2ej

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"PAPEL DE LA ESTRUCTURA ELECTRONICA DE LOS LIGANDOS EN LA ACTIVACION DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE HOJA DE MAIZ".

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

**ANDRES ADRIAN BOBADILLA PONCE**

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA 275029

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**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:

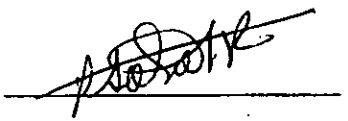
| | |
|---|---|
| Presidente | Prof. HERNÁNDEZ MONTES HOMERO |
| Vocal | Prof. GAVILANES RUÍZ MARINA |
| Secretario | Prof. RODRÍGUEZ SOTRES ROGELIO |
| 1er. suplente | Prof. GARCÍA RAMÍREZ ELPIDIO |
| 2do. suplente | Prof. PEDRAZA CHAVERRI JOSÉ |

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Laboratorio 115, División de Estudios de Posgrados, Edificio E, Facultad de Química, U.N.A.M.

Nombre completo y firma del asesor del tema:

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres



Nombre completo y firma del sustentante:

Andrés Adrian Bobadilla Ponce

# Tabla de contenidos

Tabla de contenidos

Dedicatoria

Agradecimientos

Abreviaturas

1. Resumen. 8

2. Introducción. 9

3. Antecedentes. 12

3.1. Reacción catalizada por la fosfo*enol*piruvato carboxilasa. 12

3.2. Características fisicoquímicas, cinéticas y moleculares de la fosfo*enol*piruvato carboxilasa. 12

3.3. Estructura de la fosfo*enol*piruvato carboxilasa. 16

3.4. Papel de la fosfo*enol*piruvato carboxilasa en el metabolismo de las plantas. 19

3.5. Mecanismo cinético y químico de la reacción catalizada por la fosfo*enol*piruvato carboxilasa. 24

3.6. Sitios alostéricos reguladores de la enzima fosfo*enol*piruvato carboxilasa. 26

3.7. Efecto de los análogos de fosfo*enol*piruvato sobre la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa. 27

4. Planteamiento del problema. 33

5. Hipótesis. 35

6. Objetivos. 36

7. Metodología 37

8. Resultados. 47

9. Discusión de resultados. 75

10.Conclusiones. 80

11.Referencias bibliográficas. 81

Anexo 90

**DEDICATORIA**

A mi madre que siempre me ha apoyado, a mi padre por lo que me ha enseñado y a mi hermano por el cariño que me ha brindado.

**AGRADECIMIENTOS**

Ante todo le agradezco al Dr. Rogelio por su enorme apoyo, que sin este no hubiera podido realizar mi tesis y también a todos los compañeros del laboratorio por su apoyo.

Le agradezco a todos los excelentes profesores que tuve en la escuela, que han sido los responsables de mi educación., En especial a dos profesores que han sido mi guia en esta carrera el profesor Jesús y la Maestra Haruko.

Les agradezco a todos mis amigos por su gran apoyo que me han brindado. A Raúl por soportar todos mis problemas, a Milton, Aurora, Omar y Juan Carlos por compartir conmigo la carrera y formar un excelente grupo de trabajo. También agradezco a todos los demás compañeros de la facultad que siempre estuvieron ahí cuando los necesite gracias.

Gracias a mis amigos de la prepa Juan, Jorge, Jazmín. Gracias a mis amigos del museo Armando y Sandy, por el enorme apoyo que me han brindado.

**Abreviaturas**

| | |
|---|---|
| A-2SB | Ácido 2-sulfobenzoico |
| ASB | albúmina de suero bovino |
| AFA | ácido fenilarsónico |
| CAM | metabolismo ácido de las crasuláceas |
| DTT | ditiotreitol |
| G6P | D-glucosa-6-fosfato |
| HEPES | ácido (N-[2-hidroxietil]-piperazin-N´-[2-etanosulfónico]) |
| $K_a$ | constante activación |
| $k_{cat}$ | constante catalítica |
| kDa | kilodalton |
| $K_m$ | constante de Michaelis-Menten |
| MDH | málico deshidrogenasa |
| OAA | oxaloacetato |
| PEP | fosfo*enol*piruvato |
| PEPC | fosfo*enol*piruvato carboxilasa |
| $P_i$ | fosfato inorgánico |
| PLP | piridoxal-5´- fosfato |
| RuBisCO | ribulosa-1,5-bisfofato carboxilasa/ oxigenasa |
| $V_{max}$ | velocidad máxima |

## 1. RESUMEN

La fosfo*enol*piruvato carboxilasa es una enzima que esta involucrada en la asimilación del dióxido de carbono en las plantas. Esta enzima se encuentra regulada por la D-glucosa-6-fosfato, el malato y la glicina. El sito activo ha sido objeto de numerosos estudios (Izui *et al.*,1983; González y Andreo, 1989) pero el sitio alostérico para la D-glucosa-6-fosfato no se ha estudiado a fondo (Tovar-Mendez *et al.*, 1997).

En este trabajo se demuestra que en el sitio alostérico para la D-glucosa-6-fosfato de la fosfo*enol*piruvato carboxilasa de hoja de maíz, puede unir al ácido 2-sulfobenzoico y al ácido fenilarsónico con una $k_{d\text{-}APP}$ de 12.6 y 35.9 mM respectivamente; esto es sin la necesidad de un sustrato que ocupe el sitio activo de esta enzima. Pero con la presencia de los ligandos fosfoglicolato y el ión magnesio, la $k_{d\text{-}APP}$ se reduce en ambos casos; los valores obtenidos fueron de 0.13 mM para el ácido 2-sulfobenzoico y de 1.3 mM para el ácido fenilarsónico.

Con estos resultados podemos decir que se unen a el sitio alostérico activador para la D-glucosa-6-fosfato de la enzima fosfo*enol*piruvato carboxilasa moléculas que presenten dos cargas formales parcial o totalmente comunicadas entre sí y que por lo menos una de las cargas debe localizarse sobre un grupo altamente oxidado y con geometría tetrahédrica tal como el sulfato, el fosfato o el arsonato.

## 2. INTRODUCCIÓN

La fosfo*enol*piruvato carboxilasa (PEPC) es una enzima citosólica y oligomérica que se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores (Lepiniec *et al.*, 1994). Además, la PEPC constituye alrededor del 15% del total de la proteína soluble en el maíz (Uedan y Sugiyama, 1976; Hague y Sims, 1980; Hayakawa *et al.*, 1981). En las plantas $C_4$ (de alta productividad) la relación de la PEPC con respecto a la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) es de 2 a 1 mientras que en las plantas $C_3$ (las más comunes) es de 0.1 a 1 (O'Leary, 1982).

La PEPC cataliza la carboxilación del fosfo*enol*piruvato (PEP), empleando el bicarbonato y un catión divalente (Chollet *et al.*, 1996). Su participación es crucial en la fijación inicial del $CO_2$ atmosférico durante la fotosíntesis de las plantas $C_4$ (por ejemplo el maíz) y en las plantas crasuláceas con metabolismo ácido (CAM). Se han determinado 3 isoformas de la PEPC en las plantas superiores, las cuales podemos clasificar como: PEPC de plantas $C_3$ y de células vegetales no verdes, PEPC fotosintética de plantas $C_4$ y PEPC fotosintética de plantas CAM (Ting y Osmond, 1973).

Según Toh *et al.* (1994) las isoformas de la PEPC se pueden agrupar en dos categorías:

La PEPC que presenta funciones anapleróticas en una variedad propia de sistemas no fotosintéticos; es decir, participa en el suministro de oxaloacetato al ciclo del ácido cítrico; suministrando así el carbono para la

fijación del nitrógeno, como en hojas de plantas $C_3$ y en las semillas y frutos en formación (Lepiniec *et al.*, 1994). Esta forma de la PEPC también está involucrada en otros aspectos como el matenimiento del pH (Davies, 1986), la regulación de la osmolaridad (Israel y Jackson,1982), la apertura y cierre de los estomas de las hojas (Deroche y Carrayol, 1988) y la recaptura del $CO_2$ respirado (Van *et al.*, 1991).

La PEPC relacionada con las actividades fotosintéticas de las plantas $C_4$ y CAM. En las plantas $C_4$ estan separadas las funciones de la PEPC y de la RuBisCO en compartimentos distintos, separando la captura del $CO_2$ atmosférico (células del mesófilo) de su asimilación en el ciclo de Calvin (células de la vaina del haz). En las plantas CAM se presenta un ciclo circadiano en el que la PEPC fija el $CO_2$ atmosférico generando malato en las noches y en el día el ciclo de Calvin lo asimila en azúcares y almidón (Bandarian *et al.*, 1992).

La PEPC es una enzima alostérica cuya actividad se encuentra altamente regulada (Chollet *et al.*, 1996). Existen evidencias de por lo menos dos tipos diferentes de regulación.

La enzima es altamente activada por metabolitos como la glicina, la D-glucosa-6-fosfato (G6P), la fructosa-6-fosfato (F6P) y las triosas fosfato (Uedan y Sugiyama, 1976; Doncaster y Leegood, 1987; Bandarian *et al.*, 1992). Estos activadores reducen la $K_m$ para el PEP y algunos producen además incrementos ligeros en la $V_{max}$ (O'Leary, 1982). Las isoformas de plantas $C_3$ y de tejidos no fotosintéticos son menos sensibles a la activación por los azúcares fosforilados (Tarczynski y Outlaw, 1993). El malato y el

aspartato inhiben a la PEPC incrementando la $K_m$ aparente para el PEP sin alterar la $V_{max}$ , el malato puede producir una inhibición competitiva o no competitiva dependiendo del pH (Huber y Edwards, 1975; Gonzalez *et al.*, 1984, 1987). El efecto inhibitorio del malato sobre la PEPC es general para todas las isoformas. El efecto inhibitorio del malato es reducido por el activador G6P (Schuller *et al.*, 1990).

Un segundo tipo de regulación se ejerce mediante la fosforilación reversible de un residuo de serina que se encuentra cerca del extremo N-terminal del polipétido; en el maíz se trata de la serina 15 y en el sorgo es la serina 8 (Jiao y Chollet, 1990, 1991; Jiao *et al.*, 1990, Lepiniec *et al.*, 1994; Duffs y Chollet, 1995). Al parecer la fosforilación *in vivo* de la PEPC en las plantas superiores ocurre durante los períodos de iluminación (Jiao *et al.*, 1991; Jiao y Chollet, 1992). En plantas $C_4$, la PEPC fosforilada posee mayor actividad enzimática (Jiao y Chollet, 1988, 1989), ya que la fosforilación protege a la enzima de la inhibición por el malato (Jiao y Chollet, 1989; Arrio-Dupont *et al.*, 1992; Tovar-Mendez *et al.*, 1998).

A nivel de la expresión del gen que codifica a la PEPC, su transcripción responde a diferentes factores ambientales como la luz (Vidal y Gadal, 1983; Sims y Hague, 1981), el déficit de agua (Pipenbrock y Schmitt, 1991; Brulfert *et al.*, 1993) y la disponibilidad y el tipo de la fuente de nitrógeno (Manh *et al.*, 1993; Sugiharto *et al.*, 1990, 1992; Champigny y Foyer 1992; Champigny 1995; Deroche y Carrayol, 1988).

## 3. ANTECEDENTES

### 3.1. Reacción catalizada por la fosfo*enol*piruvato carboxilasa.

La fosfo*enol*piruvato carboxilasa (ortofosfato : oxaloacetato carboxiliasa; E.C.4.1.1.31; Dixon, 1979) cataliza la reacción irreversible de β-carboxilación del fosfo*enol*piruvato en presencia del bicarbonato y el magnesio, dando como productos el oxaloacetato y el fosfato inorgánico (esquema 1; Bandurski y Greiner, 1953).

$$\text{Fosfo}\textit{enol}\text{piruvato} + HCO_3^- \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{Oxaloacetato} + Pi$$

Esquema 1. Reacción catalizada por la PEPC (tomado de O'Leary, 1982).

La reacción catalizada por la PEPC es altamente exergónica con un $\Delta G°$ entre -6 a -8 kcal/mol (O'Leary, 1982). Además, es la única carboxilasa que se conoce que utiliza bicarbonato y no depende de biotina (Knowles, 1989).

### 3.2. Características fisicoquímicas, cinéticas y moleculares de la fosfo*enol*piruvato carboxilasa.

La fosfo*enol*piruvato carboxilasa se ha encontrado en plantas superiores, algas y cianobacterias (Lepiniec *et al.*, 1994). Durante la purificación de la PEPC de maíz, se ha determinado que la masa molecular

de la enzima es de 400 kDa mediante la velocidad y equilibrio de su sedimentación, (Uedan y Sugiyama, 1976). En análisis mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), la PEPC de maiz muestra una sola banda con una masa molecular de 100 kDa, lo que nos indica que la enzima está formada por un tetrámero de cuatro subunidades con la misma masa molecular (O'Leary, 1982).

El extremo N-terminal es susceptible de sufrir proteólisis durante la purificación si no se incluyen en el medio de extracción los inhibidores de proteasas adecuados (McNaughton *et al.*, 1989). La degradación proteolítica parcial de la PEPC de plantas $C_4$ conduce a la pérdida de la sensibilidad de la enzima al inhibidor malato y a cambios en otras propiedades cinéticas de la misma (Jiao y Chollet, 1991). Sin embargo, esta forma conserva su actividad casi íntegra, razón por la cual este cambio pasó inadvertido por más de una década (Chollet *et al.*, 1996).

Dependencia del pH

En estudios cinéticos se ha visto que la PEPC presenta una buena actividad en un intervalo de pH de 7.5 a 8.5 (Lepiniec *et al.*, 1994) y que la máxima actividad enzimática se alcanza a un pH de 8 (O'Leary, 1982). La afinidad de la PEPC de maiz por el PEP disminuye a un pH mayor de 9.5 y a un pH menor de 7.5 (O'Leary *et al.*, 1981).

Los cambios en el pH alteran la estructura cuaternaria de la proteína generando con esto formas no activas de la enzima (Podestá y Andreo, 1989). La estructura cuaternaria de la PEPC ha sido descrita como un

homotetrámero. En estudios realizados *in vitro* se observa que a pH neutro se favorece la forma tetramérica y disminuyendo o aumentando el pH se favorece la disociación de la forma tetramérica, la cual pasa a una forma dimérica con menor o nula actividad y en condiciones más drásticas alcanza un estado monomérico, siendo esta última una forma totalmente inactiva de la enzima (Wu *et al.*, 1990).

Otros cosolutos

El ácido etilendiamonio tetracético (EDTA) y un pH de 8 protegen a la enzima de su inactivación, la dilución de la enzima a un pH de 7 a temperatura ambiente favorece la forma dimérica al igual que la presencia del malato y el EDTA. La presencia del PEP, $Mg^{2+}$ y bicarbonato, inducen la forma tetramérica (Wu *et al.*, 1990). También, se ha visto que el glicerol estabiliza la estructura cuaternaria de la enzima (Podestá y Andreo, 1989).

