismo, la especie libre que se una primero, el metal en el caso (a), se comportará como un inhibidor competitivo de la reacción cuando se considere el complejo S-M como el sustrato variable, mientras que la especie libre que se una en segundo lugar se comportará como un activador que afecta V_{max} y K_m por un mismo factor. Esto se puede claramente ver en las ecuaciones de velocidad en ausencia de productos deducidas considerando al complejo sustrato-metal como el sustrato variable:

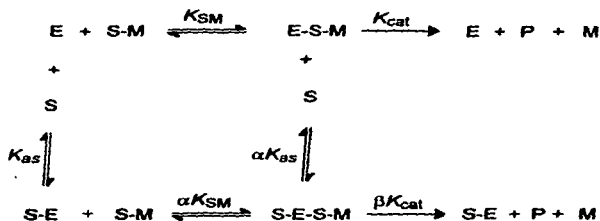
$$v = \frac{V_{max} [S - M]}{K_0 K_{SM} \left(1 + \frac{[M]}{K_S} \right) + [S - M]} \quad (12)$$

$$v = \frac{\frac{V_{max} [S - M]}{1 + \frac{K_S}{[S]}}}{\frac{K_0 K_{SM}}{\left(1 + \frac{K_S}{[S]} \right)} + [S - M]} \quad (13)$$

Mecanismo 4

Cualquiera de los tres mecanismos descritos anteriormente puede hacerse más complejo si alguna o ambas de las especies libres, es decir, el metal y el sustrato, regula positiva o negativamente la actividad enzimática al unirse a un sitio diferente al sitio activo.

Por ser pertinente a los estudios llevados a cabo en este trabajo, describiremos aquí sólo el caso en que el sustrato es además un regulador alostérico de la reacción, de acuerdo con el siguiente esquema:



Esquema 4: Mecanismo en el que el sitio activo une sólo al complejo sustrato-metal y hay un sitio alostérico para el sustrato libre.

En este mecanismo K_{as} representa la constante de disociación de S del complejo que forma con el sitio alostérico de la enzima. Los factores de interacción α y β indican el cambio que sufren las constantes de disociación o catalítica cuando se ocupan por el sustrato ambos sitios, tanto el activo como el alostérico. Dependiendo

de los valores de α y β , el sustrato afectará en forma diferente a la reacción. Así para valores de $\alpha < 1$ el sustrato libre activará, aumentando la afinidad de la enzima por el complejo sustrato-metal. Un valor de $\alpha = 1$ significa que el sustrato libre no afecta la afinidad de la enzima por este complejo y finalmente un valor de $\alpha > 1$ indica que el sustrato libre inhibe la reacción al disminuir la afinidad de la enzima por el verdadero sustrato el complejo sustrato-metal. En cuanto a β , valores < 1 se acompañan de inhibición por disminuir la velocidad del paso catalítico, mientras que valores > 1 ocurren cuando hay activación por acelerarse la catálisis. Un valor de $\beta = 1$ indica que el sustrato libre no afecta la catálisis.

La ecuación de velocidad inicial deducida para un mecanismo como el mostrado en el esquema 4 en equilibrio rápido es:

$$v = \frac{V_{max} [S][M](\alpha K_{as} + \beta [S])}{\alpha K_{as} K_{SM} K_0 + [S] K_{SM} K_0 + [S][M](\alpha K_{as} + [S])} \quad (14)$$

Si $\beta = 1$, cuando la concentración de metal libre es variado manteniendo fija la concentración del sustrato libre, la ecuación se simplifica a:

$$v = \frac{V_{max} [M] [S]}{K_{SM} K_0 + [M] [S]} \quad (15)$$

Por tanto, la cinética de saturación por el metal libre será hiperbólica y con un valor de V_{max} independiente de la concentración del sustrato libre a la que se determine. Por el contrario, la K_m aparente si es función de la concentración del sustrato libre y el gráfico de las pendientes de las líneas de dobles recíprocos versus el inverso de la concentración del sustrato libre es una línea recta que pasa

por el origen y que tiene por pendiente $K_{SM} K_0 / V_{max}$, idéntica al mecanismo 1 en el que no hay activación por el sustrato.

En el mismo caso ($\beta = 1$), cuando el sustrato libre es variado manteniendo fija la concentración del metal libre, la ecuación (15) queda:

$$v = \frac{V_{max} [S][M](\alpha K_{ax} + [S])}{\alpha K_{ax} K_{SM} K_0 + [S](K_{SM} K_0 + [M](\alpha K_{ax} + [S]))} \quad (16)$$

Los términos en $[S]^2$ de esta ecuación predicen una cinética de saturación por el sustrato libre de tipo sigmoideal. Puesto que los términos en $[S]^2$ van multiplicados por $[M]$, la cooperatividad aparente se hará mayor a medida que aumenta la concentración del metal libre. Los valores aparentes de V_{max} y $Km_{(sustrato)}$ son función de la concentración del metal libre.

En este caso no es posible hacer regráficos de las pendientes dada la curvatura de las líneas de la gráfica de dobles recíprocos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Un aspecto central en la comprensión del funcionamiento de cualquier enzima es conocer su mecanismo cinético, es decir, el orden de adición de los sustratos y de liberación de los productos (Cleland, 1970).

A este respecto, en el caso de la PEPC sólo se ha reportado hasta la fecha un estudio no muy completo sobre la enzima de maíz (Janc y col., 1992a), a pesar de que la enzima de diversas fuentes ha sido objeto de muy numerosos estudios sobre otros aspectos de su modo de acción o estructura, como se ha descrito en antecedentes.

Por otra parte, la mayoría de los estudios de velocidad inicial con PEPC de muy diversos orígenes reportados hasta la fecha se han realizado variando la concentración de PEP total a una concentración fija alta de Mg^{2+} total, generalmente como $MgCl_2$, o variando la concentración de Mg^{2+} total a una concentración fija de PEP total. Sin embargo la forma trianiónica del PEP tiene la capacidad de formar complejos con metales divalentes y concretamente con el Mg^{2+} con una constante de estabilidad de 5.55 mM (Wold & Ballou, 1957) . Además se conoce que el ión metálico sirve de puente para la unión de PEP a la enzima (Miller y col., 1968). Debido a estas características, cabe preguntarse si el sitio activo de la enzima PEPC reconoce a las especies libres de PEP y Mg^{2+} al complejo PEP-Mg o a ambos. El contestar esta pregunta de forma inequívoca es importante particularmente para entender como se regula la actividad de la enzima por los propios sustratos de la reacción. Además, en el caso de PEPC de hoja de maíz abordar el estudio del papel de las especies libres en la cinética de la enzima tiene especial relevancia dado que en base a evidencias surgidas de estudios de velocidad inicial (Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990), de estudios de análogos de PEP que son activadores de la

enzima (Jenkins y col., 1986; Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990, Tovar-Méndez y col., 1997) y de estudios de cambios en la fluorescencia (Rustin y col., 1991) se ha postulado que PEP además de sustrato es un activador alostérico que se une al sitio alostérico de Gluc-6-P. Esta activación por PEP complica los resultados de velocidad inicial y hace muy difícil establecer de manera inequívoca el mecanismo cinético de la misma.

Recientemente en nuestro laboratorio se logró insensibilizar al activador Gluc-6-P a la PEPC pura de hoja de maíz por modificación química con PLP (Tovar-Méndez y col., 1997). Por ello contamos con una excelente herramienta que nos permitirá investigar: (1) si la activación observada por PEP libre (Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990) se debe a la unión del PEP con el sitio alostérico de Gluc-6-P, (2) el mecanismo cinético de la enzima en ausencia de esta interacción.

HIPÓTESIS

Si PEP es además de sustrato un efector de la enzima PEPC de hoja de maíz, que ejerce su efecto activador al unirse al sitio alostérico de Gluc-6-P, la eliminación funcional de este sitio alostérico eliminará la activación por PEP libre y permitirá determinar el mecanismo cinético de esta importante enzima fotosintética.

OBJETIVOS

Objetivo general

- **Determinar mediante estudios de velocidad inicial con enzima nativa e insensible a Gluc-6-P si PEP es sustrato y activador de la enzima PEPC de hoja de maíz. Al mismo tiempo determinar el mecanismo cinético tanto de la enzima nativa como de la enzima carente funcionalmente del sitio activador de Gluc-6-P.**

Objetivos particulares

- **Obtener una enzima activa e insensible a Gluc-6-P por medio de modificación química con PLP.**
- **Determinar el mecanismo cinético de la enzima modificada y establecer que papel juegan las especies libres de Mg^{2+} y PEP.**
- **Establecer una comparación entre los patrones de velocidad inicial de la enzima nativa y de la modificada, con el fin de confirmar el papel de PEP como activador alostérico.**

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Equipo

Balanza analítica Ohaus, capacidad de 210g x 0.1 mg.

Potenciómetro Φ 32 Beckman.

Espectrofotómetro DU-65 Beckman, con temperatura controlada y registrador integrado.

Refrigerador Bendix Nofrost 19 a 4 °C y -20 °C.

Ultracongelador Forma Scientific a -70 °C.

Vortex-2 Genie Scientific Industries, INC.

Platos de agitación magnéticos Thermolyne Nuova II.

Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico, obtenidos de las siguientes casas comerciales:

Aldrich: NaBH_3CN

Amicon: Centricon 100 concentrators.

MERCK: EDTA, NaHCO_3 , MgO

Sigma Chemical Co.: ASB, azul de Coomassie brillante R, DTT, HEPES, MDH (de corazón de cerdo), PEG (6000), PLP, NADH, PEP (sal de monociclohexilamonio), D-glucosa-6-fosfato.

Pfaltz & Bauer: Trietanolamina.
Pharmacia Biotech.: Sephadex G-25 Medium.

Material biológico

Se utilizaron plantas de maíz (*Zea mays* L., var. Chalqueño) crecidas en tierra en invernadero y fotoperíodo natural a una temperatura de 20-30 °C, de 8 semanas de edad.

Métodos

Extracción y purificación de PEPC

La extracción se realizó a partir de hojas previamente mantenidas en oscuridad por 3 h, por lo que se obtuvo la forma, de oscuridad, no fosforilada, de la enzima.

Tanto la extracción como la purificación, llevada a cabo por métodos cromatográficos estándares, se realizaron tal y como se describe en Tovar-Méndez y col., 1997.

La pureza de la enzima era superior al 95%, de acuerdo al criterio de SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y tinción con azul de Coomassie.

Determinación de la concentración de proteína

La cantidad de proteína fue determinada por el método propuesto por Bradford (Bradford, 1976), que está basado en la formación de un complejo azul entre el reactivo azul de Coomassie (azul brillante G) y los residuos de arginina de las proteínas.

El reactivo de Bradford se preparó de la siguiente manera: azul de Coomassie al 0.05% (p:v) en una solución de EtOH-HClO₄ 0.6% (p:v). Se agitó toda una noche a temperatura ambiente, posteriormente se filtró a través de papel Whatman (0.45 µm) y luego en papel Millipore (0.22µm) para eliminar residuos no disueltos.

Se hizo una curva patrón o estándar empleando ASB disuelta en agua a una concentración de 2 mg/mL. De esta solución se tomaron volúmenes equivalentes a 0, 2, 4, 6, 8 10, 20, 30 y 40 µg de proteína que se llevaron a un volumen final de 50 µL con agua destilada.

Para las muestras problema el volumen de la muestra utilizado fue de 5 µL y se completó a 50 µL con agua destilada.

Tanto a los tubos de la curva patrón como a los de las muestras problema se les adiciono 5 mL del reactivo de Bradford.

Se midió absorbancia a 595 nm, calibrando el espectrofotómetro con el primer tubo de la curva patrón.

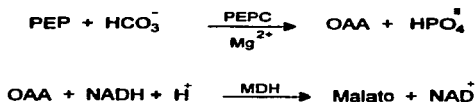
Para la determinación de la concentración de proteína se interpolaron las lecturas de absorbancia de las muestras problema en la curva patrón de ASB (Ley de Lambert-Beer).

