

20  
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

PAPEL DE LA CARGA DEL CARBOXILATO DE  
ANALOGOS DEL FOSFOENOLPIRUVATO EN LA  
SELECTIVIDAD DE DOS DE LOS SITIOS DE UNION  
DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO  
CARBOXILASA C. DE MAIZ

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO-BIOLOGO

P R E S E N T A

RICARDO AARON CHAVEZ MONTES



MEXICO, 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:

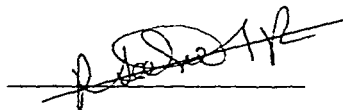
Presidente: Prof. Gavilanes Ruiz Marina  
Vocal: Prof. Rodríguez Sotres Rogelio  
Secretario: Prof. García Ramírez Elpidio  
1er. Suplente: Prof. Ortega Muñoz Raquel  
2do. Suplente: Prof. Pedraza Chaverri José

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 115, División de Estudios de Posgrado, Edificio E, Facultad de Química, U.N.A.M.

Trabajo financiado por D.G.A.P.A., proyecto IN211694.

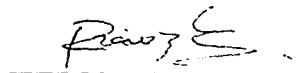
Nombre completo y firma del asesor del tema:

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rogelio Rodríguez Sotres', written over a horizontal line.

Nombre completo y firma del sustentante:

Ricardo Aarón Chávez Montes

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ricardo Aarón Chávez Montes', written over a horizontal line.

## **DEDICATORIAS.**

**A mi mamá**

**y a mis hermanitos.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

**Al Doctor Rogelio, por su infinita paciencia, por su apoyo incondicional y por explicarme qué estaba pasando.**

**A la Doctora Rosario A. Muñoz Clares, que señaló mis errores al tiempo que me animaba en mi trabajo.**

**Al laboratorio 102, en especial a Carlos Mújica Jiménez por toda su ayuda.**

## Tabla de contenidos.

Tabla de contenidos.

Dedicatorias.

Agradecimientos.

Abreviaturas.

1. Resumen.	1
2. Introducción.	2
2.1. Metabolismo C <sub>3</sub> vs. fotorrespiración y mecanismos concentradores de CO <sub>2</sub>	2
2.1.1. Fotosíntesis.	2
2.1.2. El ciclo de Calvin y su regulación.	2
2.1.2.1. Regulación de la Rubisco.	4
2.1.2.1.1. Activación por CO <sub>2</sub> , Mg <sup>2+</sup> y pH.	4
2.1.2.1.2. Regulación por la Rubisco activasa.	5
2.1.2.1.3. Regulación por carboxiarabinitol-1-fosfato.	6
2.1.2.2. Regulación de otras enzimas del ciclo de Calvin.	6
2.1.3. Fotorrespiración.	7
2.1.4. El metabolismo C <sub>4</sub> .	11
2.1.5. El metabolismo CAM.	14
2.2. La anhidrasa carbónica en las plantas C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub> y CAM.	15
2.3. Características generales de la PEPC.	16
2.4. Papeles no-fotosintéticos de la PEPC.	17
2.5. Características moleculares de la PEPC.	19
2.6. Mecanismo de reacción de la PEPC.	20
2.7. Características cinéticas de la PEPC.	21

2.7.1. Regulación por pH.	21
2.7.2. Regulación por metabolitos.	21
2.7.2.1. Metabolitos activadores.	21
2.7.2.2. Metabolitos inhibidores.	22
2.7.3. Regulación por fosforilación.	23
2.7.4. Otros posibles tipos de regulación.	25
2.7.4.1. El estado de agregación	25
2.7.4.2. Presencia de cosolutos.	26
2.8. Estrategias para el estudio de la PEPC.	26
2.8.1. Estudios cinéticos.	26
2.8.2. Modificación química.	27
2.8.2.1. Generalidades de la modificación química.	27
2.8.2.2. El 5'-fosfato de piridoxal.	29
2.8.3. Uso de análogos del PEP.	31
3. Hipótesis.	36
4. Objetivos.	36
5. Materiales y métodos.	37
5.1 Materiales.	37
5.2. Métodos.	37
5.2.1. Purificación de la PEPC.	37
5.2.2. Determinación de las constantes de estabilidad de los complejos con $Mg^{2+}$ de ligandos.	39
5.2.3. Determinación de las concentraciones al equilibrio de las especies y complejos con $Mg^{2+}$ presentes en el medio de reacción.	41
5.2.4. Determinación de proteína por el método de Bradford.	41
5.2.5. Patrones de velocidad inicial.	42
5.2.6. Ensayos de protección frente a la modificación química por PLP.	43

5.2.7. Procesamiento de datos.	44
5.2.7.1. Datos cinéticos.	44
5.2.7.2. Datos de protección frente a la modificación química.	47
6. Resultados.	49
6.1. Constantes de estabilidad global de los complejos con magnesio de los análogos oFMB y oFAB.	49
6.2. Patrones de velocidad inicial.	51
6.2.1. Efecto del oFMB.	51
6.2.2. Efecto del oFAB.	63
6.3. Ensayos de protección frente a la modificación por PLP.	71
7. Discusión de resultados.	84
8. Conclusiones.	92
9. Bibliografía.	93
Apéndice.	102



## 1. RESUMEN.

La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) cataliza la  $\beta$ -carboxilación del fosfoenolpiruvato en presencia de  $Mg^{2+}$  y bicarbonato para formar oxaloacetato y fosfato inorgánico. Esta enzima es regulada alostéricamente por varios metabolitos entre ellos la D-glucosa-6-fosfato, el L-malato y la glicina. Además, se ha demostrado que el fosfoenolpiruvato es también un activador de la enzima (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990) y la evidencia sugiere que posiblemente se une al sitio para la glucosa-6-fosfato (López-Valentín, 1997).

Por otra parte, numerosos análogos del fosfoenolpiruvato han demostrado tener actividad frente a la PEPC, resultando gran parte de ellos inhibidores de la enzima mientras que unos cuantos han demostrado ser activadores. A primera vista pareciera que los inhibidores se caracterizan por poseer tres cargas negativas y los activadores únicamente dos.

En este trabajo se utilizaron dos análogos estructurales del fosfoenolpiruvato que diferían en el número de cargas negativas; estos compuestos son el ácido 2-fosfonometil benzoico (con tres cargas negativas) y el 2-fosfonometil benzoato de metilo (con dos cargas negativas). Esta diferencia de carga neta fue suficiente para que, en ensayos cinéticos, el ácido (al que llamaremos oFAB) se comportara como un inhibidor mixto de la enzima y el éster (al que llamaremos oFMB) se comportara como un activador tipo K. Sin embargo, ensayos de protección frente a la modificación química con 5'-fosfato de piridoxal mostraron que, tanto en ausencia como en presencia de ligandos, oFAB provocaba una desprotección del sitio activo y no ofrecía protección del sitio alostérico, lo cual parece indicar que dicho compuesto no se une ni al sitio activo ni al sitio alostérico o se une con una geometría tal que no ofrece protección. El oFMB tampoco ofrecía protección de ninguno de los sitios en ausencia de ligandos, mas en presencia de fosfoglicolato·Mg si fue capaz de proteger al sitio alostérico.

## **2. INTRODUCCIÓN.**

Las plantas han sido clasificadas según su metabolismo en plantas  $C_3$ ,  $C_4$  o CAM. Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E.C. 4.1.1.31) es la enzima que cataliza la fijación inicial de  $CO_2$  en estos dos últimos tipos de metabolismo. Para comprender mejor su papel y su importancia es necesario explicar primero el funcionamiento del metabolismo  $C_3$  y un fenómeno colateral, el proceso llamado fotorrespiración.

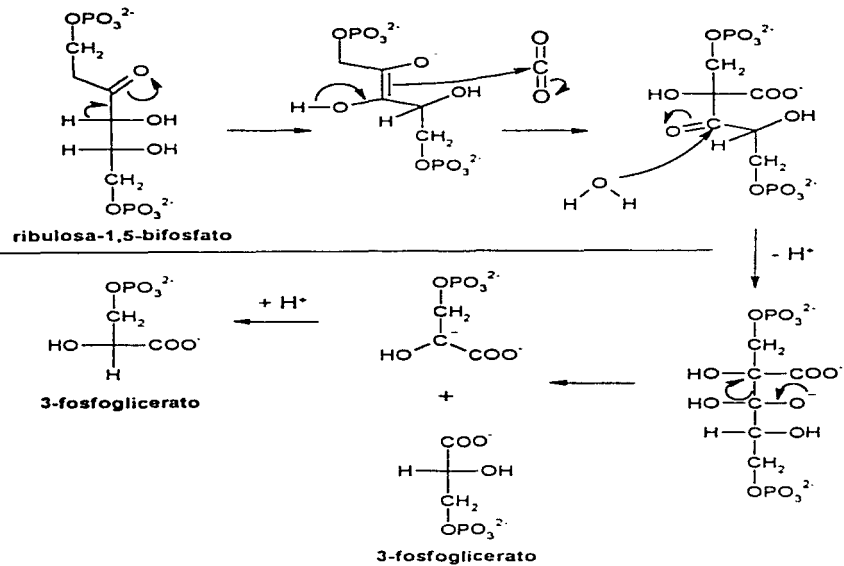
### **2.1. Metabolismo $C_3$ vs. fotorrespiración y mecanismos concentradores de $CO_2$ .**

#### **2.1.1. Fotosíntesis.**

La fotosíntesis consiste esencialmente de dos fases, las llamadas fase luminosa y fase oscura. Durante la fase luminosa la energía en forma de fotones es transformada en el potencial químico (ATP y NADPH) que se requiere para llevar a cabo las reacciones de la fase oscura. Durante la fase oscura ocurre la síntesis de azúcares gracias a la fijación de  $CO_2$  atmosférico. Las reacciones iniciales de esta última fase reciben en conjunto el nombre de ciclo de Calvin.

#### **2.1.2. El ciclo de Calvin y su regulación.**

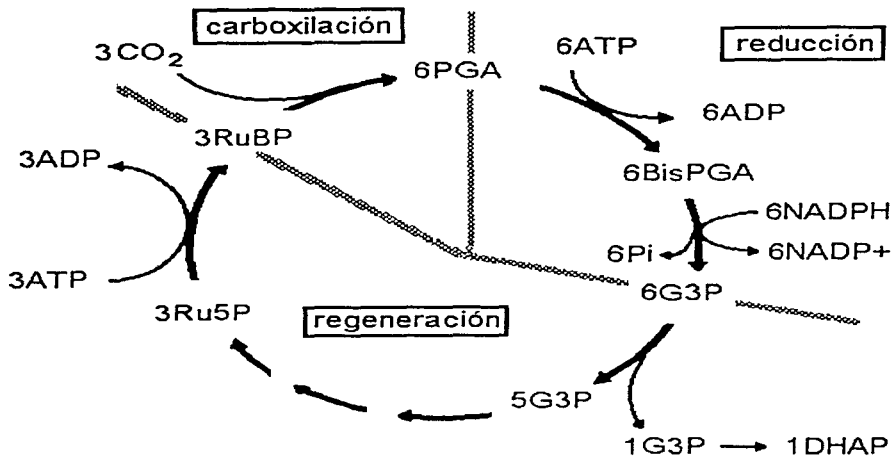
La enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) es una enzima cloroplástica que cataliza la carboxilación de la ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) con  $CO_2$ , en el primer paso del ciclo de Calvin (esquema 1).



Esquema 1. El mecanismo de la reacción de carboxilación catalizada por la Rubisco (tomado de Lehninger *et al.*, 1993a).

En esta reacción de carboxilación se producen dos moléculas de 3-fosfoglicerato (molécula de 3 carbonos, de ahí el nombre de metabolismo  $\text{C}_3$ ).

El ciclo de Calvin puede dividirse en tres etapas: la carboxilación, la producción de gliceraldehído-3-fosfato y la regeneración del aceptor RuBP (esquema 2).



Esquema 2. El ciclo de Calvin

RuBP, ribulosa-1,5-bifosfato; PGA, 3-fosfoglicerato; BisPGA, 1,3-bifosfoglicerato; G3P, gliceraldehído-3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; Ru5P, ribulosa-5-fosfato (adaptado de Macdonald y Buchanan, 1990).

El gliceraldehído-3-fosfato se utiliza entonces para la formación de glucosa-6-fosfato a través de la gluconeogénesis (Jensen, 1990; Macdonald y Buchanan, 1990).

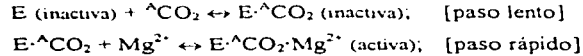
### 2.1.2.1. Regulación de la Rubisco.

#### 2.1.2.1.1. Activación por $\text{CO}_2$ , $\text{Mg}^{2+}$ y pH.

Durante la iluminación del cloroplasto se genera un transporte de protones desde el estroma hacia la luz del tilakoide lo que provoca un aumento del pH en el primero; para

compensar esta pérdida de cargas hay un transporte de iones  $Mg^{2+}$  en sentido opuesto. Como es de esperarse, la Rubisco es una enzima regulable y aprovecha los cambios en su medio para modificar su actividad.

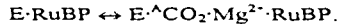
La Rubisco para ser catalíticamente competente debe pasar a un estado activado:



Estos dos pasos son reacciones no-enzimáticas; el primero se ve favorecido por un pH alcalino y consiste en la formación de un carbamilo ( $E\text{-NH-COO}^-$ ) con un residuo de lisina del sitio activo. Nótese que el  $\text{CO}_2$  que participa en la activación *no es* el  $\text{CO}_2$  que participa en la reacción de carboxilación. El segundo paso es la formación de un complejo con  $Mg^{2+}$  y esta forma final de la enzima es la capaz de unir RuBP para la catálisis. Resulta entonces evidente el porqué un pH alcalino, el  $\text{CO}_2$  y el  $Mg^{2+}$  son activadores de la enzima.

#### 2.1.2.1.2. Regulación por la Rubisco activasa.

A bajas concentraciones de  $\text{CO}_2$  la RuBP se puede unir también a la forma no activada de la enzima, impidiendo así su activación. La Rubisco activasa cataliza el paso de activación de la Rubisco



Este proceso requiere de ATP, si bien el mecanismo de la activación está aún en discusión, ya que algunos autores proponen que esta enzima pudiera ser una nueva chaperona (Sánchez-de-Jiménez *et al.*, 1995) mientras que otros no están de acuerdo con esta hipótesis (Eckardt y Portis, 1997).

### **2.1.2.1.3. Regulación por carboxiarabinitol-1-fosfato.**

El carboxiarabinitol-1-fosfato (CAIP) es un inhibidor de la Rubisco. Su concentración es dependiente de la intensidad de la luz recibida por la hoja; de noche su concentración es inclusive mayor a la concentración de sitios activos de la Rubisco y durante este periodo la actividad de ésta es el 10% de la actividad que se observa durante el día. La luz lleva a la degradación del CAIP y en condiciones de iluminación continua este inhibidor se vuelve prácticamente indetectable.

Es necesario señalar que este mecanismo de regulación y el anterior no necesariamente se encuentran en todas las plantas ni operan conjuntamente.

### **2.1.2.2. Regulación de otras enzimas del ciclo de Calvin.**

La luz puede regular la actividad de otras enzimas del ciclo de Calvin como son la pseudoheptulosa-1,7-bifosfato, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la ribulosa-5-fosfato cinasa, las cuales participan en la fase de regeneración de la RuBP a partir del gliceraldehído-3-fosfato. Esta regulación es llevada a cabo mediante la oxidación/reducción de sus grupos sulfhidrilo mediante el proceso ilustrado en la figura 1. En este mecanismo, cuando el fotosistema I se encuentra iluminado se generan equivalentes reductores, los cuales son transferidos a la ferredoxina; ésta a su vez es capaz de reducir a la tiorredoxina, la cual es la responsable de reducir a las enzimas mencionadas y llevarlas de su forma inactiva (-S-S-) a su forma activa (-SH HS-).

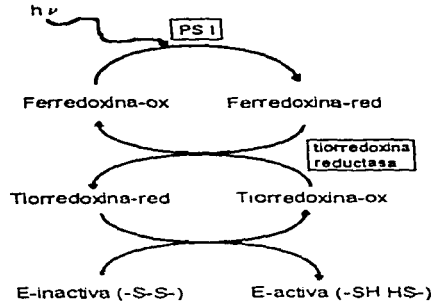
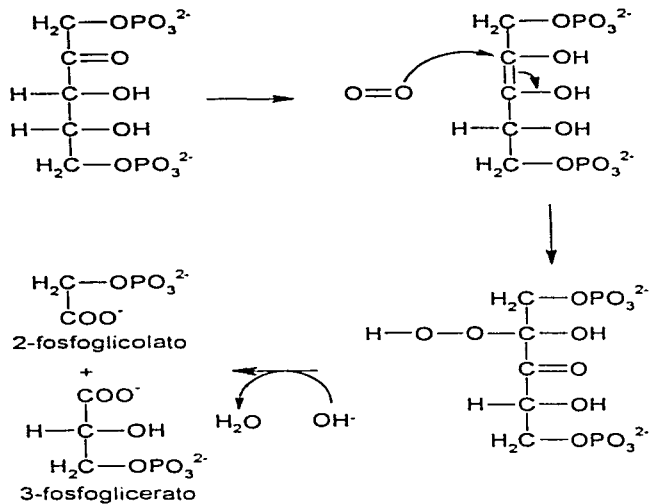


Figura 1. Mecanismo de acción de la ferredoxina-tiorredoxina (adaptado de Lehninger *et al.*, 1993b).

### 2.1.3. Fotorrespiración.

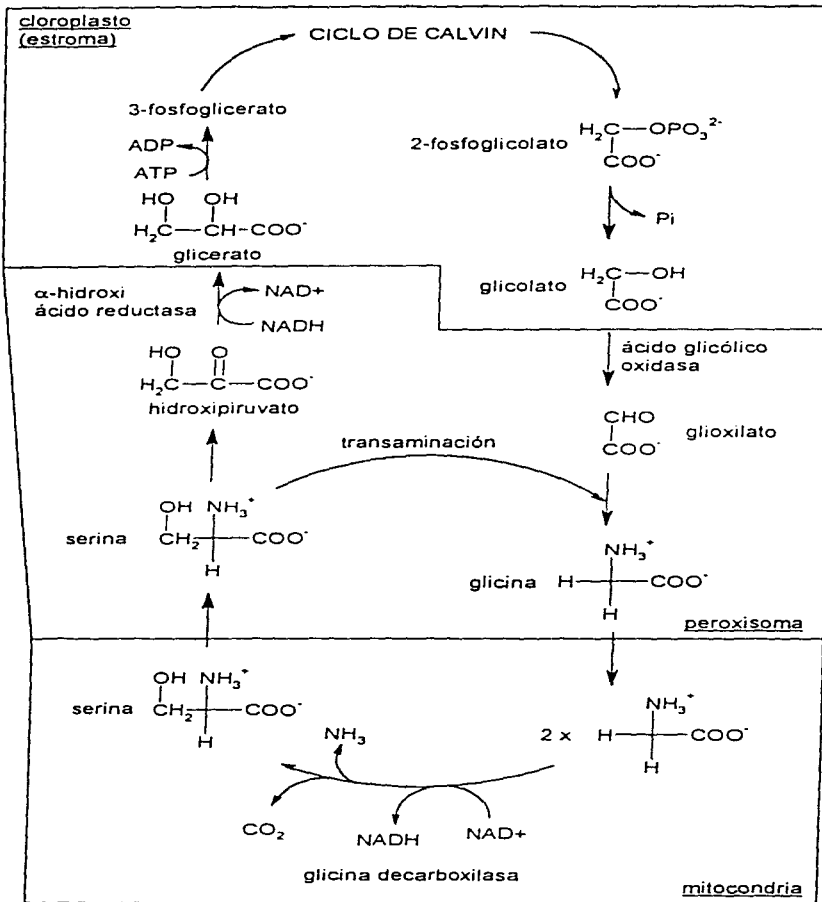
Aún cuando Rubisco acepta  $\text{CO}_2$  en la reacción de carboxilación, *puede* aceptar  $\text{O}_2$  en su lugar y funcionar entonces como oxigenasa (esquema 3). Este proceso junto con las reacciones subsiguientes es llamado **fotorrespiración**. El primer paso de la fotorrespiración consiste en la producción de 3-fosfoglicerato y 2-fosfoglicolato.



Esquema 3. Reacción de oxigenasa catalizada por la Rubisco (tomado de Lehninger *et al.*, 1993c).

El 2-fosfoglicolato es un metabolito tóxico para las plantas, por lo que es necesario metabolizarlo mediante el llamado ciclo  $\text{C}_2$  (esquema 4).





Esquema 4. El ciclo C<sub>2</sub> (adaptado de Lehninger *et al.*, 1993d).

En el ciclo  $C_2$  por cada cuatro carbonos (dos moléculas de fosfoglicolato) metabolizados, un carbono es liberado como  $CO_2$  y los tres restantes son regresados al ciclo de Calvin. Resulta entonces evidente que la presencia de  $O_2$  lleva, debido a la fotorrespiración, a la pérdida del carbono fijado.

Puesto que la fotorrespiración libera  $CO_2$  durante la fijación del mismo, existe una concentración atmosférica de  $CO_2$  a la cual la liberación y la fijación son iguales. Esta concentración de  $CO_2$  es llamada punto de compensación de  $CO_2$  y normalmente es de 40 a 60  $\mu l$  de  $CO_2 \cdot l^{-1}$  en las plantas  $C_3$ . Siendo que la liberación de  $CO_2$  requiere la presencia de  $O_2$ , el punto de compensación depende de la concentración de este gas, así, en hojas de plantas  $C_3$  y a 2% de  $O_2$ , el punto de compensación es casi de cero y aumenta en forma lineal al aumentar la concentración de  $O_2$ . Ya que la energía necesaria para la fijación de  $CO_2$  proviene de la captación de energía luminosa, existe un umbral de iluminación en el cual el balance entre el  $CO_2$  fijado y el  $CO_2$  respirado a través de los procesos normales de respiración y de la fotorrespiración es igual a cero y por debajo del cual la planta ya no puede sostener su metabolismo autótrofo. La intensidad de luz en este umbral es llamado punto de compensación de luz. Por arriba de éste el punto de compensación de  $CO_2$  no cambia con la intensidad de la luz. Igualmente, la fotorrespiración varía en función de la concentración de  $CO_2$ . A concentraciones elevadas de  $CO_2$  y a bajas intensidades de luz la incorporación de  $O_2$  es inhibida. La respuesta puede resultar más compleja cuando se consideran otros factores como la temperatura y la humedad, pero en cualquier caso, altas concentraciones de  $CO_2$  inhiben la incorporación de  $O_2$  al competir por el sitio activo de la Rubisco.

En las hojas  $C_3$ , la relación fotorrespiración/fotosíntesis aumenta al incrementarse la temperatura. Esto se debe por una parte a la cinética de la Rubisco, pues al aumentar la temperatura disminuye la afinidad de la enzima por el  $CO_2$  y se favorece la reacción de oxigenación; además, la solubilidad relativa del  $CO_2$  y del  $O_2$  cambia con la temperatura. Como es de esperarse, el punto de compensación de  $CO_2$  en plantas  $C_3$  aumenta con la temperatura (Canvin, 1990).

Para evitar el efecto del oxígeno en la fotosíntesis las plantas  $C_4$  y CAM han desarrollado elaborados mecanismos bioquímicos y anatómicos que les permiten aumentar la concentración de  $CO_2$  en la proximidad de la Rubisco, minimizando así su actividad de oxigenasa. Microalgas y cianobacterias han adoptado un método más directo, utilizando un transporte intenso de  $HCO_3^-$  y  $CO_2$  que les permite alcanzar así un resultado similar (Lucas, 1983).

#### 2.1.4. El metabolismo $C_4$ .

En las plantas  $C_4$  la fotosíntesis es casi insensible a la concentración de  $O_2$  y su incorporación no varía con la concentración de  $CO_2$  dentro de un rango muy amplio de concentraciones de estos gases. En estas plantas el punto de compensación de  $CO_2$  es menor a  $5 \mu l CO_2 \cdot l^{-1}$ . Esto sugiere que la actividad de oxigenasa y la fotorrespiración están muy reducidas o están ausentes en estas plantas. La temperatura tampoco afecta al punto de compensación de  $CO_2$ , lo que sin duda se refleja en una distribución predominante de las plantas  $C_4$  en regiones con climas cálidos y soleados. El maíz, el sorgo y la caña de azúcar son plantas  $C_4$  y su importancia económica sin duda explica el interés de la comunidad científica por el estudio de este metabolismo.