Cationes

Un catión divalente como el $Mg^{2+}$ resulta ser un activador indispensable de la reacción catalizada por la PEPC. El papel del $Mg^{2+}$ es el de formar un complejo de unión en el sitio activo de la enzima (enzima-catión-PEP; Maruyama *et al.*, 1966). Además, esta enzima dependiente de bicarbonato puede catalizar la hidrólisis del PEP con la formación de piruvato (Ausenhus y O´Leary, 1992). Dicha reacción colateral (esquema 2) representa menos del 5% de la conversión del PEP en condiciones que semejan la situación *in vivo*, pero esta proporción se puede incrementar hasta alcanzar un 50% en

presencia de otros metales divalentes como el $Ni^{2+}$ (Ausenhus y O'Leary, 1992). Aún cuando *in vitro* el $Mn^{2+}$ y el $Co^{2+}$ pueden reemplazar al $Mg^{2+}$ como cofactores de la PEPC, éstos son menos efectivos (O'Leary *et al.*, 1981). Otros cationes divalentes como el $Zn^{2+}$, $Hg^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Cu^{2+}$ y $Cd^{2+}$ resultan ser inhibidores de la enzima (Andreo *et al.*, 1987). Se cree que el $Mg^{2+}$ es el cofactor de la PEPC *in vivo* porque se encuentra en mayor proporción en el citoplasma de las plantas que los otros metales mencionados (Andreo *et al.*, 1987; Wedding y Black, 1988; Sigel y Sigel, 1990; da Silva y Williams, 1991).

$$\text{Fosfo}\textit{enol}\text{piruvato} + HCO_3^- \xrightarrow{Me^{2+}} \text{piruvato} + CO_2 + Pi$$

Esquema 2. Reacción de hidrólisis del PEP catalizada por la PEPC.

Bicarbonato

El bicarbonato que se utiliza en esta reacción proviene principalmente del $CO_2$ atmosférico, el cual pasa a través de los estomas de las hojas de la planta (Davies, 1979). El dióxido de carbono reacciona con el agua para formar el bicarbonato, esta reacción se favorece con ayuda de la enzima que es la anhidrasa carbónica (Badger y Price, 1994).

Para los estudios cinéticos de la PEPC por efecto del bicarbonato, es difícil controlar la concentración del $HCO_3^-$ porque existe un equilibrio entre el $CO_2$ del ambiente, el dióxido de carbono disuelto en agua y el $HCO_3^-$ en disolución acuosa por ello es necesario trabajar en atmósferas controladas.

Se ha reportado una $K_m$ ($HCO_3^-$) para la enzima de maiz de 20 μM a un pH de 7, 100 μM a un pH de 8 , y 160 μM a un pH de 9.5, todos los ensayos se hicieron en presencia del $Mg^{2+}$ (O´Leary, 1982).

Sustrato

El PEP se considera como el sustrato de la PEPC, pero ciertos estudios realizados en los últimos años demuestran que la afinidad de la PEPC de maíz por el complejo Mg-PEP es mayor que por el PEP o por el $Mg^{2+}$ por lo que se considera el sustrato de la enzima al complejo Mg-PEP (Wedding *et al.*, 1988; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Lopez-Valentin, 1997; Tovar-Méndez *et al.*, 1998).

### 3.3. Estructura de la fosfo*enol*piruvato carboxilasa.

La estructura primaria de la PEPC ha sido deducida a partir de los genes que la codifican en un número importante de especies, además se ha visto que se conserva en un porcentaje significativo la secuencia de los aminoácidos (Andreo *et al.*, 1987; Rajagopalan *et al.*, 1994). Se cree que las secuencias más conservadas participan en los eventos catalíticos y en los mecanismos regulatorios de la enzima (Andreo *et al.*, 1987; Rajagopalan *et al.*, 1994). En la secuencia del ADN que codifica para la PEPC de maiz se encontró que la enzima está constituida por 935 aminoácidos, revelando un 43% de homología con la enzima de *E. coli* y un 33% de homología con la carboxilasa de cianobacterias (Andreo *et al.*, 1987; Rajagopalan *et al.*, 1994).

Además la secuencia entre los residuos 603 y 616 (FHGRGGSIGRGGAP) de la enzima de *Zea mays* está altamente conservada en las tres isoformas de la proteína y parece ser única para la PEPC (Rajagopalan *et al.*, 1994). Se propone que en ésta secuencia puede encontrarse el sito de unión para el PEP. Además, algunas lisinas y varias argininas están conservados en la secuencia de varias carboxilasas (Andreo *et al.*, 1987; Gao y Woo, 1995, 1996).

Estudios de modificación química en la PEPC de maíz han demostrado que 2 de los residuos de arginina antes descritos y cuatro residuos de lisina por tetrámero, son indispensables para la actividad y que estos grupos son protegidos por el PEP (Andreo *et al.*, 1987). Estudios cinéticos a diferentes valores de pH nos indican 2 residuos de aminoácido con un $pK_a$ alrededor de 7.3 que son muy importantes para la unión del PEP y/o $Mg^{2+}$ de la PEPC de maíz, probablemente se trate de residuos de histidinas (Iglesias y Andreo, 1983). Varios residuos de histidinas se conservan en las tres isoformas de la proteina y uno de estos se encuentra en la región entre los residuos 603 a 616 de la enzima de maíz antes mencionada. Estudios de derivatización de la enzima con piridoxal 5´-fosfato demuestran que existe un residuo de histidina en la vecindad de las lisinas mencionadas anteriormente (Andreo *et al.*, 1987). Muchos estudios han reportado que grupos tiol son indispensables en la actividad de la enzima, cuatro de estos grupos por tetrámero parecen estar presentes en los sitios de unión del PEP (Chardot y Wedding, 1991). Experimentos realizados con bromopiruvato sugieren que se encuentran localizados cerca de la región de interacción con el grupo metileno del PEP

(Gonzalez *et al.*, 1986). La PEPC de maíz tiene varios residuos de cisteínas y estudios más recientes han confirmado que en la enzima nativa presenta 8 puentes disulfuros (Stiborvá y Leblová, 1986).

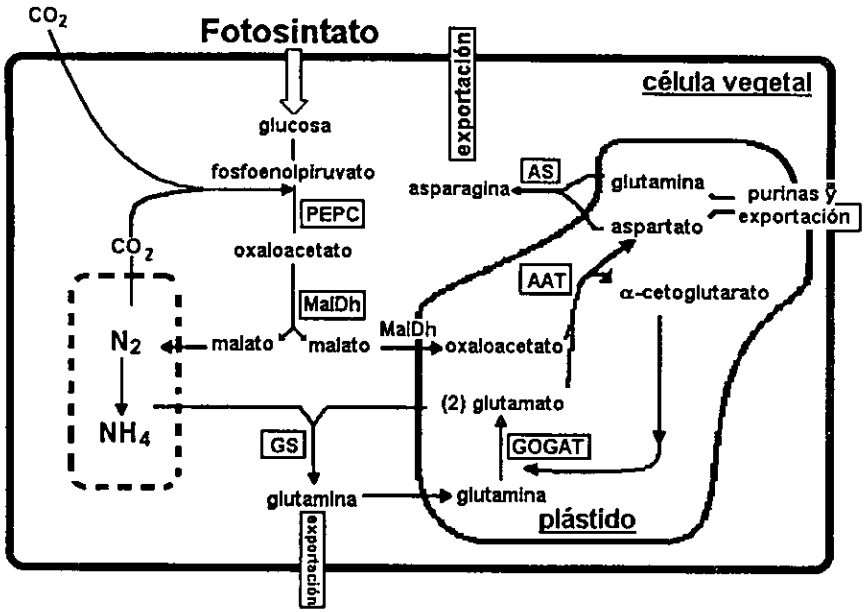
Walker *et al.* (1986) reportaron que la modificación de los grupos tiol por *p*-cloromercuribenzoato y de los residuos de histidinas por dietil pirocarbonato causan la disociación en dímeros y monómeros. Estos resultados indican que los residuos de histidinas y cisteínas son importantes para mantener la estructura cuaternaria de la enzima (Walker *et al.*, 1986). El arreglo espacial de las subunidades del tetrámero ha sido determinado por medición de la difusión rotacional de la PEPC de hoja de maíz modificada con isotiocianato de eosina. La estructura hidrodinámica de ésta enzima en ausencia y presencia de todos los sustratos podrían describir un arreglo tetraédrico, mientras con el bicarbonato y el $Mg^{2+}$ o el PEP y el $Mg^{2+}$ el arreglo es trigonal con una distorsión centrada. Se puede especular que ésta estructura representa una transición conformacional de la enzima durante el ciclo catalítico (Andreo *et al.*, 1987).

Se ha descrito que la PEPC de plantas CAM extraída de hojas mantenidas en obscuridad presenta la forma tetramérica y la forma dimérica cuando las hojas se encontraban iluminadas. Ambos extractos presentan actividad, pero la forma dimérica o iluminada era sensible a la inhibición por malato mientras que la otra forma no (Andreo *et al.*, 1987). Sin embargo, el significado de estas observaciones es cuestionable, ya que estudios recientes demuestran que la enzima se mantiene en estado tetramérico bajo condiciones de alta concentración de proteína, semejante a las que deben

existir *in vivo* (Chollet *et al.*, 1996; Tovar-Mendez *et al.*, 1997). por lo tanto es más factible que el efecto de sensibilidad a malato se deba a las diferencias en el estado de fosforilación de la enzima bajo las condiciones de luz y obscuridad (Jiao y Chollet, 1991).

### 3.4. Papel de la fosfoenolpiruvato carboxilasa en el metabolismo de las plantas.

La PEPC tiene otras funciones no fotosintéticas en las plantas como: la función anaplerótica en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Outlaw y Kennedy, 1991). Consiste en el restablecimiento de intermediarios del ciclo (i.e. oxaloacetato y malato), ofreciendo esqueletos carbonados necesarios para asimilar el nitrógeno y biosíntesis de aminoácidos (Melzer y O´Leary, 1987; Schuller *et al.*, 1990; Huppe y Turpin, 1994). La función anaplerótica de la PEPC es importante en todas las células vegetales (esquema 3) y es especialmente notable en condiciones en las que el consumo de ácidos orgánicos de 4, 5 y 6 carbonos es abundante, como por ejemplo en tejidos con una abundante síntesis de aminoácidos (Melzer *et al.*, 1987), como ocurre durante la formación de las semillas y la germinación (Duffs y Chollet, 1995; Bort *et al.*, 1996; Watson y Duffus, 1988), ó durante la maduración de las frutas (Blanke y Lenz, 1989). Por lo general, la actividad de PEPC se ve incrementada durante la división celular y la organogénesis (Lepiniec *et al.*, 1994) y también recaptura el $CO_2$ respirado, mantiene el pH y la electroneutralidad (Andreo *et al.*, 1987).




Esquema 3. Interrelación entre los metabolismos del N y el C (adaptado de Vance *et al.*, 1994). PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH: malato deshidrogenasa; GS: glutamina sintetasa; AS: asparagina sintetasa; AAT: aspartato aminotransferasa; GOGAT: NADH-glutamato sintasa.

Por otra parte, existen tres tipos de mecanismos descritos en plantas $C_4$ que permiten aprovechar el oxaloacetato producido por la reacción catalizada por la PEPC. La vía de la enzima málica dependiente del nicotinadenina-di nucleótido ($NAD^+$), la vía de la enzima málica dependiente del nicotinadenina-fosfodinucleótido ($NADP^+$) y la vía de la fosfo*enol*piruvato carboxicinasa.

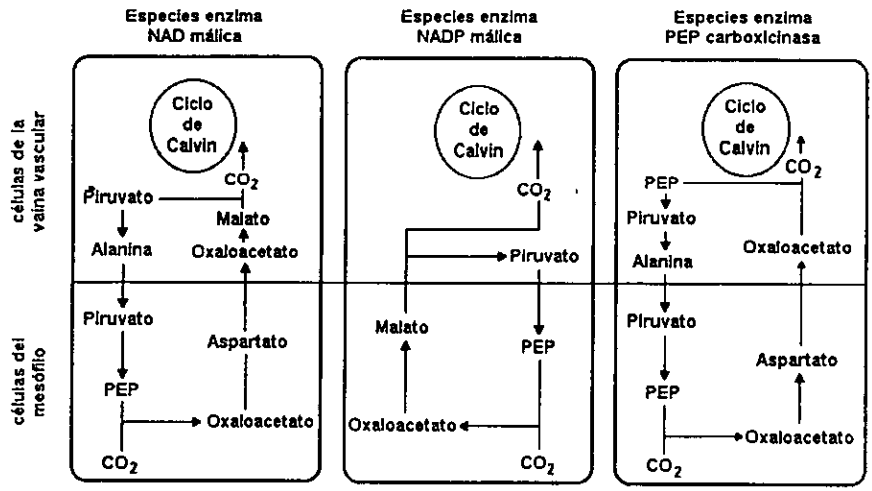
En las células del mesófilo de las especies en las que predomina la enzima málica dependiente de $NADP^+$, el oxaloacetato producido por la reacción catalizada por la PEPC es reducido a malato. El malato pasa después a las células envolventes del haz vascular y es descarboxilado por la

enzima málica dependiente de $NADP^+$. Los productos de reacción son el NADPH, el $H^+$, el piruvato y el $CO_2$. El $CO_2$ formado es fijado por el ciclo de Calvin y el piruvato es transportado de regreso hasta las células del mesófilo, en donde es reconvertido a PEP dentro del cloroplasto por la enzima piruvato ortofosfato dicinasa para reiniciar el ciclo.

En las especies en que predomina la enzima málica dependiente de $NAD^+$, el oxaloacetato es transaminado a aspartato dentro del mesófilo y es conducido a las células envolventes del haz vascular. En las transaminaciones asociadas a la ruta $C_4$ se encuentran implicados el glutamato y el α-cetoglutarato como donante y aceptor del grupo amino, respectivamente. Una vez en las células envolventes del haz vascular, el aspartato es desaminado a oxaloacetato, que es reducido después a malato, transportado a la mitocondria y descarboxilado por la enzima málica dependiente de $NAD^+$. Los productos de reacción son el NADH, el $H^+$, el piruvato y el $CO_2$, este último se integra al ciclo de Calvin. El piruvato formado en esta reacción es transaminado a alanina, que es transportado a las células del mesófilo. Una vez allí, la alanina sufre una nueva transaminación volviéndose a formar el piruvato, el cual es incorporado al cloroplasto y convertido a PEP para reiniciar el ciclo. Esta última transaminación permite mantener el balance de nitrógeno entre las células del mesófilo y las del haz vascular.

En las especies en las que predomina la PEP carboxicinasa, el oxaloacetato es transaminado a aspartato en las células del mesófilo. El aspartato es transportado después a las células envolventes del haz y es

transaminado de nuevo generando el oxaloacetato. El oxaloacetato es descarboxilado por una PEP carboxicinasa dependiente de ATP. Los productos de la reacción de descarboxilación son el ADP, el PEP y el $CO_2$. El $CO_2$ se intregra al ciclo de calvin. El PEP producido es transportado a las células del mesófilo. Dado que un aminoácido $C_4$ (aspartato) es capturado por las células envolventes del haz vascular y que lo que regresa es un ácido orgánico $C_3$, se necesita un intercambio antiparalelo de piruvato y alanina para mantener el balance de nitrógeno entre las células del mesófilo y las células de la vaina vascular (esquema 4).

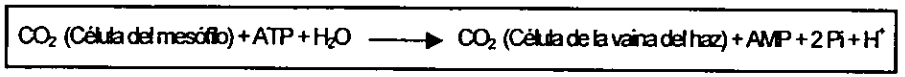



Esquema 4. Los subgrupos de plantas $C_4$ (tomado de Smith y Wood, 1992).

Esto indica que el metabolismo $C_4$ ha aparecido numerosas veces a lo largo del proceso evolutivo en forma independiente (Lepiniec *et al.*, 1994;

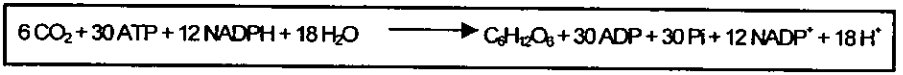
Rajagopalan *et al.*, 1994).