Preparación del MgCl₂

Se coloca en una caja de Petri MgO y se calienta en una platina hasta completa sequedad moviendo el polvo constantemente. Después se pesa la cantidad necesaria para preparar una solución de MgCl₂ 1 M. Se disuelve en agua y con agitación constante durante una noche, posteriormente se acidula con HCl concentrado hasta llegar a un pH entre 5.5 y 5.6 y finalmente se afora al volumen indicado.

Determinación de la actividad de PEPC

La actividad de la PEPC se determinó espectrofotométricamente utilizando como enzima acoplada la enzima MDH dependiente de NADH, de manera que el OAA resultante de la carboxilación del PEP es reducido a malato gracias a la actividad de la enzima MDH que paralelamente oxida NADH a NAD⁺, según el siguiente esquema de reacción:



La cantidad de OAA producido durante el transcurso de la reacción puede así medirse siguiendo el descenso de la densidad óptica a 340 nm causado por la conversión de NADH a NAD⁺.

La temperatura a la cual se realizó el ensayo fue de 30 ± 0.1 °C, manteniéndola constante con un equipo de circulación de agua a temperatura controlada.

El medio de reacción estándar para la determinación de la actividad contenía; HEPES-KOH 100 mM (pH 7.3), EDTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaHCO₃ 10 mM, NADH 0.2 mM, MDH 3 UI y PEP 5 mM.

En los experimentos en los que se utilizó el complejo Mg-PEP, las cantidades de Mg²⁺ total y de PEP total utilizadas en cada determinación para dar las concentraciones deseadas de las especies libres, y del complejo PEP-Mg se calcularon utilizando el programa de cómputo y las constantes de estabilidad descritos por Rodríguez-Sotres (1990).

La reacción se inició por la adición de 10 µL de la preparación pura de PEPC al medio de ensayo. La disminución de la absorbancia se registró por 2 min en una celda de 1 cm de paso de luz.

Durante este intervalo la desaparición de NADH con respecto al tiempo es lineal. Todos los ensayos se realizaron por duplicado o triplicado, siendo la variación entre ellos menor al 10 %.

Definimos la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que produce la conversión de 1 µmol de sustrato por min bajo nuestras condiciones experimentales.

La actividad enzimática de PEPC fue calculada mediante la siguiente expresión:

$$A = \frac{\text{Incremento D.O.}}{t \text{ (min)}} \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{1}{v \text{ (mL)}} = (\text{U/mL})$$

donde:

A = Actividad enzimática (U/mL).

D.O. = Densidad óptica.

ϵ = Coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm
($6.22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

v = Volumen de la preparación de enzima usado en el ensayo (mL).

Determinación de la sensibilidad a Gluc-6-P

Nosotros definimos la sensibilidad a Gluc-6-P como: $(v_a - v_o)/v_a$, donde v_a y v_o son la actividad enzimática en presencia y en ausencia de Gluc-6-P 10 mM, respectivamente, a una concentración de PEP total 1 mM y de Mg^{2+} total 5 mM a pH 7.3.

Preparación de las muestras

Se partió de una preparación pura de PEPC y como ésta se encontraba en el siguiente amortiguador HEPES-KOH 50 mM, pH 7.3, conteniendo EDTA 1 mM, glicerol 10% (p:v) y DTT 5 mM, fue necesario desalar la muestra (a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada y eluida con TEA-HCl 50 mM, pH 7.3, conteniendo EDTA 1 mM, polietilenglicol 3% (p:v)), ya que el DTT es un agente reductor que interfiere con la modificación química por PLP.

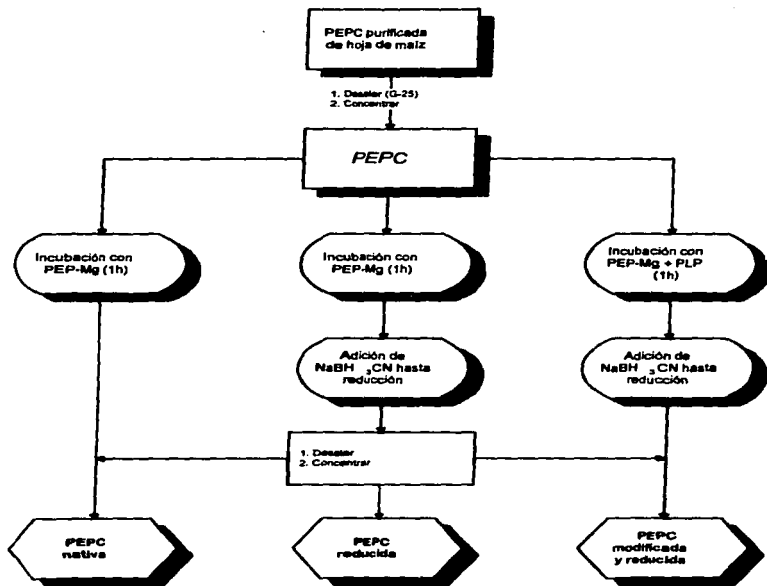
Cuando fue necesario, la preparación desalada se concentró en tubos Centricron 100 de la misma manera que se describe en el apartado Reacción de PEPC con PLP.

Esta preparación de enzima se dividió en tres partes, cada una de las cuales recibió un tratamiento diferente como se muestra a continuación: (1) PEPC nativa: incubación con PEP-Mg durante 1 h, (2) PEPC reducida: incubación con PEP-Mg

durante 1 h y reducción con NaBH_3CN , (3) PEPC modificada y reducida incubación con PEP-Mg + PLP durante 1 h y reducción con NaBH_3CN .

La concentración de los ligandos protectores en todos los casos fue la mencionada anteriormente.

Esquema de la preparación de las muestras



Reacción de PEPC con PLP

Se utilizó siempre una solución de PLP recién preparada en amortiguador de modificación (TEA-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, a pH 7.3). La concentración de esta solución fue determinada a 388 nm usando un coeficiente de extinción molar del PLP, siendo este de $4900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Blackburn & Schachman, 1976).

La reacción de modificación se llevó a cabo en la oscuridad añadiendo a la preparación de enzima (con una concentración de 2.16 mg/mL) el volumen necesario de la solución de PLP para obtener una concentración final de 1.2 mM, así como los ligandos protectores del sitio activo PEP y Mg^{2+} a una concentración final de 9.56 y 9.44 mM respectivamente (concentración del complejo PEP-Mg 4 mM). El volumen final del medio de incubación fue de 3 mL. La incubación de esta muestra duró 1 h. Posteriormente se incubó con NaBH_3CN (40 mM concentración final) durante aproximadamente 2 min para obtener una reducción total. Una vez reducida, la muestra se desaló en una columna Sephadex G-25 equilibrada con amortiguador de desalado (TEA-HCl 50 mM, pH 7.3, conteniendo EDTA 1 mM, DTT 5 mM y polietilenglicol al 3 %). Después, se concentró la muestra en tubos Centricon 100. Finalmente se agregó polietilenglicol para obtener una concentración final al 8 % (p:v) y la preparación se guardó a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Análisis de datos

Los datos de velocidad inicial se ajustaron inicialmente a la ecuación de Michaelis-Menten (Segel, 1975) (ecuación (17)) o a la ecuación de Hill (Segel, 1975) (ecuación (18)) o a la ecuación de inhibición por sustrato (ecuación (19)) en las que v es la velocidad inicial, V_{max} es la velocidad máxima; $[S]$ es la concentración de sustrato variable, K_m la constante de Michaelis-Menten, $S_{0.5}$ es la concentración de sustrato a la que se alcanza la velocidad semimáxima, n es el número de Hill y K_i es la constante de inhibición del sustrato S.

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (17)$$

$$v = \frac{V_{max} [S]^n}{S_{0.5}^n + [S]^n} \quad (18)$$

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad (19)$$

Los datos experimentales también se graficaron como dobles recíprocos, de acuerdo a la transformación de Lineweaver-Burk (Segel, 1975) de la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación (20)).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (20)$$

La forma en que se cruzan las líneas de los dobles recíprocos y los regráficos de los interceptos y pendientes de estas líneas servirán para definir el mecanismo cinético seguido en cada caso. Una vez definido éste, los datos experimentales se ajustaron en forma global a la ecuación de velocidad correspondiente al mecanismo pertinente como se describe en el apartado de Teoría Cinética.

Todos los mecanismos se consideraron ser de equilibrio rápido.

RESULTADOS

Respuesta de la PEPC nativa, reducida con NaBH_3CN y modificada con PLP y reducida con NaBH_3CN a Gluc-6-P a pH 7.3 y 8.3

Para poder llevar a cabo nuestros objetivos, se obtuvo una preparación de PEPC modificada con PLP y posteriormente reducida con NaBH_3CN . La reducción es necesaria para conseguir una enzima modificada en forma irreversible, como se describió en métodos.

Con el fin de comprobar: (a) si la modificación con PLP había eliminado la sensibilidad a Gluc-6-P y (b) si la reducción con NaBH_3CN no tenía ningún efecto adicional sobre la actividad de la enzima, se compararon tres preparaciones de enzima: (1) PEPC nativa, la cual se incubó solamente con los sustratos protectores (PEP y Mg^{2+}), (2) PEPC reducida, la cual después de ser incubada con los sustratos se redujo con NaBH_3CN y (3) PEPC modificada y reducida, la cual se incubó con PLP en presencia de sustratos protectores y se redujo posteriormente.

A estas tres muestras se les determinaron sus parámetros cinéticos y sensibilidad a 10 mM de Gluc-6-P, tanto a pH 7.3 como a pH 8.3, variando la concentración de PEP libre total a una concentración fija de MgCl_2 de 5 mM. Los resultados se muestran en las figuras 1 y 2 y en las tablas 1-4.

Considerando a la PEPC nativa como control, con una actividad y sensibilidad al activador del 100%, la PEPC reducida conservó un 41.7% de la actividad máxima del control. La reducción con NaBH_3CN no afectó ni la $S_{0.5}(\text{PEP})$, ni el número de Hill indicando que si bien una fracción importante de enzima se inactiva por este tratamiento, la enzima activa restante es idéntica a la no tratada. Igual resultado se

obtuvo a pH 8.3, en el que se obtuvieron valores similares de $Km_{(PEP)}$ para la enzima nativa y reducida.

Por el contrario, la enzima modificada y reducida presentó una afinidad más alta por el sustrato que la enzima control, ya que la $Km_{(PEP)}$ determinada a ambos valores de pH fue aproximadamente 60% del valor control. Además la enzima modificada perdió la cooperatividad positiva que muestra la enzima nativa a pH 7.3.

Cuando los mismos parámetros cinéticos se determinaron en presencia de concentraciones saturantes del activador Gluc-6-P, de nuevo se encontró que la reducción con $NaBH_3CN$ sólo afectó a la proporción de enzima activa, y no la $Km_{(PEP)}$.

Así a pH 7.3, la presencia de Gluc-6-P incrementa la $Vmax$ (38% y 21% en las enzimas control y reducida, respectivamente) y disminuye $Km_{(PEP)}$ (87% y 89% en las enzimas control y reducida, respectivamente). A pH 8.3 se encontró un efecto similar de Gluc-6-P sobre ambas enzimas, incrementándose la $Vmax$ en un 32 y un 18% en presencia del activador en las enzimas nativa y reducida, respectivamente, mientras que la $Km_{(PEP)}$ se redujo en un 40%.

La enzima modificada con PLP en cambio mostró menos cambios tanto en $Vmax$ como en $Km_{(PEP)}$ en respuesta a Gluc-6-P. En promedio los cambios observados fueron como del 30% de los observados en las enzimas control y reducida.

Estos resultados muestran que los cambios observados en la enzima modificada con PLP se debían exclusivamente a la reacción con PLP y no a la reducción con $NaBH_3CN$ y que la enzima modificada había perdido considerablemente su sensibilidad a Gluc-6-P.