Las hojas de las plantas  $C_4$  poseen una estructura anatómica que las diferencia de las plantas  $C_3$ ; en las plantas  $C_3$  las células del mesófilo se encuentran distribuidas sin una organización clara en el tejido de la hoja siendo el principal sitio de fijación de  $CO_2$ . En cambio, en las hojas de las plantas  $C_4$  las células del mesófilo se encuentran rodeando a las células de la vaina vascular, formando una estructura a la que se ha llamado **anatomía Kranz** (del alemán, que significa "corona"; figura 2).

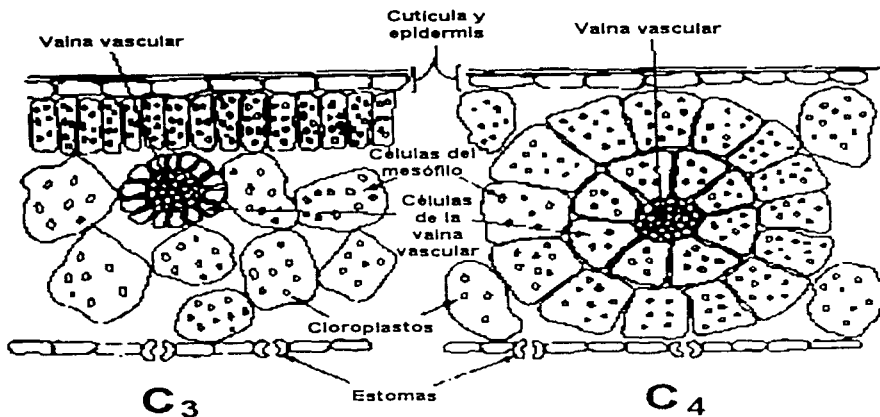


Figura 2. Anatomía de las hojas de las plantas C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> (tomado de Smith y Wood, 1992a).

Las células del mesófilo no poseen las enzimas del ciclo de Calvin, pero la actividad de la PEPC es muy elevada, por lo que fijan activamente CO<sub>2</sub> en forma de oxaloacetato, el cual es rápidamente reducido a malato o transaminado a aspartato. Esta forma de carbono se transporta a las células de la vaina vascular en donde es descarboxilado para generar CO<sub>2</sub> y un compuesto de 3 carbonos. Las células de la vaina vascular si poseen las enzimas del ciclo de Calvin y el CO<sub>2</sub> liberado es entonces fijado por la Rubisco como en una planta C<sub>3</sub>. El compuesto de 3 carbonos producto de la descarboxilación es regresado a las células del mesófilo en donde se regenera el PEP que se requiere para empezar un nuevo ciclo (figura 3).

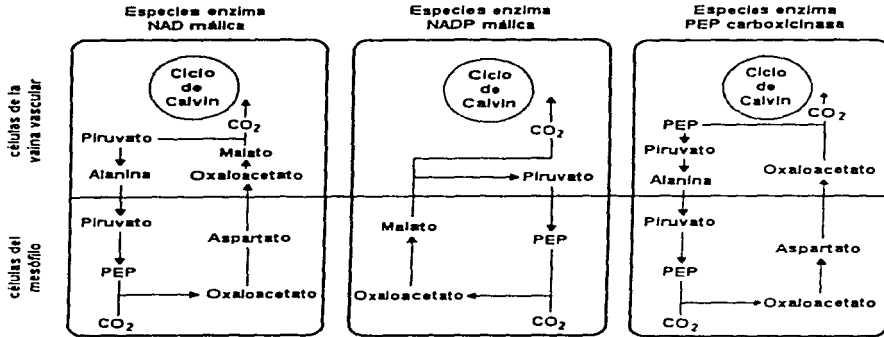


Figura 3. Los subgrupos de plantas C<sub>4</sub> (tomado de Smith y Wood, 1992b).

El resultado neto de este proceso es un transporte de CO<sub>2</sub> a las células de la vaina vascular. Como las velocidades de carboxilación del PEP y la subsecuente descarboxilación del PEP proceden a velocidades mayores que la velocidad con la que opera la Rubisco, la concentración de CO<sub>2</sub> en los cloroplastos de las células de la vaina vascular es mucho mayor que la concentración del CO<sub>2</sub> atmosférico. De esta manera, la actividad de oxigenasa de la Rubisco y la fotorrespiración se reducen notablemente.

Existen igualmente plantas con un metabolismo intermedio entre C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>, plantas C<sub>4</sub> que no poseen la anatomía de *Kranz*, plantas acuáticas que tienen hojas C<sub>3</sub> o C<sub>4</sub> dependiendo de si se encuentran sumergidas o no (Nelson y Langdale, 1994) y plantas que poseen en diferentes hoja tipos de fotosíntesis llamados perfil fotorrespiratorio alto y perfil fotorrespiratorio bajo (Spencer *et al.*, 1996); sin embargo, una discusión detallada de estas adaptaciones metabólicas va más allá de nuestro interés presente.

### 2.1.5. El metabolismo CAM.

Hemos visto como las plantas  $C_4$  separan *en el espacio* la fijación del  $CO_2$  y su incorporación en forma de 3-fosfoglicerato. En las plantas CAM la separación, en lugar de ser en el espacio, ocurre *en el tiempo*; las enzimas involucradas se encuentran dentro de una misma célula, pero sus actividades se expresan de manera distinta a lo largo del día.

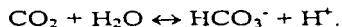
El metabolismo CAM debe su nombre a la familia de plantas llamada *Crassulaceae* en donde fue descrito por primera vez (CAM del inglés "Crassulacean Acid Metabolism" que puede traducirse como "Metabolismo Ácido de las Crasuláceas"). Las plantas CAM generalmente crecen en lugares áridos y este metabolismo se concibe con frecuencia como una adaptación al estrés hídrico. Sin embargo, esto no explica porqué ciertas plantas acuáticas (género *Isoetes*) son CAM. Esta y otras observaciones nos hacen pensar que el metabolismo CAM no es una mera adaptación a la sequía, sino más bien a condiciones de escasez de  $CO_2$  (Ting, 1985).

En la mayoría de las plantas CAM se observa lo siguiente: durante la noche, cuando la temperatura y la evaporación de agua es baja, los estomas se encuentran abiertos y permiten el libre intercambio de gases. En este mismo periodo, la actividad de PEPC es mayor debido a que se encuentra fosforilada (*cf.* 2.7.) y el  $CO_2$  es fijado activamente. El oxaloacetato es transformado a malato y este se almacena en vacuolas, en donde permanece hasta que llegue el día. Al aparecer la primera luz del día, la fijación de  $CO_2$  la llevan a cabo conjuntamente la PEPC y la Rubisco; mas al aumentar temperatura e intensidad de luz, los estomas se cierran para evitar la pérdida excesiva de agua. Es entonces cuando el malato es movilizado desde las vacuolas y la actividad de PEPC se ve muy disminuida debido a que la enzima es desfosforilada y se encuentra en presencia de su inhibidor (*cf.* 2.7.). Una rápida descarboxilación del malato crea una concentración elevada de  $CO_2$ , el cual es utilizado por la Rubisco en la misma forma que en las plantas  $C_3$ . Desafortunadamente, el único periodo de ganancia neta de carbono es el momento en que tanto la PEPC como la Rubisco se encuentran activas, ya que el  $CO_2$  para ser atrapado en forma de malato requirió de la respiración de glucosa proveniente de la degradación del

almidón que se acumula durante el día. Esta es una de las razones por las cuales las plantas CAM crecen lentamente.

## 2.2. La anhidrasa carbónica en las plantas C<sub>4</sub>, CAM y C<sub>3</sub>.

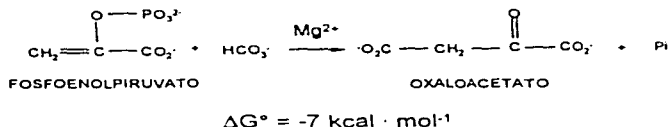
La anhidrasa carbónica (AC; E.C. 4.2.1.1) es una metalo-enzima (Zn) que cataliza la reacción



El  $\text{HCO}_3^-$  requerido por la PEPC proviene del  $\text{CO}_2$  atmosférico y Badger y Price consideran a la AC como la primera enzima del metabolismo C<sub>4</sub>. Se estima que la velocidad de fotosíntesis en plantas C<sub>4</sub> con AC es 10<sup>4</sup> veces superior a la que ocurre en su ausencia. La concentración de  $\text{CO}_2$  que ocurre en las células de la vaina vascular sólo puede lograrse al existir una barrera física que evita su difusión y por el hecho de que únicamente las células del mesófilo posean AC. Existen pocos estudios sobre la AC en plantas CAM, pero se puede especular que la requieren en el mismo modo que las plantas C<sub>4</sub>. En las plantas C<sub>3</sub> se ha propuesto que la AC facilita la difusión del  $\text{CO}_2$  en el estroma de los cloroplastos (Badger y Price, 1994).

### 2.3. Características generales de la PEPC.

La PEPC es una enzima citoplásmica que se encuentra en todas las plantas, así como en algunas bacterias, cianobacterias y algas verdes (Chollet *et al.*, 1996). La reacción que cataliza se muestra en el esquema 5.



Esquema 5. Reacción catalizada por la PEPC (el valor de  $\Delta G^\circ$  es el reportado por O'Leary, 1982).

En esta reacción el fosfoenolpiruvato (PEP) es carboxilado en la posición  $\beta$  en presencia de un catión divalente y bicarbonato para formar oxaloacetato y fosfato inorgánico. Esta enzima fue descrita por primera vez en 1953 (Bandurski y Greiner, 1953) y es la única carboxilasa no-dependiente de biotina que utiliza bicarbonato como sustrato (Knowles, 1989). La afinidad de la PEPC por el complejo PEP·Mg es mayor que la afinidad por PEP o por  $\text{Mg}^{2+}$ , por lo que se considera al complejo el sustrato verdadero de la enzima (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; López-Valentín, 1997). Aunque se propone que el  $\text{Mg}^{2+}$  es el ión utilizado *in vivo* para la catálisis (O'Leary, 1982), la PEPC puede usar otros cationes divalentes para su reacción (N'guyen *et al.*, 1988) entre ellos el  $\text{Mn}^{2+}$ .

La PEPC recombinante de un termófilo extremo, *Thermus sp.*, ya ha sido purificada (Nakamura *et al.*, 1996) y recientemente la enzima fue aislada de una arqueobacteria, *Methanothermus sociabilis* (Sako *et al.*, 1996). Los termófilos (Forterre, 1996) y más aún las arqueobacterias (Gupta y Golding, 1996) pertenecen a ramas evolutivas que se originaron en los albores mismos de la vida, lo que nos dice que la PEPC es realmente una enzima ancestral.



## 2.4. Papeles no-fotosintéticos de la PEPC.

Además de su participación en los metabolismos  $C_4$  y CAM, la PEPC tiene otras funciones en las plantas.

La PEPC se encuentra en tejidos no fotosintéticos de plantas  $C_4$  (O'Leary, 1982), en diferentes tejidos de plantas  $C_3$  (Amâncio *et al.*, 1993; Vance *et al.*, 1994) y en semillas (Leblová *et al.*, 1991; Osuna *et al.*, 1996) en donde funciona como una enzima anaplerótica produciendo oxaloacetato, un intermediario del ciclo de Krebs.

Esta función anaplerótica es de especial relevancia en la asimilación de nitrógeno en las plantas  $C_3$ , ya que se ha observado que la actividad de la PEPC aumenta cuando la planta requiere de esqueletos carbonados para la asimilación de nitrógeno (Schuller *et al.*, 1990; Podestá y Plaxton, 1994a; Podestá y Plaxton, 1994b; Díaz *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 1996). Una planta  $C_3$  con amonio como única fuente de nitrógeno responde con un aumento de la actividad de la PEPC (Schuller *et al.*, 1990; Díaz *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 1996) y además, la inhibición de la asimilación de nitrógeno inhibe este aumento (Díaz *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 1996). Durante la fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas se requieren igualmente esqueletos carbonados  $C_4$  provenientes de la actividad de la PEPC (Deroche y Carrayol, 1988; Vance *et al.*, 1994); estos ácidos  $C_4$  pueden además ser utilizados directamente por los bacteroides como fuente de energía (Deroche y Carrayol, 1988).

Debemos recordar que los metabolismos del nitrógeno y el carbono están íntimamente ligados (figura 4) y en esta interrelación la PEPC juega un papel importante (Huppe y Turpin, 1994; Champigny, 1995).

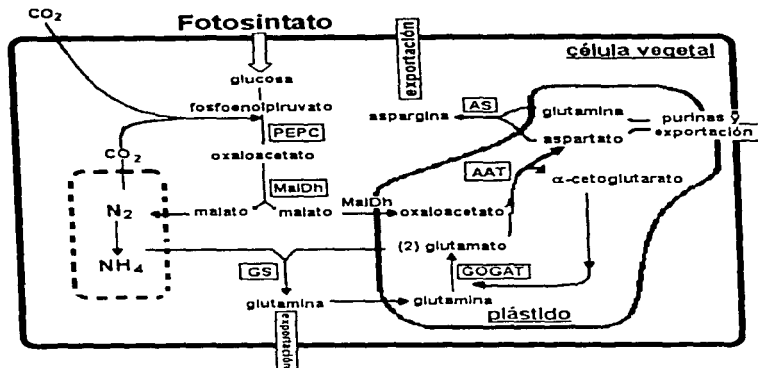


Figura 4. Esquema de la interrelación entre los metabolismos del N y el C (adaptado de Vance *et al.*, 1994). PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa; MalDh: malato deshidrogenasa; GS: glutamina sintetasa; AS: asparagina sintetasa; AAT: aspartato aminotransferasa; GOGAT: NADH-glutamato sintasa

Dos de los ácidos C<sub>4</sub> producto de la actividad de la PEPC son el L-malato y el L-aspartato (que en adelante llamaremos simplemente malato y aspartato). El malato participa en el transporte de equivalentes reductores desde la mitocondria o el cloroplasto hacia el citoplasma o el peroxisoma respectivamente. Contribuye al mantenimiento del balance de cargas en la célula y fluidos de la planta, aumentando su concentración al existir un exceso de cationes y degradándose al haber un exceso de aniones (Deroche y Carrayol 1988; Kurdjian y Guern, 1989; Martinoia y Rentsch, 1994). En las células estomatales este ácido participa no sólo como osmolito (Outlaw, 1990; Martinoia y Rentsch, 1994) sino que mantiene el balance de cargas y pH (Du *et al.*, 1997). Se propone igualmente que tiene una función regulando el pH celular ya que su síntesis genera iones H<sup>+</sup> y su degradación iones OH<sup>-</sup> (Kurdjian y Guern, 1989; Martinoia y Rentsch, 1994). El aspartato es transformado a asparagina, la cual es la principal amida transportada de la raíz a los tallos (Deroche y Carrayol, 1988).

Para aumentar la bio-disponibilidad del fósforo en el suelo, algunas plantas secretan un exudado rico en ácidos orgánicos, entre los cuales se encuentra el malato (Martinoia y

Rentsch, 1994) lo que requiere de un aumento de actividad de la PEPC (Johnson *et al.*, 1996).

Una función adicional de la PEPC es el reciclar una parte significativa del CO<sub>2</sub> proveniente de la respiración en los nódulos de leguminosas (Deroche y Carrayol 1988) y de las espigas de cereales C<sub>3</sub> (Bort *et al.*, 1996).

Finalmente, los metabolismos C<sub>4</sub> y CAM, que dependen de la participación de la PEPC en el proceso de fijación de CO<sub>2</sub> fotosintético, permiten a las plantas tener un uso más eficiente del agua (Martinoia y Rentsch, 1994) y evadir la fotorrespiración.

## 2.5. Características moleculares de la PEPC.

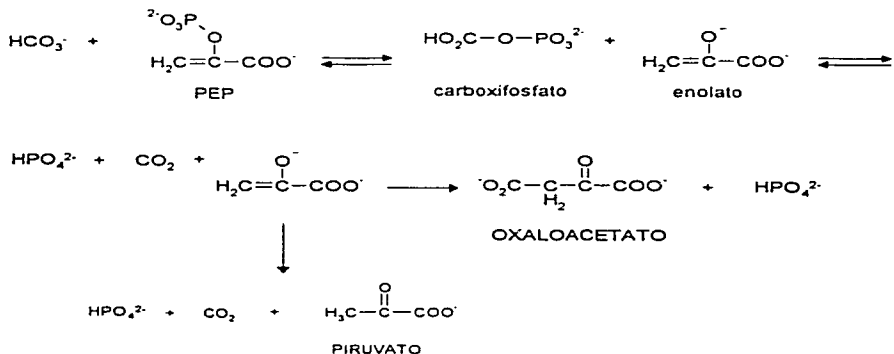
La PEPC se ha purificado de numerosas fuentes (para más referencias véase O'Leary, 1982 y Chollet *et al.*, 1996); *in vivo* la PEPC tiene un peso molecular de aproximadamente 400 kDa (Uedan y Sugiyama, 1976; O'Leary, 1982; Andreo *et al.*, 1987; Lepiniec *et al.*, 1994; Chollet *et al.*, 1996). La enzima purificada de maíz muestra una sola banda en gel de SDS con un peso aproximado de 100 kDa, lo que indica que se trata de un homotetrámero (Uedan y Sugiyama, 1976; O'Leary, 1982). Inclusive la enzima de *Methanothermus sociabilis* es un tetrámero (Sako *et al.*, 1996), aunque en esta arqueobacteria la subunidad tiene una masa molecular de 68 kDa. Se ha demostrado ampliamente, mediante inmunología y secuenciación de la proteína y de sus genes, que existe una gran homología entre las PEPC de plantas superiores pero que existen notables diferencias entre la enzima de plantas y la enzima proveniente de procariontes (Lepiniec *et al.*, 1994). Especialmente, la PEPC bacteriana carece de una secuencia del extremo amino-terminal cuya importancia aclararemos más adelante.

Recientemente, se han caracterizado en el alga C<sub>3</sub> *Selenastrum minutum* 4 isoformas de la PEPC (Rivoal *et al.*, 1996) en donde la subunidad catalítica se une a péptidos inmunológicamente no-relacionados, lo que le confiere a estas variantes características fisicoquímicas y cinéticas distintas a las del homotetrámero; el significado fisiológico de este fenómeno se desconoce aún.

La PEPC no ha podido ser cristalizada lo cual ha sido un obstáculo para identificar a los aminoácidos importantes para su función. Por lo pronto, algunos estudios han logrado identificar en la enzima de maíz a la lisina 606 como esencial para la catálisis (Jiao *et al.*, 1990) y en *Flaveria trinervia* a las argininas 450 y 767 como esenciales para la actividad catalítica y a la lisina 829 como esencial para la unión del PEP y el  $Mg^{2+}$  (Gao y Woo, 1996). Estos autores proponen además que la lisina 600 de la misma planta podría participar en la unión del bicarbonato (Gao y Woo, 1995).

## 2.6. Mecanismo de reacción de la PEPC.

El mecanismo de reacción de la PEPC que se acepta en la actualidad es el mostrado en el esquema 6.



Esquema 6. Mecanismo de reacción de la PEPC (tomado de Chollet *et al.*, 1996).

El primer paso químico es la transferencia del fosfato para formar carboxifosfato y el enolato del piruvato, el cual es estabilizado por el ión metálico. Se propone que una base de la enzima desprotona el carboxifosfato para formar fosfato inorgánico y enzima-CO<sub>2</sub>. Un cambio conformacional de la enzima aproxima el CO<sub>2</sub> al carbono 3 del enolato, los

cuales reaccionan para formar el oxaloacetato. Finalmente, el fosfato inorgánico y el oxaloacetato son liberados al medio.

La PEPC puede, siguiendo una variante del mecanismo, catalizar la hidrólisis del PEP a piruvato y fosfato inorgánico. Aunque en presencia de  $Mg^{2+}$  y a  $pH=8.0$  esta reacción sólo representa el 3% del total de la actividad, el uso de algún otro ión divalente aumenta este porcentaje, por lo que se propone que el ión metálico es esencial para estabilizar el enolato y favorecer la reacción de carboxilación (Ausenhuis y O'Leary, 1992)

## **2.7. Características cinéticas de la PEPC.**

La PEPC es una enzima que posee varios sitios alostéricos, presenta cooperatividad positiva para la unión del sustrato  $PEP \cdot Mg$  y es regulada conjuntamente por el pH, por metabolitos activadores e inhibidores y por fosforilación.

### **2.7.1. Regulación por pH.**

Los cambios moderados de pH tienen un efecto muy notable sobre la PEPC de maíz, el pH para su actividad óptima está entre 7.5 y 8.5 (Lepiniec *et al.*, 1994), presenta cooperatividad a  $pH=7$  o  $7.5$  y a  $pH=8$  ésta desaparece mientras que su velocidad máxima aumenta al igual que su afinidad por el sustrato (Uedan y Sugiyama, 1976; Stiborová y Leblová, 1985; Bandarian *et al.*, 1992; Duff *et al.*, 1995).

### **2.7.2. Regulación por metabolitos.**

#### **2.7.2.1. Metabolitos activadores.**

La D-glucosa-6-fosfato es un activador de la PEPC de maíz así como de *Crassula* (una planta CAM) y de trigo (una planta  $C_3$ ) (Wedding *et al.*, 1989); sus efectos son disminuir la  $K_m$  para el sustrato con un aumento ligero de la  $V_{max}$  y pérdida de la cooperatividad (Uedan y Sugiyama, 1976; Stiborová y Leblová, 1985; Bandarian *et al.*, 1992; Duff *et al.*,

1995). La activación tiene un mínimo a  $\text{pH}=7.5$  y aumenta al disminuir o aumentar el  $\text{pH}$  entre 7 y 9 (Stiborová y Leblová, 1985; Wedding *et al.*, 1989).

La glicina es igualmente un activador de la PEPC de maíz (Uedan y Sugiyama, 1976; Stiborová y Leblová, 1985; Bandarian *et al.*, 1992) pero no de la enzima de *Crassula* (Bandarian *et al.*, 1992). La glicina disminuye la  $K_m$  para el sustrato, aumenta la  $V_{max}$  y provoca la pérdida de la cooperatividad, aunque sus efectos sobre las constantes cinéticas son modestos comparados con los de la glucosa-6-fosfato. La glicina se une a un sitio alostérico distinto de la glucosa-6-fosfato y cuando ambas están presentes sus efectos son aditivos (Stiborová y Leblová, 1985; Bandarian *et al.*, 1992). La activación por glicina es dependiente de  $\text{pH}$  y disminuye al aumentar este último de 7 a 9 (Stiborová y Leblová, 1985).

Existe evidencia importante de que el sustrato PEP puede unirse a la PEPC a un sitio distinto del sitio activo, al parecer al sitio para la glucosa-6-fosfato (Podestá *et al.*, 1986). El PEP se comporta como un activador de la PEPC de hoja de maíz a través de un sitio al cual se ha propuesto que no se une  $\text{Mg}^{2+}$  si bien no existen evidencias suficientes para concluir algo definitivo (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; López-Valentín, 1997).

#### 2.7.2.2. Metabolitos inhibidores.

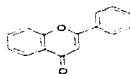
El malato y el aspartato son dos inhibidores de la PEPC, siendo el malato el más importante desde el punto de vista fisiológico.

El malato a bajas concentraciones es un inhibidor competitivo, mientras que a altas concentraciones se vuelve un inhibidor mixto (Donkin *et al.*, 1982; Duff *et al.*, 1995). En casi todas las isoenzimas de la PEPC reportadas el efecto del malato es aumentar la  $K_m$  para el PEP·Mg afectando o no a la  $V_{max}$  según las condiciones del experimento ( $\text{pH}$ , concentración de sustrato e inhibidor). Para la PEPC de casi todas las especies la inhibición por malato es menor a  $\text{pH}$  alcalino que a  $\text{pH}$  cercano a 7 (Huber y Edwards, 1975; Hill y Brown, 1978; Schuller *et al.*, 1990; Tarczynski y Outlaw, 1993; Law y Plaxton, 1995) y también es menor a concentraciones saturantes de sustrato debido a la

predominancia del componente competitivo en la cinética de inhibición que la enzima presenta frente a este compuesto (Huber y Edwards, 1975).