Se podría establecer una reacción neta para la asimilación del $CO_2$ donde interviene la PEPC en las plantas $C_4$ , (esquema 5).




Esquema 5. Reacción neta de bombeo de $CO_2$ presente en el metabolismo fotosintético de las plantas $C_4$ (tomado de Stryer 1990).

Se puede ver que el transporte del $CO_2$ de la célula del mesófilo a la célula de la vaina del haz se consumen dos enlaces fosfatos de alta energía. Si conjuntamos la vía $C_4$ y el ciclo de Calvin quedaría representado como lo muestra el esquema 6.




Esquema 6. Reacción neta de asimilación del $CO_2$ en plantas $C_4$ (tomado de Stryer 1990).

A pesar de los costos energéticos adicionales, el ciclo $C_4$ es tan efectivo suprimiendo las pérdidas por fotorrespiración que bajo condiciones fotosintéticas en las que la irradiación solar no es limitante las plantas $C_4$ tiene mayor rendimiento cuántico (mol de $CO_2$ fijado por mol de fotones absorbido) superior al que presentan las plantas $C_3$ bajo estas mismas condiciones, por lo que se ha catalogado a las plantas $C_4$ como plantas de

alta productividad. Sin embargo, bajo condiciones de iluminación limitante y baja temperatura, la fotosíntesis es más lenta y las plantas $C_3$ resultan tan eficientes como las $C_4$. Además, las plantas $C_3$ son más tolerantes al estrés por frío, por lo que la distribución global de las plantas $C_4$ esta casi limitada a las regiones tropicales y subtropicales.

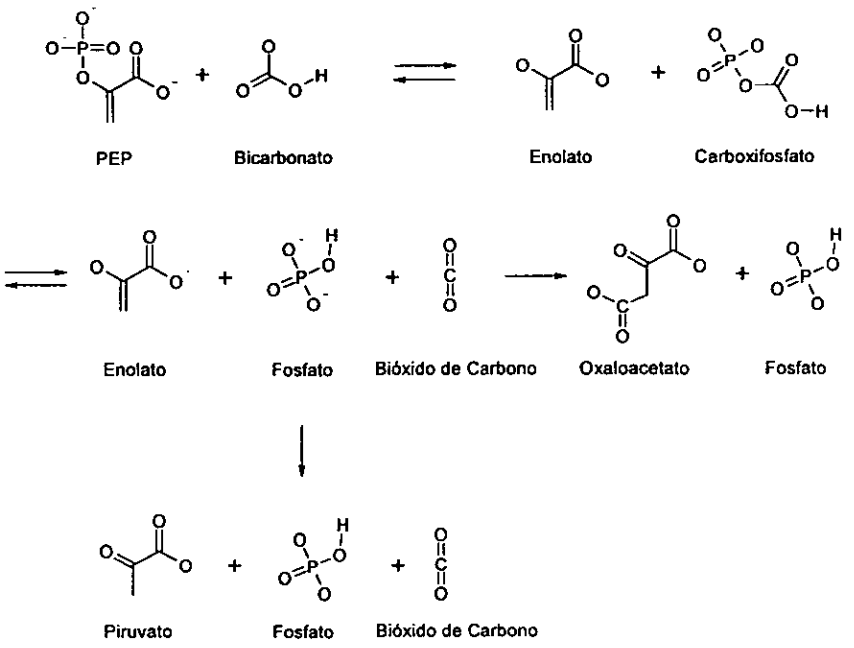
Las plantas tropicales que tienen la vía $C_4$ presentan escasa fotorrespiración debido a que la elevada concentración del $CO_2$ en sus células de la vaina del haz acelera la reacción de carboxilasa respecto a la de oxigenasa (Dennis y Turpin, 1990).

### 3.5. Mecanismo cinético y químico de la reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxilasa.

El mecanismo cinético que se ha propuesto es ordenado, primero el metal, después el PEP y por último el $HCO_3^-$ (O'Leary *et al.*, 1981; Chollet *et al.*, 1996). Sin embargo, este mecanismo ha sido revisado recientemente y se ha concluido que bajo las condiciones operantes *in vivo,* la adición de los sustratos PEP y $Mg^{2+}$ a la enzima ocurre preferencialmente en la forma del complejo Mg-PEP(Tovar-Mendez, *et al.* 1998.).

El primer paso del mecanismo químico es la transferencia reversible del grupo fosfato del PEP al bicarbonato formando el carboxifosfato y el *enol*piruvato (Chollet *et al.*, 1996), este último se halla aparentemente estabilizado por el ión metálico magnesio. El paso final previo a la liberación del oxaloacetato es el ataque nucleofílico del $CO_2$ al carbono-3 del

*enol*piruvato dando como producto el oxaloacetato; este paso requiere de la descomposición previa del intermediario carboxifosfato en dióxido de carbono y en fosfato inorgánico, también existe un paso irreversible no identificado que podría ser determinante de la velocidad de la reacción. Se propone que alguna base del sitio activo desprotona al intermediario provocando que se obtenga dióxido de carbono y fostato inorgánico, pero no se ha podido delucidar como el dióxido de carbono ataca al carbono-3 del *enol*piruvato, ya que estos dos intermediarios se encuentran fisicamente muy separados. Se plantea la hipótesis de que se requeriría un cambio conformacional de la enzima para poder acercar el carbono-3 del *enol*piruvato con el dióxido de carbono, ésta propuesta está apoyada por el hecho de que ninguno de los pasos claramente identificados son irreversibles y/o determinantes de la velocidad de la reacción y porque se ha observado que la carboxilación puede ser impedida por la liberación irreversible y prematura del piruvato sin la formación del oxaloacetato (hidrólisis del *enol*piruvato; esquema 7). Es decir, el estado del sitio activo previo a la carboxilación perdura lo suficiente para permitir el escape del enolato, lo que apoya la propuesta de que el paso siguiente está entre los pasos más lentos de la reacción (Janc *et al.*, 1992).




Esquema 7. Mecanismo de reacción de la PEPC (tomado de Chollet *et al.*, 1996).

### 3.6. Sitios alostéricos reguladores de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.

Por modificaciones química de argininas y lisinas de la PEPC se ha determinado la presencia de 3 sitios distintos de unión el la PEPC: uno para el PEP, otro para la G6P y otro para el malato y se ha establecido que el PEP puede unirse al sitio para la G6P (Rustin *et al.*, 1988; Tovar-Mendez *et al.*, 1997).

El sitio de unión para el PEP es el sitio activo, aunque ya se sabe que el sustrato es el complejo Mg-PEP (Wedding *et al.*, 1988; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Lopez-Valentin, 1997; Tovar-Méndez *et al.*, 1998).

El efecto de la G6P es disminuir la $K_m$ para el sustrato e incrementar ligeramente la $V_{max}$ , perdiendose al parecer la cooperatividad (Bandarian *et al.*, 1992; Duff y Chollet, 1995). Aunque el malato a bajas concentraciones es un inhibidor competitivo, a altas concentraciones es mixto (Huber y Edwards, 1975; Duff y Chollet, 1995).

Otro sitio adicional es el sitio para la glicina (Stiborová y Leblová, 1985; Bandarian *et al.*, 1992) que presenta efectos aditivos con la activación por la G6P.

### 3.7. Efecto de los análogos del fosfoenolpiruvato sobre la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.

El estudio con análogos del sustrato nos puede definir un perfil de un sitio. Este análisis resulta particularmente interesante en el caso de la PEPC, dado que el sustrato (PEP) también se pega al sitio alostérico activador para la G6P (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez *et al.*, 1997).

En seguida se muestra la tabla 1 con una lista de análogos del sustrato PEP que son inhibidores competitivos, es decir, que se unen al sitio activo de la PEPC de maíz.

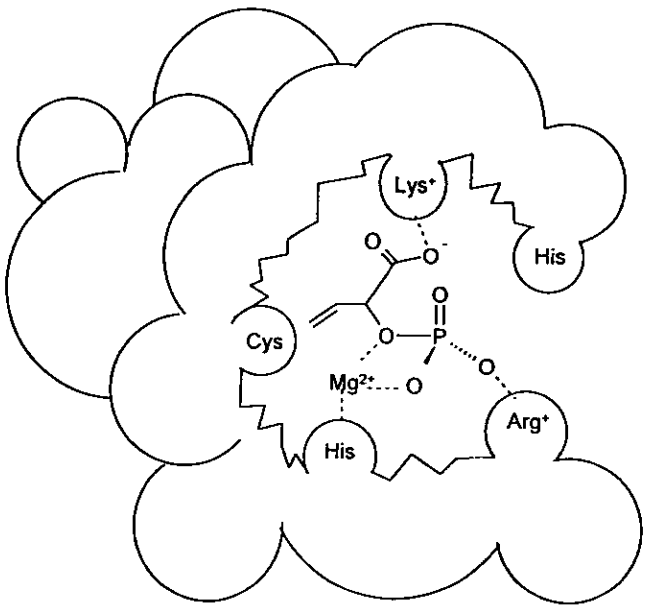
**Tabla 1**. Análogos del PEP y sus constantes de inhibición sobre la actividad de la PEPC de hoja de maíz (tomado de González y Andreo, 1989).

| Análogo | $K_i$ (μM) |
|---|---|
| Ácido 1-hidroxiciclopropano carboxílico fosfato | 7 |
| Fosfo*enol*-3-bromopiruvato | 7 |
| *Z*-metilfosfo*enol*piruvato | 17 |
| 3,3-dicloro-2-dihidroxifosfinoil-metil-2-propenoato | 80 |
| *L*-fosfolactato | 100 |
| *E*-metilfosfo*enol*piruvato | 110 |
| Fosfoglicolato | 200 |
| Fosfo*enol*piruvato fosfonato | 400 |
| Dimetilfosfo*enol*piruvato | 380 |
| *E*-3-cianofosfo*enol*piruvato | 1360 |
| Fosfo*enol*tiopirivato | 2000 |
| Fosfonoacetato | 2000 |
| Fosfomalato | 2600 |
| Fosfonopropionato | 10000 |

La conclusión general de los estudios realizados con los análogos de PEP que se unen al sitio activo es que el grupo fosfato y el carboxilato son muy importantes para la unión (O´Leary, 1982; Izui *et al.*, 1983; Andreo *et al.*,

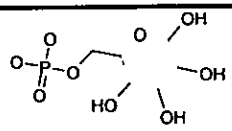
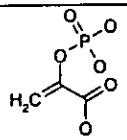
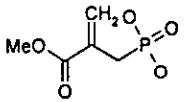
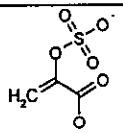
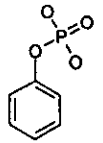
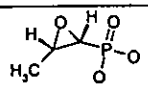
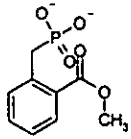
1987; Chavez-Montes, 1997). Cuando uno de estos dos grupos falta la constante de disociación se ve incrementada 2 veces el orden de magnitud (Andreo *et al.*, 1987). El ángulo en el carbono 2 (alrededor de 120°), el oxigeno del enlace C-O-P y el grupo metileno (carbono 3), son importantes para que se una el sustrato a la PEPC (Andreo *et al.*, 1987). Cuando se substituyó uno de los hidrógeno del metileno por un bromuro o un metilo, se generó una disminución de un orden de magnitud de la constante de disociación. Cuando se reemplazan ambos hidrógenos por metilos disminuye la constante de afinidad, esto indica la existencia de un impedimento estérico en una de las dos posiciones (Andreo *et al.*, 1987). En un experimento que utilizó *E*-cianofosfo*enol*piruvato se demostró una alta constante de disociación (1.36 mM) en presencia del $Mg^{2+}$. en tanto que el grupo ciano en posición *Z* no redujo la afinidad (Wirsching y O´Leary, 1985). Este y otros estudios han demostrado que los grupos en la posición *E* (trans al fosfato) producen un impedimento estérico severo (Duffy y Nowak, 1984; Andreo *et al.*, 1987; González y Andreo, 1988). Con todos los resultados obtenidos se sabe que en el sitio activo se encuentran presentes residuos de histidina, cisteína, arginina y lisina, los cuales son indispensables para la unión y catálisis del PEP. Se realizó un esquema hipotético de como podrían encontrarse distribuidos estos aminoácidos en el sitio activo de la PEPC (esquema 8). Posiblemente los grupos cargados de arginina y lisina interaccionan con los grupos fosfato y carboxilato (en el esquema son asignados arbitrariamente). El imidazol de la histidina tal vez interaccione con el $Mg^{2+}$ y este a su vez interactúe con parte del grupo fosfato. Tomando esto en cuenta se puede

explicar la protección parcial proporcionada por el catión divalente contra la inactivación por dietil pirocarbonato y la disminución en la afinidad por el PEP y el $Mg^{2+}$ cuando las histidinas se encontraban protonadas. Una de las cisteínas postuladas está localizada cerca de la región de unión del grupo metileno. Esto es soportado por los experimentos con análogos del PEP como son el fosfo*enol*-3-bromopiruvato y el bromopiruvato (Andreo *et al.*, 1987).




Esquema 8. Propuesta del sitio activo de la PEPC (modificado de Andreo *et al.*, 1987).

**Tabla 2.** Análogos del PEP que han sido reportados como activadores de la PEPC.

| Análogo | Fórmula desarrollada |
|---|---|
| Glucosa-6-fosfato[1] |  |
| Fosfo*enol*piruvato[2] |  |
| 2-fosfometil-2-propenoato de metilo[3] |  |
| Sulfo*enol*piruvato[4] |  |
| Fenilfosfato[5] |  |
| Fosfomicina[6] |  |
| 2-fosfometil benzoato de metilo[7] |  |

[1]Wedding *et al.*, (1989); [2]Rustin et al., (1988); [3]Jenkings *et al.*, (1986); [4]Peliska y O´Leary, (1989); [5]Rodriguez-Sotres y Muñoz-Clares, (1990); [6]Mújica-Jiménez *et al.*, (1998); [7]Chavez-Montes, (1997).

En la tabla 2 se muestran algunos de los activadores naturales de la PEPC como la G6P y el PEP, también se muestran otros activadores que presentan cierta analogía estructural con el PEP, pero que no se encuentran *in vivo*.

Se ha reportado que los flavonoides también son excelentes inhibidores de la PEPC, pero aún no se sabe como podrían intervenir como reguladores de esta enzima *in vivo*, ni se ha descrito el sitio al que se unen (Pairoba *et al.*, 1996).

## 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las especies de pastos de origen tropical llamadas $C_4$, como el maíz, la caña de azucar y el sorgo, son especies que presentan una gran importancia económica; ya que son capaces de fotosintetizar con mayor rapidez y producir mayor biomasa si se les cultiva bajo irradiación y temperatura elevadas.

Dada la importancia de la fosfo*enol*piruvato carboxilasa (PEPC) encargada de fijar inicialmente al $CO_2$ en las plantas $C_4$ y CAM, y que además está altamente regulada (O'Leary, 1982; Chollet *et al.*, 1996), los estudios acerca de las características del sitio activo y del sitio alostérico de la enzima resultan de gran relevancia.