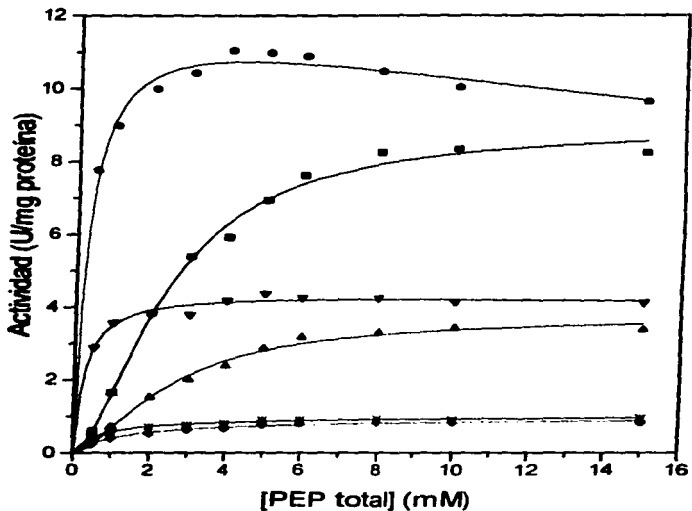


Figura 1

Cinética de saturación por PEP total a pH 7.3 (Mg^{2+} total 5 mM). PEPC nativa en ausencia (■) y presencia (●) de Gluc-6-P, PEPC reducida en ausencia (▽) y presencia (◆) de Gluc-6-P y PEPC modificada y reducida en ausencia (○) y presencia (▲) de Gluc-6-P. Los puntos son los datos experimentales y las líneas las resultantes del ajuste de estos datos a las ecuaciones correspondientes (ecuaciones (17), (18) y (20)).

Tabla 1

Parámetros cinéticos de PEPC nativa, PEPC reducida y PEPC modificada determinados a pH 7.3 y en ausencia de Gluc-6-P. Para la obtención de estos valores aparentes se ajustaron los datos experimentales a la ecuación (18).

PEPC	V_{max} (U/mg)	$S_{0.5(PEP)}$ (mM)	n
Nativa	8.90 ± 0.27	2.38 ± 0.13	1.72 ± 0.14
Reducida	3.71 ± 0.15	2.51 ± 0.18	1.64 ± 0.16
Modificada y reducida	0.95 ± 0.02	1.40 ± 0.13	1.02 ± 0.12

Tabla 2

Parámetros cinéticos de PEPC nativa, PEPC reducida y PEPC modificada determinados a pH 7.3 y en presencia de Gluc-6-P 10 mM. Para la obtención de estos valores aparentes se ajustaron los datos experimentales a las ecuaciones (17) y (19).

PEPC	V_{max} (U/mg)	$K_{m(PEP)}$ (mM)	K_i (mM)
Nativa	12.28 ± 0.37	0.31 ± 0.04	60.11 ± 14.45
Reducida	4.49 ± 0.15	0.27 ± 0.05	—
Modificada y reducida	0.99 ± 0.01	0.76 ± 0.06	—

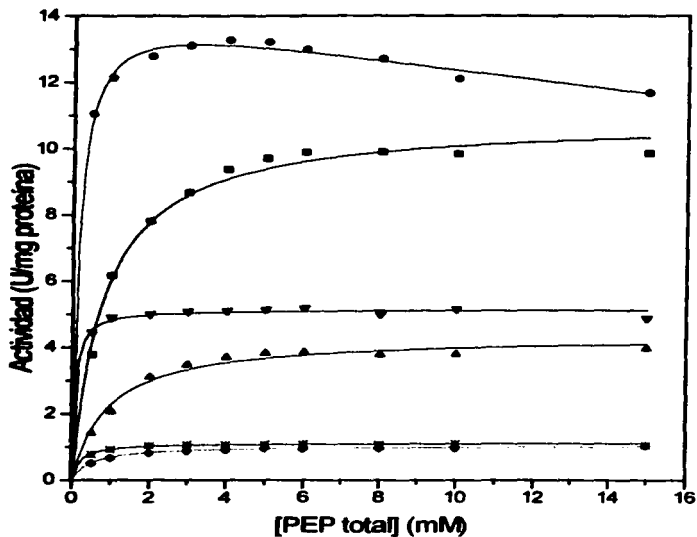


Figura 2

Cinética de saturación por PEP total a pH 8.3 (Mg^{2+} total 5 mM). PEPC nativa en ausencia (■) y presencia (●) de Gluc-6-P, PEPC reducida en ausencia (▲) y presencia (◆) de Gluc-6-P y PEPC modificada y reducida en ausencia (◆) y presencia (†) de Gluc-6-P. Los puntos son los datos experimentales y las líneas las resultantes del ajuste de estos datos a las ecuaciones correspondientes (ecuaciones (17) y (19)).

Tabla 3

Parámetros cinéticos de PEPC nativa, PEPC reducida y PEPC modificada determinados a pH 8.3 y en ausencia de Gluc-6-P. Para la obtención de estos valores aparentes se ajustaron los datos experimentales a la ecuación (17).

PEPC	V_{max} (U/mg)	$K_{m(PEP)}$ (mM)
Nativa	10.87 ± 0.19	0.79 ± 0.07
Reducida	4.34 ± 0.11	0.90 ± 0.11
Modificada y reducida	1.04 ± 0.01	0.52 ± 0.03

Tabla 4

Parámetros cinéticos de PEPC nativa, PEPC reducida y PEPC modificada determinados a pH 8.3 y en presencia de Gluc-6-P 10 mM. Para la obtención de estos valores aparentes se ajustaron los datos experimentales a la ecuaciones (17) y (19).

PEPC	V_{max} (U/mg)	$K_{m(PEP)}$ (mM)	K_i (mM)
Nativa	14.40 ± 0.20	0.15 ± 0.01	66.77 ± 8.49
Reducida	5.14 ± 0.05	0.06 ± 0.01	—
Modificada y reducida	1.12 ± 0.01	0.20 ± 0.02	—

Mecanismo cinético de PEPC nativa y PEPC modificada

A continuación procedimos a determinar si existen diferencias entre los mecanismos cinéticos de ambas enzimas determinando los patrones de velocidad inicial para las especies libres de PEP y Mg^{2+} a concentración fija saturante de $NaHCO_3$ (10 mM). Puesto que para que se lleve a cabo la catálisis se requiere que en el sitio activo se encuentre el complejo PEP-Mg, Mg^{2+} puede considerarse para efectos de su influencia sobre la velocidad de la reacción como un activador esencial o como un sustrato, aunque estrictamente no es sustrato ya que no sufre ninguna transformación química. En este trabajo, se le ha considerado como sustrato. Los resultados obtenidos en estos estudios se describen a continuación.

Cinética de saturación de la PEPC nativa por PEP y Mg^{2+} libres a pH 7.3

Los patrones de velocidad inicial se determinaron en un rango de concentración de 0.25 a 4 mM de las dos especies libres. Tanto con Mg^{2+} libre como con PEP libre como sustratos fijos variables se obtuvieron cinéticas de saturación sigmoidales a este pH (figura 3). Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos tras el ajuste individual de los datos experimentales de cada una de las concentraciones de las especies fijas variables a la ecuación de Hill (ecuación (18) en Material y Métodos) dio como resultado valores de V_{max} que son independientes de la concentración del sustrato fijo variable al que se determinaron (tablas 5 y 6). Este resultado sugiere un mecanismo cinético en el que el sitio activo de la enzima no es capaz de unir a las especies libres, sino solamente al complejo PEP-Mg (mecanismo 1, descrito en Antecedentes). Sin embargo, la ecuación de velocidad correspondiente a este mecanismo (ecuación (4)) predice no sólo que los valores de V_{max} deben ser iguales

a cualquier concentración del otro sustrato, sino que además los valores de Km aparente también deben serlo cuando se comparan las cinéticas de saturación de cualquiera de los sustratos a concentraciones iguales del otro sustrato mantenido fijo. Por ejemplo, el valor de Km aparente o $S_{0.5}$ encontrado para PEP libre a 0.25 mM Mg^{2+} libre debería ser el mismo que el encontrado para Mg^{2+} libre a 0.25 mM de PEP libre. Los datos de las tablas 5 y 6 muestran que este último requisito no se cumple. Así, si bien los valores de V_{max} son muy parecidos cuando se comparan las cinéticas de saturación por PEP libre con las de saturación por Mg libre (8.70 y 9.16 U/mg proteína, respectivamente), los valores de $S_{0.5}$ (PEP) son siempre inferiores a los de $S_{0.5}$ (Mg^{2+}). Tampoco el número de Hill es igual en los dos casos, como debería ser, siendo mayor cuando PEP libre es el sustrato variable.

Sin embargo, la cooperatividad homotrópica positiva, observada a este pH en la unión tanto de PEP libre como de Mg^{2+} libre, dificulta el análisis a fondo de este mecanismo cinético.

Esto nos indica que el mecanismo cinético debe ser más complejo que el simple mecanismo anteriormente mencionado.

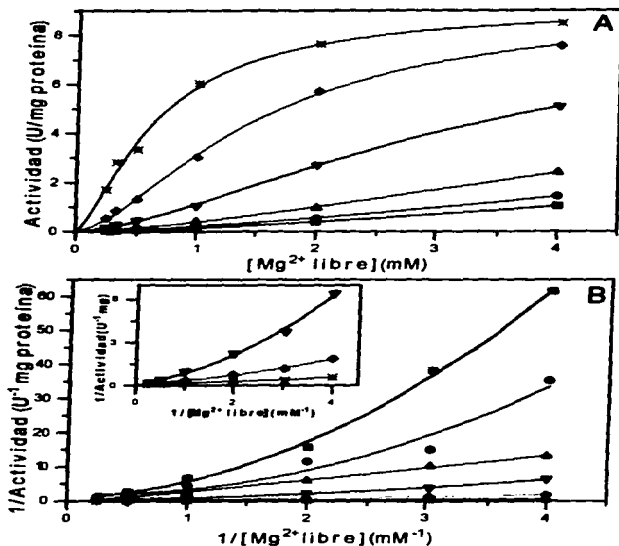


Figura 3

- A) Patrón de velocidad inicial a pH 7.3 de PEPC nativa con Mg²⁺ libre como sustrato variable y PEP libre como fijo variable a las siguientes concentraciones: (■) 0.25, (●) 0.33, (○) 0.5, (▲) 1, (◆) 2 y (◊) 4 mM. Los puntos son los datos experimentales del ajuste individual de los datos en cada una de ellas a la ecuación (18).
- B) Dobles recíprocos de los datos del panel A. Inseto: Ampliación de las 3 últimas líneas de la figura principal.

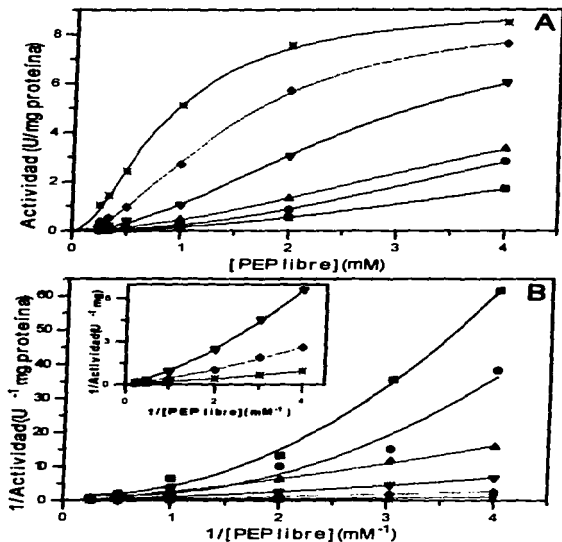


Figura 4

- A) Patrón de velocidad inicial a pH 7.3 de PEPC nativa con PEP libre como sustrato variable y Mg²⁺- libre como fijo variable a las siguientes concentraciones: (■) 0.25, (●) 0.33, (▲) 0.5, (◆) 1, (▼) 2 y (+) 4 mM. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del ajuste individual de los datos en cada una de ellas a la ecuación (18).
- B) Dobles recíprocos de los datos del panel A. Inseto: Ampliación de las 3 últimas líneas de la figura principal

Tabla 5

Parámetros cinéticos aparentes de PEPC nativa con PEP libre como sustrato variable a diferentes concentraciones de Mg^{2+} libre, determinados a pH 7.3. Para la obtención de estos valores aparentes se ajustaron los datos experimentales a la ecuación (18).