Se propone que *in vivo* el pH, pero sobre todo el malato y la glucosa-6-fosfato, participan en la regulación de la PEPC ya que los efectos de estos últimos no sólo son antagonísticos, sino que la presencia de uno de ellos provoca la insensibilización de la enzima hacia la acción del otro (Donkin *et al.*, 1982; Tarczynski y Outlaw, 1993).

Recientemente, se ha descrito que algunos flavonoides se comportan como inhibidores competitivos de la PEPC (Pairoba *et al.*, 1996; Colombo *et al.*, 1996). La estructura básica de los flavonoides se muestra en el esquema 7. Aunque su relevancia fisiológica aún no ha sido claramente determinada, resulta importante señalar que estos compuestos tienen unos valores de  $K_i$  del orden de 0.01 nM, lo que los convierte en los inhibidores de la PEPC más potentes reportados hasta la fecha.



Esquema 7. Estructura básica de los flavonoides.

### 2.7.3. Regulación por fosforilación

La fosforilación es de crucial importancia en la regulación de la PEPC, pues la enzima fosforilada aumenta su actividad y modifica su sensibilidad hacia sus reguladores alostéricos, aumentando de manera importante su  $K_i$  para malato y disminuyendo su  $K_s$  para glucosa-6-fosfato a pH fisiológico (Duff *et al.*, 1995). Resulta evidente que esta forma de regulación es esencial para la fijación de  $\text{CO}_2$  en las plantas  $\text{C}_4$  y CAM, ya que de no ser fosforilada la PEPC sería inhibida por un metabolito que se acumula a causa de su actividad (el malato).

La PEPC es fosforilada en una serina del extremo amino-terminal que corresponde a la posición 8 en la enzima de sorgo (Jiao *et al.*, 1991) y a la posición 15 en la enzima de maíz (Jiao y Chollet, 1990). Se ha observado en la enzima de sorgo que el reemplazo de la serina 8 por un aspartato (una carga negativa) reproduce parcialmente los efectos de la fosforilación (Wang *et al.*, 1992; Duff *et al.*, 1995).

En las plantas CAM ha sido demostrado que un ritmo circadiano controla la síntesis de la proteína-quinasa responsable de la fosforilación nocturna de la PEPC (Carter *et al.*, 1991) mediante la regulación de la expresión de su ARN mensajero traducible (Hartwell *et al.*, 1996).

En las plantas C<sub>4</sub> la luz provoca la fosforilación de la PEPC y la investigación sobre este proceso se ha encauzado en los últimos años hacia la dilucidación de la(s) cascada(s) de señales que la median. Los eventos bioquímicos responsables han sido caracterizados parcialmente en *Digitalis sanguinalis* (Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996). Además se ha demostrado recientemente que en una planta C<sub>3</sub>, *Nicotiana tabacum* L., ocurren fenómenos parecidos (Hartwell *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996) aunque no idénticos a los de las plantas C<sub>4</sub> (Li *et al.*, 1996).

Resulta interesante mencionar que además de la PEPC de hojas de una planta C<sub>3</sub> (Duff y Chollet, 1995), la enzima de nódulos (Zhang *et al.*, 1995), de semillas (Osuna *et al.*, 1996) y de células estomáticas (Du *et al.*, 1997) también es regulada *in vivo* por fosforilación.



## 2.7.4. Otros posibles tipos de regulación.

### 2.7.4.1. Estado de agregación.

El estado de agregación de la PEPC de diferentes plantas, entre ellas la de maíz, depende de su concentración, así como del pH y de la presencia de ligandos y cosolutos. Aún cuando los investigadores del tema no consideran relevante este tipo de regulación *in vivo* (ver Lepiniec *et al.*, 1994 y Chollet *et al.*, 1996), los posibles cambios en el estado de agregación no pueden menospreciarse al trabajar con la enzima purificada.

La PEPC de maíz puede disociarse de forma reversible a dímeros y hasta monómeros a bajas concentraciones de proteína (McNaughton *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1990) y la presencia de glicerol estabiliza a la enzima en su forma tetramérica (Podestá y Andreo, 1989). En maíz, el PEP en ausencia o presencia de magnesio y bicarbonato favorece la formación del tetrámero, mientras que el malato no sólo estabiliza la enzima en su forma dimerica, sino que puede también inducir su formación (Wu *et al.*, 1990).

La fuerza iónica (Wagner *et al.*, 1987) y algunos iones tienen también un efecto sobre el estado de agregación de la PEPC, según se trate de iones que estructuran el agua (kosmotrópicos) o que la desordenan (caotrópicos; Jensen *et al.*, 1995). Finalmente, un estudio de mutagénesis dirigida de la enzima de *Escherichia coli* muestra que el cambio de la arginina 438 por una cisteína afecta la estabilidad de la enzima, haciéndola más propensa a disociarse a dímeros (Izui *et al.*, 1995).

#### **2.7.4.2 Presencia de cosolutos.**

Se ha observado que en presencia de glicerol, polietilenglicol o metanol la PEPC tiene una mayor actividad (Uedan y Sugiyama, 1976; Podestá y Andreo, 1989; Schuller *et al.*, 1990; Law y Plaxton, 1995; Podestá *et al.*, 1995). Se ha asumido que este efecto activador se debe a que la presencia de cosolutos favorece la formación del estado tetramérico de la enzima (Podestá y Andreo, 1989). Sin embargo, recientemente se demostró que el glicerol tiene efectos sobre la PEPC que se encuentra exclusivamente en su forma tetramérica (Tovar-Méndez *et al.*, 1997), lo que sugiere entonces que dichos efectos pueden deberse a alguna alteración de la conformación tridimensional de la enzima y no necesariamente a las alteraciones del estado de agregación.

### **2.8. Estrategias para el estudio de la PEPC.**

Es evidente que existen numerosas estrategias que se pueden seguir para estudiar a una enzima, en este caso la PEPC. Por razones de extensión sólo mencionaremos las tres que se utilizaron en el presente estudio.

#### **2.8.1. Estudios cinéticos.**

Mediante diferentes tipos de experimentos, que incluyen los llamados patrones de velocidad inicial, los llamados patrones de inhibición por productos y los patrones de inhibición por análogos de los sustratos y/o productos, es posible determinar cual es la secuencia requerida de eventos de unión de ligandos a la enzima para que pueda llevarse a cabo la catálisis (Segel, 1975). Esta secuencia de eventos es un reflejo de las características de la enzima y de los requerimientos químicos del proceso catalítico, consecuentemente, basados en estas observaciones es posible derivar conclusiones importantes acerca de la enzima y el proceso catalítico en sí (Segel, 1975). Adicionalmente, mediante la influencia de parámetros ambientales tales como el pH y la temperatura es posible identificar posibles grupos químicos relevantes al proceso de

catálisis y/o a los procesos de unión de la enzima a sus ligandos (Segel, 1975). Otros estudios que se utilizan son los estudios de efectos isotópicos, los cuales facilitan la identificación del paso limitante de la catálisis (Cook, 1991).

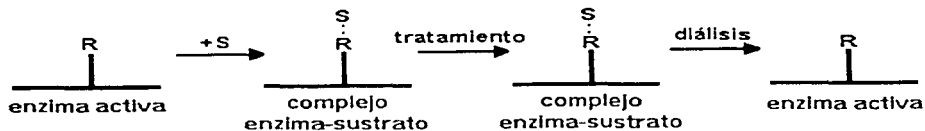
### **2.8.2. Modificación química.**

#### **2.8.2.1. Generalidades de la modificación química.**

Si una enzima es modificada por la conversión de un residuo de aminoácido particular a una forma distinta y esta modificación trae como consecuencia una pérdida de la actividad enzimática, entonces es posible que el aminoácido en cuestión sea parte del sitio activo de la enzima. Sin embargo, también es posible que la pérdida de actividad se deba a un cambio en la estructura terciaria y/o cuaternaria provocado por la modificación de un residuo de aminoácido aún cuando no se encuentre en el sitio activo. Las dos situaciones pueden distinguirse intentando llevar a cabo la misma modificación en presencia de sustrato, al fijarse éste debe proteger tanto su sitio de unión como los residuos aledaños al mismo. Una protección similar debería darse en presencia de concentraciones altas de inhibidores reversibles que se unen al sitio activo, esto es, la mayoría de los inhibidores competitivos con dicho sustrato. Así, si una enzima pierde su actividad cuando uno de los residuos es modificado por algún tratamiento químico en ausencia de sustrato o inhibidor competitivo (esquema 8), pero conserva su actividad en presencia de concentraciones saturantes de sustrato o de inhibidor competitivo (esquema 9), entonces el residuo de aminoácido se encuentra muy probablemente en el sitio activo de la enzima. Nótese que la presencia del sustrato protege no sólo a los residuos que unen al sustrato sino también a los residuos cercanos, incluyendo a aquellos involucrados directa o indirectamente en la catálisis.



Esquema 8. Un residuo de aminoácido (R) del sitio activo es modificado químicamente (R') con lo que la enzima pierde su actividad.



Esquema 9. En presencia de sustrato (S) o de un análogo del sustrato el residuo de aminoácido (R) no es modificado por el tratamiento

Está claro que esta técnica puede aplicarse de la misma manera para identificar residuos de aminoácido que formen parte del sitio alostérico de una enzima; su modificación se traduce en una pérdida de la sensibilidad hacia el ligando correspondiente (aunque como en el caso anterior, es posible que el aminoácido no forme parte del sitio alostérico, sino que intervenga en el cambio conformacional asociado a la transición alostérica).

Los estudios de modificación enzimática han revelado la presencia de residuos de histidina, cisteína, serina, metionina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y triptofano en los sitios activos de las enzimas.

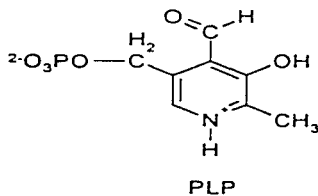
La modificación química, sin embargo, no proporciona respuestas definitivas en cuanto al papel de cierto residuo en el sitio activo (o alostérico) de la enzima. Para comprender mejor su función es necesario determinar su posición en la estructura primaria de la enzima y modificar entonces ese aminoácido mediante mutagénesis dirigida. Finalmente, los estudios de cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear nos mostrarán la estructura tridimensional del sitio activo. Combinando estos resultados con los estudios

cinéticos y químicos será entonces posible conocer detalladamente el mecanismo de catálisis de la PEPC o de cualquier otra enzima.

### 2.8.2.2. El 5'-fosfato de piridoxal.

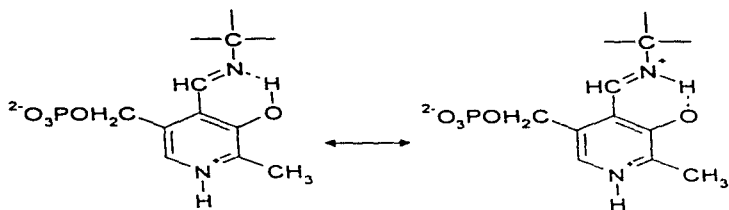
Son numerosos los reactivos que pueden utilizarse para modificar selectivamente residuos de aminoácido, entre los cuales podemos mencionar al iodoacetato (un agente alquilante de cisteínas), la N-etilmaleimida (una agente alquilante de cisteínas), anhídrido acético (un agente acetilante de grupos amino), el fluorodinitrobenzoceno (un agente alquilante de grupos amino), la S-metiltiourea (un agente guanidinizante de grupos amino), el fenilglioxal (una agente alquilante de argininas), las carbodiimidas (modificadores de grupos carboxilo), la 1,2-ciclohexanodiona (un modificador de argininas) y el 5'-fosfato de piridoxal (PLP).

El PLP es un derivado de la vitamina B<sub>6</sub> (llamada también piridoxal, piridoxina o piridoxamina) y su estructura se muestra en el esquema 10.



Esquema 10. Estructura del PLP.

El PLP es una coenzima importante en el metabolismo de aminoácidos e interviene en las reacciones de aminotransferasas, decarboxilasas y racemasas. Reacciona con grupos amino, formando una base de Schiff, esto es un enlace imina (-HC=N-; esquema 11).



Esquema 11. Formas resonantes de una base de Schiff con PLP.

De la misma manera el PLP puede reaccionar con el grupo amino de los residuos de lisina de la PEPC, en donde se ha visto que modifica al sitio activo (Podestá *et al.*, 1986) y al sitio alostérico para glucosa-6-fosfato (Tovar-Méndez *et al.*, 1997) de la enzima, lo que se traduce en una inactivación o insensibilización a glucosa-6-fosfato. Además, ésta modificación es reversible si se lleva a cabo en la oscuridad (Podestá *et al.*, 1986; Tovar-Méndez *et al.*, 1997).

Podestá y col. (1986) observaron que tanto el PEP (30 mM) y el malato (10 mM) son capaces de proteger a la enzima de la inactivación por PLP 0.7 mM a pH=7.0 (obteniendo 67% y 70% de la actividad original, contra 45 % de la enzima incubada únicamente con PLP) y que la protección es aún mayor en presencia de PEP y  $Mg^{2+}$  (30 mM y 10 mM respectivamente; 95 % de la actividad original); observan además una recuperación de la actividad cuando la enzima parcialmente modificada se incubaba en presencia de PEP·Mg, lo que sugiere que ambos ligandos compiten por el sitio activo. Finalmente, no observan ningún efecto en presencia de  $HCO_3^-$ ,  $Mg^{2+}$  o glucosa-6-fosfato.

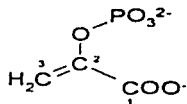
Tovar-Méndez y col. (1997) por su parte observan una inactivación e insensibilización a glucosa-6-fosfato en presencia de PLP 1.19 mM a pH 7.3, pero en presencia de fosfoglicolato y  $Mg^{2+}$  (15 mM y 25 mM respectivamente) sólo observan la insensibilización; además, la enzima modificada por PLP ya no es activable por glucosa-6-fosfato. Finalmente, muestran que, en ausencia de ligandos, la glucosa-6-fosfato (10 mM) no evita ni la inactivación ni la insensibilización de la PEPC, mientras que PEP·Mg

(4 mM) protege de la inactivación, pero aumenta la insensibilización y cuando PEP·Mg y glucosa-6-fosfato están ambos presentes hay una protección total de ambos sitios.

La modificación química puede utilizarse de manera distinta, esto es, si se conoce un reactivo que modifique un sitio dado (en nuestro caso el PLP), uno puede determinar si un determinado ligando se une o no a dicho sitio. Si el compuesto se une de manera reversible a la enzima, entonces es incluso posible calcular la constante de unión del compuesto a su sitio mediante esta misma metodología.

### 2.8.3. Uso de análogos del PEP.

La estructura del PEP se muestra en el esquema 12.



Esquema 12. Estructura del fosfoenolpiruvato.

Los análogos de un sustrato son herramientas muy útiles para el estudio del mecanismo de acción enzimática. Su uso puede proporcionar datos sobre la naturaleza química de los residuos involucrados en la unión del sustrato, así como sobre la topografía del sitio activo. Igualmente se pueden determinar los grupos funcionales y las características del sustrato relevantes para la unión o la catálisis. En la tabla 1 se muestran algunos inhibidores que se han utilizado para el estudio de la PEPC.

Tabla 1. Algunos análogos del PEP y sus constantes de inhibición (adaptada de González y Andreo, 1989).

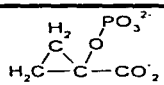
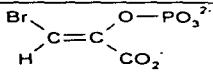
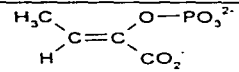
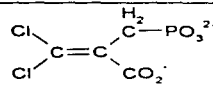
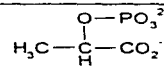
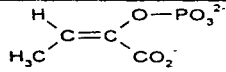
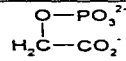
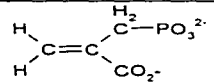
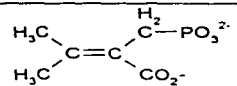
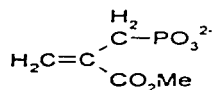
Nombre	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	Fórmula
ácido 1-hidroxiciclopropano carboxílico fosfato	7	
fosfoenol-3-bromopiruvato	7	
Z-metil-fosfoenolpiruvato	17	
3,3-dicloro-2-dihidroxi- fosfinoil-metil-2-propenoato	80	
L-fosfolactato	100	
E-metil-fosfoenolpiruvato	110	
fosfoglicolato	200	
fosfoenolpiruvato fosfonato	400	
dimetil-fosfoenolpiruvato	380	



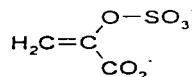
Tabla 1 (continuación). Algunos análogos del PEP y sus constantes de inhibición (adaptada de González y Andreo, 1989).

<i>E</i> -3-cianofosfoenolpiruvato	1360	$\begin{array}{c} \text{H} & & \text{O}-\text{PO}_3^{2-} \\ & \diagdown & / \\ & \text{C}=\text{C} & \\ & / & \diagdown \\ \text{N}\equiv\text{C} & & \text{CO}_2^- \end{array}$
fosfoenoltiopiruvato	2000	$\begin{array}{c} \text{H} & & \text{S}-\text{PO}_3^{2-} \\ & \diagdown & / \\ & \text{C}=\text{C} & \\ & / & \diagdown \\ \text{H} & & \text{CO}_2^- \end{array}$
fosfonoacetato	2000	$\begin{array}{c} \text{PO}_3^{2-} \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CO}_2^- \end{array}$
fosfomalato	2600	$\begin{array}{c} \text{O}-\text{PO}_3^{2-} \\   \\ \text{O}_2\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{CO}_2^- \\   \quad   \\ \text{H}_2 \quad \text{H} \end{array}$
fosfonopropionato	10000	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{PO}_3^{2-} \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CO}_2^- \end{array}$

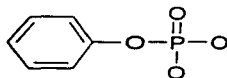
Esta lista de inhibidores de la PEPC es bastante amplia y, sin embargo, algunos de los análogos que se han encontrado actúan como activadores de la enzima. Se han reportado compuestos como el 2,4-dihidroxisfosfinoilmetil-2-propenoato (Jenkins *et al.*, 1986), el sulfoenolpiruvato (Peliska y O'Leary, 1989), el fenilfosfato (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990) y la fosfomicina (Catellanos-Martínez *et al.*, 1997), cuyas estructuras se muestran en el esquema 13.



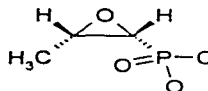
2,4-dihidroxisfosfinoilmetil-2-propenoato



sulfoenolpiruvato



fenilfosfato



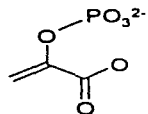
fosfomicina

Esquema 13. Estructura de algunos activadores de la PEPC.

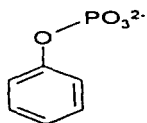
Si uno compara las estructuras entre inhibidores y activadores, a primera vista pareciera que el número de cargas negativas presentes en la molécula es el elemento que determina su actividad frente a la PEPC, siendo los inhibidores trianiones y los activadores dianiones.

En lo que concierne a los grupos funcionales relevantes de los análogos, desde hace ya más de una década se menciona la importancia de los grupos carboxilo y fosfato para la unión del PEP al sitio activo (O'Leary, 1982; Andreo *et al.*, 1987; González y Andreo, 1989). Sin embargo, un estudio que intentó determinar alguna relación entre estructura y actividad de diferentes análogos no arrojó conclusiones claras (Mancera *et al.*, 1995).

La presencia de enlaces dobles conjugados en el PEP nos invita a usar como sus análogos estructurales a compuestos fenólicos (esquema 14).



PEP

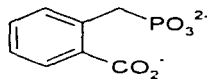
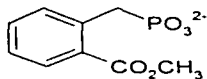


fenilfosfato

Esquema 14. Estructuras del PEP y el fenilfosfato.

Sin embargo, los análogos que poseen un grupo fosfato son susceptibles de ser hidrolizados; para tener entonces un análogo estructural que permanezca intacto durante el transcurso de la catálisis se utilizan compuestos con un grupo fosfono ( $-\text{CH}_2-\text{PO}_3^{2-}$ ).

En este estudio se utilizaron los compuestos mostrados en el esquema 15.



Esquema 15. Estructuras de dos análogos estructurales del PEP.

oFMB: 2-fosfonometil benzoato de metilo.

oFAB: ácido 2-fosfonometil benzóico.

Como se puede observar, los dos análogos difieren solamente en poseer o carecer de la carga negativa de un único grupo carboxilo.

### **3. HIPÓTESIS.**

Análogos estructurales del PEP idénticos entre si excepto por la presencia o ausencia de un único grupo carboxilo presentarán actividades distintas sobre la PEPC C<sub>4</sub> de hoja de maíz, lo que será reflejo tanto de las propiedades cinéticas de esta enzima como de la selectividad de los sitios activo y activador para glucosa-6-fosfato de la enzima por dichos análogos.

### **4. OBJETIVOS.**

- Estudiar el efecto de dos compuestos sintéticos (oFMB y oFAB) sobre la actividad de la PEPC.
- Determinar si éstos actúan como inhibidores o activadores de la enzima, caracterizando la respuesta cinética de la PEPC frente a ellos.
- Determinar las constantes de unión de estos compuestos al sitio activo y al sitio alostérico activador para glucosa-6-fosfato.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1 Materiales.

Todos los reactivos fueron de grado analítico. La trietanolamina (TEA), el  $\text{HCO}_3^-$  (sal de sodio), el KOH, el  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , el ácido acético glacial y el HCl fueron de J.T. Baker. La albúmina de suero bovino (BSA) fue de GIBCO. La glicina, el ácido fosfórico y el ácido perclórico fueron de Mallinckrodt. El HEPES (ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico]), el DTT (DL-ditiotreitol) y el PMSF (fenilmetilsulfonyl fluoruro) fueron de Research Organics Inc. La resina DEAE Sephadex y la resina Sefarosa Q de flujo rápido fueron de Pharmacia Fine Chemicals. El EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), el KCl, el MgO, el etanol y el glicerol fueron de Merck. La enzima málico deshidrogenasa (de corazón de bovino -mitocondrial), el NADH ( $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido, reducido), el PEP (sal de monociclohexilamonio), la D-glucosa-6-fosfato (sal monosódica), el L-(-)-ácido málico (sal disódica), el 5'-fosfato de piridoxal, la urea, la benzamidina y el azul de Coomassie G fueron de Sigma Chemical Co. La 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) fue de Aldrich.

Los análogos oFMB y oFAB fueron sintetizados por Ivette Arellano Camacho (Arellano-Camacho, 1997) en el laboratorio del Dr Blas Flores Pérez, laboratorio 201 del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química y su identidad fue comprobada por estudios de espectroscopia infrarroja y de resonancia magnética nuclear de protones.

### 5.2. Métodos.

#### 5.2.1. Purificación de la PEPC.

Se crecieron plantas de maíz (*Zea mays* L., cv. Chalqueño) en un invernadero con iluminación natural a una temperatura de entre 20 y 30 °C. Las plantas se mantuvieron en

oscuridad total durante por lo menos 12 horas previas a la extracción, para la cual se emplearon hojas de plantas de 6 a 8 semanas de edad totalmente extendidas y despojadas de la nervadura central. A partir de este momento todos los pasos se realizaron a 4 °C salvo otra indicación. Aún en oscuridad el tejido se homogeneizó en amortiguador de extracción<sup>†</sup> en una proporción de 3 a 1 (amortiguador/peso de tejido). El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 40,000 revoluciones · min<sup>-1</sup> durante 30 minutos.

El sobrenadante se aplicó a una columna de 50 ml de DEAE Sephacel previamente equilibrada con el amortiguador A. Después de lavar exhaustivamente, la columna se eluyó con un gradiente lineal de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> de 25 a 500 mM de 250 ml.

Las fracciones con actividad de PEPC se juntaron y se aplicaron a una columna de 20 ml de Sefarosa Q de flujo rápido previamente equilibrada con el amortiguador B. La columna se eluyó con un gradiente lineal de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> de 25 a 500 mM de 100 ml.

Las fracciones con actividad de PEPC se concentraron por centrifugación en un Centricon 100 (Amicon) hasta 1 ml y éste se aplicó a una columna Superdex 200 adaptada a un equipo de HPLC y previamente equilibrada con el amortiguador C. Se eluyó la columna con un flujo de 0.5 ml/min del mismo amortiguador.