Como ya se mencionó, además de su función fotosintética, una gran cantidad de funciones fisiológicas han sido propuestas para la PEPC puesto que puede proveer de esqueletos carbonados para el ciclo de Krebs (función anaplerótica) y para los requerimientos de asimilación del nitrógeno (Manh *et al.*, 1993; Sugiharto *et al.*, 1990, 1992; Champigny y Foyer 1992; Champigny; 1995); también la enzima está involucrada en la regulación en los cambios del pH (Manicol y Jacobsen, 1992). Dada la diversidad de funciones en que la PEPC puede participar, no es sorprendente que esta proteína presente múltiples sitios alostéricos regulatorios que le permitan modular versatilmente su actividad a través de la unión de diversos ligandos.

Así, si deseamos modificar en una planta ciertas caraterísticas relacionadas con su capacidad para acumular determinados compuestos

carbonados tales como las proteínas, los azúcares, los polisacáridos y/o los ácidos grasos, es necesario entender las características que regulan a la PEPC, a fin de modificar sólo la respuesta necesaria para obtener el resultado deseado, sin afectar todas las demás funciones de la planta.

Como ya se ha mencionado en los antecedentes, el análisis de los ligandos que interactúan con un sitio de una proteína puede decirnos mucho sobre las características de dicho sitio (González y Andreo, 1987). Así, el presente proyecto intenta definir mejor las características químicas y moleculares de los ligandos que modifican la actividad de la PEPC al unirse al sitio alostérico activador para la G6P de esta enzima. Para entender mejor la acción de estos ligandos, también es necesario conocer las afinidades relativas de los mismos por el $Mg^{2+}$, en virtud de que la concentración de este catión puede modificarse inadvertidamente si no se toma en cuenta la formación de complejos con el ligando en estudio.

## 5. HIPÓTESIS

Los compuestos que se unen al sitio alósterico activador de la fosfo*enol*piruvato carboxilasa se distinguen de los que se unen al sitio activo por poseer dos en lugar de tres cargas negativas y existe una distancia óptima entre los átomos que soportan dichas cargas.

## 6. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar el efecto cinético de varios análogos del PEP sobre la PEPC y en su caso, determinar las constantes de unión al sitio alostérico activador para la G6P sobre la enzima fosfo*enol*piruvato carboxilasa de hoja de maíz.

Objetivos particulares:

- Determinar la capacidad de los compuestos para formar complejos con el magnesio.
- Estudiar el efecto los compuesto elegidos sobre la cinética de la fosfo*enol*piruvato carboxilasa.
- Determinar las constantes de unión de los compuestos al sitio activo y al sitio alostérico activador para la D-glucosa-6-fosfato.
- Analizar la geometría de los compuestos y su distribución de cargas.

## 7. METODOLOGÍA

**Purificación de la enzima.**

La enzima fosfo*enol*piruvato carboxilasa se obtuvo de las hojas de la planta de maíz (*Zea mays*). Las plantas crecieron en un invernadero con iluminación natural, por 4 a 6 semanas y a una temperatura entre 20 y 30 °C.

La enzima se purificó conforme a lo reportado por Mújica-Jiménez *et al*,. (1998), según se describe a continuación. La planta se mantuvo por lo menos 12 horas antes de su extracción en completa obscuridad y el proceso de extracción se realizó en las mismas condiciones. A las hojas se les despojó de su nervadura, se les colocó en una solución amortiguadora de extracción (A) en una relación de buffer a tejido de 1:3 y se les homogenizó a 4 °C en un mortero. El amortiguador de extracción (A) contenía: el ácido N-[2-dihidroxietil] piperazina-N´-[2-etanosulfónico](HEPES) a una concentración de 100 mM ajustado a un pH de 7.5 con KOH, con 20 % (v/v) de glicerol y 0.2 mM de EDTA y, un momento antes de la extracción, fueron adicionados con 5 mM de malato, 10 mM de $MgCl_2$, 25 mM de $PO_4^{3-}$ (sal de potasio), 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 5 mM de DL-ditiotreitol (DTT) y 2 mM de benzamidina, más 100 µg/mL de quimostatina como inhibidores de proteasas. El homogenado se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugó a 40,000 rpm durante 30 minutos. Los pasos subsecuentes ya no se realizaron en obscuridad.

El sobrenadante se aplica a una columna de dietilaminoetil-celulosa (DEAE)-Sephacel de 50 mL, equilibrada con un amortiguador (B) que contenía: HEPES-KOH 50 mM a un pH de 7.5, 0.1 mM de EDTA , 10% (v/v) de glicerol, 25 mM de $K_2HPO_4$, 1 mM de PMSF, 5 mM de DTT, 5 mM de malato, 2 mM de benzamidina y 10 µg/mL de quimostatina. La actividad de PEPC se eluyó con un gradiente de fosfatos de potasio (pH 7.5) de 25 hasta 500 mM, aplicado en el mismo amortiguador (B) de equilibrio. Finalmente, se reunieron las fracciones de mayor actividad (ver ensayo de actividad más adelante) y se aplicaron a una columna de Sepharosa Q de flujo rápido de 30 mL, equilibrada con el amortiguador (B). La actividad de PEPC se eluyó con un gradiente de fosfatos de potasio de 25-500 mM, aplicado en el mismo amortiguador de equilibrio (B).

Después se reunieron las fracciones de mayor actividad y se aplicaron a una columna de Superdex 200 FPLC utilizando el mismo amortiguador (B, sin fosfatos) para su elución. Las fracciones eluídas de la columna de Superdex con actividad de PEPC se colectaron y mezclaron, se les añadido glicerol al 10% (v/v) y se congelaron a -70 °C. En estas condiciones la enzima puede conservarse durante varias semanas sin pérdida apreciable de actividad.

El análisis mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), reveló que la enzima tenía una pureza de más del 98%, según el criterio de tinción con azul de Coomassie G.

**Determinación de la concetración de proteína.**

La proteína se cuantificó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), el cual se basa en la formación de un complejo azul que se forma al unirse el reactivo azul de Coomasie (azul brillante G) con ciertos residuos de las proteínas. El reactivo se preparó a partir de azul de Coomasie 0.05% (p/v) en una solución de ácido perclórico al 0.6% (p/v), una vez disuelto se filtró. Se realizó una curva patrón con la albúmina de suero bovino (ASB) disuelta en agua a un concentración de 2 mg/mL. A esta disolución se agregó 0.02% de azida de sodio. Se tomaron volúmenes crecientes de la disolución de ASB desde 0 hasta 40 µL y se completó a 50 µL con agua destilada. Luego se le agregaron 5 mL del reactivo de Bradford, se mezclaron y dejaron reposar 20 minutos y finalmente se midió la absorbancia a 595 nm. Para la determinación de la proteína en nuestras muestras se tomaron 5 µL de estas y se llevaron a un volumen de 50 µL con agua destilada, después se les adicionaron los 5 mL del reactivo de Bradford y se midió su absorbancia a 595 nm; el valor obtenido se interpoló en la curva patrón de ASB.

**Determinación de las constantes de unión de $Mg^{2+}$ con los compuestos en estudio, Método espectofotométrico.**

El ión magnesio es indispensable para la reacción que cataliza la PEPC por lo que la concentración de este ión en el medio debe conocerse muy bien. Por lo tanto se tuvo que determinar las constantes de unión del ión magnesio con los ligandos en estudio. Para esto se utilizó un método

espectrofotométrico, el cual se basa en la formación del complejo de $Mg^{2+}$ con la 8-hidroxiquinoleina (8-HQ) :

$$8\text{-HQ} + Mg^{2+} \overset{K_0}{\rightleftharpoons} Mg\text{—}8HQ$$

donde $K_0$ es la constante de formación del complejo que presenta un máximo de absorbancia a 360 nm, si el ligando forma un complejo con el magnesio entonces se establecería la siguiente reacción:

$$\text{Ligando} + Mg^{2+} \overset{K_e}{\rightleftharpoons} Mg\text{—ligando}$$

donde $K_e$ es la constante de estabilidad del complejo magnesio-ligando.

Se utilizó un amortiguador que contenía: trietanolamina (TEA) 50 mM ajustando el pH a 7.3 con HCl, 0.5 mM de 8-hidroxiquinoleina (quelante del magnesio) y se fijó la fuerza iónica a 0.15 M con cloruro de tetraetilamonio. La absorción a 360 nm revela la presencia del complejo Mg—8-hidroxiquinoleina, por lo que en dos celdas espectrofotométricas paralelas se añadió el amortiguador anterior y solo a una ellas se le adicionó cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 10 mM. La absorbancia de la celda sin magnesio se empleó como blanco y se registró la absorbancia de la seguna celda. A continuación, se adicionaron alícuotas sucesivas de la solución con magnesio a la celda blanco y la absorbancia se registró después de cada adición. Este procedimiento se repitió pero en presencia de una cierta concentración del

ligando en estudio en ambas celdas a varios niveles de concentración. Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación siguiente:

$$[Mg^{2+}]_{total} = \frac{A}{\varepsilon} + \frac{A}{K_0 \cdot HQ_t \cdot \varepsilon - A} + \frac{L_t \cdot K_e \cdot A}{K_0 \cdot HQ_t \cdot \varepsilon + A \cdot (K_e - K_0)}$$

La variable dependiente fue la absorbancia y la variable independiente fue la concentración total del ión magnesio, $HQ_t$ es la concentración total de la 8-hidroxiquinoleina, $L_t$ es la concentración total del ligando, $K_0$ es la constante de estabilidad global del complejo Mg — 8-hidroxiquinoleina (Mg-8HQ), $\varepsilon$ es el coeficiente de extinción molar del complejo Mg-8HQ, ($A$) es la absorbancia de la disolución y $K_e$ es la constante de estabilidad aparente del complejo Mg-ligando la cual es la que queremos calcular; todas las concentraciones se manejaron en mM y las constantes en $mM^{-1}$.

Con los valores obtenidos de las $K_e$ por cada una de las diferentes concentraciones de ligando se hizo un regráfico de $1/K_e$ *vs* la concentración del ligando total. La interpolación a concentración del ligando igual a cero nos proporciona el valor de la constante de estabilidad global del complejo Mg-ligando al pH de trabajo (O´sullivan y Smithers, 1979). Para todos los cálculos se utilizó el programa MicroCal Origin version: 3.01 (MicroCal Software, Inc. One Roundhouse Plaza Northampton, MA 01060. USA).

**Ensayos de la actividad de la PEPC para los estudios cinéticos.**

Con los valores obtenidos de las constantes de estabilidad de los complejos Mg-ligando se pudieron calcular las concentraciones totales requeridas de PEP, $MgCl_2$ y ligandos requeridas para la realización de los experimentos que se detallan a continuación. Dichos cálculos se realizaron mediante el uso del programa MECOMPLX.EXE el cual sigue un sistema de ecuaciones autoconsistentes descrito por Storer y Cornish-bowden (1976), este programa fue desarrollado en la facultad de Química (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990).

Para este estudio se utilizó una disolución amortiguadora de TEA-HCl a pH 7.3, que contenía: 1 mM de EDTA, 0.2 mM de nicotinadenina dinucleótido (NADH), 10 mM $NaHCO_3$, 2 U/mL de malato deshidrogenasa (MDH), las concentraciones indicadas de ligando, PEP y $MgCl_2$ en un volumen final de 1 mL. La actividad se determinó mediante una reacción acoplada a la reacción que cataliza la PEPC:

$$PEP + HCO_3^- \xrightarrow{PEPC} \textbf{Oxaloacetato + NADH + } H^+ \xrightarrow{MDH} \textbf{malato + } NAD^+$$

el cambio de absorbancia se debió a la oxidación del NADH que es la especie que absorbe a 340 nm, esto se realizó en un intervalo de hasta 120 segundos a 30 °C y a 340 nm. El coeficiente de extinción molar empleado fue de 6.22 $\mu M^{-1}cm^{-1}$. El ensayo estándar para medir actividad de PEPC contenía 2.5 mM de PEP y 5 mM de $MgCl_2$.

**Determinación de la constantes de unión por protección frente a la modificación química de la PEPC con piridoxal-5'-fosfato.**

A una alícuota de la enzima recién descongelada se le aplicó un desalado por repetidos pasos de concentración y dilución mediante centrifugación en centricón (amicón S30) en un medio TEA HCl 0.1M, pH 7.3 y 1 mM de EDTA.

Por otro lado, en un tubo envuelto con papel aluminio se colocó una pequeña cantidad de piridoxal-5'- fosfato (PLP, aproximadamente 1 mg) adicionando 1 mL de agua. La concentración se determinó a través de su absorción a 388 nm, con un coeficiente de extinción molar de 4.9 $\mu M^{-1}$ $cm^{-1}$.

Después se mezcló la enzima con 0.4 mM de PLP, cantidades variables del ligando en estudio y agua hasta alcazar un dilución de la enzima de 2 veces. Cuando se indica, también se adicionaron Mg y/o fosfoglicolato. Las muestras se incubaron en obscuridad, por una hora a temperatura ambiente y al término de la incubación se determinó la actividad residual de PEPC. Mediante ensayos de actividad estándar con y sin adición de 10 mM del activador glucosa 6-fosfato en la cubeta.

**Procesamiento de datos.**

Los datos cinéticos se ajustaron mediante una regresión no lineal a la ecuación de velocidad mediante el programa MicroCal Origin y de este ajuste se determinaron las constantes correspondientes, a saber: $I_{50}$, $V_{max}$ y $K_m$ o $S_{0.5}$ y h.

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

Michaelis-Menten:

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

Hill:

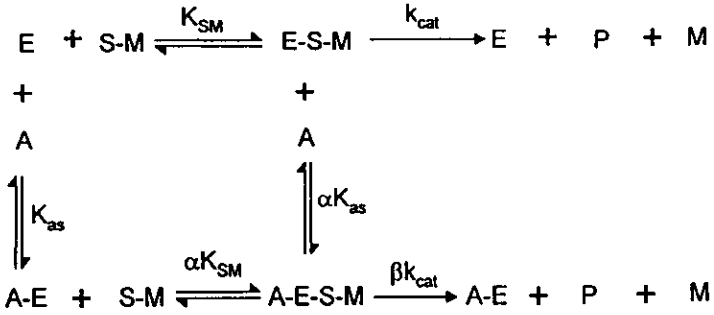
$$v = \frac{V_{max} \cdot [PEP \cdot Mg]^h}{S_{0.5}{}^h + [PEP \cdot Mg]^h}$$

Inhibición de tipo hiperbólico (general):

$$v = \frac{(P_0 - P_\alpha)}{(1 + x / I_{50}) + P_\alpha}$$

En donde ($v$) es la velocidad inicial determinada experimentalmente, $V_{max}$ es la velocidad máxima, $K_m$ es la constante de Michaelis-Menten, $S_{0.5}$ es la concentración de sustrato a la cual se tiene la mitad de la velocidad máxima, (h) es el número de Hil, $P_0$ es la velocidad inicial, $P_\alpha$ es la velocidad a concentración al infinito y la $I_{50}$ es la concentración de sustrato a la cual se tiene la mitad de la velocidad final.

Para los activadores alostéricos se maneja el siguiente mecanismo:




Esquema 9. E es la enzima PEPC, S-M es el sustrato y metal PEP-$Mg^{2+}$, E-S es el complejo enzima-sustrato, P es el producto, M es el metal, A es el activador, Kas representa laconstante de disociación del activador y la enzima. Los factores a y b indican el cambio que sufren las constantes de disociación o catalítica cuando se ocupa el sitio por el activador (Segel, 1975).

La ecuación resultante del mecanismo cinético de un activador alostéricos en condiciones de equilibrio rápido es :

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S\text{-}M] \cdot (\alpha K_{as} + \beta \cdot [A])}{\alpha K_{as} \cdot K_{SM} \cdot K_0 + [A] \cdot K_{SM} \cdot K_0 + [S\text{-}M] \cdot (\alpha K_{as} + [A])}$$

De los datos de protección frente a la modificación química se calculó la sensibilidad de la PEPC frente a la D-glucosa-6-fosfato.