$[Mg^{2+}]$ (mM)	V_{max} (U/mg)	$S_{0.5}$ (PEP) (mM)	n
0.25	8.94	8.70 ± 0.18	1.85 ± 0.04
0.33	8.94	5.83 ± 0.11	2.06 ± 0.06
0.5	8.94	5.39 ± 0.05	1.75 ± 0.02
1	8.94	2.78 ± 0.03	1.95 ± 0.05
2	8.94	1.47 ± 0.07	1.93 ± 0.10
4	8.94	0.86 ± 0.03	1.76 ± 0.08

Tabla 6

Parámetros cinéticos aparentes de PEPC nativa con Mg^{2+} libre como sustrato variable a diferentes concentraciones de PEP libre, determinados a pH 7.3. Para la obtención de estos valores aparentes se ajustaron los datos experimentales a la ecuación (18).

[PEP] (mM)	V_{max} (U/mg)	$S_{0.5}$ (Mg^{2+}) (mM)	n
0.25	9.16	15.69 ± 0.43	1.50 ± 0.02
0.33	9.16	12.01 ± 0.59	1.53 ± 0.05
0.5	9.16	7.91 ± 0.23	1.52 ± 0.04
1	9.16	3.46 ± 0.03	1.59 ± 0.03
2	9.16	1.50 ± 0.10	1.60 ± 0.08
4	9.16	0.65 ± 0.08	1.44 ± 0.19

Cinética de saturación de la PEPC nativa por PEP y Mg^{2+} libres a pH 8.3

Las cinéticas de saturación por Mg^{2+} libre obtenidas a este pH fueron hiperbólicas como se muestra en la figura 5A y por consiguiente se obtuvieron líneas rectas en la gráfica de dobles recíprocos (figura 5B). Los valores de los parámetros cinéticos estimados tras el ajuste de los datos experimentales a la ecuación (17) se muestran en la tabla 7. El valor de la V_{max} estimado es independiente de la concentración del sustrato fijo variable por lo que al igual que ocurre a pH 7.3, el patrón de velocidad inicial es intersectante en el eje de las ordenadas. La linealidad de las gráficas de los dobles recíprocos permitió hacer un análisis de la variación de las pendientes en función del sustrato fijo variable. El regráfico de las pendientes de las gráficas de dobles recíprocos, es una línea recta que pasa por el origen (insertos de la figura 5B).

Por otra parte, se observaron gráficas sigmoidales en las cinéticas de saturación por PEP libre a diferentes concentraciones fijas de Mg^{2+} libre, sigmoicidad que iba incrementándose a medida que la concentración de Mg^{2+} libre aumentaba. También, semejante a lo encontrado a pH 7.3, los valores aparentes de $S_{0.5 (PEP)}$ son menores que los valores aparentes de $Km_{(Mg^{2+})}$, al menos a las concentraciones bajas del sustrato fijo variable.

Estos resultados muestran un mecanismo cinético complejo, que no es ninguno de los tres descritos en el apartado de Teoría Cinética en Antecedentes. Se intentó entonces hacer un ajuste global de estos datos a la ecuación de velocidad inicial correspondiente al mecanismo 1 en el que además existe activación por PEP libre (ecuación (14)). El ajuste fue muy bueno, cuando se consideraba que la unión de PEP libre al sitio alostérico sólo afectaba la unión del sustrato PEP-Mg al sitio activo y no el paso catalítico. Los valores de las constantes cinéticas encontrados con este ajuste fueron: $V_{max} = 9.51$ U/mg proteína, $Km_{(PEP-Mg)} = 0.416$ mM, $Ka_{(PEP)} = 1.38$ mM, $Km_{(PEP-Mg) \text{ límite}} = 0.132$ mM y $Ka_{(PEP) \text{ límite}} = 0.44$ mM.

En un mecanismo de equilibrio rápido como éste, los valores límite de $K_{m(\text{PEP-Mg})}$ y $K_{a(\text{PEP})}$ definen la afinidad del sitio activo por PEP-Mg cuando el sitio alostérico está saturado por PEP libre, o la afinidad del sitio alostérico por PEP libre cuando el sitio activo está saturado por PEP-Mg, respectivamente.

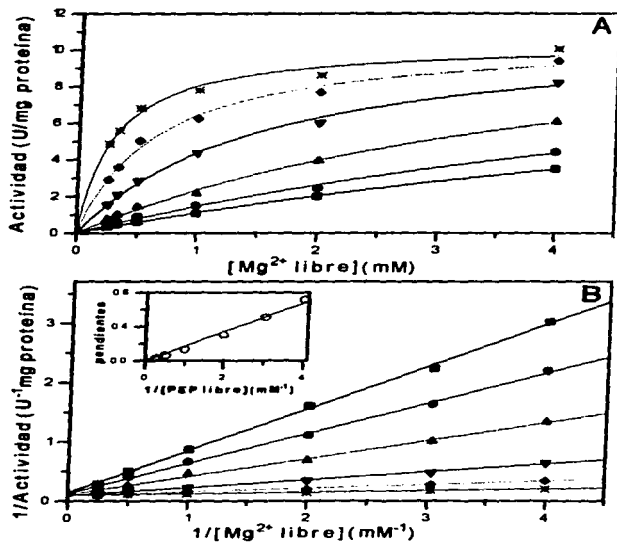


Figura 5

- A) Patrón de velocidad inicial a pH 8.3 de PEPC nativa con Mg^{2+} libre como sustrato variable y PEP libre a las siguientes concentraciones: (■) 0.25, (●) 0.33, (▲) 0.5, (●) 1, (◆) 2 y (◀) 4 mM. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del ajuste individual de los datos en cada una de ellas a la ecuación (17).
- B) Dobles recíprocos de los datos del panel A. Inserto: regráfico de las pendientes de las líneas de la figura principal versus el inverso de la concentración del sustrato fijo variable. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del ajuste global de los datos a la ecuación (14).

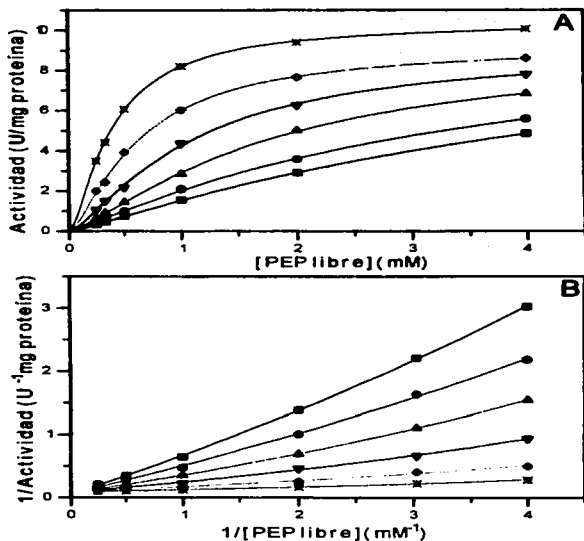


Figura 6

- A)** Patrón de velocidad inicial a pH 8.3 de PEP nativa con PEP libre como sustrato variable y Mg^{2+} libre como fijo variable a las siguientes concentraciones: (■) 0.25, (●) 0.33, (◐) 0.5, (◑) 1, (◒) 2 y (◓) 4 mM. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del ajuste individual de los datos en cada una de ellas a la ecuación (18).
- B)** Dobles recíprocos de los datos del panel A. Inserto: gráfico de las pendientes de las líneas de la figura principal versus el inverso de la concentración del sustrato fijo variable. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del ajuste global de los datos a la ecuación (14).

Tabla 7

Parámetros cinéticos aparentes de PEPC nativa con Mg^{2+} libre como sustrato variable a diferentes concentraciones de PEP libre, determinados a pH 8.3. Para la obtención de estos valores aparentes se ajustaron los datos experimentales a la ecuación (17).

[PEP] (mM)	V_{max} (U/mg)	$Km_{(Mg^{2+})}$ (mM)
0.25	10.70	8.43 ± 0.14
0.33	10.70	6.02 ± 0.21
0.5	10.70	3.34 ± 0.13
1	10.70	1.41 ± 0.05
2	10.70	0.65 ± 0.03
4	10.70	0.31 ± 0.02

Tabla 8

Parámetros cinéticos aparentes de PEPC nativa con PEP libre como sustrato variable a diferentes concentraciones de Mg^{2+} libre, determinados a pH 8.3. Para la obtención de estos valores se ajustaron los datos experimentales a la ecuación (18).

[Mg^{2+}] (mM)	V_{max} (U/mg)	$S_{0.5(PEP)}$ (mM)	n
0.25	10.18 ± 0.52	4.33 ± 0.35	1.18 ± 0.02
0.33	9.74 ± 0.81	3.12 ± 0.45	1.17 ± 0.05
0.5	9.05 ± 0.31	1.73 ± 0.10	1.35 ± 0.04
1	9.06 ± 0.31	1.08 ± 0.07	1.38 ± 0.07
2	9.21 ± 0.22	0.63 ± 0.03	1.42 ± 0.07
4	10.38 ± 0.08	0.40 ± 0.00	1.44 ± 0.04

Cinética de saturación de la PEPC modificada y reducida por Mg^{2+} libre y por PEP libre a pH 7.3

A diferencia de la enzima nativa, la enzima modificada con PLP muestra a pH 7.3 una cinética de saturación hiperbólica, para ambas especies libres (figuras 7A y 8A), lo que permitió encontrar un patrón de velocidad inicial intersectante en el eje de las ordenadas para ambos sustratos (figuras 7B y 8B). Los regráficos de las pendientes de las líneas de las gráficas de dobles recíprocos versus el inverso de la concentración del sustrato fijo variable son lineales y pasan por el origen (insertos de las figuras 7 y 8). Los parámetros cinéticos aparentes, estimados a partir de los ajustes de los datos experimentales de velocidad inicial a las ecuaciones correspondientes, se incluyen en las tablas 9 y 10. Como puede verse, tanto los valores de V_{max} , como los de K_m aparentes son en este caso parecidos para las dos muestras. Estos resultados sugieren que a este pH la enzima modificada con PLP une exclusivamente al complejo PEP-Mg y no a las especies libres, al menos en el rango de concentración estudiado. Tampoco se observó activación por PEP libre.

A partir de los datos obtenidos, y considerando un mecanismo de equilibrio rápido en el que el sustrato de la reacción es el complejo PEP-Mg (esquema 1), estimamos que la enzima modificada con PLP presenta a pH 7.3 un valor de V_{max} de 1.09 U/mg proteína y de K_m (PEP-Mg) de 0.61 mM. Estos valores se obtuvieron por un ajuste global de los datos a la ecuación (1).