Las fracciones con actividad de PEPC se juntaron, se llevaron a 40% (v/v) de glicerol y se conservaron en alícuotas a -70 °C hasta su uso. En estas condiciones la actividad resultó estable por varios meses.

La I<sub>50</sub> para malato de la preparación final de enzima determinada según Wang y col. (1992) fue de 0.23 ± 0.02, lo que indica que tenemos esencialmente una enzima no fosforilada y no truncada.

El análisis mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) reveló que la enzima era al menos 90% pura según el criterio de tinción con azul de Coomassie G.

---

<sup>†</sup> Para una descripción de los amortiguadores y disoluciones empleados referirse al apéndice.

### 5.2.2. Determinación de las constantes de estabilidad de los complejos con $Mg^{2+}$ de ligandos.

La 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) y el ión  $Mg^{2+}$  forman un complejo que presenta un máximo de absorbencia a 360 nm. Aprovechando esta propiedad podemos calcular las constantes de estabilidad de los complejos con  $Mg^{2+}$  de los compuestos oFMB y oFAB. Para esto se preparan dos cubetas de la siguiente manera:

- Blancos:

8-HQ 0.5 mM en TEA·HCl 25 mM, pH=7.3

Sin y con ligando a por lo menos tres concentraciones (por ejemplo 10, 20 y 30 mM)

KCl c.b.p. I=0.15 M

Agua c.b.p 1000  $\mu$ l

- Muestra:

8-HQ 0.5 mM en TEA·HCl 25 mM

$MgCl_2$  15 mM

Ligando a la misma concentración que el blanco respectivo.

KCl c.b.p. I=0.15 mM

agua c.b.p. 1000  $\mu$ l

Se prepara de la misma manera una cubeta con una concentración de  $MgCl_2$  50 mM de la siguiente manera:

8-HQ 0.5 mM en TEA·HCl 25 mM, pH=7.3

$MgCl_2$  50 mM

Agua c.b.p 1000  $\mu$ l

I es la fuerza iónica, la cual se calcula mediante la ecuación

$$I = \frac{1}{2} \sum [Z_i^2 \cdot C_i],$$

en donde  $Z_i$  es la carga de la especie iónica y  $C_i$  su concentración molar. Para el cálculo de la distribución iónica de las moléculas del tampón se emplea la ecuación de Hendersson-Hasselbach.

Se calibra a la absorbencia igual a cero con el blanco. Se mide la absorbencia de la cubeta 50 mM para calcular el coeficiente de extinción molar del complejo 8-HQ·Mg al pH de trabajo. Se mide seguidamente la absorbencia de la muestra 15 mM de Mg<sup>2+</sup>. Se coloca nuevamente el blanco en el espectro, se agregan poco a poco volúmenes definidos de la muestra a 15 mM y se va registrando la absorbencia resultante después de cada adición. Este procedimiento se repite con las 3 concentraciones de ligando. Los datos así obtenidos se ajustan a la ecuación

$$[Mg^{2+}]_{total} = \frac{A}{\epsilon} + \frac{A}{K_o \cdot HQ_i \cdot \epsilon - S_i \cdot A} + \frac{L_i \cdot K_e \cdot A}{K_o \cdot HQ_i \cdot \epsilon + S_i \cdot A \cdot (K_e - K_o)}$$

utilizando la absorbencia como las abscisas y  $[Mg^{2+}]_{total}$  como las ordenadas y en donde  $HQ_i$  es la concentración total de 8-HQ en mM,  $L_i$  es la concentración total de ligando en mM,  $K_o$  es la constante de estabilidad global del complejo 8-HQ·Mg en mM<sup>-1</sup>,  $S_i$  es un coeficiente que vale 1 en este caso,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar del complejo 8-HQ·Mg en mM<sup>-1</sup>,  $A$  la absorbencia de la solución y  $K_e$  es la constante de estabilidad aparente del complejo ligando·Mg en mM<sup>-1</sup>, que es el dato que se desea calcular.

Con los datos de  $K_e$  así obtenidos se hace un gráfico de  $1/K_e$  vs. la concentración del ligando total. La interpolación a concentración de ligando igual a cero nos proporciona el valor de la constante de estabilidad global del complejo ligando·Mg al pH de trabajo (O'Sullivan y Smithers, 1979).

Las determinaciones de las constantes de estabilidad se deben realizar para cada pH al que se vaya a trabajar, pero podemos inferir que no cometemos un error significativo al utilizar la constante calculada a pH=7.3 para hacer los cálculos para pH=8.3 siendo que el estado de ionización de los compuestos empleados en este estudio es esencialmente el mismo en dicho rango de pH.



### 5.2.3. Determinación de las concentraciones al equilibrio de las especies y complejos con $Mg^{2+}$ presentes en el medio de reacción.

El cálculo de las concentraciones al equilibrio de las especies y complejos se hizo con un programa desarrollado por el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, laboratorio 115, conjunto E de la Facultad de Química, siguiendo un sistema de ecuaciones autoconsistente descrito por Storer y Cornish-Bowden (1976). Con este programa se obtienen las cantidades totales de cada reactivo que se tienen que añadir para tener una concentración dada del complejo PEP·Mg. Las constantes de estabilidad globales que se utilizaron para los cálculos fueron las siguientes:

complejo PEP·Mg <sup>+</sup>	$1.800 \cdot 10^{-1} \text{ mM}^{-1}$
complejo PEPH <sup>2-</sup>	$2.240 \cdot 10^{-3} \text{ mM}^{-1}$
complejo CO <sub>3</sub> Mg	$2.340 \cdot 10^{-1} \text{ mM}^{-1}$
complejo HCO <sub>3</sub> Mg <sup>+</sup>	$7.430 \cdot 10^{-4} \text{ mM}^{-2}$
complejo HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	$1.259 \cdot 10^{-7} \text{ mM}^{-1}$
complejo NADHMg <sup>2-</sup>	$1.000 \cdot 10^{-1} \text{ mM}^{-1}$
complejo EDTAMg <sup>2-</sup>	$3.980 \cdot 10^{-5} \text{ mM}^{-1}$
complejo EDTAH <sup>3-</sup>	$2.190 \cdot 10^{-7} \text{ mM}^{-1}$
complejo EDTAHMg <sup>-</sup>	$3.980 \cdot 10^{-9} \text{ mM}^{-2}$
complejo G6PMg	$5.000 \cdot 10^{-2} \text{ mM}^{-1}$
complejo glicinaMg	$2.188 \cdot 10^{-1} \text{ mM}^{-1}$

### 5.2.4. Determinación de proteína por el método de Bradford.

El método de Bradford (1976) utiliza el colorante azul de Coomassie G el cual se une a las proteínas presentando un máximo de absorbencia entre 595 y 690 nm. La concentración de la disolución de albúmina de suero bovino (BSA) se calcula sabiendo que una solución de 1 mg / ml de BSA tiene una absorbencia de 1.48 a 280 nm.

Una curva patrón de BSA y la muestra se prepararon de la siguiente manera:

Curva patrón:

BSA	Amortiguador C	Urea 6 M	Agua	Reactivo de Bradford
0-20 µg en 50 µl	50 µl	100 µl	500 µl	500 µl

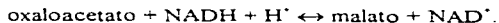
Muestra:

PEPC	Urea 6 M	Agua	Reactivo de Bradford
x µl de PEPC +amortiguador C c.b.p. 50 µl	100 µl	550 µl	500 µl

Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente después de agregar la urea; se agrega el agua e inmediatamente después de agregar el reactivo de Bradford se lee la absorbencia a 595 nm.

### 5.2.5. Determinaciones de velocidades iniciales.

Las mediciones cinéticas de velocidades iniciales se efectuaron en un espectrofotómetro Beckman DU640 equipado con un controlador de temperatura con recirculación de agua, el cual se mantuvo a una temperatura constante de  $30 \pm 0.5$  °C. Los ensayos se efectuaron en un volumen total de 1 ml en cubetas de plástico con un paso de luz de 1 cm. La producción de oxaloacetato catalizada por la PEPC se cuantificó mediante una reacción acoplada utilizando la enzima malato deshidrogenasa y midiendo la oxidación del NADH a 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). La reacción que cataliza la enzima malato deshidrogenasa es



Todos los experimentos se iniciaron con la adición de la PEPC y se realizaron a pH=7.3 o pH=8.3 según se indique. La desaparición de NADH se monitoreó durante 120 segundos como máximo. Una cubeta contiene como medio de reacción básico TEA·HCl 100 mM pH=7.3 u 8.3, EDTA 1 mM (concentración final),  $\text{HCO}_3^-$  10 mM (concentración final), NADH 0.2 mM (concentración final), malato deshidrogenasa 2 unidades internacionales y

las cantidades que se requieran de PEP, MgCl<sub>2</sub>, malato, glucosa-6-fosfato, glicina, oFMB u oFAB.

Las actividades de la PEPC se expresan como  $\mu\text{mol de NADH transformado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$  y los datos presentados son el promedio de por lo menos duplicados de las determinaciones.

### 5.2.6. Ensayos de protección frente a la modificación por PLP.

Un volumen de la preparación final de PEPC se concentró por centrifugación a 4,000 rpm en un Centricon 100 hasta llegar a un volumen menor o igual a 100  $\mu\text{l}$ ; se agregó 1 ml de amortiguador de desalado (TEA·HCl 200 mM pH=7.3, EDTA 2 mM) y se concentró nuevamente. Esta operación se repitió por lo menos dos veces para asegurarnos de que la concentración de glicerol remanente fuera despreciable ( $< 0.4\%$ ).

El PLP es extremadamente sensible a la luz por lo que todos los pasos siguientes deben realizarse tomando las precauciones pertinentes.

La disolución de PLP se preparó justo antes de ser utilizada. Una pizca de PLP se disolvió en agua y de esta disolución se tomó una alícuota que se agregó a un volumen final conocido; a ésta dilución se le mide la absorbencia a 388 nm y con el coeficiente de extinción molar  $4900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Blackburn y Schachman, 1976) se calculó la concentración de la disolución de PLP utilizando la siguiente fórmula:

$$[PLP] = \frac{A_{(388\text{nm})} \cdot FD}{4.9}$$

en donde [PLP] es la concentración de PLP en mM de la disolución,  $A_{(388 \text{ nm})}$  es la absorbencia a 388 nm de la alícuota diluida y FD es el factor de dilución.

Se tomaron volúmenes de la enzima concentrada y desalada y se les agregó el ligando correspondiente (ajustado con TEA a pH=7.3), MgCl<sub>2</sub>, oFAB u oFMB y PLP a las concentraciones indicadas hasta tener un volumen final igual al doble del volumen de enzima empleado. Se incubó durante por lo menos una hora a temperatura ambiente.

Transcurrida la incubación se tomaron alícuotas de 5  $\mu\text{l}$  a las cuales se les midió inmediatamente la actividad en 500  $\mu\text{l}$  totales de un medio de reacción estándar sin y con

glucosa-6-fosfato 10 mM. El medio de reacción estándar contiene TEA·HCl 100 mM pH=7.3, EDTA 1 mM, PEP 2.5 mM (concentración final), MgCl<sub>2</sub> 5 mM (concentración final), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 10 mM (concentración final), NADH 0.2 mM (concentración final) y malato deshidrogenasa 2 unidades internacionales. La dilución de 1:100 practicamente detiene las reacciones de inactivación y de desensibilización. La recuperación de la actividad y de la sensibilidad a glucosa-6-fosfato son despreciables en el tiempo que tomaron estos ensayos de actividad (Tovar-Méndez *et al.*, 1997) que en ningún caso fue mayor a 90 segundos.

### 5.2.7. Procesamiento de datos.

#### 5.2.7.1. Datos cinéticos.

Los datos cinéticos se ajustaron mediante una regresión no lineal a la ecuación de velocidad correspondiente utilizando el paquete de cómputo MicroCal Origin (ver. 3.01) y de este ajuste se obtuvieron las constantes cinéticas correspondientes, a saber: V<sub>max</sub> y K<sub>m</sub> o V<sub>max</sub>, S<sub>0.5</sub> y h.

Las ecuaciones que se utilizaron para los ajustes fueron las siguientes:

Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [PEP \cdot Mg]}{K_m + [PEP \cdot Mg]} \quad (1)$$

Hill:

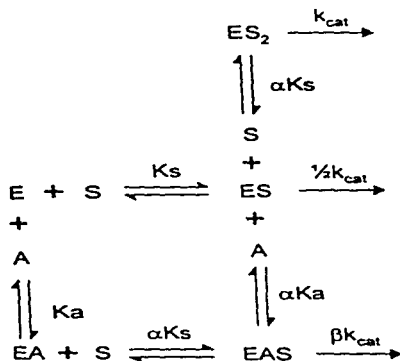
$$v = \frac{V_{max} \cdot [PEP \cdot Mg]^h}{S_{0.5}^h + [PEP \cdot Mg]^h} \quad (2)$$

Inhibición por exceso de sustrato en el modelo de Hill:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [PEP \cdot Mg]^h}{S_{0.5}^h + [PEP \cdot Mg]^h + \left( \frac{[PEP \cdot Mg]^{(h+1)}}{K_i} \right)} \quad (3)$$

En donde  $v$  es la velocidad inicial determinada experimentalmente,  $V_{max}$  la velocidad máxima,  $K_m$  la constante de Michaelis-Menten,  $S_0$  la concentración de sustrato a la cual se tiene la mitad de la  $V_{max}$  y  $h$  el número de Hill.

Por otro lado, proponemos un mecanismo cinético para oFMB, el cual se muestra en el esquema 16.

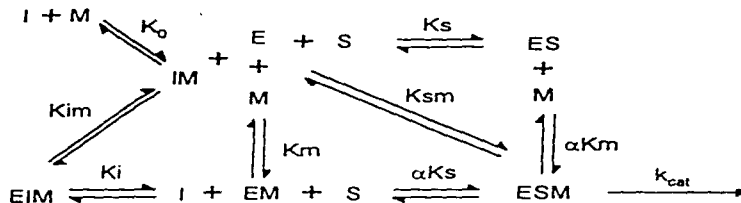


Esquema 16. Mecanismo cinético propuesto para la acción del oFMB, en donde E es PEPC, S es PEP-Mg y A es el activador oFMB.

La ecuación (4) es la ecuación de velocidad resultante del mecanismo cinético propuesto en el esquema 16 en condiciones de equilibrio rápido.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [PEPMg] \cdot \left( \frac{[PEPMg]}{\alpha K_s} + \frac{1}{2} + \frac{\beta \cdot [A]}{\alpha K_a} \right)}{K_s \cdot \left( 1 + \frac{[A]}{K_a} \right) + [PEPMg] \cdot \left( 1 + \frac{[PEPMg]}{\alpha K_s} + \frac{[A]}{\alpha K_a} \right)} \quad (4)$$

Para oFAB proponemos el mecanismo que se muestra en el esquema 17.



Esquema 17. Mecanismo cinético propuesto para la acción del oFAB, en donde E es PEPC, S es PEP, M es  $Mg^{2+}$ , I es oFAB e IM es el complejo oFAB·Mg.

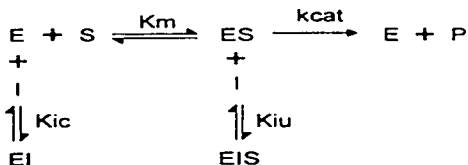
La ecuación (5a) es la ecuación de velocidad resultante del mecanismo cinético propuesto en el esquema 17 en condiciones de equilibrio rápido cuando la concentración de PEP libre es constante.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [PEPMg]}{\alpha K_s K_m K_o \cdot \left(1 + \frac{[Mg]}{K_m} + \frac{[Mg] \cdot [I]}{K_m \cdot K_i}\right) + [PEPMg] \cdot \left(1 + \frac{\alpha K_m}{[Mg]}\right)} \quad (5a)$$

La ecuación (5b) es la ecuación de velocidad resultante del mecanismo cinético propuesto en el esquema 17 en condiciones de equilibrio rápido cuando la concentración de magnesio libre es constante.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [PEPMg]}{\alpha K_s K_m K_o \cdot \left(1 + \frac{[PEP]}{K_s}\right) + [PEPMg] \cdot \left(1 + \frac{\alpha K_s}{[PEP]} + \frac{\alpha K_s \cdot [I]}{[PEP] \cdot K_i}\right)} \quad (5b)$$

Recordemos que en un mecanismo cinético de inhibición mixta en condiciones de equilibrio rápido (esquema 18) es más sencillo que el mecanismo anterior.



Esquema 18. Mecanismo cinético de una inhibición mixta, en donde E es una enzima, S su sustrato e I es un inhibidor mixto.

La ecuación (5c) es la ecuación de velocidad resultante del mecanismo del esquema 18 en condiciones de equilibrio rápido.

$$v = \frac{\frac{V_{max}}{I} \cdot S}{\left(1 + \frac{I}{K_{iu}}\right) \cdot \left(1 + \frac{K_{ic}}{I}\right) + \frac{K_m}{\left(1 + \frac{I}{K_{iu}}\right)}} \quad (5c)$$

### 5.2.7.2. Datos de protección frente a la modificación química.

De los datos de protección frente a la modificación química se calcularon tanto la desprotección del sitio activo como la sensibilidad frente a glucosa-6-fosfato.

La desprotección de sitio activo (D) se calculó según la ecuación 6,

$$D = \frac{v_0 - v_i}{v_0} \quad (6)$$

en donde  $v_0$  es la actividad determinada en ausencia de glucosa-6-fosfato para la concentración de ligando igual a cero y  $v_i$  es la actividad determinada en ausencia de glucosa-6-fosfato para la concentración de ligando  $i$ .

La sensibilidad frente a glucosa-6-fosfato ( $S$ ) se calculó utilizando la ecuación 7,

$$S = \frac{v - v_0}{v_0} \quad (7)$$

en donde  $v$  es la actividad medida en presencia de glucosa-6-fosfato para un valor de ligando  $i$  y  $v_0$  es la actividad medida en ausencia de glucosa-6-fosfato para el mismo valor de ligando  $i$ .



## 6. RESULTADOS.

### 6.1. Constantes de estabilidad global de los complejos con magnesio de los análogos oFMB y oFAB.

Se determinaron las constantes de estabilidad global de los complejos con magnesio de los análogos del PEP utilizados. Los resultados se muestran en las figuras 5 y 6 y el valor de la constante de estabilidad para cada compuesto se muestra en la tabla 2.

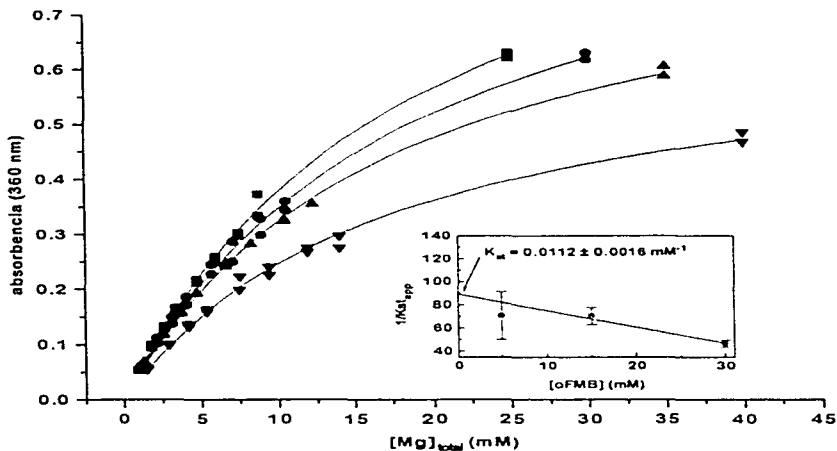


Figura 5. Cálculo de la constante de estabilidad del complejo oFMB-Mg (cf. 5.2.2.). En la gráfica principal se muestran las absorbancias resultantes en ausencia (■) y en presencia de oFMB 5 mM (●), 15 mM (▲) y 30 mM (▼). El inserto es el regráfico de las constantes de estabilidad aparentes en función de la concentración de ligando.

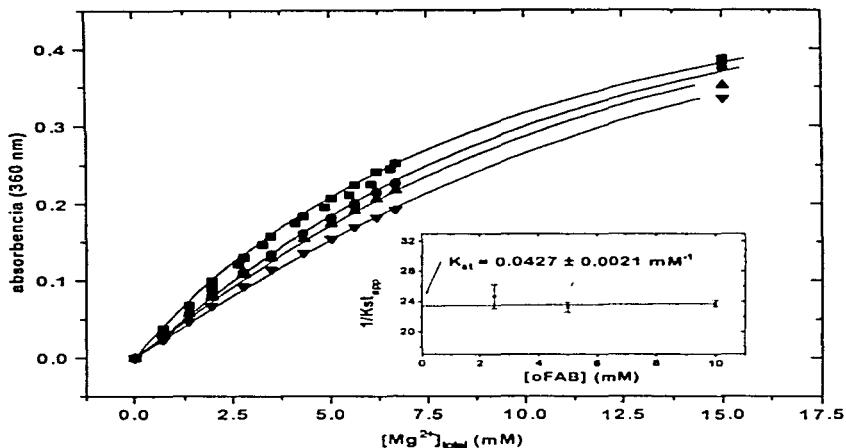


Figura 6. Cálculo de la constante de estabilidad del complejo oFAB·Mg (cf. 5.2.2.). En la gráfica principal se muestran las absorbancias resultantes en ausencia (■) y en presencia de oFAB 2.5 mM (●), 5 mM (▲) y 10 mM (▼). El inserto es el regráfico de las constantes de estabilidad aparentes en función de la concentración de ligando.

Tabla 2. Constantes de estabilidad global ( $K_{st}$ ) de los complejos con magnesio de los análogos oFMB y oFAB.

Complejo	$K_{st}$
oFMB·Mg	$1.120 \cdot 10^{-2} \text{ mM}^{-1}$
oFAB·Mg	$4.270 \cdot 10^{-2} \text{ mM}^{-1}$

## 6.2. Velocidades iniciales.

### 6.2.1. Efecto del oFMB.

Los valores de los parámetros cinéticos que se muestran en cada tabla se obtuvieron del ajuste de los datos presentados en la figura correspondiente a alguna de las ecuaciones presentados en 5.2.7.1. Los valores de  $h=1$  no tienen desviación estándar por tratarse de ajustes a la ecuación de Michaelis-Menten pero se muestran para ilustrar la pérdida de cooperatividad. Los valores de  $V_{max}$  están expresados en  $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$  y los valores de  $K_m$  o  $S_{0.5}$  en mM.

En la figura 7 y en la tabla 3 podemos ver como en presencia de oFMB a PEP libre 0.5 mM y  $\text{pH}=7.3$  se presentó una disminución tanto de la  $S_{0.5}$ , como de la cooperatividad y un aumento ligero en la  $V_{max}$ .

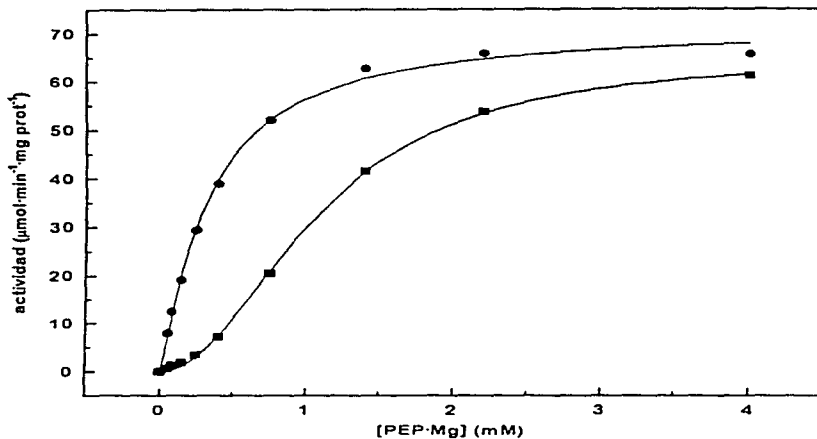


Figura 7. Cinética de saturación de la PEPC para el sustrato PEP·Mg en ausencia ( ■ ) y en presencia de oFMB 5 mM concentración total ( ● ), a PEP libre 0.5 mM y pH=7.3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la saturación de la PEPC por PEP·Mg en ausencia y en presencia de oFMB 5 mM a PEP libre 0.5 mM y pH=7.3.