La sensibilidad se calculó como actividad en presencia de la G6P (v) menos actividad en su ausencia ($v_0$) divida por la actividad en ausencia de la G6P ($v_0$).

$$S = \frac{v - v_0}{v_0}$$

Los compuestos estudiados son:

El ácido 2-sulfobenzoico, el ácido 3-sulfobenzoico, el ácido 4-sulfobenzoico, el ácido fenilarsonico, el ácido sulfobenzoico, el ácido sulfoacético, la glucosa-6-fosfato y la fosfomicina (ver anexo).

## 8. RESULTADOS

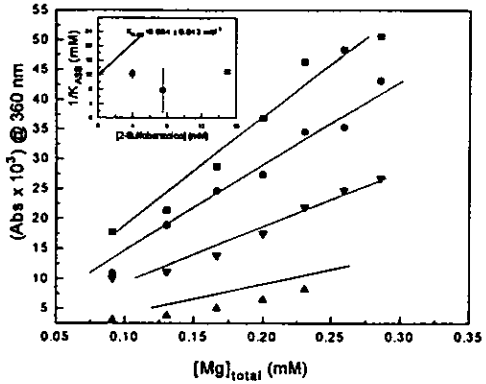
**Constantes de estabilidad de los complejos de magnesio con los análogos del PEP.**

Debido a que se ha demostrado que el sustrato preferencial de la PEPC es el complejo Mg-PEP (Wedding *et al.*, 1988; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Lopez-Valentin, 1997; Tovar-Méndez *et al.*, 1998), es necesario conocer la afinidad de los componentes de las mezclas de reacción que se desean ensayar con $Mg^{2+}$, ya que de otra manera resulta imposible calcular la concentración real del sustrato. Para ello se empleó el método de la competencia de la 8-hidroxiquinoleína y el ligando en estudio por el magnesio, que se describe en la sección de Metodologías. Las constantes aparentes de formación de los complejos magnesio-ligando obtenidas por este método se presentan en la tabla 3. Como puede observarse existe una gran variación en las afinidades de estos compuestos por el $Mg^{2+}$. La figura 1a y b muestran una gráfica que ilustra el tipo de datos que se obtienen con el uso de esta metodología; el ajuste se hizo a un modelo de equilibrios químicos múltiples mediante dos tipos de análisis distinto. Los valores obtenidos con ambos tipos de análisis fueron similares, si bien el modelo general reportó valores más pequeños para el error estándar. Los valores reportados en la tabla 3 son los obtenidos mediante este último tipo de análisis. Puede observarse que con excepción del ácido fenilársonico y del ácido sulfoácetico los valores de las constantes de formación de los complejos a pH 7.3 son similares a los

obtenidos a pH 8.3. Este resultado es el esperado puesto que a pH 7.3 todas estas moléculas menos el ácido fenilársonico, se hallan completamente ionizadas. En el caso del ácido fenilársonico, se calcularon con estos datos los valores de las constates de estabilidad globales (β) para las especies parcial y totalmente ionizadas.

El comportamiento del ácido sulfoacético resultó anómalo y para explicarlo se requeriría una mayor experimentación, lo que está más allá de nuestros intereses presentes.

a




b

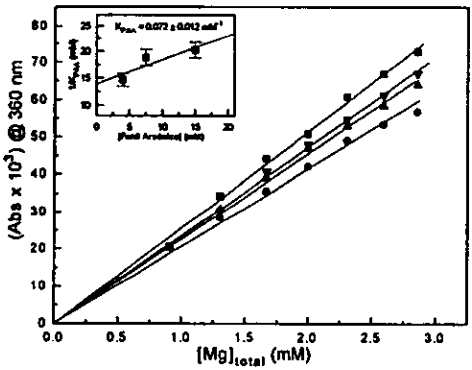



*Figura 1.* Determinación de la constante de estabilidad de los complejo Mg-Ligando a pH 7.3, con una fuerza iónica de 0.15 M y a 30 °C. En la gráfica principal se muestra la absorbancia (@) en función de la concentración de $Mg^{2+}$ añadido: a) En ausencia (■) y en presencia de 4.0 mM (●), 7.5 mM (▼) y 15.0 mM (▲) del ácido 2-sulfobenzoico. b) En ausencia (■) y en presencia del ácido fenilársonico 4.0 mM (●), 7.5 mM (▼) y 15.0 mM (▲). Las líneas son el resultado de un ajuste conjunto de los datos a una ecuación general con $Mg^{2+}$ y la concentración del ligando en estudio como variables. En los recuadros se muestra el resultado de ajustar cada curva a un modelo parcial con $Mg^{2+}$, como variable. El valor aparente de la constante de estabilidad obtenido a varias concentraciones de ligando se grafica en función de la concentración total del ligando añadido. Los valores de la constante de estabilidad obtenida con ambos métodos fueron similares.

Tabla 3. Constantes de estabilidad global ($K_{st}$) para los complejos con magnesio del fosfo*enol*piruvato y de algunos análogos.

| | pH 7.3 | pH 8.3 |
|---|---|---|
| | K ± se[1] ($M^{-1}$) | K ± se ($M^{-1}$) |
| 2-Sulfobenzoico | 84 ± 13 | 98 ± 74 |
| 3-Sulfobenzoico | 11 ± 3 | 4.6 ± 0.6 |
| 4-Sulfobenzoico | 3.6 ± 3 | 8.9 ± 0.91 |
| Fenilarsónico[2] | 84 ± 12 | 160 ± 14 |
| Bencensulfónico | 5.3 ± 0.4 | 3.2 ± 0.7 |
| Sulfoacético | 520 ± 40 | 210 ± 14 |
| Glucosa-6-fosfato[3] | 50 | n.d. |
| Fosfomicina[4] | 173 | n.d. |
| Fosfo*enol*piruvato | 180 | n.d. |

[1]Error estándar de la media. [2]Con estos datos se calcularon las constantes de estabilidad global $\beta_1(MgH(C_6H_5)AsO_3^+)$ 72 ± 11 $M^{-1}$ y $\beta_2(Mg(C_6H_5)AsO_3)$ 161 ± 50 $M^{-1}$ con un $pK_a$ de 8.77 (Eidhin y Cinneide, 1968). [3]Mancherster. [4]Flores-Santos L. y Rodríguez-Sotres R. (datos no publicados).

**Ensayos de cinética de saturación.**

Una vez establecido el valor de las constante de estabilidad entre las diferentes especies en el ensayo, se decidió realizar un análisis del efecto de estos compuestos sobre la actividad de la enzima PEPC a dos concentraciones fijas de PEP libre, una alta (5 mM) y otra baja (0.5 mM), y a dos concentraciones fijas de $Mg^{2+}$ libre (1 y 0.1 mM). Esto se hizo para el ácido 2-sulfobenzoico y para el ácido fenilarsónico, ya que en estudios preeliminares estos compuestos se identificaron como posibles activadores de la enzima PEPC. En la figura 2a y b se muestran las gráficas obtenidas para el ácido 2-sulfobenzoico a PEP libre constante. Se puede ver que en la figura 2a (PEP libre 0.5 mM) hay una fuerte activación de la PEPC por el

ácido 2-sulfobenzoico.

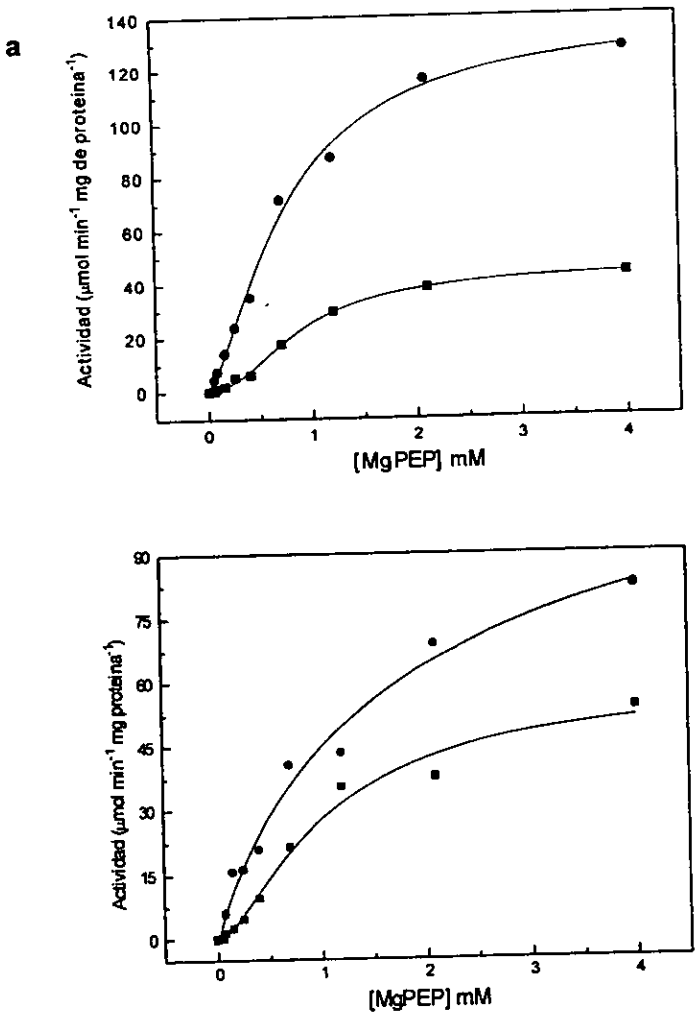
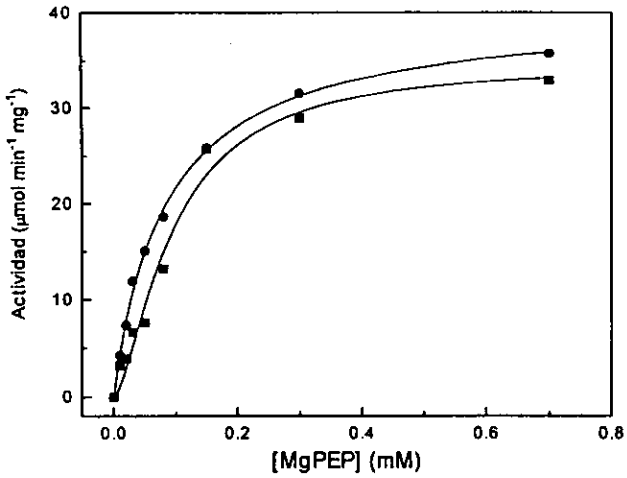



*Figura* 2. Cinética de saturación de la PEPC por el sustrato MgPEP a pH de 7.3, 30 °C y en ausencia ( ■ ), o en presencia de 5 mM del ácido 2-sulfobenzoico ( ● ). **a)** Se mantuvo la concentración de PEP libre constante en 0.5 mM. **b)** Se mantuvo la concentración de PEP libre constante en 5 mM.

a




b

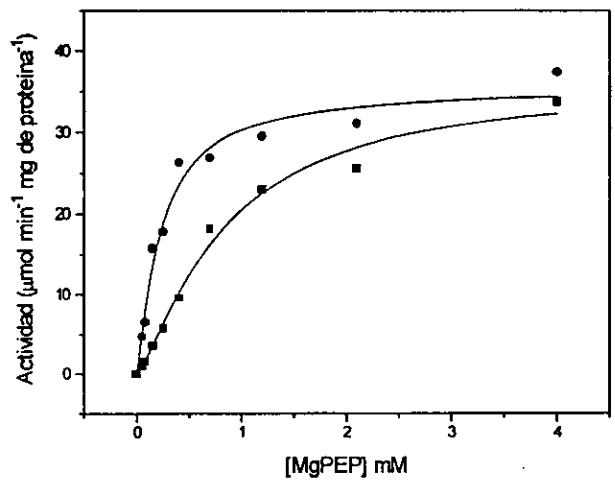
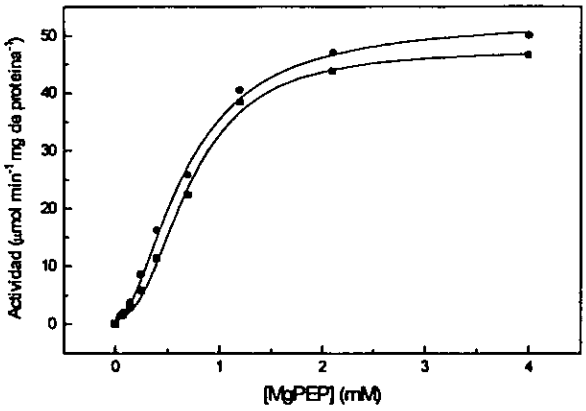



*Figura 3.* Cinética de saturación de la PEPC por el sustrato MgPEP a pH de 7.3, 30 °C y en ausencia ( ■ ), o en presencia de 5 mM del ácido 2-sulfobenzoico ( ● ). **a)** Se mantuvo la concentración de $Mg^{2+}$ libre constante en 0.1 mM. **b)** Se mantuvo la concentración de $Mg^{2+}$ libre constante en 1 mM.

a




b

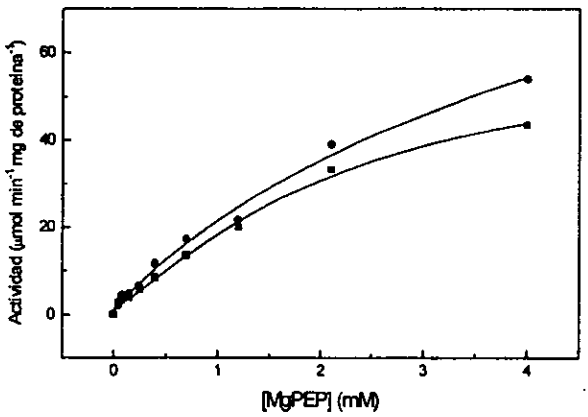
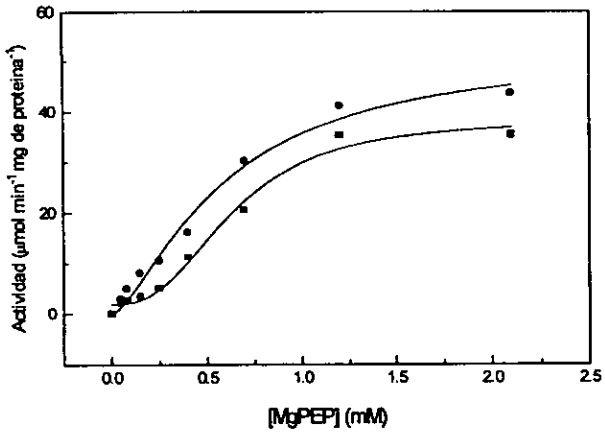



*Figura 4.* Cinética de saturación de la PEPC por el sustrato MgPEP a pH de 7.3, 30 °C y en ausencia ( ■ ), o en presencia de 5 mM del ácido fenilarsónico ( ● ). **a)** Se mantuvo la concentración de PEP libre constante en 0.5 mM. **b)** Se mantuvo la concentración de PEP libre constante en 5 mM.

a




b

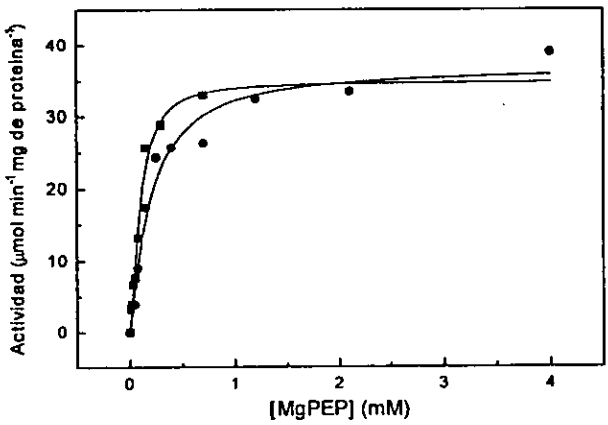



*Figura 5.* Cinética de saturación de la PEPC por el sustrato MgPEP a pH de 7.3, 30 °C y en ausencia ( ■ ), o en presencia de 5 mM del ácido fenilarsónico ( ● ). **a)** Se mantuvo la concentración de $Mg^{2+}$ libre constante en 0.1 mM. **b)** Se mantuvo la concentración de $Mg^{2+}$ libre constante en 1 mM.