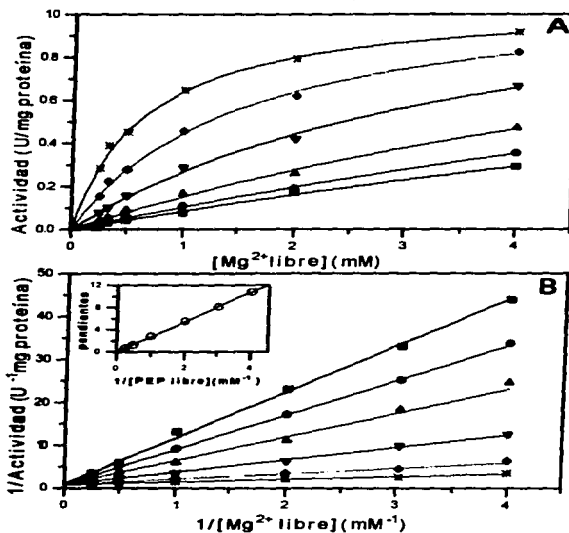


Figura 7

- A) Patrón de velocidad inicial a pH 7.3 de PEP modificada y reducida con Mg^{2+} libre como sustrato variable y PEP libre a las siguientes concentraciones: (■) 0.25, (●) 0.33, (◐) 0.5, (◆) 1, (◑) 2 y (◔) 4 mM. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del ajuste individual de los datos en cada una de ellas a la ecuación (17).
- B) Dobles recíprocos de los datos del panel A. Inserto: regráfico de las pendientes de las líneas de la figura principal versus el inverso de la concentración del sustrato fijo variable. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del ajuste global de los datos a la ecuación (4).

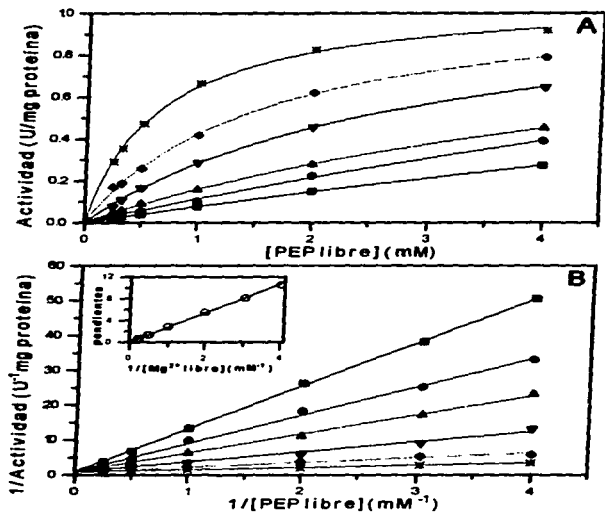


Figura 8

- A) Patrón de velocidad inicial a pH 7.3 de PEPC modificada y reducida con PEP libre como sustrato variable y Mg^{2+} libre como fijo variable a las siguientes concentraciones: (■) 0.25, (●) 0.33, (○) 0.5, (◆) 2 y (△) 4 mM. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del ajuste individual de los datos en cada una de ellas a la ecuación (17).
- B) Dobles recíprocos de los datos del panel A. Inseto: regráfico de las pendientes de las líneas de la figura principal versus el inverso de la concentración del sustrato fijo variable. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del ajuste global de los datos a la ecuación (1).

Tabla 9

Parámetros cinéticos aparentes de PEPC modificada y reducida con Mg^{2+} libre como sustrato variable a diferentes concentraciones de PEP libre, determinados a pH 7.3. Para la obtención de estos valores aparentes se ajustaron los datos experimentales a la ecuación (17).

[PEP] (mM)	V_{max} (U/mg)	$Km_{(PEP)}$ (mM)
0.25	1.15	12.07 ± 0.33
0.33	1.15	9.46 ± 0.23
0.5	1.15	6.18 ± 0.22
1	1.15	3.19 ± 0.11
2	1.15	1.60 ± 0.05
4	1.15	0.80 ± 0.04

Tabla 10

Parámetros cinéticos aparentes de PEPC modificada y reducida con PEP libre como sustrato variable a diferentes concentraciones de Mg^{2+} libre, determinados a pH 7.3. Para la obtención de estos valores aparentes se ajustaron los datos experimentales a la ecuación (17).

[Mg^{2+}] (mM)	V_{max} (U/mg)	$Km_{(PEP)}$
0.25	1.12	12.79 ± 0.28
0.33	1.12	7.96 ± 0.32
0.5	1.12	5.97 ± 0.04
1	1.12	2.92 ± 0.03
2	1.12	1.63 ± 0.03
4	1.12	0.71 ± 0.02

Cinética de saturación por Mg^{2+} libre y por PEP libre de la PEPC modificada y reducida a pH 8.3

A pH 8.3, los patrones de velocidad inicial obtenidos también son lineales e intersectantes, pero en este caso se cruzan a la izquierda del eje de ordenadas (figuras 9 y 10), tanto para Mg^{2+} libre como para PEP libre. Los regráficos de las pendientes frente al inverso de la concentración del sustrato fijo variable correspondiente siguen siendo lineales pero ya no pasan por el origen (insertos de las figuras 9 y 10). Así mismo, los regráficos de los intersechos frente al inverso de la concentración del sustrato fijo variable son también lineales. Los valores de los parámetros cinéticos aparentes correspondientes a cada uno de los patrones de velocidad inicial se incluyen en las tablas 11 y 12.

Estos resultados son consistentes con un mecanismo de equilibrio rápido en que la enzima modificada con PLP reconoce tanto al complejo PEP-Mg como a las especies libres, a diferencia de lo que ocurre a pH 7.3. En este caso tampoco existe activación por PEP libre. Podemos calcular las constantes de disociación (K_d) de las especies libres de los complejos binarios que forman con la enzima libre o de los complejos ternarios que forman con la enzima y el otro sustrato, ya que estas constantes son las K_m límites estimadas a concentración cero o infinita del sustrato fijo variable, respectivamente. Por tanto, la constante de disociación del metal del complejo E-Metal puede determinarse en una gráfica de dobles recíprocos de $1/v$ versus $1/[Mg^{2+}]$ a partir de la abscisa del punto de intersección de las líneas ($-1/K_{m(Mg^{2+})}$), lo que es equivalente a extrapolar la K_m del ión metálico libre a una concentración de PEP igual a cero. Igualmente, extrapolar la K_m del ión metálico libre a una concentración infinita de PEP nos da la constante de disociación del metal del complejo E-PEP-Mg. El mismo procedimiento puede aplicarse para

calcular las constantes de disociación de PEP libre de los complejos E-PEP y E-PEP-Mg.

Alternativamente, los valores para ambas constantes de disociación y para V_{max} pueden en forma práctica obtenerse a partir de los regráficos de intersección o pendientes frente al inverso de la concentración del sustrato fijo variable, como se muestra en los intersección de las figuras 9 y 10, o bien por medio de un ajuste global de los datos a la ecuación (6). Los valores obtenidos mediante este ajuste se incluyen en la tabla 13.

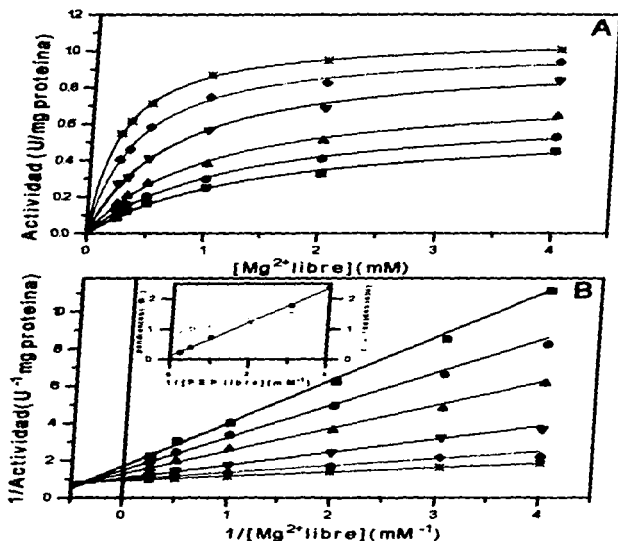


Figura 9

- A) Patrón de velocidad inicial a pH 8.3 de PEP modificada y reducida con Mg^{2+} libre como sustrato variable y PEP libre como fijo variable a las siguientes concentraciones: (■) 0.25, (○) 0.33, (●) 0.5, (○) 1, (●) 2 y (●) 4 mM. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del ajuste individual de los datos en cada una de ellas a la ecuación (17).
- B) Dobles recíprocos de los datos del panel A. Inserto: regráfico de las pendientes de las líneas de la figura principal versus el inverso de la concentración del sustrato fijo variable así como de los interceptos de la misma. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del ajuste global de los datos a la ecuación (6).

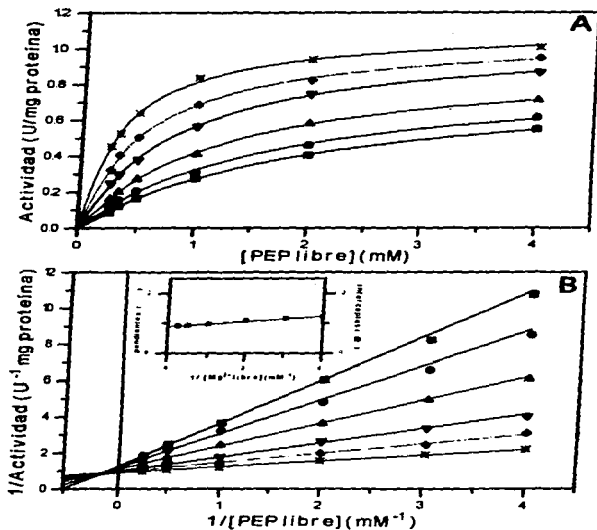


Figura 10

- A) Patrón de velocidad inicial a pH 8.3 de PEPC modificada y reducida con PEP libre como sustrato variable y Mg^{2+} libre como fijo variable a las siguientes concentraciones: (■) 0.25, (●) 0.33, (▲) 0.5, (◆) 1, (○) 2 y (△) 4 mM. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del ajuste individual de los datos en cada una de ellas a la ecuación (17).
- B) Dobles recíprocos de los datos del panel A. Inserto: regráfico de las pendientes de las líneas de la figura principal versus el inverso de la concentración del sustrato fijo variable así como de los interceptos de la misma. Los puntos son los datos experimentales, las líneas son las teóricas resultantes del ajuste global de los datos a la ecuación (6).

Tabla 11

Parámetros cinéticos aparentes de PEPC modificada y reducida con Mg^{2+} libre como sustrato variable a diferentes concentraciones de PEP libre, determinados a pH 8.3. Para la obtención de estos valores aparentes se ajustaron los datos experimentales a la ecuación (17).

[PEP] (mM)	V_{max} (U/mg)	$K_m(Mg^{2+})$ (mM)
0.25	0.58 ± 0.03	1.39 ± 0.17
0.33	0.67 ± 0.02	1.19 ± 0.09
0.5	0.77 ± 0.02	0.96 ± 0.08
1	0.95 ± 0.02	0.67 ± 0.05
2	1.01 ± 0.01	0.37 ± 0.02
4	1.06 ± 0.00	0.24 ± 0.00

Tabla 12

Parámetros cinéticos aparentes de PEPC modificada y reducida con PEP libre como sustrato variable a diferentes concentraciones de Mg^{2+} libre, determinadas a pH 8.3. Para la obtención de estos valores aparentes se ajustaron los datos experimentales a la ecuación (17).

[Mg^{2+}] (mM)	V_{max} (U/mg)	$K_m(PEP)$ (mM)
0.25	1.10	2.73 ± 0.31
0.33	1.10	2.68 ± 0.18
0.5	1.10	1.73 ± 0.10
1	1.10	0.93 ± 0.02
2	1.10	0.59 ± 0.01
4	1.10	0.34 ± 0.00

Tabla 13

Constantes de disociación, K_d , para PEP libre, Mg^{2+} libre y PEP-Mg de sus complejos con la enzima PEPC modificada con PLP, determinadas a pH 8.3. Estos valores se obtuvieron por ajuste de los datos experimentales a la ecuación (6).