[oFMB]	0 mM <sup>(1)</sup>	5 mM <sup>(1)</sup>
$V_{max}$	$65.4 \pm 1.0$	$71.3 \pm 1.9$
$S_{0.5}$	$1.08 \pm 0.02$	$0.33 \pm 0.02$
$V_{max}/S_{0.5}$	$60.6 \pm 1.2$	$216.1 \pm 11.4$
$h$	$2.09 \pm 0.07$	$1.20 \pm 0.08$

(1) ajuste a la ecuación del modelo de Hill.

En la figura 8 y en la tabla 4 podemos observar como en presencia de oFMB a PEP libre 5 mM y pH=7.3 existió nuevamente una disminución de la  $S_{0.5}$  y de la cooperatividad,

aunque ahora es de menor magnitud que a PEP libre 0.5 mM; sin embargo, en esta ocasión se observó una ligera disminución de la  $V_{max}$ .

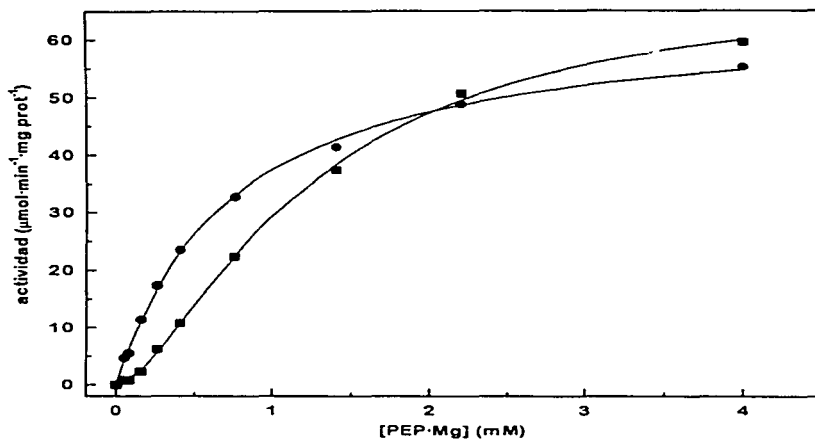


Figura 8. Cinética de saturación de la PEPC para el sustrato PEP·Mg en ausencia (■) y en presencia de oFMB 5 mM concentración total (●), a PEP libre 5 mM y pH=7.3.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la saturación de la PEPC por PEP-Mg en ausencia y en presencia de oFMB 5 mM a PEP libre 5 mM y pH=7.3.

[oFMB]	0 mM <sup>(1)</sup>	5 mM <sup>(2)</sup>
$V_{max}$	69.9 ± 1.8	64.5 ± 0.9
$S_{0.5}$ o $K_m$	1.23 ± 0.06	0.72 ± 0.03
$V_{max}/S_{0.5}$ o $K_m$	56.8 ± 2.3	89.8 ± 3.2
$h$	1.53 ± 0.06	1.00

(1) ajuste a la ecuación del modelo de Hill. (2) ajuste a la ecuación del modelo de Michaelis-Menten.

En la figura 9 y en la tabla 5 podemos observar como en presencia de oFMB a  $Mg^{2+}$  libre 0.1 mM y pH=7.3 hubo una disminución de la  $S_{0.5}$  y de la cooperatividad, mientras que la  $V_{max}$  permaneció esencialmente igual

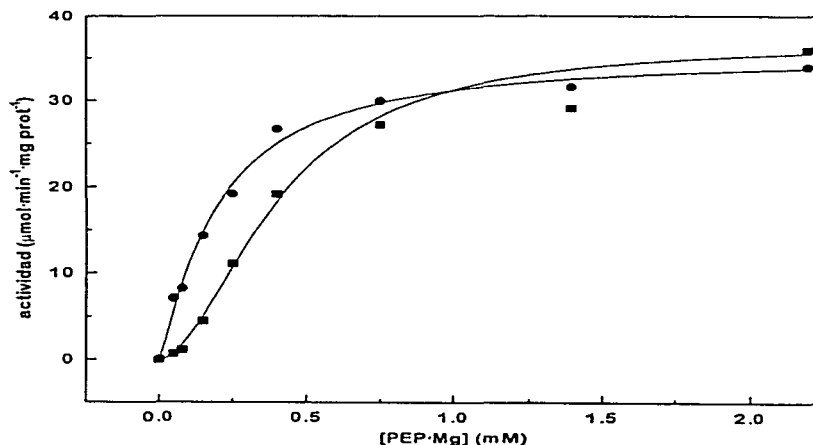


Figura 9. Cinética de saturación de la PEPC para el sustrato PEP·Mg en ausencia (■) y en presencia de oFMB 5 mM (●), a  $Mg^{2+}$  libre 0.1 mM y pH=7.3.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de la saturación de la PEPC por PEP·Mg en ausencia y en presencia de oFMB 5 mM a  $Mg^{2+}$  libre 0.1 mM y pH7.3.

[oFMB]	0 mM <sup>(1)</sup>	5 mM <sup>(1)</sup>
$V_{max}$	$37.0 \pm 1.0$	$35.6 \pm 1.5$
$S_{0.5}$	$0.40 \pm 0.02$	$0.20 \pm 0.02$
$V_{max}/S_{0.5}$	$91.8 \pm 3.9$	$180.6 \pm 16.9$
h	$1.86 \pm 0.12$	$1.22 \pm 0.13$

(1) ajuste a la ecuación del modelo de Hill.

En la figura 10 y en la tabla 6 podemos observar como en presencia de oFMB y a  $Mg^{2+}$  libre 0.5 mM y pH=7.3 se encontró una disminución de la  $S_{0.5}$  y de la cooperatividad de menor grado que a  $Mg^{2+}$  libre 0.1 mM, aunque ahora se observó una ligera disminución de la  $V_{max}$ .

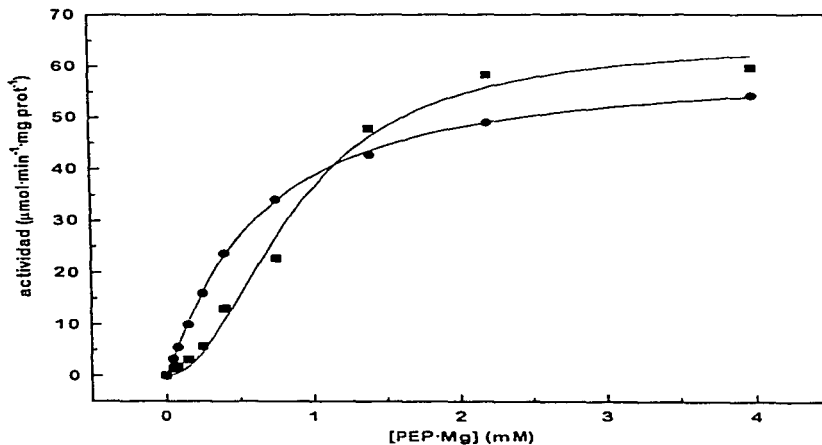


Figura 10. Cinética de saturación de la PEPC para el sustrato PEP·Mg en ausencia (■) y en presencia de oFMB 5 mM totales (●), a  $Mg^{2+}$  libre 0.5 mM y pH=7.3.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la saturación de la PEPC por PEP·Mg en ausencia y en presencia de oFMB 5 mM a Mg<sup>2+</sup> libre 0.5 mM y pH=7.3.

[oFMB]	0 mM <sup>(1)</sup>	5 mM <sup>(1)</sup>
V <sub>max</sub>	65.0 ± 3.5	60.5 ± 0.9
S <sub>0.5</sub>	0.90 ± 0.08	0.61 ± 0.02
V <sub>max</sub> /S <sub>0.5</sub>	72.6 ± 5.9	99.1 ± 3.1
h	2.00 ± 0.26	1.13 ± 0.03

(1) ajuste a la ecuación del modelo de Hill.

Para caracterizar mejor la activación causada por el oFMB se realizó un patrón de activación completo a PEP libre 0.5 mM (figura 11 y tabla 7), que es la condición en donde el efecto activador era más claro. Se observó que al aumentar la concentración del oFMB disminuyó la S<sub>0.5</sub>[PEP·Mg] y la cooperatividad de la PEPC mientras que la V<sub>max</sub> no se modificó de manera significativa. Las curvas fueron trazadas ajustando los datos a la ecuación de velocidad del modelo cinético propuesto para este activador (cf. 5.2.8.1). De este ajuste se obtuvieron los parámetros cinéticos mostrados en la tabla 8.



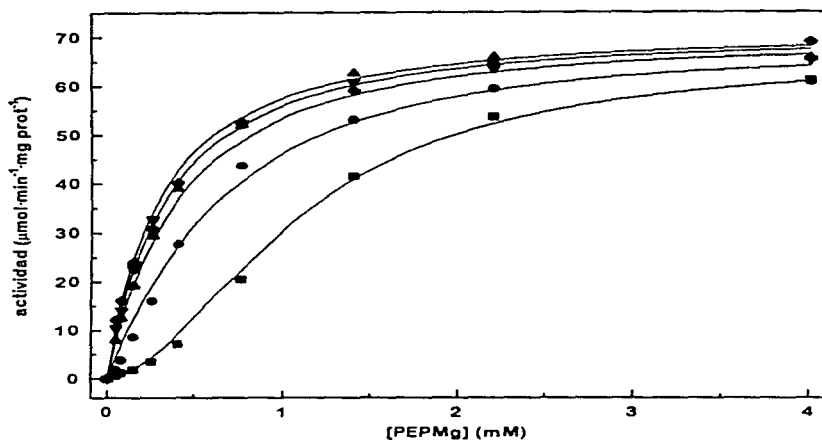


Figura 11. Cinética de saturación de la PEPC para el sustrato PEP·Mg en ausencia (■) y en presencia de oFMB 2 mM (●), 5 mM (▲), 7.5 mM (▼) y 10 mM totales (◆), a PEP libre 0.5 mM y pH=7.3.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de la saturación de la PEPC por PEP·Mg en ausencia y en presencia de oFMB a PEP libre 0.5 mM y pH=7.3.

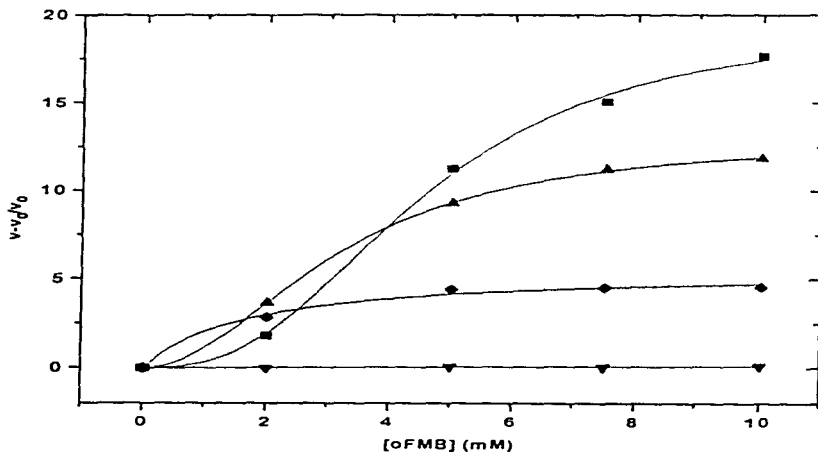
[oFMB]	0 mM <sup>(1)</sup>	2 mM <sup>(1)</sup>	5 mM <sup>(1)</sup>	7.5 mM <sup>(1)</sup>	10 mM <sup>(2)</sup>
$V_{max}$	$65.4 \pm 1.0$	$62.9 \pm 0.7$	$71.3 \pm 1.9$	$70.5 \pm 1.4$	$73.7 \pm 1.1$
$S_{0.5}$ o $K_m$	$1.08 \pm 0.02$	$0.46 \pm 0.01$	$0.33 \pm 0.02$	$0.29 \pm 0.02$	$0.32 \pm 0.02$
$V_{max}/S_{0.5}$ o $K_m$	$60.6 \pm 1.2$	$135.4 \pm 3.1$	$217.6 \pm 13.8$	$243.2 \pm 12.0$	$232.0 \pm 10.6$
h	$2.09 \pm 0.07$	$1.64 \pm 0.05$	$1.20 \pm 0.08$	$1.07 \pm 0.05$	1.00

(1) ajuste a la ecuación del modelo de Hill. (2) ajuste a la ecuación del modelo de Michaelis-Menten.

Tabla 8. Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los datos de la figura 7 a la ecuación (4) (cf. 5.2.7.1.).

$V_{max}$	$66.6 \pm 1.7$
$K_s$	$6.78 \pm 1.29$
$K_a$	$7.42 \pm 1.90$
$\alpha$	$0.0260 \pm 0.0085$
$\beta$	$1.124 \pm 0.047$

Cuando los datos obtenidos en este experimento se graficaron en función de la concentración de oFMB (figura 12) se pudo observar que la activación por oFMB es significativa y que tuvo un comportamiento cooperativo a bajas concentraciones de PEP·Mg, mientras que a concentraciones saturantes del mismo dicha activación se hizo inexistente.



**Figura 12.** Activación relativa de la PEPC en función de la concentración de oFMB para una misma concentración de sustrato PEP·Mg de 0.05 mM (■), 0.15 mM (●), 0.4 mM (▲) y 4 mM (▼). Por razones de claridad de la figura no se muestran todos los datos.

Puesto que oFMB se comportaba como un activador de la PEPC, se decidió realizar un experimento manteniendo fijas las concentraciones de PEP libre a 0.5 mM y de PEP·Mg a 0.4 mM en ausencia o presencia de glucosa-6-fosfato 5 mM o glicina 5 mM (dos activadores de la enzima) y a concentraciones crecientes de oFMB. Los resultados se muestran en la figura 13. Podemos observar como, en ausencia de glucosa-6-fosfato o glicina, al aumentar la concentración de oFMB la PEPC se activó, en presencia de glicina el efecto de ambos activadores fue aditivo y, sin embargo, en presencia de glucosa-6-fosfato se observa una clara disminución en la activación de la PEPC, directamente proporcional a la concentración de oFMB.

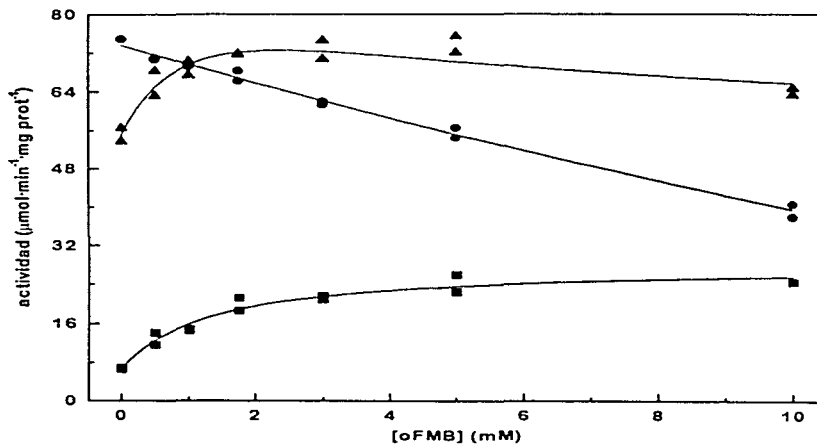


Figura 13. Cinética de saturación de la PEPC para el activador oFMB en ausencia (■) y en presencia de glucosa-6-fosfato 5 mM (●) o glicina 5 mM (▲), a PEP libre 0.5 mM, PEP·Mg 0.4 mM y pH=7.3.

Finalmente, se realizaron cinéticas de saturación en presencia de glucosa-6-fosfato 1 mM y/o oFMB 5 mM a pH=7.3 (figura 14 y tabla 9). Se observan claramente el efecto

activador de la glucosa-6-fosfato (aumento de la  $V_{max}$  y disminución de la  $S_{0.5}$  sin pérdida de la cooperatividad) y del oFMB pero cuando ambos están presentes y a las concentraciones empleadas se tuvo un efecto intermedio sobre las constantes cinéticas.

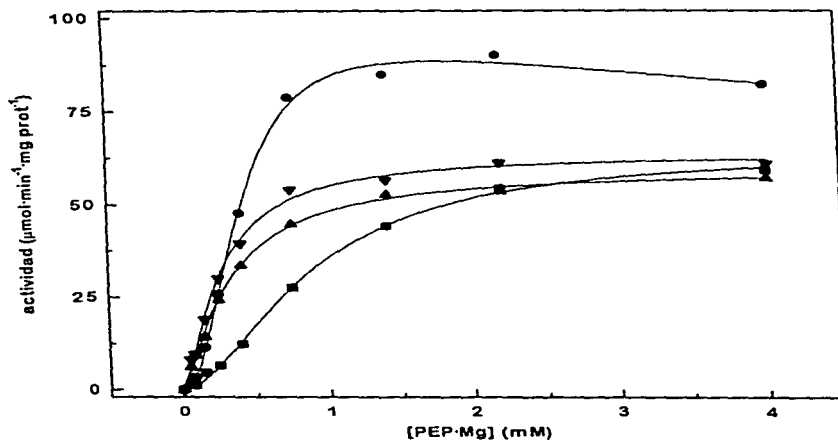


Figura 14. Cinética de saturación de la PEPC para el sustrato PEP·Mg en ausencia (■) y en presencia de glucosa-6-fosfato 1 mM (●), oFMB 5 mM (▲) o glucosa-6-fosfato 1 mM + oFMB 5 mM (▼), a PEP libre 0.5 mM y pH=7.3.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de la saturación de la PEPC por PEP·Mg en ausencia y en presencia de oFMB y/o glucosa-6-fosfato a PEP libre 0.5 mM y pH=7.3.

[ligando]	0 mM <sup>(1)</sup>	1 mM G6P <sup>(2)</sup>	5 mM oFMB <sup>(1)</sup>	1 mM G6P + 5 mM oFMB <sup>(1)</sup>
V <sub>max</sub>	63.1 ± 1.1	122.0 ± 7.6	71.3 ± 1.9	75.6 ± 1.5
S <sub>0.5</sub> o K <sub>m</sub>	1.03 ± 0.03	0.61 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.56 ± 0.02
V <sub>max</sub> /S <sub>0.5</sub> o K <sub>m</sub>	61.3 ± 1.5	200.7 ± 13.6	216.1 ± 11.4	135.7 ± 5.2
h	2.11 ± 0.09	2.01 ± 0.13	1.20 ± 0.08	1.48 ± 0.07
K <sub>i</sub>	---	15.3 ± 5.0	---	---

(1) ajuste a la ecuación del modelo de Hill. (2) ajuste a la ecuación del modelo de inhibición por exceso de sustrato en el modelo de Hill.

Este último experimento se realizó también a pH=8.3 (figura 15 y tabla 10), pH al cual la enzima perdió su cooperatividad; se observó un comportamiento similar al que se tuvo a pH=7.3 con respecto a la respuesta de la enzima a los activadores.

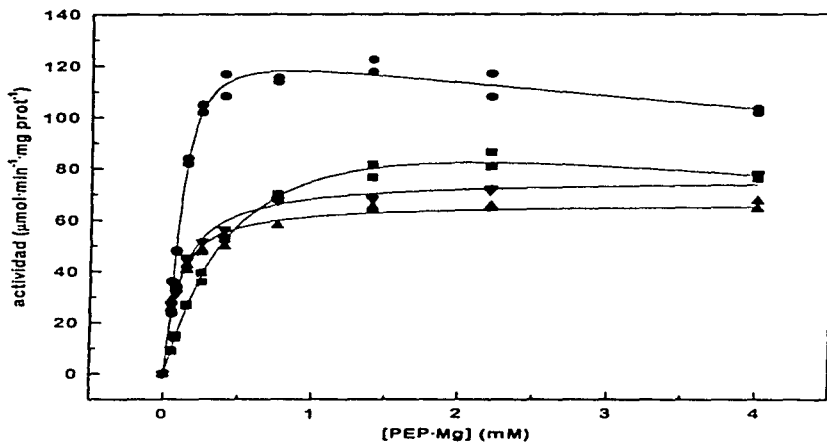


Figura 15. Cinética de saturación de la PEPC para el sustrato PEP·Mg en ausencia (■) y en presencia de glucosa-6-fosfato 1 mM (●), oFMB 5 mM (▲) o glucosa-6-fosfato 1 mM + oFMB 5 mM (▼), a PEP libre 0.5 mM y pH=8.3.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de la saturación de la PEPC por PEP-Mg en ausencia y en presencia de oFMB y/o glucosa-6-fosfato a PEP libre 0.5 mM y pH=8.3.

[ligando]	0 mM <sup>(1)</sup>	1 mM glucosa-6-fosfato <sup>(1)</sup>	5 mM oFMB <sup>(2)</sup>	1 mM G6P + 5 mM oFMB <sup>(2)</sup>
$V_{max}$	115.5 ± 9.8	127.3 ± 4.1	66.5 ± 1.0	75.7 ± 1.2
$S_{0.5}$ o $K_m$	0.47 ± 0.08	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.01
$V_{max}/S_{0.5}$ o $K_m$	247.3 ± 35.9	1221.2 ± 62.1	811.1 ± 53.4	695.2 ± 45.9
h	1.08 ± 0.07	1.68 ± 0.14	1.00	1.00
$K_i$	10.1 ± 2.8	17.3 ± 4.5	---	---

(1) ajuste a la ecuación de inhibición por exceso de sustrato en el modelo de Hill. (2) ajuste a la ecuación del modelo de Michaelis-Menten.

### 6.2.2. Efecto del oFAB.

En la figura 16 se presenta un patrón de inhibición completo a PEP libre 0.5 mM y pH=7.3 y las constantes cinéticas resultantes se muestran en la tabla 11. Podemos observar que el oFAB se comporta como un inhibidor de la PEPC, provocando una disminución de la  $V_{max}$  y un aumento de la  $S_{0.5}$  con pérdida de la cooperatividad.

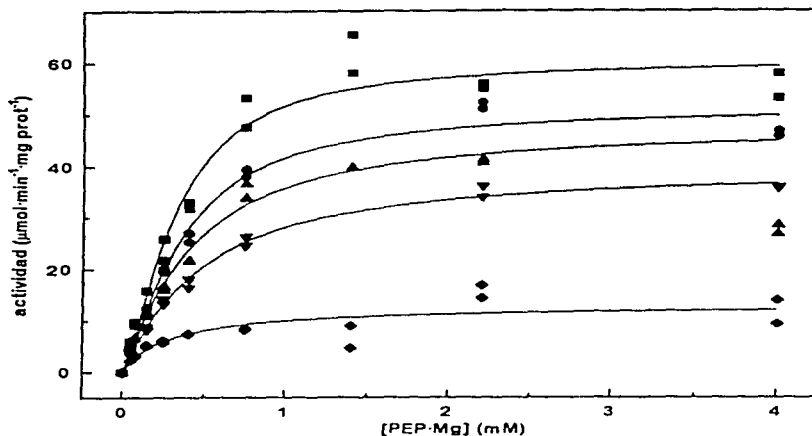


Figura 16. Cinética de saturación de la PEPC para el sustrato PEP·Mg en ausencia (■) y en presencia de oFAB 0.5 mM (●), 1 mM (▲), 2 mM (▼) y 5 mM totales (◆), a PEP libre 0.5 mM y pH=7.3.

Tabla 11. Parámetros cinéticos de la saturación de la PEPC por PEP·Mg en ausencia y en presencia de oFAB a PEP libre 0.5 mM y pH=7.3.

[oFAB]	0 mM <sup>(1)</sup>	0.5 mM <sup>(1)</sup>	1 mM <sup>(1)</sup>	2 mM <sup>(1)</sup>	5 mM <sup>(2)</sup>
$V_{max}$	60.3 ± 2.6	51.4 ± 1.9	47.6 ± 2.6	39.7 ± 1.3	12.9 ± 1.4
$S_{0.5}$ o $K_m$	0.31 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.40 ± 0.05	0.46 ± 0.04	0.29 ± 0.11
$V_{max}/S_{0.5}$ o $K_m$	195.7 ± 18.1	146.6 ± 11.6	119.3 ± 13.0	87.0 ± 6.3	45.0 ± 15.3
h	1.53 ± 0.21	1.40 ± 0.16	1.21 ± 0.11	1.14 ± 0.08	1.00

(1) ajuste a la ecuación del modelo de Hill. (2) ajuste a la ecuación del modelo de Michaelis-Menten.