El ácido 2-sulfobenzoico activó moderadamente a la PEPC a dos diferentes concentraciones de magnesio libre constante, esto lo podemos ver en las figuras 3a y b.

En las figuras 4a y b se pudieron ver las gráficas para el ácido fenilarsónico a dos diferentes concentraciones de PEP libre constante y en las figuras 5a y b se pudo ver el efecto del ácido fenilarsónico a dos diferentes concentraciones de $Mg^{2+}$ libre constante. A la concentración del ácido fenilarsónico (5 mM) a la que se trabajó en estos ensayos no se ve una clara activación de la PEPC.

**TABLA 4.** Constantes cinéticas de la saturación de PEPC por su sustrato Mg-PEP obtenidas manteniendo la concentración de PEP libre constante ó la concentración de $Mg^{2+}$ libre constantes.

| | Adición | $V_{max}$ [a] | $S_{0.5}$ [b] | h [c] |
|---|---|---|---|---|
| PEP libre 0.5 mM | ninguna | 47.7 ± 1.6 | 0.9 ± 0.05 | 2.0 ± 0.2 |
| | AFA 5 mM | 52.5 ± 1.4 | 0.67 ± 0.03 | 1.8 ± 0.1 |
| | A2SB 5 mM | 139.8 ± 7.8 | 0.78 ± 0.08 | 1.5 ± 0.2 |
| PEP libre 5 mM | ninguna | 59.1 ± 1.5 | 1.07 ± 0.24 | 1.5 ± 0.3 |
| | AFA 5 mM | 137.7 ± 18 | 3.78 ± 0.72 | 1.0 |
| | A2SB 5 mM | 128.0 ± 7.8 | 1.86 ± 1.13 | 0.9 ± 0.2 |
| Mg libre 0.1 mM | ninguna | 34.9 ± 2.7 | 0.1 ± 0.02 | 1.5 ± 0.3 |
| | AFA 5 mM | 52.7 ± 6.1 | 0.60 ± 0.13 | 1.4 ± 0.3 |
| | A2SB 5 mM | 40.7 ± 1.6 | 0.09 ± 0.01 | 1.0 ± 0.1 |
| Mg libre 1 mM | ninguna | 34.9 ± 2.7 | 0.7 ± 0.06 | 1.5 ± 0.3 |
| | AFA 5 mM | 36.9 ± 2.6 | 0.19 ± 0.04 | 1.2 ± 0.2 |
| | A2SB 5 mM | 35.5 ± 2.3 | 0.23 ± 0.02 | 1.3 ± 0.1 |

a) Velocidad máxima en µmol/min/mg de proteína purificada
b) Valor de la concentración de sustrato semi-saturante en mM
c) Valor del índice de cooperatividad homotrópica según el modelo de Hill.

Los resultados obtenidos de los dos compuestos en los diferentes ensayos se muestran en la tabla 4, donde vemos claramente que el ácido 2-

sulfobenzoico es un mejor activador que el ácido fenilarsónico ya que aumenta el valor para la $V_{max}$ y esto se observa más claramente en las condiciones de ensayo con PEP libre constante 0.5 mM. Se puede ver que a la concentración de 0.5 mM de PEP libre el ácido 2-sulfobenzoico aumenta la $V_{max}$ y a la concentración de 1 mM de $Mg^{2+}$ libre, tanto el ácido fenilarsónico (AFA) como el ácido 2-sulfobenzoico (A-2SB) reducen la $S_{0.5}$.

Como se obtuvo una muy clara activación de la PEPC por el A-2SB a una concentración de PEP libre constante (0.5 mM), entonces se realizó una cinética de saturación a esta concentración de PEP libre, variando la concentración del ácido 2-sulfobenzoico desde 0.05 mM hasta 5 mM. Podemos ver en la figura 6 las curvas de saturación obtenidas, la $S_{0.5}$[Mg-PEP] disminuye y la $V_{max}$ aumenta conforme aumenta la concentración del ácido 2-sulfobenzoico.

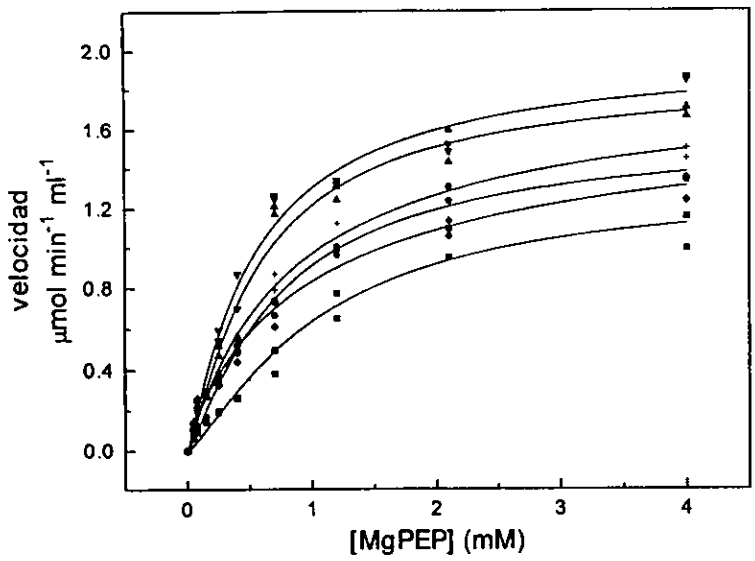



*Figura 6.* Cinética de saturación de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa frente a la concentración de su sustrato MgPEP en ausencia ( ■ ) y en presencia de ácido 2-sulfobenzoico 0.05 ( ◆ ), 0.2 ( ● ), 0.4 ( ✚ ), 1.0 ( ▲ ) y 5 mM totales ( ▼ ), a PEP libre 0.5 mM, pH 7.3 y a 30 °C.

En la tabla 5 se muestran los parámetros del ajuste de los valores de la cinética de saturación de la PEPC en presencia del A-2SB a un modelo general (vease la metodología).

**TABLA 5.** Constantes cinéticas de la saturación de PEPC por su sustrato MgPEP a concentraciones variables del ácido 2-sulfobenzoico, manteniendo la concentración de PEP libre 0.5 mM a pH de 7.3.

| $A_{max}$ | $K_s$ | $K_a$ | α | β |
|---|---|---|---|---|
| 1.62 ± 0.11 | 1.65 ± 0.24 | 0.52 ± 0.09 | 0.39 ± 0.07 | 1.33 ± 0.11 |

**Ensayos de protección frente a la modificación por PLP**

A continuación se muestran los ensayos de protección del sitio activo o del sitio alostérico frente a la modificación por PLP en presencia de los análogos A-2SB y AFA. De esta manera se puede saber a cual de los dos sitios se une el análogo y se puede calcular una constante de disociación.

En un primer ensayo se puso el ácido 2-sulfobenzoico a diferentes concentraciones y una concentración fija de PLP (0.4 mM) lo suficiente para insensibilizar a la PEPC. En la figura 7a podemos observar que hubo una protección por este análogo del sitio alostérico para la G6P y que no hubo protección del sitio activo. Con los datos de este experimento se calculó la sensibilidad frente a glucosa 6-fosfato, y de este cálculo se determinó que la $k_{d\text{-}app}$ fue de 12.6 ± 0.8 mM (figura 7b).

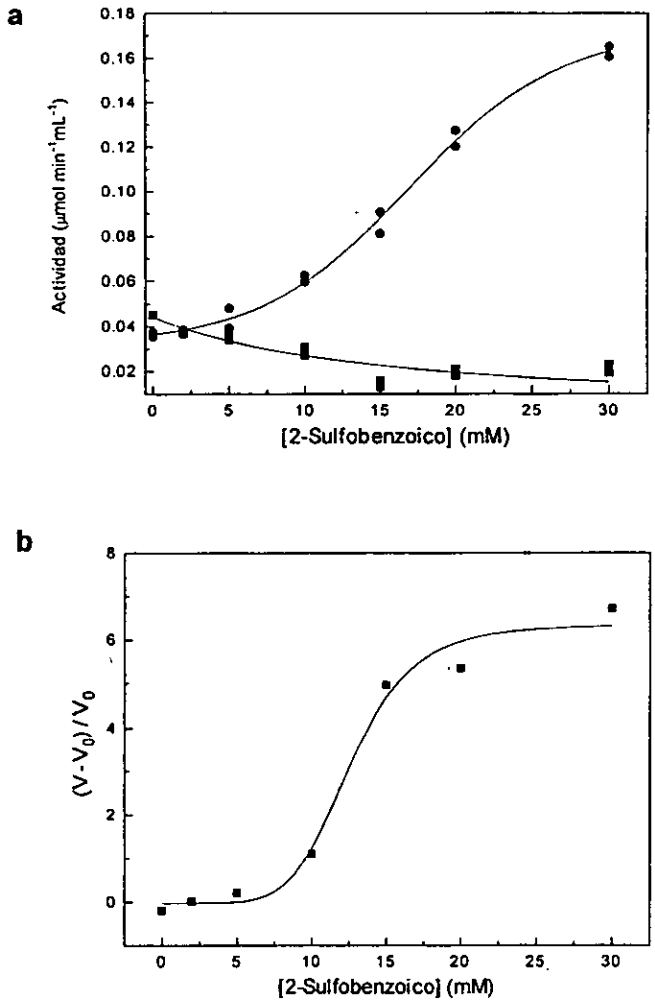
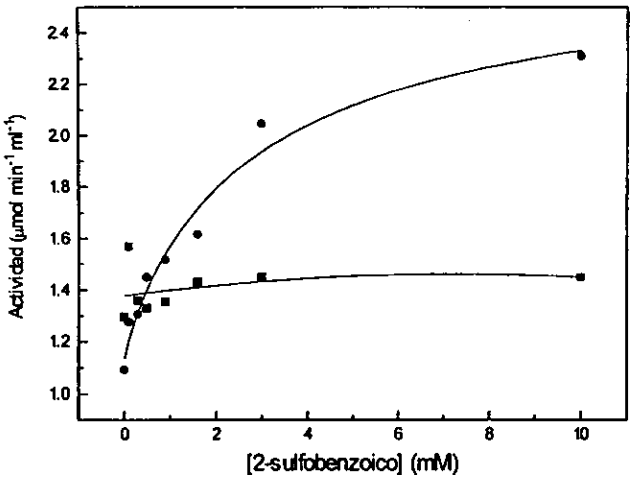



*Figura 7.* **a)** Efecto del PLP sobre la actividad de la fosfoeneolpiruvato carboxilasa. **b)** Determinación de la constante de unión aparente del ácido 2-sulfobenzoico al sitio alósterico para la G6P de la fosfoenolpiruvato carboxilasa purificada. La constante se determinó por la protección que el ácido 2-sulfobenzoico ofrece frente a la modificación química de este sitio por PLP que se detecta como una insensibilización de esta enzima frente a la G6P. La enzima se incubó a pH 7.3 y a 30 °C en presencia de PLP (0.4 mM) y en ausencia de otros ligandos, las concentraciones del ácido 2-sulfobenzoico se indican en la gráfica. La actividad fue determinada en ausencia ( ■ ) y en presencia de la G6P 10 mM ( ● ).

Se realizó otro experimento con concentraciones crecientes del ácido 2-sulfobenzoico, se duplicó la concentración del PLP (0.8 mM) para ver si se insesibilizaba un poco más la PEPC y además se agregó $Mg^{2+}$ (5 mM) a la cubeta de incubación como protector del sitio activo. En la figura 8a y b podemos ver que se mantiene la protección que el A-2SB ofrece al sitio alostérico para la D-glucosa-6-fosfato, la $k_{d\text{-}app}$ en esta condición fue 6 veces menor que en ausencia de$Mg^{2+}$.

En un experimento adicional se midió la protección del sitio alostérico para la G6P por el A-2SB frente a el PLP en presencia de fosfoglicolato (25 mM) y de magnesio (15 mM) como protectores del sitio activo (figura 9a y b). En estas condiciones el sitio activo no se modifica ya que se mantuvo constante la actividad de la PEPC en ausencia de la G6P (figura 9a) y la protección del A-2SB fue excelente ya que al hacer el ensayo cinético con la G6P la PEPC se activo rápidamente (figura 9B), el cáculo de la $k_{d\text{-}app}$ para este ensayo dió un valor de casi 100 veces menor que en ausencia de ligandos del sitio activo (tabla 6).

**a**




**b**

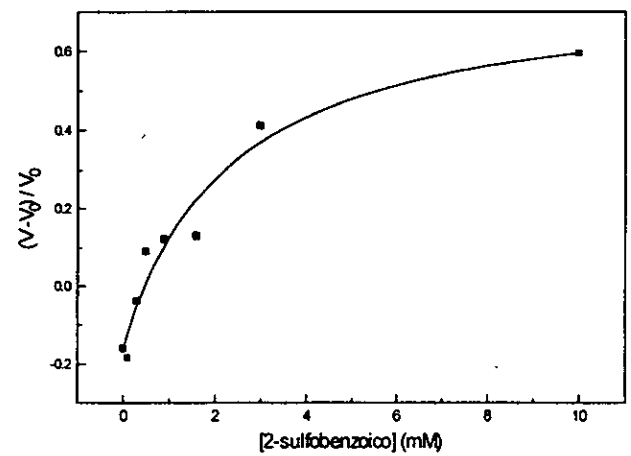



*Figura 8* **a)** Efecto del PLP sobre la actividad de la fosfoeneolpiruvato carboxilasa. **b)** Determinación de la constante de unión aparente del ácido 2-sulfobenzoico al sitio alósterico para la G6P de la fosfoenolpiruvato carboxilasa purificada. La constante se determinó por la protección que el ácido 2-sulfobenzoico ofrece frente a la modificación química de este sitio por PLP que se detecta como una insensibilización de esta enzima frente a la G6P. La enzima se incubó a pH 7.3 y a 30 °C en presencia de PLP 0.8 mM y $Mg^{2+}$ 5 mM como ligando del sitio activo, las concentraciones del ácido 2-sulfobenzoico se indican en la gráfica. La actividad fue determinada en ausencia ( ■ ) y en presencia de la G6P 10 mM ( ● ).