Sustrato	Complejo	K_d (mM)
PEP	E-PEP	5.473
PEP	E-PEP-Mg	0.230
Mg^{2+}	E- Mg^{2+}	2.571
Mg^{2+}	E-PEP-Mg	0.098
PEP-Mg	E-PEP-Mg	0.106

DISCUSIÓN

Mecanismo cinético de la enzima nativa

El primer objetivo del trabajo era determinar si el sitio activo reconoce a las especies libres y, en caso afirmativo, la afinidad relativa de éstas y del complejo PEP-Mg y el orden en que se unen. Establecer de manera inequívoca este punto es importante para entender el funcionamiento de la enzima y su posible regulación por las especies libres.

Como se mencionó en los antecedentes, algunos autores habían propuesto que el verdadero sustrato de la reacción era el complejo PEP-Mg (Wedding y col., 1988; Meyer y col., 1990; Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990), mientras que otros proponían la unión de las especies libres siendo Mg^{2+} el primero en combinarse con la enzima (Janc y col., 1992a).

Sin embargo, ninguno de los estudios mencionados se habían realizado bajo condiciones que permitieran aceptar sus conclusiones sin lugar a dudas. Así, en el trabajo reportado por Wedding y col., 1988, no se controló la concentración de las especies libres, por lo que es difícil establecer si éstas afectarán la velocidad de la reacción. El trabajo de Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990, sí se realizó a concentraciones fijas de PEP libre usando como sustrato PEP-Mg, pero al no establecerse el mecanismo cinético queda la duda de si la activación por PEP libre observada en este trabajo cuando se usó como sustrato PEP-Mg, se debía a la unión al sitio alostérico o a un mecanismo ordenado en el que PEP libre se unía en segundo lugar, es decir al complejo E-Mg²⁺.

Finalmente Janc y col., 1992a, usaron PEP y Mg^{2+} total como sustratos de la reacción, por lo que no podían diferenciar el efecto sobre la velocidad de la reacción de las especies libres del complejo sustrato-metal. Ellos encontraron un patrón intersectante en el eje de ordenadas cuando graficaron $1/v$ versus $1/PEP$, lo que los llevó a concluir que la enzima sigue un mecanismo secuencial ordenado como Mg^{2+} como primer ligando. Sin embargo, para poder concluir a ciencia cierta que éste es el mecanismo cinético seguido por PEPC, los autores del trabajo citado deberían haber determinado el patrón de velocidad inicial con Mg^{2+} como sustrato variable a concentraciones fijas de PEP, cosa que no hicieron. De ser cierto el mecanismo propuesto por estos autores, cuando se realicen cinéticas de saturación por PEP-Mg se debería encontrar un patrón de inhibición competitiva por Mg^{2+} y de activación por PEP.

Existen datos en la literatura que muestran que Mg^{2+} es capaz de unirse a la enzima libre. Así Mg^{2+} protege frente a la inactivación por modificación química (Podestá y col., 1986; Jiao y col., 1990) y produce cambios en la fluorescencia intrínseca de la enzima (Podestá y col., 1986). Ambos resultados son indicativos de la interacción de Mg^{2+} con la enzima, aún cuando no puede concluirse si la unión es al sitio activo o a algún sitio alostérico. Igualmente algunos reportes indican que PEP puede también unirse a la forma libre de la enzima. Estos datos son de la misma naturaleza que los mecanismos para el Mg^{2+} : PEP protege frente a inactivación por modificación química (Podestá y col., 1986; Jiao y col., 1990), altera la fluorescencia intrínseca de la enzima (Podestá y col., 1986) y además induce agregación de dímeros en tetrameros (Uedan & Sugiyama, 1976; Hayakawa y col., 1981; Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1987). Por ello más que un mecanismo ordenado como el propuesto por Janc y col., 1992a, sería de esperarse un mecanismo de unión al azar de Mg^{2+} y PEP.

La solución a esta controversia y la respuesta inequívoca a la pregunta de cual es el mecanismo cinético de la enzima PEPC de hoja de maíz se dará sólo si se hacen estudios de velocidad inicial considerando a las especies libres como sustratos.

Los resultados de los estudios, aquí reportados, demuestran que tanto a pH 7.3 como a pH 8.3 las especies PEP libre y Mg^{2+} libre no se unen al sitio activo de la enzima, que reconoce sólo al complejo PEP-Mg. No se puede descartar que las especies libres puedan unirse a concentraciones superiores a las empleadas en nuestro trabajo. La concentración más alta usada fue de 4 mM, tanto para PEP libre como para Mg^{2+} libre. Se conoce que la concentración citoplasmática de Mg^{2+} libre es de alrededor de 0.44 mM (Yazaki y col., 1988), mientras que la de PEP libre se ha estimado en 0.1 mM (Outlaw & Kennedy, 1978). Puesto que en el caso de PEP libre las concentraciones determinadas son las totales intracelulares, es probable que la concentración de este metabolito en el citoplasma, es decir en el lugar donde ocurre la reacción catalizada por PEPC sea entre 10% veces superior (teniendo en cuenta que en una célula vegetal el citoplasma no es más del 5 al 10% de volumen celular). Aun así, la concentración citoplasmática de PEP libre estaría entre 0.27 mM, concentraciones superiores a las usadas por nosotros no serían fisiológicas y por ello podemos concluir que tal unión no ocurre *in vivo*. Además, los patrones de velocidad inicial obtenidos con la enzima nativa reflejan la activación alostérica por PEP libre, lo que es particularmente claro a pH 8.3, puesto que la ausencia de cooperatividad positiva a este pH permite plantear el mecanismo cinético en términos relativamente simples y obtener una ecuación de velocidad no muy compleja (mecanismo 4 y ecuación (14)). Los datos obtenidos se ajustan perfectamente a esta ecuación tanto cuando el Mg^{2+} libre es el sustrato variable como cuando lo es PEP libre. La constante de disociación estimada para PEP libre está dentro del rango de concentración que puede suponerse fisiológico, como se discutió.

Resulta interesante destacar que la participación del PEP libre como activador alostérico y como parte del sustrato de la reacción produce una cinética de aparente cooperatividad positiva cuando se considera a éste como sustrato variable, aun cuando a este pH no existe la interacción entre los sitios activos característica de una verdadera cooperatividad de unión. A pesar de que este análisis no pudo hacerse a pH 7.3, que es el pH al que se encuentra el citoplasma de las células vegetales (Davies, 1986), los resultados obtenidos son consistentes con el mismo mecanismo que el demostrado a pH 8.3. Así, la mayor cooperatividad aparente observada cuando el PEP libre es el sustrato variable que cuando lo es el Mg^{2+} libre es consistente con la suma de los dos tipos de cooperatividad: la cinética, debida a la activación alostérica por el PEP libre, y la de unión que la enzima exhibe a este pH y que es también observada en la cinética de saturación por el Mg^{2+} libre. Igualmente, las diferencias en los valores aparentes de $S_{0.5}$ obtenidos para las dos especies libres, son del mismo tipo que los observados a pH 8.3 y justificables debido a la activación por PEP libre. Estudios previos en nuestro laboratorio ya habían concluido que PEP libre podría estar uniéndose al sitio alostérico de Gluc-6-P (Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990), lo que además es congruente con los hallazgos de que ciertos análogos del PEP son activadores de la PEPC (Jenkins y col., 1986; Peliska & O'Leary, 1989; Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990, Castellanos-Martínez y col., 1997), produciendo una activación no aditiva con Gluc-6-P (Peliska & O'Leary, 1989; Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990; Castellanos-Martínez y col., 1997).

Mecanismo cinético de la enzima modificada con PLP

La modificación irreversible de la enzima PEPC con PLP en presencia de concentraciones saturantes de sustrato permitió insensibilizarla en gran medida al activador alostérico Gluc-6-P, si bien se perdió una cantidad considerable de actividad. Estas pérdidas de actividad pueden deberse a una protección insuficiente del sitio activo por los sustratos, probablemente por consumo de éstos durante el transcurso de la incubación. Por otra parte, el no lograr la total insensibilización de la enzima al activador alostérico probablemente es la consecuencia de la protección que podría ejercer PEP sobre el sitio alostérico, ya que como se demuestra con los resultados de este trabajo, el sustrato se une al sitio alostérico de Gluc-6-P. A pesar de ello, la preparación de la enzima modificada obtenida nos ha permitido hacer estudios cinéticos comparativos con la enzima no modificada que han arrojado resultados bastante claros.

La enzima modificada con PLP presenta dos características que simplifican el análisis del mecanismo cinético: primero, no tiene cooperatividad positiva a ningún valor de pH y segundo el sitio alostérico para Gluc-6-P está bloqueado en un elevado porcentaje de sus subunidades.

Los datos obtenidos a pH 7.3 con esta enzima modificada nos han permitido confirmar que el complejo PEP-Mg es el verdadero sustrato de la reacción y que PEP libre activa la reacción al unirse al sitio alostérico para Gluc-6-P, ya que el bloqueo de este sitio no sólo insensibiliza a la enzima frente a Gluc-6-P sino que también elimina la activación por PEP libre.

A pH 8.3, sigue sin observarse la activación por PEP libre, pero ahora los patrones de velocidad claramente indican que hay unión tanto de PEP-Mg como de las especies libres. La magnitud de las constantes de disociación estimadas para las especies libres de sus complejos binarios con la enzima libre es tal bajo estas

condiciones que podemos observar la unión de estas especies en el rango de concentración utilizado en nuestro estudio. Sin embargo, como puede observarse en la Tabla 13, estos valores de las constantes de disociación son 25 y 50 veces mayores del valor estimado de la constante de disociación del complejo.

Además se observa un fuerte sinergismo en la unión de ambas especies libres. La afinidad del sitio activo por cualquiera de las dos especies libres se incrementa unas 25 veces cuando ya está unida a la enzima la otra especie libre, lo que es consistente con la elevada afinidad por el complejo.

Cabe hacerse ahora la pregunta de por qué el sitio activo de la enzima modificada si une a las especies libres a pH 8.3 mientras que la enzima nativa no lo hace. Es bien conocido que a pH 8.3 la afinidad de la isoforma C₄ de PEPc por sus sustratos es mayor que a pH 7.3. Esto se observa también en nuestros resultados ya sea considerando los valores aparentes de $S_{0.5}$ y K_m en el caso de la enzima nativa o los valores reales de $K_{m(Mg-PEP)}$ encontrados en el caso de la enzima modificada.

Por otra parte, la unión de cualquier ligando al sitio alostérico de Gluc-6-P tiene como principales consecuencias un incremento en la afinidad del sitio activo por los sustratos a cualquier pH y la pérdida de cooperatividad positiva a pH 7.3 (Coombs y col., 1973; Marés & Leblová, 1980; Stiborová & Leblová, 1985). Por ello pensamos que la modificación con PLP en cierta medida simula la unión de un ligando al sitio alostérico y produce ambos efectos, si bien en menor grado que un ligando natural probablemente porque el PLP no cumple con los requerimientos estructurales de un verdadero ligando de este sitio alostérico.

Los resultados con la enzima modificada nos hacen suponer que en presencia del activador alostérico Gluc-6-P el sitio activo podría cambiar de reconocer solamente al complejo PEP-Mg a reconocer también a las especies libres.

Queda por delante determinar el mecanismo cinético de la enzima en presencia de sus conocidos efectores alostéricos: los activadores Gluc-6-P y glicina y el inhibidor malato.

Implicación fisiológica del mecanismo cinético de PEPC

Como se indicó en Antecedentes la enzima PEPC de hoja de maíz, forma parte de la llamada ruta C_4 que está involucrada en la asimilación fotosintética del CO_2 atmosférico. El funcionamiento de esta ruta, donde se produce la incorporación del CO_2 a compuestos orgánicos en forma transitoria, debe estar perfectamente coordinado al funcionamiento del ciclo de Calvin, donde el CO_2 se incorpora a un compuesto orgánico en forma definitiva y ambos controlados por la luz. Efectivamente, se sabe que las enzimas clave del ciclo de Calvin sufren inactivación por la noche que se revierte al llegar el día (Lehninger, 1972).