Un nuevo patrón de inhibición a pH=7.3 ahora a  $Mg^{2+}$  libre 5 mM se muestra en la figura 17 y los parámetros cinéticos resultantes en la tabla 12. Se volvió a observar que el oFAB



es un inhibidor de la PEPC aunque en estas condiciones su efecto fue de mucho menor magnitud y no parece haber pérdida de la cooperatividad.

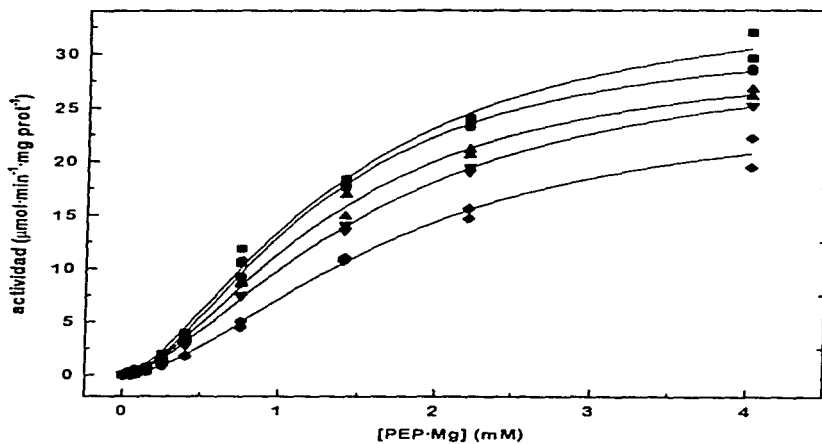


Figura 17. Cinética de saturación de la PEPC para el sustrato PEP·Mg en ausencia (■) y en presencia de oFAB 0.5 mM (●), 1 mM (▲), 2 mM (▼) y 5 mM totales (◆), a  $Mg^{2+}$  libre 5 mM y pH=7.3.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de la saturación de la PEPC por PEP·Mg en ausencia y en presencia de oFAB a  $Mg^{2+}$  libre 5 mM y pH=7.3.

[oFAB]	0 mM <sup>(1)</sup>	0.5 mM <sup>(1)</sup>	1 mM <sup>(1)</sup>	1 mM <sup>(1)</sup>	5 mM <sup>(1)</sup>
$V_{max}$	35.8 ± 1.6	32.0 ± 0.6	30.3 ± 0.9	30.9 ± 0.5	25.6 ± 1.5
$S_{0.5}$	1.35 ± 0.10	1.22 ± 0.04	1.33 ± 0.06	1.59 ± 0.05	1.72 ± 0.15
$V_{max}/S_{0.5}$	26.5 ± 1.7	26.1 ± 0.7	22.7 ± 0.9	19.4 ± 0.5	14.9 ± 1.1
h	1.59 ± 0.10	1.74 ± 0.06	1.69 ± 0.07	1.60 ± 0.04	1.72 ± 0.13

(1) ajuste a la ecuación del modelo de Hill.

Es necesario resaltar que, al aumentar la concentración del sustrato PEP·Mg y manteniendo el PEP libre constante, aumenta de forma considerable la concentración de  $Mg^{2+}$  libre y por lo tanto la concentración del complejo oFAB·Mg.

De los datos de la figura 17 se hizo un gráfico de los valores de  $V_{max}$  y  $V_{max}/S_{0.5}$  (figura 18).

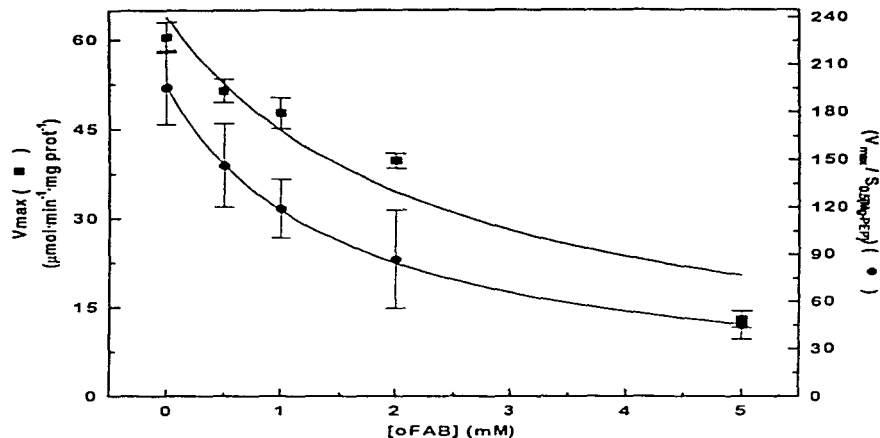


Figura 18. Regráfico de los valores de  $V_{max}$  (■) y  $V_{max} / S_{o5}$  (●) obtenidos en el experimento de la figura 16. Las curvas son el resultado del ajuste de los datos a la ecuación que determina el comportamiento de dichos valores (ver ecuación 5c, cf. 5.2.7.1.).

De estos gráficos se obtienen los valores de  $K_{ic}$  y  $K_{iu}$  mostrados en la tabla 13.

Tabla 13. Constantes de inhibición competitiva (unión a la enzima libre;  $K_{ic}$ ) y acompetitiva (unión al complejo enzima-PEP-Mg;  $K_{iu}$ ) para oFAB.

$K_{ic}$	$K_{iu}$
$1.52 \pm 0.43$ mM	$2.34 \pm 0.22$ mM

Finalmente, ya que los resultados sugerían que la inhibición por oFAB presentaba un componente competitivo importante, se realizaron dos experimentos: por un lado, se hicieron curvas de saturación a  $Mg^{2+}$  libre 0.5 mM en ausencia y en presencia de oFAB 1

mM y en presencia de la misma concentración de complejo oFAB·Mg que hay con 1 mM de oFAB pero a Mg<sup>2+</sup> libre 5 mM (figura 19).

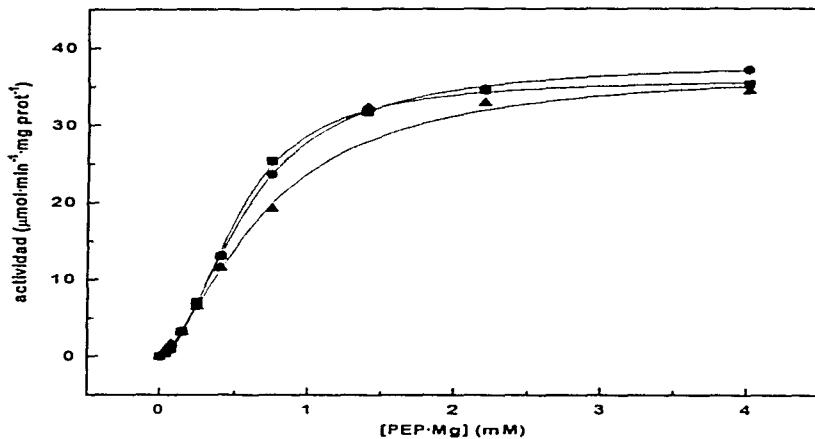


Figura 19. Cinética de saturación de la PEPC para el sustrato PEP·Mg, a Mg<sup>2+</sup> libre 0.5 mM y pH=7.3, en ausencia (■) y en presencia de oFAB 1 mM (●), y la concentración de oFAB·Mg que habría si la curva se hubiese realizado a Mg<sup>2+</sup> libre 5 mM (▲).

Tabla 14. Parámetros cinéticos de la saturación de la PEPC por PEP·Mg en ausencia y en presencia de oFAB a Mg<sup>2+</sup> libre 0.5 mM y pH=7.3.

[oFAB]	0 mM <sup>(1)</sup>	1 mM <sup>(1)</sup>	equivalente <sup>(1)</sup>
V <sub>max</sub>	36.0 ± 0.4	38.2 ± 0.3	37.4 ± 0.9
S <sub>0.5</sub>	0.51 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.70 ± 0.04
V <sub>max</sub> /S <sub>0.5</sub>	70.6 ± 1.2	67.0 ± 1.0	53.4 ± 2.7
h	2.03 ± 0.07	1.80 ± 0.04	1.53 ± 0.09

(1) ajuste a la ecuación del modelo de Hill.

Podemos observar que a 1 mM de oFAB y Mg<sup>2+</sup> libre 0.5 mM no hubo inhibición notable de la PEPC mientras que a la concentración de oFAB·Mg [Mg<sup>2+</sup> libre 5 mM] la inhibición fue mayor, aunque muy modesta si pensamos que la concentración de la especie libre (oFAB) es de aproximadamente 8 mM.

Siguiendo el mismo principio se hizo el experimento complementario a una concentración de Mg<sup>2+</sup> libre 5 mM (figura 20).

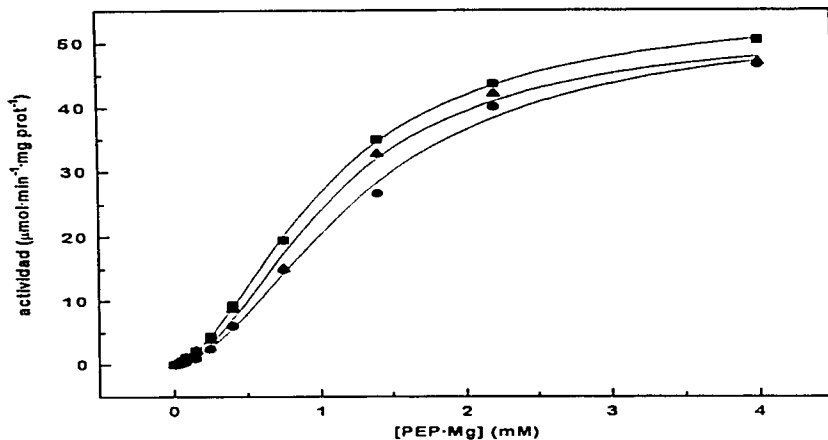


Figura 20. Cinética de saturación de la PEPC para el sustrato PEP·Mg, a  $Mg^{2+}$  libre 5 mM y pH=7.3, en ausencia (■) y en presencia de oFAB 1 mM (●), y la concentración de oFAB·Mg que habría si la curva se hubiera realizado a  $Mg^{2+}$  libre 0.5 mM (▲).

Tabla 15. Parámetros cinéticos de la saturación de la PEPC por PEP·Mg en ausencia y en presencia de oFAB a  $Mg^{2+}$  libre 0.5 mM y pH=7.3.

[oFAB]	0 mM <sup>(1)</sup>	1 mM <sup>(1)</sup>	equivalente <sup>(1)</sup>
$V_{max}$	$55.8 \pm 0.8$	$53.7 \pm 2.4$	$52.3 \pm 2.5$
$S_{0.5}$	$1.05 \pm 0.03$	$1.31 \pm 0.09$	$1.09 \pm 0.09$
$V_{max}/S_{0.5}$	$53.1 \pm 1.3$	$41.0 \pm 2.5$	$48.0 \pm 3.4$
h	$1.70 \pm 0.04$	$1.79 \pm 0.13$	$1.84 \pm 0.17$

(1) ajuste a la ecuación del modelo de Hill.

Podemos observar que a 1 mM de oFAB hubo una ligera inhibición, mientras que a la concentración de oFAB·Mg [ $Mg^{2+}$  libre 0.5 mM] se tuvo un efecto mucho menor sobre la PEPC.

### 6.3. Ensayos de protección frente a la modificación por PLP.

Con el propósito de determinar si el sitio de unión de los análogos empleados es el sitio activo (que parecía ser el caso para oFAB·Mg) y/o el sitio alostérico para glucosa-6-fosfato (que parecía ser el caso para oFMB) se realizaron ensayos de protección frente a la modificación por PLP.

Los valores de actividad se expresan como  $\mu\text{mol NADH transformado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml de enzima}^{-1}$ .

En un primer experimento se incubó a la enzima a  $\text{pH}=7.3$  con PLP 1.2 mM, en ausencia de  $Mg^{2+}$  y a las concentraciones indicadas de oFAB u oFMB (figura 21).

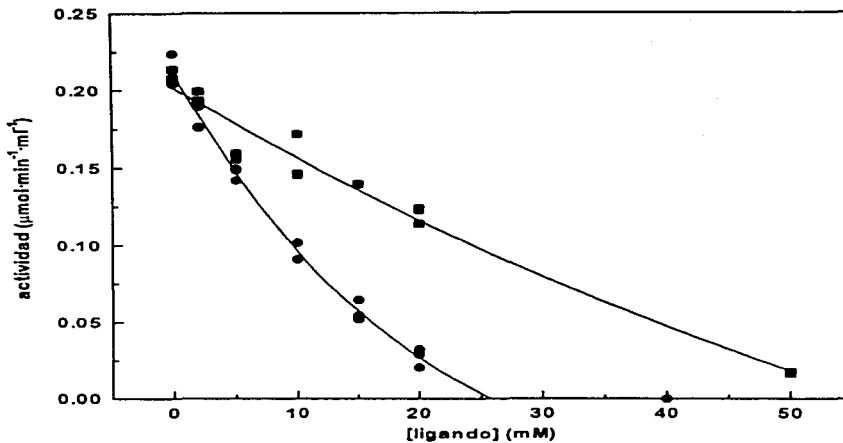


Figura 21. Efecto del PLP sobre la actividad de la PEPC. La enzima fue incubada en presencia de PLP 1.2 mM a las concentraciones indicadas de oFMB (■) y oFAB (●). La actividad fue determinada en ausencia de glucosa-6-fosfato.

Podemos observar que no sólo no existió protección del sitio activo, sino que la actividad remanente disminuyó de forma exponencial al aumentar la concentración del ligando; dicho de otra manera, ambos análogos se están uniendo a un sitio diferente del sitio activo, provocando una desprotección de este último. Con los datos de este experimento se graficó la desprotección del sitio activo (figura 22) lo que nos permitió calcular las constantes aparentes para la disociación de dichos ligandos de su sitio de unión (véase más adelante la tabla 16).



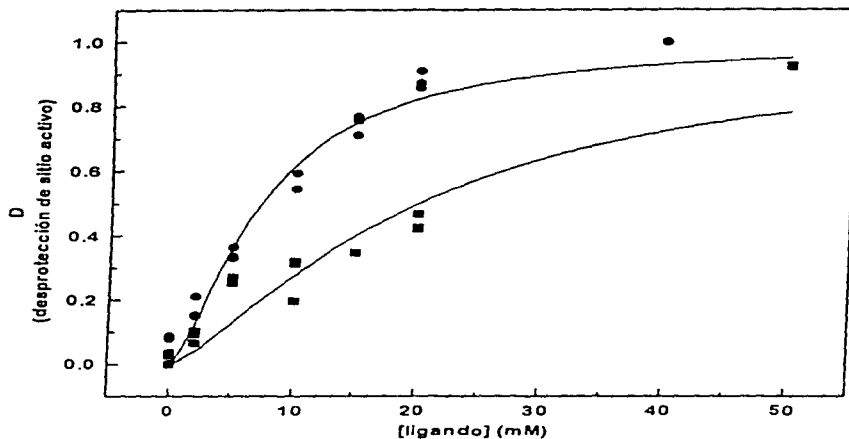


Figura 22. Desprotección del sitio activo provocada por oFMB y oFAB. La desprotección se calculó según la ecuación (6) (cf. 5.2.7.2.) para oFMB (■) y oFAB (●) a partir de los datos obtenidos en el experimento mostrado en la figura 22. Las curvas son el resultado del ajuste de los datos a la ecuación del modelo de Hill con la restricción  $D_{\max} = 1$ .

En una segunda fase se hicieron cuatro experimentos en donde la enzima se incubó a pH=7.3 en presencia de PLP 0.8 mM, en ausencia o presencia de  $Mg^{2+}$  10 mM libre y las concentraciones indicadas de oFAB u oFMB (figuras 23, 25, 27 y 28).

En presencia de oFAB y en ausencia de  $Mg^{2+}$  (figura 23) se observó nuevamente una desprotección del sitio activo y no se observó protección del sitio alostérico para glucosa-6-fosfato.

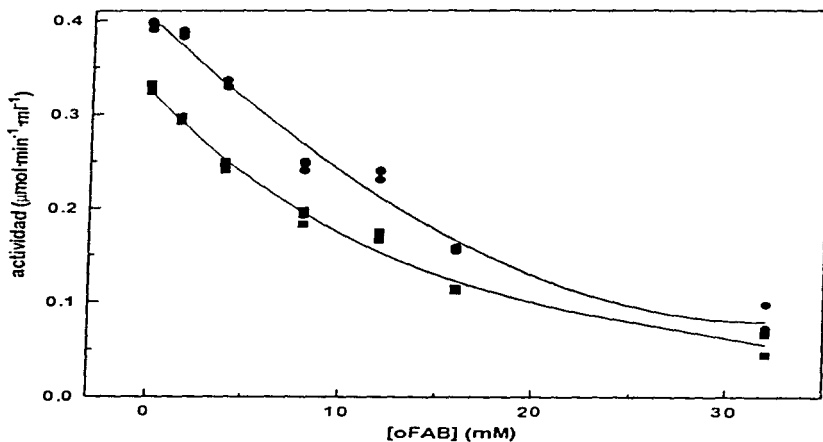


Figura 23. Efecto del PLP sobre la actividad de la PEPC. La enzima fue incubada en presencia de PLP 0.8 mM a las concentraciones indicadas de oFAB. La actividad fue determinada en ausencia (■) y en presencia de glucosa-6-fosfato 10 mM (●).

De los datos anteriores se calculó la desprotección del sitio activo producida por el oFAB en presencia de  $Mg^{2+}$  (figura 24). El dato de  $K_{d-app}$  obtenido se presenta en la tabla 16.

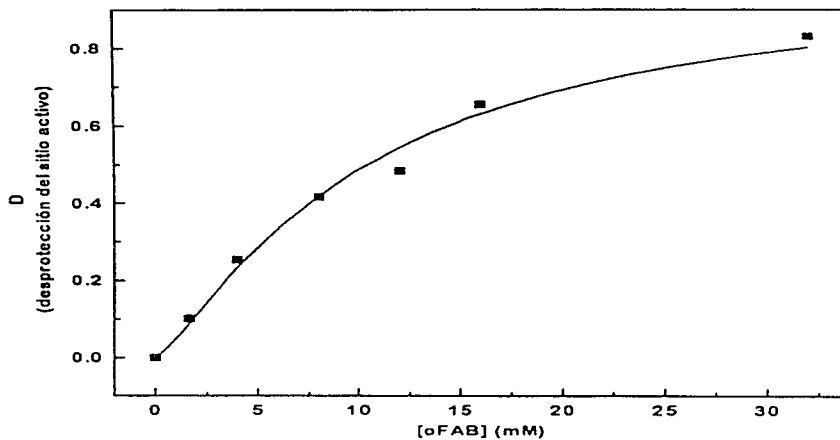


Figura 24. Desprotección del sitio activo provocada por oFAB. La desprotección se calculó según la ecuación (6) (cf. 5.2.7.2.) a partir de los datos obtenidos en el experimento mostrado en la figura 23. La curva es el resultado del ajuste de los datos a la ecuación del modelo de Hill con la restricción  $D_{max} = 1$ .

En presencia de oFAB y  $Mg^{2+}$  libre 10 mM (figura 25) se volvió a observar la desprotección del sitio activo, sin protección del sitio alostérico.

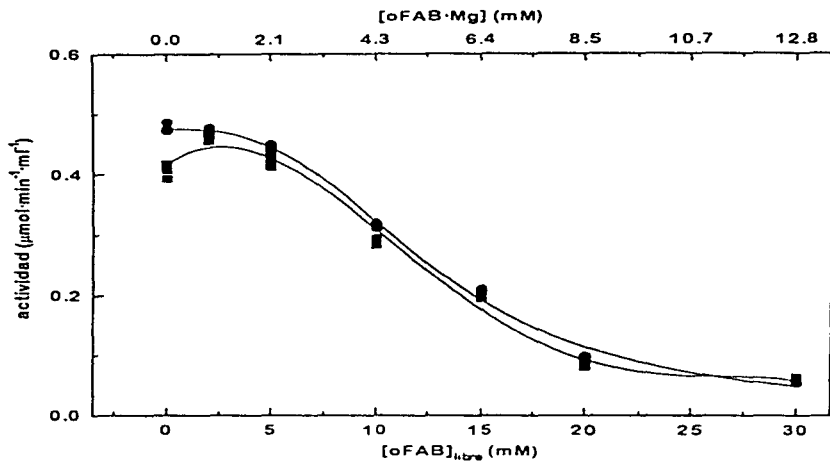


Figura 25. Efecto del PLP sobre la actividad de la PEPC. La enzima fue incubada en presencia de PLP 0.8 mM y  $Mg^{2+}$  10 mM libre a las concentraciones indicadas de oFAB. La actividad fue determinada en ausencia (■) y en presencia de glucosa-6-fosfato 10 mM (●).

Nuevamente se hizo el cálculo de la desprotección del sitio activo provocada por oFAB en presencia de  $Mg^{2+}$  (figura 26). El dato de  $K_{d-app}$  obtenido se presentan en la tabla 16.

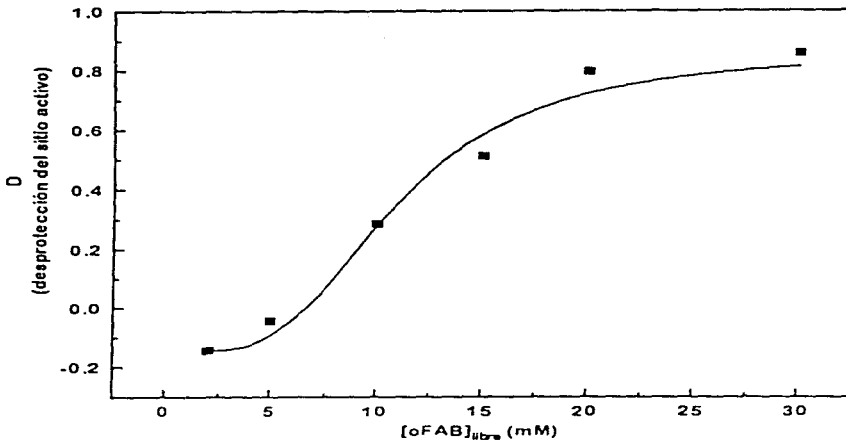


Figura 26. Desprotección del sitio activo provocada por oFAB en presencia de  $Mg^{2+}$ . La desprotección se calculó según la ecuación (6) (cf. 5.2.7.2.) a partir de los datos obtenidos en el experimento mostrado en la figura 25. La curva es el resultado del ajuste de los datos a la ecuación del modelo de Hill con la restricción  $D_{max} = 1$ .

Tabla 16. Constantes de disociación aparentes de los análogos oFMB y oFAB obtenidos mediante un ajuste a la ecuación del modelo de Hill con la restricción  $D_{max}=1$ .

Análogo	oFMB	oFAB (PLP 1.2 mM, sin $Mg^{2+}$ )	oFAB (PLP 0.8 mM, sin $Mg^{2+}$ )	oFAB (PLP 0.8 mM, con $Mg^{2+}$ )
$K_{d-app}$	$20.0 \pm 1.7$	$7.2 \pm 0.4$	$10.4 \pm 0.6$	$9.0 \pm 0.7$
h	$1.39 \pm 0.21$	$1.51 \pm 0.12$	$1.25 \pm 0.11$	$2.68 \pm 0.50$

Se puede observar en esta tabla como la  $K_{d-app}$  para oFMB fue unas tres veces mayor que para oFAB; la unión de oFAB no pareció depender de la concentración de magnesio

aunque las  $K_{d-app}$  obtenidas para oFAB sí parecen depender de la concentración de PLP presente.

En presencia de oFMB en ausencia de  $Mg^{2+}$  (figura 27) se observó nuevamente desprotección del sitio activo, aunque es más modesta que en presencia de PLP 1.2 mM (figura 21) y sólo se manifiesta claramente a concentraciones altas de ligando, a diferencia de lo que ocurría con oFAB. En este caso no se observó una protección frente a la insensibilización, aunque tampoco se observó la desprotección del sitio alostérico.