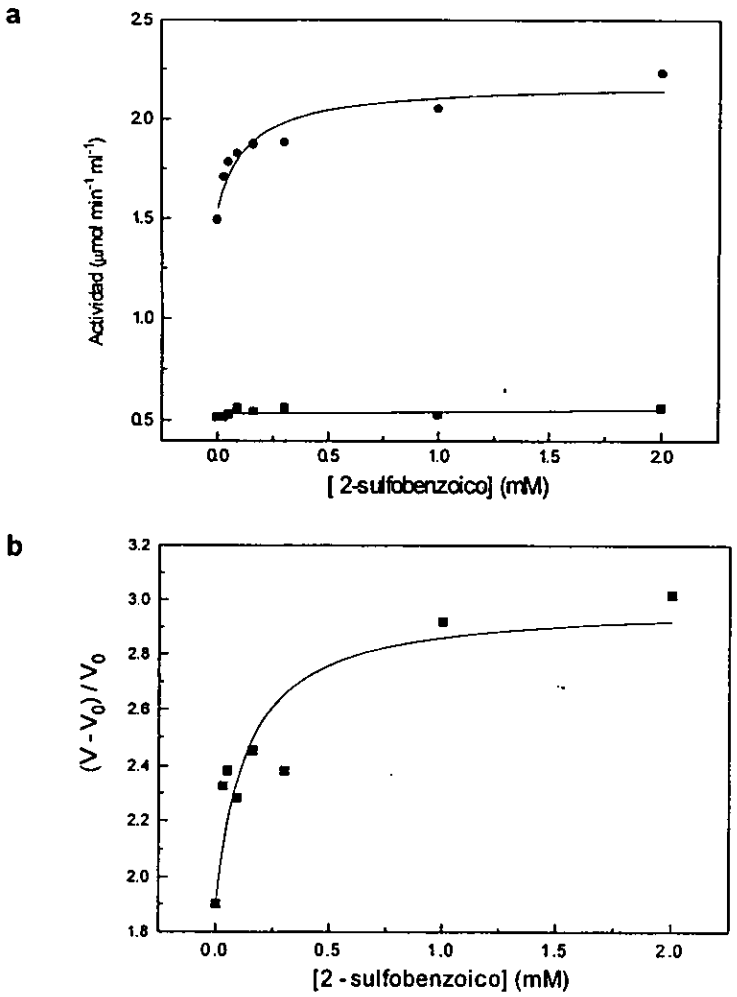



*Figura 9* **a)** Efecto del PLP sobre la actividad de la fosfoeneolpiruvato carboxilasa. **b)** Determinación de la constante de unión aparente del ácido 2-sulfobenzoico al sitio alósterico para la G6P de la fosfoenolpiruvato carboxilasa purificada. La constante se determinó por la protección que el ácido 2-sulfobenzoico ofrece frente a la modificación química de este sitio por PLP que se detecta como una insensibilización de esta enzima frente a la G6P. La enzima se incubó a pH 7.3 , a 30 °C, en presencia de PLP (0.4 mM), $Mg^{2+}$ (15 mM) y fosfoglicolato (25 mM) como ligandos del sitio activo, las concentraciones del ácido 2-sulfobenzoico se indican en la gráfica. La actividad fue determinada en ausencia ( ■ ) y en presencia de la G6P 10 mM ( ● ).

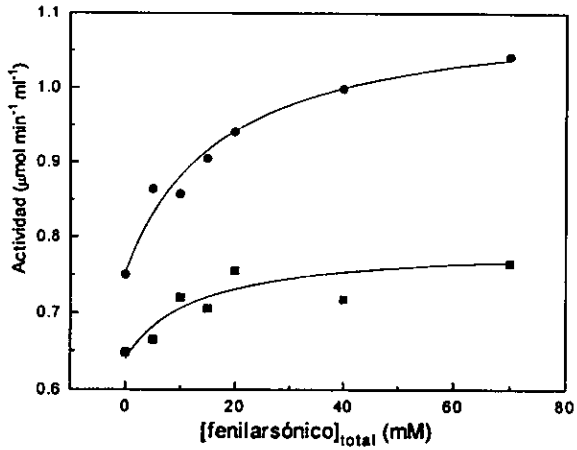
**Tabla 6.** Constantes de disociación aparente del análogo ácido 2-sulfobenzoico, obtenidos mediante un ajuste de la ecuación del modelo de Hill.

| | Protección$_{max.}$ | $K_{d\text{-}APP}$ | h |
|---|---|---|---|
| Control | 6.4 ± 0.6 | 12.6 ± 0.8 | 1.0 |
| PLP 0.8 mM $Mg^{2+}$ 5 mM | 0.93 ± 0.11 | 2.2 ± 0.6 | |
| fosfoglicolato25m M $Mg^{2+}$ 15 mM | 1.1 ± 0.2 | 0.13 ± 0.07 | 1.0 |

En ensayos de protección por concentraciones crecientes del ácido fenilarsónico $(AFA)_{total}$ y con una concentración de PLP de 0.4 mM, el resultado demostró que también este compuesto puede unirse al sitio alostérico para la D-glucosa-6-fosfato (figura 10a), aún en ausencia de otros ligandos. La $k_{d\text{-}app}$ resultó muy alta y debido a ello resulta difícil definirla con precisión (figura 10b). En presencia de los ligandos del sitio activo fosfoglicolato (25 mM) y magnesio (15 mM), AFA brindó una buena protección del sitio alostérico para la D-glucosa-6-fosfato (figura 11a), y la $k_{d\text{-}app}$ estimada (figura 11b) fue de casi treinta veces menor que la obtenida anteriormente (tabla 7).

La baja afinidad aparente de la PEPC por el AFA puede deberse a que el ácido fenilarsónico a pH de 7.3 no se encuentra totalmente desprotonado ya que su segundo $pK_a$ es de 8.77, por lo que los valores obtenidos de los ajustes fueron corregidos a esta posibilidad (tabla 7).

a




b

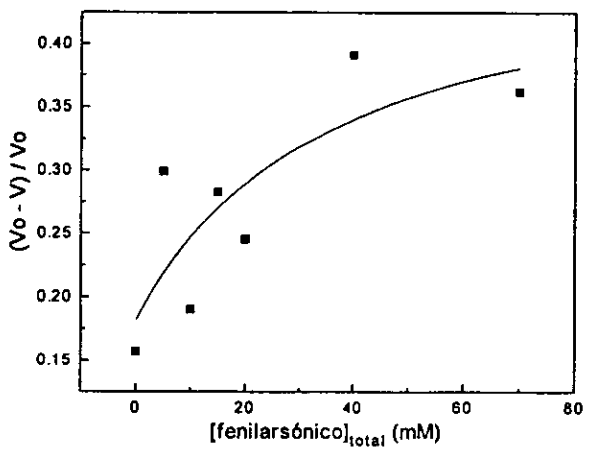
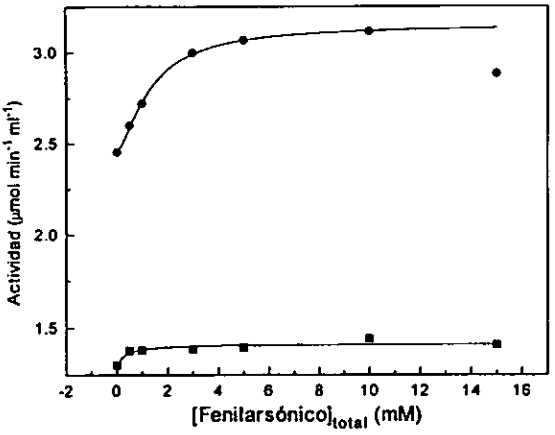



*Figura 10* **a)** Efecto del PLP sobre la actividad de la PEPC. **b)** Determinación de la constante de unión aparente del ácido fenilarsónico al sitio alósterico para la G6P de la PEPC purificada. La constante se determinó por la protección que el ácido fenilarsónico ofrece frente a la modificación química de este sitio por PLP que se detecta como una insensibilización de esta enzima frente a la G6P. La enzima se incubó a pH 7.3 , a 30 °C en presencia de PLP (0.4 mM) y en ausencia de otros ligandos, las concentraciones del ácido fenilarsónico se indican en la gráfica. La actividad fue determinada en ausencia ( ■ ) y en presencia de la G6P 10 mM ( ● ).

a




b

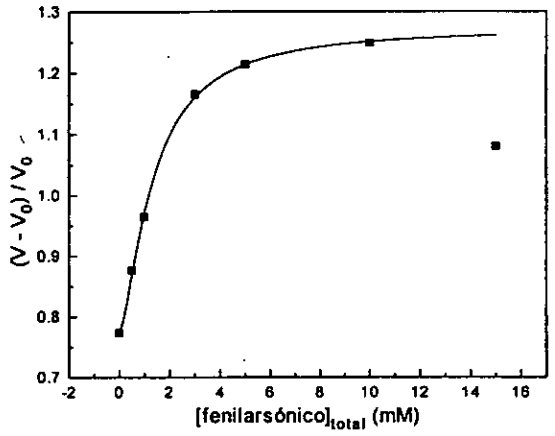



*Figura 11* **a)** Efecto del PLP sobre la actividad de la PEPC. **b)** Determinación de la constante de unión aparente del ácido fenilarsónico al sitio alósterico para la G6P de la PEPC purificada. La constante se determinó por la protección que el ácido 2-fenilarsónico ofrece frente a la modificación química de este sitio por PLP que se detecta como una insensibilización de esta enzima frente a la G6P. La enzima se incubó a pH 7.3 , a 30 °C, en presencia de PLP (0.4 mM), $Mg^{2+}$ (15 mM) y fosfoglicolato (25 mM) como ligandos del sitio activo, las concentraciones del ácido fenilarsónico se indican en la gráfica. La actividad fue determinada en ausencia ( ■ ) y en presencia de la G6P 10 mM ( ● ).

**Tabla 7.** Constantes de disociación aparente del análogo ácido fenilarsónico, obtenidos mediante un ajuste de la ecuación del modelo de Hill.

| | $V_{max}$ | $K_{d\text{-}APP}$ | h |
|---|---|---|---|
| Control | 0.5 ± 0.2 | 35.9 ± 64.8 | 1.0 |
| fosfoglicolato 25mM $Mg^{2+}$ 15mM | 1.3 ± 0.01 | 1.3 ± 0.1 | 1.5 ± 0.1 |
| **Como $AFA^{2-}$** | | | |
| Control | 0.5 ± 0.2 | 0.73 ± 0.72 | 1.0 |
| fosfoglicolato 25mM $Mg^{2+}$ 15mM | 1.3 ± 0.01 | 0.04 ± 0.003 | 1.5 ± 0.1 |

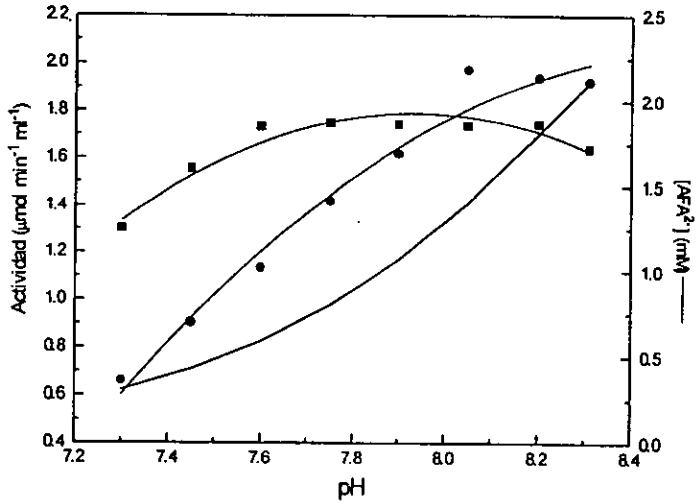



*Figura 12.* Curvas de activación de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en función del pH frente a una concentración constante de los ligandos glucosa-6-fosfato (2.5 mM, ■ ) y el ácido fenilarsónico total (10 mM, ● ), a una concentración fija de PEP libre 0.5 mM y Mg-PEP 0.1 mM, a 30 °C. se trazó a lo largo del experimento una curva que indica los cambios en la concentración de la especie totalmente desprotonada del ácido fenilarsónico (——).

Con el fin de corroborar esta posibilidad, se realizó un estudio de la capacidad activadora del AFA en función del pH a una concentración subsaturante del substrato. Se introdujo como punto de comparación en el mismo experimento. a la G6P, un ligando totalmente ionizado en este intervalo de pH. .Los resultados se muestran en la figura 12 que claramente señala que la respuesta de la enzima al AFA varía con el pH, en contraste con el efecto que se observa para la G6P; además, la concentración del $AFA^{2-}$ varía en forma paralela a esta activación, indicando que la especie totalmente desprotonada del AFA es la responsable del efecto activador observado.

**Efecto de otros compuestos estudiados.**

Para aportar evidencias sobre la importancia de la distancia entre las cargas del activador A-2SB se trabajó con los isómeros 3 y 4 del ácido sulfobenzoico, también se utilizó el ácido bencensulfónico para saber el efecto del compuesto sin el grupo carboxilato (carga negativa) y, por último, se utilizó el ácido sulfoacético para ver si es necesario tener las cargas deslocalizadas en el anillo bencénico. Se trabajó a una concentración de PEP libre constante (0.5mM), a una misma concentración del análogo y se varió la concentración del sustrato Mg-PEP (véase figura 13).

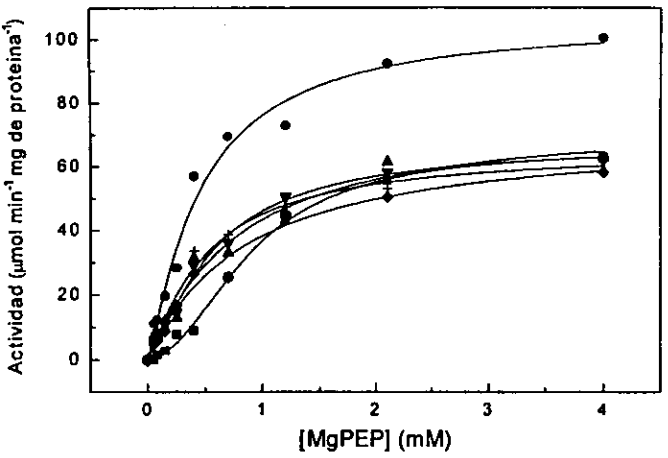



*Figura 13.* Curvas de saturación de la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa frente a la concentración de su sustrato MgPEP en ausencia de ligandos ( ■ ), y en presencia de 2-sulfobenzoico ( ● ), 3-sulfobenzoico ( ▲ ), 4-sulfobenzoico ( ▼ ), bencensulfónico ( ◆ ), sulfoacético ( ✚ ), con una concentración total de 5 mM en cada uno. La actividad de la enzima se determinó a PEP libre 0.5 mM, pH 7.3 y a 30 °C.

Los resultados se ajustaron al modelo de Hill y los valores de los parámetros se muestran en la tabla 8, donde podemos ver que solamente el ácido 2-sulfobenzoico, el 4-sulfobenzoico y el sulfoacético redujeron la $S_{0.5}$, en tanto que los compuestos restantes solamente tuvieron efecto en reducir la cooperatividad positiva para el Mg-PEP.

**TABLA 8.** Constantes cinéticas de la saturación de PEPC por su sustrato MgPEP obtenidas manteniendo la concentración de PEP libre 0.5 mM.

| Adición | $V_{max}$[a] | $S_{0.6}$[b,1] | h[c] |
|---|---|---|---|
| Control | 65.9 ± 2.2 | 0.90 ± 0.05 | 2.03 ± 0.18 |
| 2-sulfobenzoico | 106.3 ± 10.0 | 0.47 ± 0.10 | 1.19 ± 0.27 |
| 3-sulfobenzoico | 74.8 ± 12.0 | 0.77 ± 0.277 | 1.12 ± 0.32 |
| 4-sulfobenzoico | 67.3 ± 3.7 | 0.58 ± 0.07 | 1.35 ± 0.18 |
| Becensulfónico | 71.1 ± 12.9 | 0.86 ± 0.36 | 1.0 ± 0.27 |
| Sulfacético | 65.6 ± 6.2 | 0.52 ± 0.1 | 1.17 ± 0.25 |

a) Velocidad máxima en µmol/min/mg de proteína purificada
b) Valor de la concentración de sustrato semi-saturante en mM
c) Valor del índice de cooperatividad homotrópica según el modelo de Hill.
[1]Para el control es Km.