Igualmente, varias de las enzimas que componen la ruta C_4 son reguladas por la luz. Así, la malato deshidrogenasa dependiente de NADP (E.C.1.1.1.37) es inactivada en cuanto comienza el período de obscuridad por oxidación de dos grupos -SH vecinales que forman un puente disulfuro (Lehninger, 1972). Al llegar al período de luz, la reducción de este puente disulfuro activa de nuevo a la enzima. La piruvato ortofosfato dicinasa, enzima que cataliza la síntesis de PEP a partir de piruvato, es inactivada también por modificación covalente, que en su caso involucra fosforilación (Lehninger, 1972). Se conoce que PEPC también es regulada por fosforilación-defosforilación, pero esta modificación covalente no conlleva a inactivación de la enzima, sino que solamente regula su sensibilidad a los efectores alostéricos (Jiao & Chollet, 1988; Duff & Chollet, 1995).

Los niveles citoplasmáticos de Mg^{2+} libre se mantienen constantes, y hasta el momento no ha sido reportado que cambien durante el ciclo día-noche. Por el contrario, la producción de PEP libre se ve muy afectada por las condiciones de iluminación, ya que como se mencionó anteriormente este metabolito sólo se produce vía ruta C_4 cuando la planta está iluminada. Por ello la transición noche-día conllevará un incremento en la disponibilidad de PEP libre y por consiguiente de PEP-Mg, el sustrato de la enzima PEPC. Pero los niveles del complejo no pueden incrementarse mucho dada la limitación que impone la disponibilidad de Mg^{2+} libre. La enzima parece haber superado esta limitación al poseer un sitio alostérico que al unir a PEP libre incrementa notablemente la afinidad del sitio activo para PEP-Mg (unas 4 veces) lo que lógicamente conduce a un incremento notable de velocidad de reacción. Si el sitio activo uniera a las especies libres al azar, un incremento en los niveles de PEP libre tendría efectos opuestos sobre la velocidad de la reacción catalizada: por un lado provocaría un aumento de esta velocidad al incrementar los niveles de estado estacionario de la forma productiva E.Mg.PEP, pero por otro competiría con el complejo PEP-Mg por la forma de enzima libre produciendo una inhibición. Idénticas consecuencias tendría un incremento de PEP libre sobre la velocidad de reacción catalizada por una enzima que uniera a las especies libres en forma ordenada y el primer sustrato de la reacción fuese PEP. La última posibilidad que nos queda por considerar es el que el sitio activo uniera a las especies libres en forma ordenada, pero PEP lo hiciera después de que se hubiera unido el Mg^{2+} . En este último caso, la velocidad de la reacción se vería limitada por los niveles del complejo binario E-Mg, que no cambian a consecuencia de la iluminación puesto que no hay cambios en los niveles de Mg libre ni de enzima. La única forma de superar esta limitación es que la afinidad de la PEPC por Mg^{2+} libre fuese tan elevada que el metal saturara a la enzima a las bajas concentraciones intracelulares a las que se encuentra.

Esto a su vez le crearía a la célula de una planta C_4 un problema quizás mayor y es el originado por la elevada concentración de la enzima PEPC que llega a constituir el 15% del total de la proteína soluble. De esta forma PEPC atraparía una considerable cantidad del Mg total disponible y podrían ser afectados metabolitos vitales para la célula.

En base a esto, podemos concluir que el mecanismo cinético que presenta la enzima PEPC de hoja de maíz parece ser el óptimo para lograr una regulación de esta enzima por los niveles citoplasmáticos de PEP libre y a través de éstos por el ciclo noche-día.

CONCLUSIONES

Los resultados descritos en este trabajo nos permiten concluir:

- 1. En ausencia de efectores alostéricos, el complejo PEP-Mg es el verdadero sustrato de la reacción catalizada por la enzima PEPC de hoja de maíz, tanto a pH 7.3 como a pH 8.3.**
- 2. La afinidad del sitio activo por las especies libres PEP y Mg^{2+} es tan baja que su unión no es observable a concentraciones fisiológicas, de éstas se postula que sólo en presencia de activadores que aumenten grandemente esta afinidad podría observarse la unión, que sería totalmente al azar.**
- 3. El PEP libre es un activador alostérico de la reacción a ambos valores de pH.**
- 4. El sitio alostérico al que se une PEP libre es el mismo que une a Gluc-6-P.**

BIBLIOGRAFÍA

- ▣ Andreo, C.S., González, D.H., Iglesias, A.A. (1987) Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase. Structure and regulation. *FEBS Lett.* **213**, 1-8.
- ▣ Bandarian, V., Poehner, W.J. & Grover, S.D. (1992) Metabolite activation of crassulacean acid metabolism and C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **100**, 1411-1416.
- ▣ Bandurski, R.S. (1955) Further studies on the enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphoenolpyruvate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* **217**, 137-150.
- ▣ Blackburn, M.N. & Schachman, H.K. (1976) Alteration of allosteric properties of aspartate transcarbamoylase by pyridoxylation of catalytic and regulatory subunits. *Biochemistry* **15**, 1316-1323.
- ▣ 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.
- ▣ Brulfert, J., Guclu, S., Taybi, T. & Pierre, J.N. (1993) Enzymatic responses to water-stress in detached leaves of the CAM plant *Kalanchoe blossfeldiana* poelln. *Plant Physiol. Biochem.* **31**, 491-497.
- ▣ Carter, P.J., Nimmo, H.G., Fewson, C.A. & Wilkins, M.B. (1991) Circadian rhythms in the activity of a plant protein kinase. *EMBO J.* **10**, 2063-2068.

- ▣ Castellanos-Martínez A., Mújica-Jiménez C. & Muñoz-Clares, R.A. (1997) Kinetics of the activation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by the phosphoenolpyruvate analogue phosphomycin. *Manuscrito en publicación.*
- ▣ Cleland, W.W. (1970) *The Enzymes*. Third edition. Vol 2, p.p. 1-65.
- ▣ Coombs, J., Baldry, C.W. & Bucke, C. (1973) The C₄ pathway in *Pennisetum purpureum*. L. The allosteric nature of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Planta* **110**, 95-107.
- ▣ Cooper, T.G. & Wood, H.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.
- ▣ Chollet R., Vidal J., O'Leary M. H. (1996) Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 273-298.
- ▣ Davies, D.D. (1986) The fine control of cytosolic pH. *Physiol. Plant.* **67**, 702-706.
- ▣ Deroche, M.E. & Carrayol, E. (1988) Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: A review. *Physiol. Plant.* **74**, 775-782.
- ▣ Doncaster H.D., & Leegood R.C. (1987) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity in maize leaves. *Plant Physiol.* **84**, 82-87.
- ▣ Duff, S.M.G., Andreo, C.S., Pacquit, V., Lepiniec, L., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, Gadal, P. & Chollet, R. (1995) Kinetic analysis of the non-phosphorylated, *in vitro* phosphorylated, and phosphorylation-site-mutant (Asp8) forms of intact

- recombinant C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum. *Eur. J. Biochem.* **228**, 92-95.
- ▣ Duff, S.M.G. & Chollet, R. (1995) *In vivo* regulation of wheat-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. *Plant Physiol.* **107**, 775-782.
- ▣ Gavallas, N.A., Manetas, Y. (1980) Calcium inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase: Possible physiological consequences for C₄-photosynthesis. *Z. Pflanzenphysiol.* **100**, 179-184.
- ▣ Gillinta, J. & Grover, S.D. (1995) Kinetic interactions of glycine with substrates and effectors of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Photosynth. Res.* **45**, 121-126.
- ▣ González, D.H., Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1984) On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity from maize leaves by l-malate. Effect of pH. *J. Plant Physiol.* **116**, 425-434.
- ▣ González, D.H., Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1987) Interaction of acetyl phosphate and carbamyl phosphate with plant phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **241**, 543-548.
- ▣ Guidici-Ortoni, M.T., Vidal, J., Le Maréchal, P., Thomas, Gadad, P. & Rémy, R. (1988) *In vivo* phosphorylation of sorghum leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochimie* **70**, 769-772.

- ④ Gupta, S.K., Ku, M.S.B., Lin, J-H., Zhang, D. & Edwards G.E. (1994) Light/dark modulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ and C₄ species. *Photosynth. Res.* **42**, 133-143.
- ④ Hatch, M.D. (1987) C₄ Photosynthesis: A unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* **895**, 81-106.
- ④ Hayakawa, S., Matsunaga, K., Sugiyama, T. (1981) Light induction of phosphoenolpyruvate carboxylase in etiolated maize leaf tissue. *Plant Physiol.* **67**, 133-138.
- ④ Huber, S.C. & Edwards, G. E. (1975) Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄ plants by malate and aspartate. *Can. J. Bot.* **53**, 1925-1933.
- ④ Huber, S.C., Sugiyama, T. & Akazawa, T. (1986) Light modulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **82**, 550-554.
- ④ Hudspeth R.L. & Grula J.W. (1989) Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isoenzyme involved in C₄ photosynthesis. *Plant Mol. Biol.* **12**, 579-589.
- ④ Iglesias, A.A., & Andreo, C.S. (1983) The presence of essential histidine residues in phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **749**, 9-17.
- ④ Iglesias, A. A. & Andreo, C.S. (1984) On the molecular mechanism of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activation by thiol compounds. *Plant Physiol.* **75**, 983-987.

- 10 Iglesias, A.A., & Andreo C.S. (1984) Inhibition of *Zea mays* phosphoenolpyruvate carboxylase by copper and cadmium ions. *Photosynthetica* **18**, 134-138.
- 10 Iglesias, A.A., González, D.H. & Andreo, C.S. (1984) Inactivation of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by modification with phenylglyoxal. *Biochim. Biophys. Acta* **788**, 41-47.
- 10 Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. & Sánchez, D.M. (1992) Phosphoenolpyruvate carboxylase malate and alcohol dehydrogenase activities in alfalfa (*Medicago sativa*) nodules under water stress. *Physiol. Plant* **84**, 61-66.
- 10 Israel, D.W. and Jackson, W.A. (1982) Ion balance, uptake, and transport processes in N_2 -fixing and nitrate- and urea- dependent soybean plants. *Plant Physiol.* **69**, 171-178.
- 10 Janc J.W., Cleland W.W., & O'Leary M.H. (1992a) Mechanistic studies of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays* utilizing formate as an alternate substrate for bicarbonate. *Biochemistry* **31**, 6441-6446.
- 10 Janc J.W., O'Leary M.H., Cleland W.W. (1992b) A kinetic investigation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*. *Biochemistry* **31**, 6421-6426.
- 10 Janc J.W., Urbauer J.L., O'Leary M.H. & Cleland W.W. (1992c) Mechanistic studies of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays* with (Z)- and (E)-3-fluorophosphoenolpyruvate as substrates. *Biochemistry* **31**, 6432-6440.
- 10 Jawali, N. (1990) The dimeric form of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize: physical and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **277**, 69-73.

- [1] Jenkins, C.L.D., Harris, R.L.N. & McFadden, H.G. (1986) Activation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by the non-physiological substrate analogue methyl-2-dihydroxyphosphinoylmethyl-2-propenoate. *Biochem. International* **12**, 619-625.
- [2] Jiao, J-A. & Chollet, R. (1988) Light/dark regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by *in vivo* phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **261**, 409-417.
- [3] Jiao, J-A. & Chollet, R. (1989) Regulatory seryl-phosphorylation of C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase by a soluble protein kinase from maize leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 526-535.
- [4] Jiao J-A., Podestá F.E., Chollet R., O'Leary M. & Andreo C.S. (1990) Isolation and sequence of an active-site peptide from maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase inactivated by pyridoxal 5'-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* **1041**, 291-295.
- [5] Jiao, J-A. & Chollet, R. (1991) Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C_4 and crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* **95**, 981-985.
- [6] Jiao, J-A., Echevarría, C., Vidal, J. & Chollet, R. (1991) Protein turnover as a component in the light/dark regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serin kinase activity in C_4 plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 2712-2715.
- [7] Kaiser E.T., Lawrence D.S., & Rokita S.E. (1985) The chemical modification of enzymatic specificity. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 565-595.