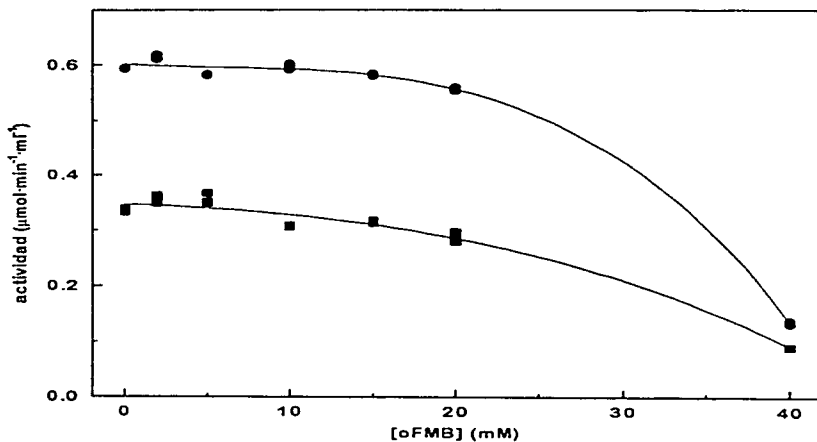


Figura 27. Efecto del PLP sobre la actividad de la PEPC. La enzima fue incubada en presencia de PLP 0.8 mM a las concentraciones indicadas de oFMB. La actividad fue determinada en ausencia (■) y en presencia de glucosa-6-fosfato 10 mM (●).

En presencia de oFMB y  $Mg^{2+}$  libre 10 mM (figura 28) observamos nuevamente desprotección del sitio activo sin protección del sitio alostérico para glucosa-6-fosfato.

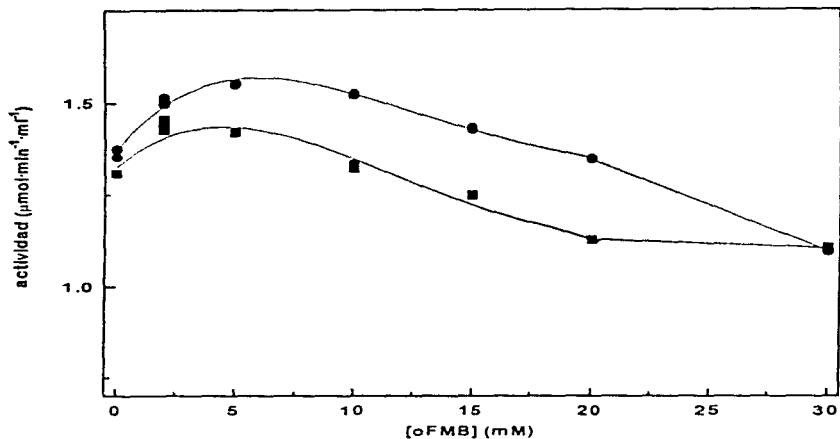


Figura 28. Efecto del PLP sobre la actividad de la PEPC. La enzima fue incubada en presencia de PLP 0.8 mM y  $Mg^{2+}$  10 mM libre a las concentraciones indicadas de oFMB. La actividad fue determinada en ausencia (■) y en presencia de glucosa-6-fosfato 10 mM (●).

Finalmente se realizaron dos experimentos en presencia de 25 mM de fosfoglicolato y 15 mM de magnesio (concentraciones totales) para proteger al sitio activo de la modificación química y en ausencia o en presencia de oFAB (figura 29) o de oFMB (figura 31). En presencia de oFAB podemos observar como existe una ligera desprotección del sitio activo sin protección del sitio alostérico para glucosa-6-fosfato.

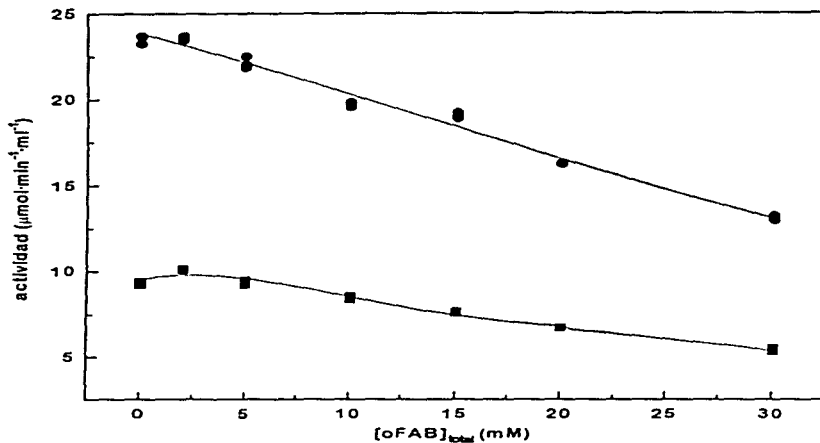


Figura 29. Efecto del PLP sobre la actividad de la PEPC. La enzima fue incubada en presencia de PLP 0.4 mM, fosfoglicolato 25 mM y  $Mg^{2+}$  15 mM (concentraciones totales) a las concentraciones indicadas de oFAB. La actividad fue determinada en ausencia (■) y en presencia de glucosa-6-fosfato 10 mM (●).

De los datos anteriores se pudo calcular la desprotección del sitio activo (figura 30); la unión del oFAB fue ligeramente cooperativa ( $h=1.20 \pm 0.06$ ) y la  $K_{d-app}$  fue ahora de  $28.0 \pm 1.0$  mM, el cual es un valor 3 veces mayor que las  $K_{d-app}$  obtenidas en ausencia de ligandos para este mismo compuesto.



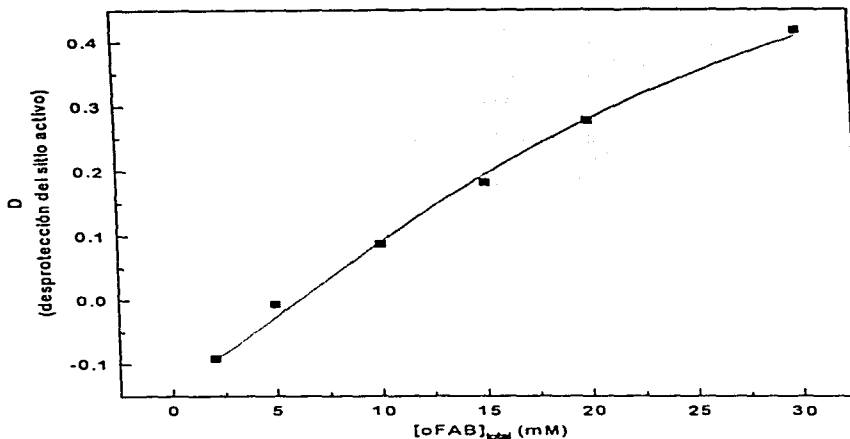


Figura 30. Desprotección del sitio activo provocada por oFAB en presencia de fosfoglicolato-Mg. La desprotección se calculó según la ecuación (6) (cf. 5.2.7.2.) a partir de los datos obtenidos en el experimento mostrado en la figura 29. La curva es el resultado del ajuste de los datos a la ecuación del modelo de Hill con la restricción  $D_{max} = 1$ .

A las mismas concentraciones de fosfoglicolato y magnesio en presencia de oFMB (figura 31) se observó una clara protección del sitio alostérico para glucosa-6-fosfato, sin un efecto significativo sobre el sitio activo.

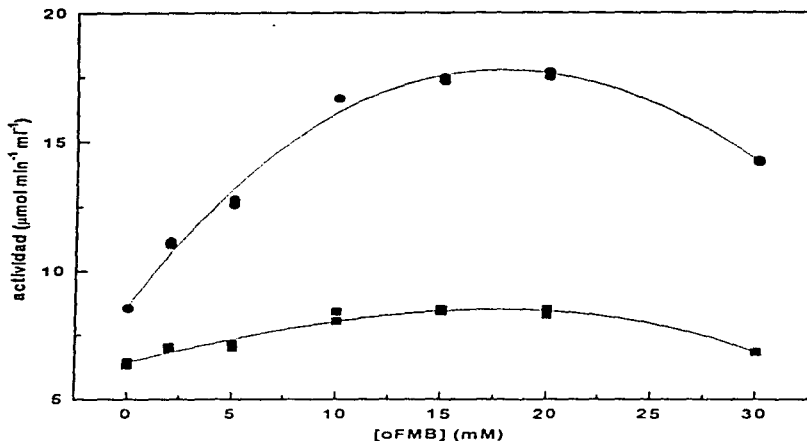


Figura 31. Efecto del PLP sobre la actividad de la PEPC. La enzima fue incubada en presencia de PLP 0.4 mM, fosfoglicolato 25 mM y  $Mg^{2+}$  15 mM (concentraciones totales) a las concentraciones indicadas de oFMB. La actividad fue determinada en ausencia (■) y en presencia de glucosa-6-fosfato 10 mM (●).

De los datos anteriores se calculó la sensibilidad frente a glucosa-6-fosfato, lo que se muestra en la figura 32. Se puede observar claramente la protección del sitio alostérico para glucosa-6-fosfato. Los datos resultantes del análisis de la figura nos permitieron calcular una  $K_{d,app}$  de  $5.20 \pm 0.25$  mM.

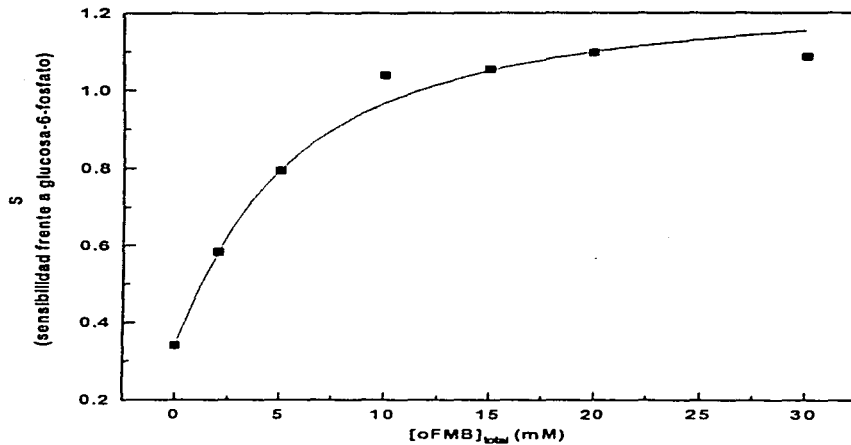


Figura 32. Sensibilidad frente a glucosa-6-fosfato. La sensibilidad se calculó según la ecuación (7) (cf. 5.2.7.2.) a partir de los datos obtenidos en el experimento mostrado en la figura 31. La curva es el resultado del ajuste de los datos a la ecuación del modelo de Hill.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Una notable característica de la PEPC es la de ser activada por moléculas que son análogos de su sustrato PEP. En la mayoría de las enzimas, los análogos del sustrato son inhibidores competitivos de la misma, ya que dada su similitud estructural, son capaces de unirse al sitio activo de la proteína impidiendo la unión del sustrato al formar un complejo sin salida enzima-inhibidor. Sin embargo, en el caso de la PEPC, se conocen varios análogos del PEP que son activadores alostericos de esta enzima (cf. 2 8 3 ) y sólo algunos de ellos son inhibidores competitivos. Aparentemente, una diferencia entre estos dos grupos de compuestos es la diferencia en el número de cargas negativas de las moléculas. En virtud de lo anterior, decidimos emplear dos análogos estructurales del PEP que poseen un grupo fosfonometilo, que es un análogo no hidrolizable del grupo fosfato del PEP y que presentan un carboxilato que se encuentra conjugado con dobles enlaces al igual que el PEP. Para generar dos compuestos casi idénticos, pero con diferente carga, uno de ellos fue sintetizado como un éster metílico del carboxilato y el otro como ácido libre

Las constates de estabilidad obtenidas para los dos compuestos en estudio complejados con magnesio indican que el cambio en la carga es suficiente para producir una importante diferencia en la estabilidad de sus respectivos complejos (figuras 5 y 6 y tabla 2). Esta diferencia es importante, ya que se ha demostrado que el sitio activo de esta enzima une a la forma acomplejada de PEP-Mg con mucha mayor afinidad que a las especies libres (López-Valentin, 1997) y, aún cuando la evidencia experimental es insuficiente, se ha sugerido que la unión del activador alostérico glucosa-6-fosfato podría unirse también al sitio correspondiente como complejo con magnesio (Wedding y Black, 1988).

Para determinar el efecto de estos compuestos bajo diferentes condiciones que nos permitieran identificar no sólo su posible sitio de unión, sino también las condiciones en la que se observaba mejor su efecto, se decidió probar dicho efecto sobre la saturación de la enzima por PEP-Mg a pH 7.3 (pH que se considera cercano al pI fisiológico) en dos condiciones: a concentración de magnesio libre fija (en donde la concentración de PEP libre

y de PEP·Mg varían en forma proporcional) y a concentración de PEP libre fija (en donde la concentración de magnesio libre y de PEP·Mg varían en forma proporcional). El compuesto metilado (oFMB) se comportó como un activador de tipo K (figuras 7 a 12 y tablas 3 a 7), cuyo efecto fue muy claro a concentraciones bajas de PEP libre constante (figura 7). Esto nos indica que este compuesto podría estarse uniendo al sitio alostérico activador para glucosa-6-fosfato aumentando la afinidad por el sustrato de la enzima PEP·Mg y, especialmente a concentraciones bajas de este último sustrato (figura 12), produciría una transición alostérica activadora que explica el aumento de la afinidad y la disminución de la cooperatividad (tablas 3 a 6). Cuando lo que se mantiene constante es la concentración de magnesio libre, el efecto observado sobre  $S_{0.5}$  es similar al ya descrito, pero de menor magnitud (tablas 5 y 6). Sin embargo, dado que la cooperatividad positiva para PEP·Mg es mayor en estas condiciones, el efecto observado sobre el número de Hill es mayor. Se observa además que en estas condiciones hay una ligera disminución de la velocidad máxima aparente en presencia del compuesto (figuras 9 y 10 y tablas 5 y 6) y este efecto es dependiente de magnesio ya sea en forma directa o indirecta, puesto que se observa más claramente a concentración de  $Mg^{2+}$  libre de 0.5 mM que a la de 0.1 mM.

Dado que el 2-fosfono-benzoato de metilo (oFMB) se comportaba como un activador similar a glucosa-6-fosfato en cuanto a que reduce la cooperatividad y aumenta la afinidad por PEP·Mg decidimos ver si el análogo competía con glucosa-6-fosfato y/o con glicina, ya que estas dos moléculas parecen unirse a sitios diferentes en la enzima (cf 2.5.2.1.). Los datos obtenidos indican que este compuesto compite con glucosa-6-fosfato, pero no con glicina (figura 13); también puede observarse que conforme la concentración del compuesto aumenta, en presencia de glucosa-6-fosfato la actividad se reduce; esto puede explicarse si este compuesto y la glucosa-6-fosfato se unen de modo mutuamente excluyente, pero la unión del oFMB induce un cambio conformacional menos adecuado para la función de la enzima que la glucosa-6-fosfato. A fin de analizar mejor el efecto de estos dos ligandos sobre la enzima se realizaron curvas de saturación para el sustrato PEP·Mg en presencia de cada uno de estos ligandos o de ambos simultáneamente. Estos experimentos se realizaron a 0.5 mM de PEP libre constante, dado que en estas condiciones el efecto del oFMB era más

claro. La figura 14 y la tabla 9 muestran que glucosa-6-fosfato es un excelente activador de la PEPC de hoja de maiz como ya se ha reportado (*cf.* 2.5.2.1); este compuesto reduce la  $S_{0,5}$  y produce un aumento importante en la  $V_{max}$  aparente; sin embargo, en estas condiciones particulares, la glucosa-6-fosfato no reduce la cooperatividad. El oFMB también reduce la  $S_{0,5}$  (nótese que este compuesto fue agregado a mayor concentración) y aumenta la  $V_{max}$  aparente, pero además y a diferencia del anterior, este compuesto también elimina la cooperatividad. En presencia de ambos compuestos los efectos son exactamente intermedios, lo que concuerda con lo observado en la figura 13, es decir, aparentemente en estas condiciones el oFMB y la glucosa-6-fosfato son activadores alostéricos de la PEPC con efectos mutuamente excluyentes entre si y además, el oFMB induce una transición alostérica menos favorable que la glucosa-6-fosfato

A continuación decidimos realizar este mismo experimento a un pH de 8.3 debido a que a este valor de pH la cooperatividad de unión para PEP·Mg desaparece. El propósito de este último experimento era el de ver si el efecto del oFMB estaba ligado a la abolición de la respuesta cinética cooperativa de la enzima o se trataba de dos efectos disociables, ya que a este pH la PEPC no presenta un comportamiento cinético cooperativo marcado (*cf.* 2.7.1). En la figura 15 se observa que a pH=8.3 la glucosa-6-fosfato sigue siendo un activador de la enzima que reduce la  $S_{0,5}$  y aumenta la  $V_{max}$  aparente (tabla 10), oFMB en cambio, reduce el valor de ambos parámetros, pero su efecto sobre la afinidad de la enzima por PEP·Mg es más marcado que a pH 7.3. Es posible que a este pH el oFMB pueda unirse al sitio activo en forma de complejo con magnesio y gracias a la extremadamente alta afinidad del sitio activo en esta condición, el oFMB podría estar actuando como un activador a concentraciones bajas de PEP·Mg (y bajas de  $Mg^{2+}$  libre) y como un inhibidor competitivo a concentraciones más elevadas de este sustrato (y altas también de  $Mg^{2+}$  libre). En cualquier caso, al igual que a pH de 7.3, la presencia de ambos compuestos brinda un efecto que es intermedio entre los observados cuando sólo uno de ellos estaba presente (figura 15 y tabla 10), indicando que su unión sigue siendo mutuamente exclusiva y que los efectos sobre la cooperatividad de unión para PEP·Mg y los aumentos en la afinidad por este sustrato son fenómenos independientes.

A fin de determinar el valor de la constante de activación del oFMB, para poder comparar la afinidad de la enzima por este compuesto y sus efectos con los reportados para otros activadores, realizamos un patrón de activación completo para el oFMB, a una concentración de PEP libre de 0.5 mM y a un pH de 7.3. Para poder analizar el efecto de esta molécula se requirió de un modelo que incluyera la cooperatividad y el efecto del activador sobre ésta, además del comportamiento ya descrito para un activador no esencial (Segel, 1975). El modelo empleado (*cf.* 5.2.8.1.) asume que la PEPC posee dos sitios activos interactuantes y un sitio alostérico activador. La unión del sustrato a un sitio activo trae como consecuencia un incremento en la afinidad de la enzima por PEP·Mg en el segundo sitio y por oFMB en el sitio activador, además, la unión del activador a su sitio trae como consecuencia un aumento de la afinidad de la enzima en todos los sitios activos (que se vuelven equivalentes) y un aumento en la constante catalítica. Las curvas en la figura 11 fueron trazadas con un ajuste de los datos al modelo global y este ajuste arroja una  $K_s$  de  $7.42 \pm 1.90$  mM para la unión del oFMB a la enzima libre y una  $K_s$  aparente de  $0.193 \pm 0.016$  mM para su unión al complejo enzima-PEP·Mg. Este último valor es un poco menor que el reportado para el 2-fosfonometil-propenoato de metilo (0.32 mM; Jenkins *et al.*, 1986) y el fosfato de fenol (0.23 mM, Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990), indicando que el sitio alostérico de esta enzima presenta mayor afinidad por el oFMB que por los anteriores.

Como un siguiente paso, investigamos el efecto que tenía sobre la actividad de la PEPC el mismo compuesto en su forma ácida (oFAB), con lo que aumentamos la carga neta del compuesto en solución. Inicialmente estudiamos este compuesto en las mismas condiciones en las que se estudió el derivado metilado y observamos que este compuesto se comportaba como un inhibidor moderado a 5 mM de  $Mg^{2+}$  libre (figura 17) y un inhibidor potente a 0.5 mM de PEP libre constante (figura 16). En la primera condición el compuesto disminuye la  $V_{max}$ , con un leve efecto sobre la  $S_{0.5}$ , lo que lo convierte en un inhibidor mixto; este resultado no se puede explicar solamente por la unión del compuesto al sitio activo en la enzima libre, sino que es necesario postular la unión de este compuesto a otras formas de la enzima, ya sea al sitio activo o a otro sitio distinto.

La explicación al hecho de que la inhibición observada en otras condiciones fuera muy pobre es que, en apariencia y de acuerdo con lo descrito para la unión del sustrato PEP (Wedding *et al.*, 1989; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clarés, 1990) la unión de oFAB a la enzima requiere de la formación del complejo con  $Mg^{2+}$ , pero debido a la baja estabilidad del complejo, se requieren concentraciones elevadas de este catión para hacer evidente el efecto inhibitorio. A concentraciones bajas de PEP libre (0.5 mM, figura 16), la concentración de oFAB·Mg aumenta de manera simultánea con el sustrato PEP·Mg, de manera que, cuando la concentración de PEP·Mg es baja el compuesto inhibe muy poco y cuando la concentración de PEP·Mg es elevada, el compuesto inhibe mucho, esto es equivalente al efecto de un inhibidor acompetitivo, que reduce  $S_{0.5}$  y  $V_{max}$  de igual manera, sólo que en este caso el efecto sobre  $S_{0.5}$  y el efecto sobre  $V_{max}$  fueron de diferente magnitud. Lo anterior es una indicación más de que este compuesto puede unirse a la enzima libre, pero también a otra forma de la enzima y esto puede explicarse por su unión al sitio activo en una forma distinta a la que se une el sustrato, o por su unión a un sitio diferente del activo.

Para confirmar el requerimiento de  $Mg^{2+}$  en la unión del oFAB realizamos curvas de saturación también a una concentración 10 veces más baja de magnesio (0.5 mM) y calculamos la cantidad de compuesto que debería añadirse para lograr una concentración de oFAB·Mg equivalente a la que se formaba a la concentración de 5 mM de  $Mg^{2+}$  libre (x mM del oFAB) y viceversa (y mM de oFAB a  $Mg^{2+}$  libre 0.5 mM). Los resultados de estos experimentos (figuras 19 y 20 y tablas 14 y 15) indican que efectivamente, cuando la concentración de oFAB·Mg es igual se observa un nivel de inhibición similar, si bien no idéntico en virtud de que la presencia de mayor o menor cantidad de  $Mg^{2+}$  libre afecta el perfil de saturación de la enzima por PEP·Mg y esto también influye.

Debido a que los resultados obtenidos con el inhibidor nos indicaban claramente la naturaleza mixta de la inhibición, decidimos determinar las constantes de disociación del oFAB y del oFMB de los sitios activo y alostérico activador para glucosa-6-fosfato a través del efecto protector que estos compuestos pudieran ofrecer, respectivamente, sobre la inactivación y la insensibilización frente a glucosa-6-fosfato de la PEPC por el 5'-fosfato de



piridoxal. Esta metodología ya ha sido previamente caracterizada por Tovar-Méndez y col. (1997); así, se realizaron experimentos de protección de la actividad y la sensibilidad de la PEPC frente a glucosa-6-fosfato, a diferentes concentraciones y oFAB u oFMB y en ausencia o presencia de magnesio. Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 21, 23, 25, 27 y 28. Y lo que se observó es que ninguno de los dos compuestos fue capaz de brindar protección ni de la actividad ni de la sensibilidad a glucosa-6-fosfato, ni en ausencia de magnesio, ni en su presencia. Antes bien, oFAB produjo principalmente un aumento en la accesibilidad del residuo de lisina del sitio activo. Podemos ver además en la tabla 16 que la intensidad de la unión de oFAB es independiente de magnesio pero se manifiesta de forma distinta según la concentración de PLP. En el caso del oFMB tampoco existe protección frente a la insensibilización, aunque este resultado no es del todo sorprendente ya que se ha demostrado que, en ausencia de otros ligandos o cosolutos, la glucosa-6-fosfato es incapaz de proteger a su sitio alostérico de la modificación por PLP (Tovar-Méndez *et al.*, 1997), lo que sugiere que el sitio alostérico está inaccesible o tiene una topología distinta en estas condiciones.

Los resultados que se muestran en las figuras 29 y 31 fueron realizados ahora en presencia de fosfoglicolato 25 mM y magnesio 15 mM (concentraciones totales) con el fin de proteger de la modificación al sitio activo. En la figura 29 se puede observar que en presencia de ligandos del sitio activo el oFAB lleva a una ligera desprotección del sitio activo. La desprotección del sitio activo puede deberse nuevamente a que dicho compuesto se une a otro sitio, aunque con una afinidad mucho menor que en ausencia de ligandos, provocando un cambio conformacional que expone el residuo de lisina. La ligera desprotección del sitio activo podría también deberse a que al aumentar la concentración de oFAB total aumenta la concentración del complejo oFAB·Mg, disminuye la concentración de fosfoglicolato·Mg y, como vimos, el oFAB·Mg no ofrece protección alguna del sitio activo.

Sin embargo, en presencia de fosfoglicolato·Mg el oFMB sí fue capaz de proteger al sitio alostérico para glucosa-6-fosfato (figura 31), lo que concuerda con resultados anteriores que muestran que en presencia de ligandos o cosolutos la glucosa-6-fosfato sí es capaz de

proteger a su sitio de la modificación química por PLP (Tovar-Méndez *et al.*, 1997) y confirma el hecho de que oFMB se está uniendo al sitio alostérico para glucosa-6-fosfato. Con estos datos pudimos calcular una  $K_{d,app}$  de  $5.20 \pm 0.25$  mM. En teoría este valor debería ser parecido al valor de  $K_s$  para la unión al complejo enzima-PEP·Mg que se calculó de los datos cinéticos, no lo es debido a que el valor de  $K_{d,app}$  está influenciado por la concentración de PLP empleada. Por otro lado, las concentraciones de fosfoglicolato·Mg son probablemente suficientes para saturar al sitio activo, por lo que casi no se observa cooperatividad en la unión del oFMB (figura 32). La ligera protección del sitio activo que parece ofrecer el oFMB quizá se deba a que la unión de este activador aumenta la afinidad del sitio activo por el fosfoglicolato·Mg. La desprotección que se observa a muy altas concentraciones de oFMB (figura 31) podría deberse a que el oFMB se está uniendo ahora a otro sitio propuesto o simplemente a efectos de la fuerza iónica del medio de incubación.

Estos resultados, junto con el comportamiento como inhibidor mixto de oFAB en las curvas de saturación por PEP·Mg de la PEPC realizadas (figuras 16 y 17) demuestran que estos compuestos se unen a la enzima, en ausencia de ligandos, en una de dos formas:

- a) A un sitio diferente del sitio activo y del sitio activador para glucosa-6-fosfato, mismo que se acompaña de un cambio conformacional asociado a una mayor exposición de la lisina del sitio activo que es modificada por el 5'-fosfato de piridoxal con pérdida de actividad.
- b) Al sitio activo o al sitio activador para glucosa-6-fosfato, pero con una geometría muy distinta a aquella con la que se unen PEP al sitio activo y glucosa-6-fosfato al sitio activador, de tal modo que en lugar de brindar protección a los respectivos residuos de lisina, los hacen más reactivos.

Finalmente, aún cuando no tenemos una idea clara del sitio al que pudieran estarse pegando estos compuestos en ausencia de otros ligandos, nuestros datos indican que en las condiciones de cubeta, es decir en presencia de sustratos y de  $Mg^{2+}$ , el oFMB se une al sitio alostérico activador para glucosa-6-fosfato, mientras que el oFAB se une a otro sitio y tal vez al sitio activo, lo que resulta en una inhibición mixta. También, la unión de oFAB a este otro sitio aún no identificado parece no requerir  $Mg^{2+}$  aunque es factible que el complejo

$\alpha$ FAB·Mg sea el que se una preferencialmente al sitio activo, dado que la cantidad de magnesio requerido para que se observen sus efectos coincide más con la afinidad de este ligando por el  $Mg^{2+}$  que con la afinidad reportada para la enzima por este catión (Rustin *et al.*, 1988). El efecto del  $\alpha$ FMB, por el contrario, muy posiblemente no requiera de la formación previa de un complejo  $\alpha$ FMB·Mg, dado que este compuesto presenta una afinidad por magnesio aún menor que  $\alpha$ FAB y sus efectos se manifestaron en forma clara aún a 0.1 mM de  $Mg^{2+}$  libre, concentración en la que la cantidad de  $\alpha$ FMB·Mg es despreciable. A pesar de lo anterior, no se puede descartar la posibilidad de que el sitio alostérico para glucosa-6-fosfato una magnesio independientemente de la afinidad de su ligando por este catión.

## 8. CONCLUSIONES.

- a) Este estudio apoya la propuesta de que ciertos análogos estructurales de PEP pueden actuar como activadores alostéricos de la PEPC, a través de su unión al sitio alostérico activador para glucosa-6-fosfato de la enzima, lo que indica la semejanza estructural de este sitio con el sitio activo.
- b) Los análogos del PEP que se unen al sitio alostérico activador parecen diferir en el número de cargas negativas del ión de aquellos que se unen al sitio activo y que son inhibidores competitivos. En efecto, el oFMB, con dos cargas negativas, resultó ser un activador de la PEPC, mientras que el oFAB, con tres cargas negativas, resultó ser un inhibidor mixto. Sin embargo, PEP has sido propuesto como un activador de la enzima (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clarés, 1990), lo que indica que existen otras características que son importantes para su reconocimiento por el sitio activo y por el sitio activador para glucosa-6-fosfato.
- c) Los análogos elegidos no presentan suficiente analogía estructural con el PEP, ya que oFAB, el más cercano, no parece estar uniéndose al sitio activo en ausencia de ligandos o bien no ocupa la misma posición que PEP en este sitio.
- d) La existencia de múltiples estados conformacionales de la PEPC resulta apoyada por nuestros datos ya que es posible inducir cambios alostéricos en la afinidad de la enzima por el sustrato en ausencia de una reducción en la cooperatividad de unión del sustrato PEP-Mg y existen condiciones en las que la cooperatividad desaparece sin que la sensibilidad a los reguladores alostéricos desaparezca.

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

- Amâncio, S., Diogo, E., Santos, H. (1993). Effects of the inorganic nitrogen source on C and N interaction in maize callus tissue: phosphoenolpyruvate carboxylase activity, cytosolic pH and  $^{15}\text{N}$  amino acids. *Physiol. Plant.* **89**:618-625.
- Andreo, C.S., González, D.H., Iglesias, A.A. (1987). Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase: structure and regulation. *FEBS Lett.* **213**: 1-8.
- Arellano-Camacho, I (1997) Síntesis de análogos del fosfoenolpiruvato. Tesis de licenciatura en preparación, Facultad de Química, U.N.A.M
- Aussenhus, S.L., O'Leary, M.H. (1992) Hydrolysis of phosphoenolpyruvate catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*. *Biochem.* **31**: 6427-6431.
- Badger M.R., Price G.D. (1994) The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**:369-392.
- Bandarian, V., Poehner, W.J., Grover, S.D. (1992). Metabolite activation of Crassulacean Acid Metabolism and  $\text{C}_4$  phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **100**: 1411-1416.
- Bandurski, R.S., Greiner, C.M. (1953). The enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphoryl-enolpyruvate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* **204**: 781-786.
- Blackburn, M.N., Schachman, H.K. (1976). Alteration of the allosteric properties of aspartate transcarbamoylase by pyridoxylation of the catalytic and regulatory subunits. *Biochemistry.* **15**: 1316-1323
- Bort, J., Brown, R.H., Araus, J.L. (1996). Refixation of respiratory  $\text{CO}_2$  in the ears of  $\text{C}_3$  cereals. *J. Exp. Bot.* **47**:1567-1575.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Canvin, D.T. (1990). Photorespiration and  $\text{CO}_2$ -concentrating mechanisms. En: Dennis, D.T., Turpin, D.H. (Eds.) Plant physiology, biochemistry and molecular biology. Longman Group UK Ltd. Londres. pp. 253-273.

- 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). Studies of the allosteric properties of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase with the phosphoenolpyruvate analogue phosphomycin as activator. Manuscrito sometido a revisión.
- Champigny, M.L. (1995) Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. *Photosynth. Res.* **46**: 117-127
- Chollet, R., Vidal, J., O'Leary, M.H. (1996) Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 273-298
- Colombo, S.L., Pairoba, C.F., Andreo, C.S. (1996). Inhibitory effect of shikimic acid on PEP carboxylase activity. *Plant Cell Physiol.* **37**: 870-872.
- Cook, P.F. (Ed) (1991) Enzyme mechanism from isotope effects. CRC Press Inc. Boca Raton.
- Deroche, M. E., Carrayol, E. (1988) Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: a review. *Physiol. Plant.* **74**:775-782.
- Díaz, A., Maza, H., González-Moro, B., Lacuesta, M., González-Murua, C., Muñoz-Rueda, A. (1995). Phosphinothricin reverts the ammonia-dependent enhancement of phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *J. Plant Physiol.* **145**:11-16.
- Díaz, A.; Lacuesta, M., Muñoz-Rueda, A. (1996) Comparative effects of phosphinothricin on nitrate and ammonium assimilation and on anaplerotic CO<sub>2</sub> fixation in N-deprived barley plants. *J. Plant Physiol.* **149**: 9-13
- Donkin, M.E., Taffs, J., Martin, E.S. (1982). A study of the *in-vitro* regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the epidermis of *Commelina communis* by malate and glucose-6-phosphate. *Planta* **155**: 416-422.
- Du, Z.R., Aghoram, K., Outlaw, W.H. (1997). *In vivo* phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in guard cells of *Vicia faba* L. is enhanced by fusicoccin and suppressed by abscisic acid. *Arch. Biochem Biophys.* **337**: 345-350.

- Duff, S.M.G., Andreo, C.S., Pacquit, V., Lepiniec, L., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, J., Gadal, P., Chollet, R. (1995). Kinetic analysis of the non-phosphorylated, *in vitro* phosphorylated, and phosphorylation-site-mutant (Asp8) forms of intact recombinant C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum. *Eur. J. Biochem.* **228**: 92-95.
- Duff, S.M.G.; Chollet, R. (1995). *In vivo* regulation of wheat-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. *Plant Physiol.* **107**: 775-782.
- Eckardt, N.A., Portis, A.R.Jr. (1997). Heat denaturation profiles of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) and Rubisco activase and the inability of Rubisco activase to restore activity of heat-denatured Rubisco. *Plant Physiol.* **113**: 243-248.
- Forterre, P. (1996). A hot topic: the origin of hyperthermophiles. *Cell* **85**: 789-792.
- Gao, Y., Woo, K.C. (1995). Site-directed mutagenesis of Lys(600) in phosphoenolpyruvate carboxylase of *Flaveria trinervia*: its roles in catalytic and regulatory functions. *FEBS Lett.* **375**: 95-98.
- Gao, Y., Woo, K.C. (1996). Site-directed mutagenesis of *Flaveria trinervia* phosphoenolpyruvate carboxylase: Arg(450) and Arg(767) are essential for catalytic activity and Lys(829) affects substrate binding. *FEBS Lett.* **392**: 285-288.
- Giglioli-Guivarc'h, N., Pierre, J.-N., Brown, S., Chollet, R., Vidal, J., Gadal, P. (1996). The light-dependent transduction pathway controlling the regulatory phosphorylation of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from *Digitalia sanguinalis*. *Plant Cell* **8**: 573-586.
- González, D.H., Andreo, C.S. (1989). The use of substrate analogues to study the active-site structure and mechanism of PEP carboxylase. *Trends Biochem. Sci.* **14**: 24-27.
- Gupta, R.S. y Golding, G.B. (1996). The origin of the eukaryotic cell. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 166-171.
- Hartwell, J., Smith, L.H., Wilkins, M.B., Jenkins, G.I., Nimmo, H.G. (1996). Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is regulated at the level of translatable mRNA in response to light or a circadian rhythm. *Plant J.* **10**: 1071-1078.

- Hill, B.C., Bown, A.W. (1978). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity from *Avena coleoptile* tissue. Regulation by H<sup>+</sup> and malate. *Can. J. Bot.* **56**: 404-407.
- Huber, S.C., Edwards, G.E. (1975). Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from C<sub>4</sub> plants by malate and aspartate. *Can. J. Bot.* **53**: 1925-1933.
- Huppe, H.C., Turpin, D.H. (1994). Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 577-607.
- Izui, K., Terada, K., Yano, M., Nakamura, T., Abe, K., Kihara, A., Yoshioka, I., Takahashi, M. (1995). Phosphoenolpyruvate carboxylase: alteration of catalytic and regulatory properties by site-directed mutagenesis and isolation of the gene from an extreme thermophile. *Energy Conversion and Management.* **36**: 751-754.
- 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. Int.* **12**: 619-625.
- Jensen, R.G. (1990). Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: mechanisms, activation and regulation. En: Dennis, D.T., Turpin, D.H. (Eds.) Plant physiology, biochemistry and molecular biology. Longman Group UK Ltd. Londres. pp. 224-238.
- Jensen, W.A., Armstrong, J.M., DeGiorgio, J., Hearn, M.T.W. (1995). Stability studies on maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: the effect of salts. *Biochemistry.* **34**: 472-480.
- Jiao, J.A., Chollet, R. (1990). Regulatory phosphorylation of serine-15 in maize phosphoenolpyruvate carboxylase by a C<sub>4</sub>-leaf protein-serine kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**: 300-305.
- Jiao, J., Vidal, J., Echeverria, C., Chollet, R. (1991). *In vivo* regulatory phosphorylation site in C<sub>4</sub>-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase from maize and sorghum. *Plant Physiol.* **96**: 297-301.
- Johnson J.F., Vance, C.P., Allan, D.L. (1996). Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*: altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **112**: 31-41.
- Knowles, J.R. (1989). The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **58**: 195-221.



- Kurkdjian, A., Guern, J. (1989). Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 271-303.
- Law, R.D., Plaxton, W.C. (1995). Purification and characterization of a novel phosphoenolpyruvate carboxylase from banana fruit. *Biochem. J.* **307**: 807-816.
- Leblova, S., Strakosova, A., Vojteckova, M. (1991). Regulation of the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from germinating maize (*Zea mays* L.) seeds by some metabolites. *Biol. Plant.* **33**: 66-74.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (1993a). Principles of biochemistry. Worth Publishers Inc. USA. pp. 620.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (1993b). Principles of biochemistry. Worth Publishers Inc. USA. pp. 631.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (1993c). Principles of biochemistry. Worth Publishers Inc. USA. pp. 633.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (1993d). Principles of biochemistry. Worth Publishers Inc. USA. pp. 634.
- Lepiniec, L., Vidal, J., Chollet, R., Gadai, P., Crétin, C. (1994). Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution. *Plant Sci.* **99**: 111-124.
- Li, B., Zhang, X.-Q., Chollet, R. (1996). Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in tobacco leaves is activated by light in a similar but not identical way as in maize. *Plant Physiol.* **111**: 497-505.
- López-Valentín, D.M. (1997). Estudio del mecanismo cinético de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz (*Zea mays*) modificada con piridoxal 5'-fosfato. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, U.N.A.M.
- Lucas, W.J. (1983). Photosynthetic assimilation of exogenous  $\text{HCO}_3^-$  by aquatic plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **34**: 71-104.
- Mancera, R.L., Gómez, A.G., Pisanty, A. (1995). Quantitative structure-activity relationships of competitive inhibitors of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Bioorg. Med. Chem.* **3**: 217-225.
- Martinoia, E., Rentsch, D. (1994). Malate compartmentalization: responses to a complex metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 447-467.

- McDonald, F.D., Buchanan, B.B. (1990). The reductive pentose phosphate pathway and its regulation. En: Dennis, D.T., Turpin, D.H. (Eds.) Plant physiology, biochemistry and molecular biology. Longman Group U.K. Ltd. Londres. pp. 239-252.
- McNaughton, G.A.L., Fewson C.A., Wilkins, M.B., Nimmo, H.G. (1989). Purification, oligomerization state and malate sensitivity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem J.* **261**: 349-355.
- Nakamura, T., Minoguchi, S., Izui, K. (1996). Purification and characterization of recombinant phosphoenolpyruvate carboxylase of *Thermus sp.* *J. Biochem.* **120**: 518-524.
- Nelson, T., Langdale, J.A. (1992). Developmental genetics of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 25-47.
- N'guyen, T.T., Ngam-Ek, A., Jenkins, J., Grover, S.D. (1988). Metal ion interactions with phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea* and *Zea mays*. *Plant Physiol.* **86**: 104-107.
- O'Leary, M.H. (1982). Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's view. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**: 297-315.
- O'Sullivan, W.J., Smithers, G.W. (1979). Stability constants for biologically important metal-ligand complexes. En: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.) *Methods in enzymology*, Vol. 63, Academic Press, New York, pp. 294-336.
- Osuna, L., González, M.-C., Cejudo, F.J., Vidal, J., Echevarría, C. (1996). *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase from wheat seeds during germination. *Plant Physiol.* **111**: 551-558.
- Outlaw, W.H. Jr. (1990). Kinetic properties of guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **186**: 317-325.
- Pairoba, C.F., Colombo, S.L., Andreo, C.S. (1996). Flavonoids as inhibitors of NADP-malic enzyme and PEP carboxylase from C<sub>4</sub> plants. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 779-783.
- Peliska, J.A., O'Leary, M.H. (1989). Sulfuryl transfer catalyzed by pyruvate kinase. *Biochem.* **28**: 1604-1611.

- Podestá, F., 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.
- Podestá, F.E., Plaxton, W.C. (1994a). Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. I. Developmental profiles for the activity, concentration, and molecular structure of the pyrophosphate -and ATP-dependent phosphofructokinases, phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *Planta.* **194**: 374-380.
- Podestá, F.E., Plaxton, W.C. (1994b). Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. II. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate kinase associated with the regulation of glycolysis and nitrogen assimilation. *Planta.* **194**: 381-387.
- Podestá, F.E., Colombo, S.L., Andreo, C.S. (1995). Purification and characterisation of the light and dark forms of phosphoenolpyruvate carboxylase from the dicot plant *Amaranthus viridis* L. An examination of its kinetic and regulatory properties in the presence of water-alcohol binary solvents. *Plant Cell Physiol.* **36**: 1471-1476.
- Rivoal, J., Dunford, R., Plaxton, W.C., Turpin, D.H. (1996). Purification and properties of four phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms from the green alga *Selenastrum minutum*: evidence that association of the 102-kDa catalytic subunit with unrelated polypeptides may modify the physical and kinetic properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **332**: 47-57.
- 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.
- Rustin, P., Meyer, C.R., Wedding, R.T. (1988). Identification of substrate and effector binding sites of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*. *J. Biol. Chem.* **263**: 17611-17614.

- Sako, Y., Takai, K., Uchida, A., and Ishida, Y. (1996). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus sociabilis*. *FEBS Lett.* **392**: 148-152.
- Sánchez-de-Jiménez, E., Medrano, L., Martínez-Barajas, E. (1995). Rubisco activase, a possible new member of the molecular chaperone family. *Biochemistry.* **34**: 2826-2831.
- Schuller, K.A., Plaxton, W.C., Turpin, D.H. (1990). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the green alga *Selenastrum minutum*: properties associated with replenishment of tricarboxylic acid cycle intermediates during ammonium assimilation. *Plant Physiol.* **93**: 1303-1311.
- Segel, I.H. (1975). Enzyme kinetics: behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley & Sons. New York. pp. 1-99.
- Spencer, W.E., Wetzel, R.G., Teeri, J. (1996). Photosynthetic phenotype plasticity and the role of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Hydrilla verticillata*. *Plant Sci.* **118**: 1-9.
- Smith, C.A., Wood, E.J. (1992a). Biosynthesis. Chapman & Hall. Hong Kong. pp. 43.
- Smith, C.A., Wood, E.J. (1992b). Biosynthesis. Chapman & Hall. Hong Kong. pp. 45.
- Stiborova, M., Leblova, S. (1985). Activation of maize (*Zea mays* L.) phosphoenolpyruvate carboxylase by glucose-6-phosphate and glycine: effects of pH and  $Mg^{2+}$ . *Photosynthetica* **19**: 177-182.
- Storer, A.C., Comish-Bowden, A. (1976). Concentration of  $ATP-Mg^{2+}$  and other ions in solution: calculation of the true concentrations of species present in mixtures of associating ions. *Biochem. J.* **159**: 1-5.
- Tarczynski, M.C., Outlaw, W.H. Jr. (1993). The interactive effects of pH, L-malate, and glucose-6-phosphate on guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **103**: 1189-1194.
- Ting, I.P. (1985). Crassulacean Acid Metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 595-622.

- Tovar-Méndez, A., Mújica-Jiménez, C., Muñoz-Clares R.A. (1997). Desensitization to glucose-6-phosphate of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by pyridoxal 5'-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **1337**: 207-216.
- Uedan, K., Sugiyama T. (1976). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiol.* **57**: 906-910.
- Vance, C.P., Gregerson, R.G., Robinson, D.L., Miller, S.S., Gantt, J.S., (1994). Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved. *Plant Sci.* **101**: 51-64.
- Wagner, R., González, D.H., Podestá, F.E., Anreo, C.S. (1987). Changes in the quaternary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase induced by ionic strength affects its catalytic activity. *Eur. J. Biochem.* **164**: 661-666.
- Wang, Y.H., Duff, S.M.G., Lepiniec, L., Crétin, C., Sarath, G. *et al.* (1992). Site directed mutagenesis of the phosphorylatable serine (Ser<sup>8</sup>) in C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum: the effect of negative charge at position 8. *J. Biol. Chem.* **267**: 16759-16762.
- Wedding, R.T., Black, M.K. (1988). Role of magnesium in the binding of substrate and effectors to phosphoenolpyruvate carboxylase from a CAM plant. *Plant Physiol.* **87**: 443-446.
- Wedding, R.T., Black, M.K., Meyer, C.R. (1989). Activation of higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol.* **90**: 648-652.
- Wu, M.-X., Meyer, C.R. Willeford, K.O., Wedding, R.T. (1990). Regulation of the aggregation state of phosphoenolpyruvate carboxylase: evidence from dynamic light-scattering measurements. *Arch. Biochem. Biophys.* **281**: 324-329.
- Zhang, X.Q., Li, B., Chollet, R. (1995). *In vivo* regulatory phosphorylation of soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **108**: 1561-1568.

## **Apéndice: preparación de disoluciones y amortiguadores.**

### **Disoluciones.**

El  $\text{MgCl}_2$  se prepara de la siguiente manera: desecar  $\text{MgO}$  en un horno a  $170\text{ }^\circ\text{C}$  hasta peso constante y agregarle  $\text{HCl}$ . La reacción se deja transcurrir durante por lo menos dos días o hasta que el pH se haya estabilizado entre 5.5 y 6. La solución de  $\text{MgCl}_2$  resultante se lleva a una concentración de 1 M.

El reactivo de Bradford se prepara de la siguiente manera: pesar 100 mg de azul de Coomassie G y disolverlos en 50 ml de etanol al 95 % (v/v) y 100 ml de ácido fosfórico al 85 % (p/v). Agitar hasta disolución total. Llevar a 1 l con agua destilada y filtrar. El reactivo se conserva en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

### **Amortiguadores para la purificación de la PEPC.**

Amortiguador A: HEPES·KOH 100 mM pH=7.5, EDTA 0.2 mM, glicerol 20% (v/v),  $\text{MgCl}_2$  10 mM, PMSF 1 mM, DTT 5 mM, malato 5 mM, benzamidina 2 mM,  $\text{PO}_4^{3-}$  (sal de potasio) 25 mM, quimostatina 100  $\mu\text{g}$  / ml.

Amortiguador B: HEPES·KOH 50 mM pH=7.5, EDTA 0.1 mM, glicerol 10% (v/v), PMSF 1 mM, DTT 5 mM, malato 5 mM, benzamidina 2 mM,  $\text{PO}_4^{3-}$  25 mM, quimostatina 10  $\mu\text{g}$  / ml.

Para los gradientes de elución se utiliza una solución de fosfatos 1 M a pH=7.5 la cual se prepara mezclando una disolución 1 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y una disolución 1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  hasta llegar a pH=7.5.

Amortiguador C: HEPES·KOH 50 mM pH=7.5, EDTA 0.1 mM, glicerol 10% (v/v), DTT 5 mM.