- ▣ Karabourniotis, G., Manetas, Y. & Gavalas, N.A. (1983) Photoregulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Salsola soda* L. and other C₄ plants. *Plant Physiol.* **73**, 735-739.
- ▣ King, B.J., Layzell, D.B. & Canvin, D.T. (1986) The role of dark carbon dioxide fixation in root nodules of soybean. *Plant Physiol.* **81**, 200-205.
- ▣ Knowles, J.R. (1989) The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 195-221.
- ▣ Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.
- ▣ Latzo, E. & Kelly, G.J. (1983) The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. *Physiol. Vég.* **21**, 805-815.
- ▣ Lepiniec, L., Vidal, J., Chollet, R., Gadat, P. & Cretin, C. (1994) Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution. *Plant Sci.* **99**, 111-124.
- ▣ Lehninger A.L. (1972) Bioquímica. Ediciones Omega. España. p.p. 483-528.
- ▣ Manh, C.T., Bismuth, E., Boutin, J.P., Provot, M. & Champigny, M.L. (1993) Metabolite effector of short-term nitrogen-dependent enhancement of phosphoenolpyruvate activity and decrease of net sucrose synthesis in wheat leaves. *Physiol. Plant* **89**, 460-466.
- ▣ Maralihalli, G.B. & Bhagwat, A.S. (1993) Modification of maize phosphoenolpyruvate carboxylase by Woodward's reagent. *J. Protein Chem.* **12**, 451-457.

- ④ Marés, J. & Leblová, S. (1980) Phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of maize, sorghum and millet. *Photosynthetica* **14**, 25-31.
- ④ Maxwell, C.A., Vance, C.P., Heichel, G. H. & Stade, S. (1984) CO₂ fixation in alfalfa and bird sfoot trefoil root nodules and partitioning of ¹⁴C to the plant. *Crop Sci.* **24**, 257-264.
- ④ McNaughton, L., MacIntosh, C., Fewson, C.A., Wilkins, M.B. & Nimmo, G.A. (1991) Illumination increases the phosphorylation state of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by causing an increase in the activity of a protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1093**, 189-195.
- ④ Meyer C.R., Rustin, P., Black, M.K. & Wedding R.T. The influence of pH on substrate form specificity of phosphoenolpyruvate carboxylase purified from *Crassula argentea*. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* **278**, 365-372.
- ④ Miller R.S., Mildvan, A.S., Chang, H.C., Easterday, R.L., Maruyama, H., Lane, M.D. (1968) The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. The binding of manganese and substrates by phosphoenolpyruvate carboxykinase and phosphoenolpyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **243**, 6030-6040.
- ④ Miziorko, H.M., Nowak, T., Mildvan, A.S. (1974) Spinach leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Purification, properties and kinetic studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 378-389.
- ④ Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J-P. (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**, 88-118.

- ▣ Nguyen, T.T., Ngam-Ek, A., Jenkins, J., and Grover, S.D. (1988) Metal ion interactions with phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea* and *Zea mays*. *Plant Physiol.* **88**, 104-107.
- ▣ Nimmo, G.A., Nimmo, H.G., Hamilton, I.D., Fewson, C.A. & Wilkins, M.B., (1986) Purification of the phosphorylated night form and dephosphorylated day form of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Bryophyllum fetschenkoii*. *Biochem. J.* **289**, 213-220.
- ▣ Nimmo, G.A., McNaughton, G.A.L., Fewson, C.A., Wilkins, M.B. & 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**, 18-22.
- ▣ Nishikido, T. & Takanashi, H. (1973) Glycine activation of phosphoenolpyruvate carboxylase from monocotyledonous C_4 plants. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **53**, 126-133.
- ▣ O'Leary, M.H., Rife, J.E. & Slater, J.D. (1981) Kinetic and isotope effect studies of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochemistry* **20**, 7308-7314.
- ▣ O'Leary, M.H. (1982) Phosphoenolpyruvate carboxylase: An enzymologist's view. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**, 297-315.
- ▣ O'Leary M.H. & Hermes J.D. (1987) Determination of substrate specificity of carboxylases by nuclear magnetic resonance. *Anal. Biochem.* **162**, 358-362.
- ▣ Outlaw, W.H.Jr. & Kennedy J. (1978) Enzymic and substrate basis for the anaplerotic step in guard cells. *Plant Physiol.* **62**, 648-652.

- ▣ Peliska J.A. & O'Leary M.H. (1989) Sulfur transfer catalyzed by pyruvate kinase. *Biochemistry* **28**, 1604-1611.
- ▣ Pipenbrock, M. & Schmitt, J.M. (1991) Environmental control of phosphoenolpyruvate carboxylase. Induction in mature *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol.* **97**, 998-1003.
- ▣ Podestá F.E., Iglesias A.A., 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.
- ▣ Podestá, F.E. & Andreo, C.S. (1989) Maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. Oligomeric state and activity in the presence of glycerol. *Plant Physiol.* **90**, 427-433.
- ▣ Price N. C. & Stevens L. Fundamentals of enzymology. Oxford Science Publications. U.S.A., 1982.
- ▣ Rajagopalan, A.V., Devi, M.T. & Raghavendra A.S, (1994) Molecular biology of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase: Structure, regulation and genetic engineering. *Photosynth. Res.* **39**, 115-135.
- ▣ Rodríguez-Sotres, R. (1990) Características cinéticas y moleculares de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en relación con la regulación de su actividad *in vivo* en hoja de maíz. Tesis doctoral. U.N.A.M.

- ▣ Rodríguez-Sotres R., & Muñoz-Clares, R.A. (1987) Short-term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by light. *J. Plant Physiol.* **128**, 361-369.
- ▣ Rodríguez-Sotres R., & Muñoz-Clares, R.A. (1990) Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* **276**, 180-190.
- ▣ Rosendahl, L., Vance, C.P. & Pedersen, W.B. (1990) Products of dark CO₂ fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiol.* **93**, 12-19.
- ▣ Rustin, P., Meyer C.R. & Wedding R.T. (1991) Fluorescence study of chemical modification of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*. *Plant Physiol.* **97**, 1011-1016.
- ▣ Schäffner A.R. & Sheen J. (1992) Maize C₄ photosynthesis involves differential regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase genes. *Plant J.* **2**, 221-232.
- ▣ Schuller, K.A., Turpin, D.H. & Plaxton, W.C. (1990) Metabolite regulation of partially purified soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **94**, 1429-1435.
- ▣ Segel I.H. Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. John Wiley & Sons. U.S.A., 1975.
- ▣ Seleniotti, E., Nikolopoulos, D. & Manetas, Y. (1987) Organic cosolutes as stabilisers of phosphoenolpyruvate carboxylase in storage: An interpretation of their action. *Aust. J. Plant Physiol.* **14**, 203-210.

- ▣ Sims, T.L. & Hague, D.R. (1981) Light stimulated increase of translatable mRNA for phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of maize. *J. Biol. Chem.* **256**, 8252-8255.
- ▣ Stiborová, M. & Leblová, S. (1985) Activation of maize (*Zea mays*) phosphoenolpyruvate carboxylase by glucose-6-phosphate and glycine: Effects of pH and Mg²⁺. *Photosynthetica* **19**, 177-182.
- ▣ Stiborová, M. & Leblová, S. (1986) Structure of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *FEBS Lett* **205**, 32-34.
- ▣ Stiborová, M. (1988) Phosphoenolpyruvate carboxylase: the key enzyme of C₄-photosynthesis. *Photosynthetica* **22**, 240-263.
- ▣ Sugiharto, B., Miyata, K., Nakamoto, H., Sasakawa, H. & Sugiyama, T. (1990) Glutamine induces the N-dependent accumulation of mRNAs encoding phosphoenolpyruvate carboxylase and carbonic anhydrase in detached maize leaf tissue. *Plant Physiol.* **92**, 963-969.
- ▣ Sugiharto, B., Suzuki, Y., Burnell, J.N. & Sugiyama, T. (1992) Glutamine induces the N-dependent accumulation of mRNAs encoding phosphoenolpyruvate carboxylase and carbonic anhydrase in detached maize leaf tissue. *Plant Physiol.* **100**, 2066-2070.
- ▣ Tarczynski, M.C. & Outlaw, Jr. W.H. (1993) The interactive effects of pH, l-malate and glucose-6-phosphate on guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **103**, 1189-1194.

- ▣ Ting, I.P. & Osmond C.B. (1973) Photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylases. Characteristics of alloenzymes from leaves of C₃ and C₄ plants. *Plant Physiol.* **57**, 906-910.
- ▣ Toh, H., Kawamura, T. & Izui, K. (1994) Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Cell Environ.* **17**, 31-43.
- ▣ Tovar-Méndez A., Mújica-Jiménez C., & Muñoz-Clares R.A. (1997) Desensitization to glucose-6-phosphate of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by pyridoxal-5'-phosphate. *Biochem. Biophys. Acta* **1337**, 207-216.
- ▣ Uedan, K. & Sugiyama, T. (1976) Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiol.* **57**, 906-910.
- ▣ Van, Q.L. Foyer, C. & Champigny, M.L. (1991) Light and NO₃ on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *Plant Physiol.* **97**, 1476-1482.
- ▣ Vidal, J. & Gadal, P (1983) Influence of light on phosphoenolpyruvate carboxylase in sorghum leaves. Identification and properties of two isoforms. *Physiol. Plant* **57**, 119-123.
- ▣ Wagner, R., González, D.H., Podestá, F.E. & 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.
- ▣ Wagner, R., Podestá, F.E., González, D.H. & 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.

- ④ Walker, G.H., Ku, M.S.B. & Edwards, G.E. (1986) Catalytic activity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase in relation to oligomerization. *Plant Physiol.* **80**, 848-855.
- ④ Wang, Y-H., Duff, S.M.G., Lepiniec, L., Crétin, C., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, J., Gadal, P., & Chollet, R. (1992) Site-directed mutagenesis of the phosphorylatable serine (ser⁸) in C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum: the effect of negative charge at position 8. *J. Biol. Chem.* **267**, 16759-16762.
- ④ Wedding R.T., Rustin P., Meyer C.R. & Black M.K. (1988) Kinetic studies of the form of substrate bound by phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **88**, 976-979.
- ④ Wedding, R.T., Black, M.K., & Meyer, C.R. (1989) Activation of higher plant phosphoenolpyruvate carboxylases by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol.* **90**, 648-652.
- ④ Willeford, K.O., Wu, M-X., Meyer, C.R. & Wedding, R.T. (1990) The role of oligomerization in regulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activity. Influence of Mg-PEP and malate on the oligomeric equilibrium of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **168**, 778-785.
- ④ Willeford, K.O. & Wedding, R.T. (1992) Oligomerization and regulation of higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **99**, 755-758.
- ④ Wold F. & Ballou C.E. (1957) Studies on the enzyme enolase. Equilibrium studies. *J. Biol. Chem.* **227**, 301-312.

- ▣ Wu, M-X. & Wedding, R.T. (1985) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase by interconversion of oligomeric forms. *Arch. Biochem. Biophys.* **240**, 655-662.
- ▣ Wu, M-X. & Wedding, R.T. (1987) Temperature effects on phosphoenolpyruvate carboxylase from CAM and C₄ plant. *Plant Physiol.* **85**, 497-501.
- ▣ Yazaki Y., Asukagawa N., Ishikawa Y., Ohta, E. & Sakata M. (1988) Estimation of cytoplasmic free Mg²⁺ levels and phosphorylation potentials in mung bean root tips by in vivo ³¹P NMR spectroscopy. *Plant Cell Physiol.* **29**, 919-924.