Con el fin de comparar la potencia relativa de estos compuestos y de determinar más claramente su efecto, se analizó la actividad de la PEPC en función de la concentración de ligando a una concentración subsaturante de sustrato (0.1 mM) y a una concentración saturante (2 mM), los resultados se presentan en las figura 14a y b, el ajuste de estos resultados se muestran en las tablas 9 y 10.

El ácido fenilarsónico, 2-sulfobenzoico y sulfoacético presentaron una clara activación de la enzima PEPC y se ajustaron a un modelo de unión no cooperativa, excepto para el ácido fenilarsónico a concentración subsaturante del sustrato que presentó una ligera cooperatividad.

Los ácidos sulfobenzoicos y el bencensulfónico resultaron ser inhibidores de la PEPC, ajustando los resultados a un modelo de inhibición de tipo hiperbólica (general), la inhibición resultó parcial en todos los casos.

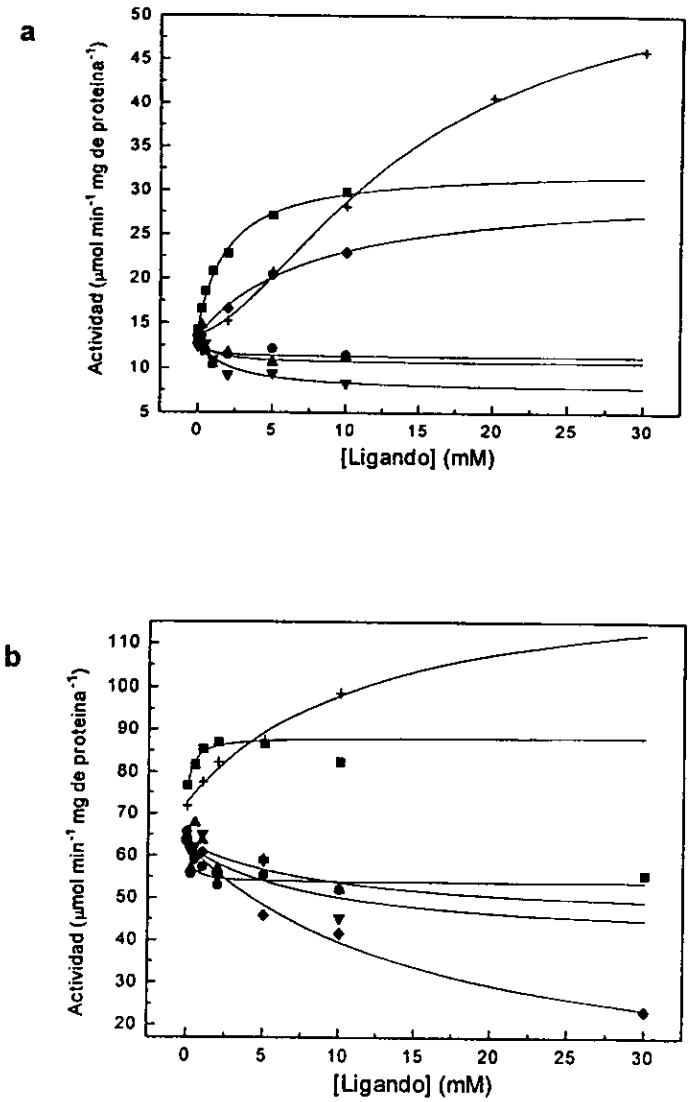



*Figura 14.* Curvas de saturación de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa a concentración a) subsaturante (0.1 mM) y b) saturante (2 mM) del sustrato. Para los ligandos ácido 2-sulfobenzoico ( ■ ), ácido sulfoacético ( ◆ ), ácido 3-sufobenzoico( ● ), ácido fenilarsónico ( ✚ ), ácido 4-sulfobenzoico ( ▲ ), ácido bencensulfónico ( ▼ ) a PEP libre 0.5 mM, pH 7.3 y a 30 °C.

**Tabla 9.** Ajuste de las curvas de activación de la enzima fosfo*enol*piruvato carboxilasa por los ácidos fenilarsónico, 2-sulfobenzoico y sulfoacético a un modelo de unión cooperativa.

| Modelo : Hill | Mg-PEP (mM) | $A^{1}_{max}$ | $A_{0.5}{}^{2}$ | $h^{3}$ |
|---|---|---|---|---|
| Fenilarsónico$_{(total)}$ | 0.1 | 4.12 | 15.0 ± 2.4 | 1.6 ± 0.21 |
| | 2.0 | 1.75 | 11.4 ± 8.1 | 1.0 |
| 2-sulfobenzoico | 0.1 | 2.24 | 2.1 ± 0.35 | 1.0 |
| | 2.0 | 1.15 | 0.47 ± 0.27 | 1.0 |
| Sulfoacético | 0.1 | 2.27 | 7.97 ± 3.6 | 1.0 |

[1]Activación máxima ($V_{max}/V_{min}$); [2]Concentración de ligando que produce 50% de la activación máxima; [3]Índice de cooperatividad.

**Tabla 10.** Ajuste de las curvas de inhibición de la enzima fosfo*enol*piruvato carboxilasa para los ácidos 3, 4-sulfobenzoicos, bencensulfónico y sulfoacético a un modelo general de inhibición de tipo hiperbólica.

| Modelo: $I_{50}$Hyp | Mg-PEP (mM) | $P_0{}^{1}$ | $I_{50}{}^{2}$ | $P_\alpha{}^{3}$ |
|---|---|---|---|---|
| 3-sulfobenzoico | 0.1 | 13.6 | 0.32 ± 0.26 | 11.3 |
| | 2.0 | 65.4 ± 2.6 | 0.185 ± 0.18 | 53.7 ± 1.8 |
| 4-sulfobenzoico | 0.1 | 13.6 | 0.65 ± 0.52 | 10.6 |
| | 2.0 | 63.2 | 9.03 ± 5.0 | 45.0 |
| Bencensulfónico | 0.1 | 13.3 ± 0.7 | 1.8 ± 1.4 | 7.5 ± 1.3 |
| | 2.0 | 62.6 | 8.13 ± 3.4 | 40.0 |
| Sulfoacético | 2.0 | 62.6 ± 1.3 | 15.9 ± 5.1 | 3.0 ± 8.3 |

[1]Actividad inicial ; [2]Concentración de ligando que produce 50% de la inhibición máxima; [3]actividad final a una concentración infinita del ligando.

El caso del ácido sulfoacético merece una mención especial, ya que se comportó como un activador pobre a baja concentración de sustrato, pero resultó un inhibidor a altas concentraciones del sustrato. Aunque su baja potencia como activador no justificó un análisis más detallado, este resultado indica que este compuesto posiblemente cause un aumento de la afinidad de la enzima por el sustrato.

Como una comparación entre diferentes activadores de la PEPC: La D-glucosa-6-fosfato, la fosfomicina, el ácido 2-sulfobenzoico y el fenilarsónico, se determinaron las curvas de activación a las concentración de sustrato empladas anteriormente.

estas curvas se analizaron con un modelo de activación con unión cooperativa y los resultados de los ajustes se presentan en la tabla 9. En esta tabla podemos ver que a bajas concentraciones de sustrato la fosfomicina es un excelente activador, superior incluso a la G6P y que este último presentó una mayor cooperatividad de unión. Los resultados obtenidos también nos muestran que el ácido fenilarsónico es un buen activador a concentraciones saturantes de Mg-PEP, pero con baja afinidad. De entre los activadores presentados en la tabla 9, la fosfomicina resultó ser el mejor a concentración subsaturante del sustrato, pero su efecto fue menor al de la G6P a concentración saturante, aunque con mayor afinidad.

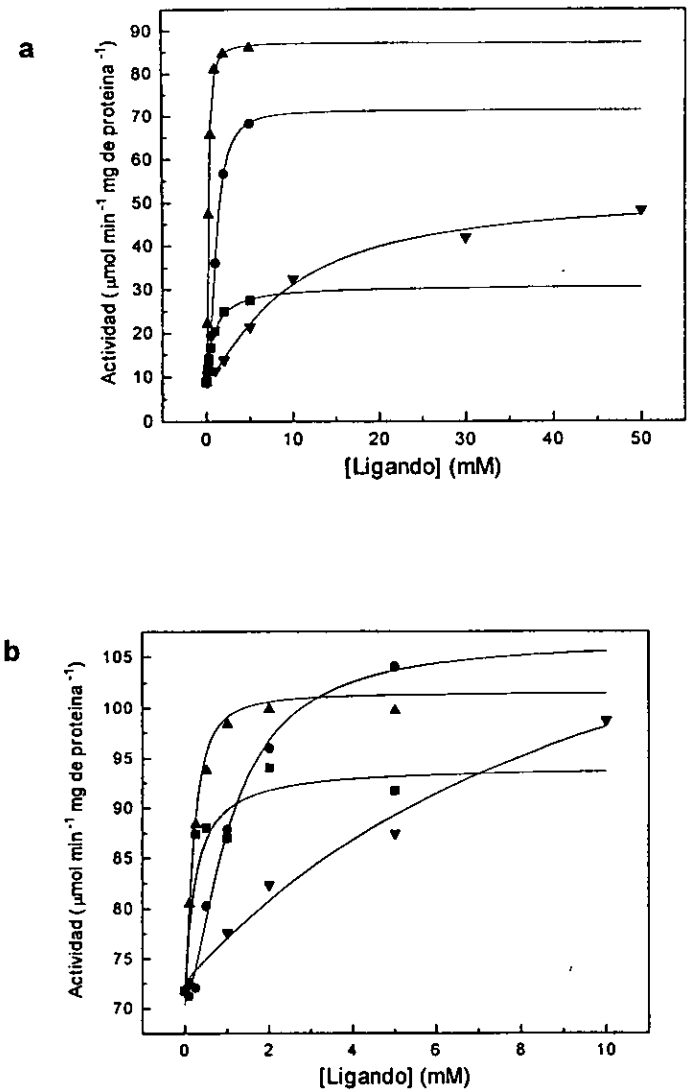



*Figura 15.* Curvas de saturación de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa a concentración **a)** subsaturante (0.1 mM) y **b)** saturante (2 mM) del sustrato. Para los ligandos ácido 2-sulfobenzoico ( ■ ), G6P ( ● ), fosfomicina ( ▲ ), ácido fenilarsónico ( ▼ ) a PEP libre 0.5 mM, pH 7.3 y a 30 °C .

**Tabla 11.** Ajuste de las curvas de activación de la enzima fosfo*enol*piruvato carboxilasa a un modelo de unión cooperativa.

| | Mg-PEP (mM) | $A^{1}_{max}$ | $A_{0.5}{}^{2}$ | $h^{3}$ |
|---|---|---|---|---|
| 2-sulfobenzoico | 0.1 | 3.38 | 0.87 ± 0.18 | 1.0 ± 0.14 |
| | 2.0 | 1.34 | 0.22 ± 0.16 | 1.0 |
| Glucosa-6P | 0.1 | 7.18 | 1.15 ± 0.04 | 2.02 ± 0.12 |
| | 2.0 | 1.5 | 1.07 ± 0.17 | 1.6 ± 0.3 |
| Fosfomicina | 0.1 | 9.75 | 0.26 ± 0.01 | 1.65 ± 0.11 |
| | 2.0 | 1.4 | 0.20 ± 0.06 | 1.5 ± 0.57 |
| $Fenilarsónico_{(total)}$ | 0.1 | 5.83 | 9.4 ± 1.9 | 1.27 ± 0.26 |
| | 2.0 | 1.75 | 11.4 ± 8.1 | 1.0 |

[1]Activación máxima ($V_{max}/V_{min}$); [2]Concentración de ligando que produce 50% de la activación máxima; [3]Índice de cooperatividad.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como ya se ha mencionado en los antecedentes, el hecho de que los ligandos del sitio alostérico para la D-glucosa-6-fosfato de la enzima PEPC sean moléculas que presentan analogía con el sustrato resulta muy significativo, ya que esto implica que existe una semejanza estructural entre ambos sitios. O'Leary (1981) ha sugerido que las moléculas con dos cargas negativas son capaces de unirse al sitio alostérico activador, mientras que las que poseen tres cargas negativas se unirían al sitio activo. En verdad, los datos presentados en este trabajo apoyan esta propuesta, ya que los compuestos estudiados aquí poseen en su mayoría 2 cargas negativas formales, pero el ácido fenilarsónico no se encuentra ionizado en todo el intervalo de pH y, como cabría esperar, su efecto activador se incrementa con el pH, al tiempo que aumenta la concentración de la forma totalmente ionizada (figura 12). Esto contrasta con el efecto producido por la G6P que varía poco con el pH. Sin embargo, Chávez-Montes (1997) encontró que el 2-fosfonometilo benzoato de metilo era un activador, pero su ácido correspondiente no era un inhibidor 100 % competitivo. De hecho, este último compuesto era incapaz de proteger a la PEPC frente a la incactivación por PLP, indicando que no se une al sitio activo. Esto demuestra que si bien el tener dos cargas negativas parece ser un requisito importante para asegurar la unión de los activadores al sitio alostérico activador para la G6P, ésta no es la única característica que distingue a los ligandos de este sitio, de aquellos que se unen al sitio activo. Otra posibilidad que no ha sido debidamente

explorada es la capacidad de los compuestos para unir al $Mg^{2+}$ en solución, esto en virtud de que Mújica-Jiménez *et al.* (1998) reportaron que la unión de fosfomicina al sitio para la G6P requería de la forma libre de este ligando. Pero como puede verse en la tabla 3, las constantes de unión de los compuestos varían significativamente y el ácido sulfobenzoico, que resultó ser el mejor activador estudiado en este trabajo (ver tabla 4), posee una afinidad por magnesio muy inferior a la que presenta la fosfomicina (tabla 3) y mayor a la que presenta el activador natural G6P (tabla 1). Ambos activadores, la fosfomicina y la G6P, son más potentes que el descrito en este trabajo, indicando que ciertamente no hay una relación entre la afinidad por $Mg^{2+}$ y el efecto activador sobre la PEPC.

Por otro lado, uno de los aspectos más interesantes de este estudio fue la posibilidad de medir la unión de los compuestos a la enzima en ausencia de sustrato, empleando un procedimiento ya reportado (Tovar-Méndez et al, 1997). Los resultados indican que la mayoría de los ligandos, incluyendo a la G6P misma, es decir el ligando natural, no son capaces de unirse a la enzima cuando el sitio activo se encuentra desocupado. Este comportamiento se observa también en el mecanismo cinético de la PEPC, recientemente revisado por Tovar-Méndez *et al.* (1998), en el que se menciona que la unión del PEP libre al sitio alostérico activador para la G6P ocurre obligatoriamente después de la unión del Mg-PEP al sitio activo. En este estudio, se demuestra que pese a lo anterior, el sitio alostérico activador para la G6P sí está accesible a los ligandos, ya que el ácido 2-sulfobenzoico sí es capaz de unirse a la enzima en ausencia de otros ligandos, incluyendo el magnesio

(figuras 7a y b, tabla 6). Adicionalmente, la simetría del efecto alostérico está claramente evidenciada por el hecho de que la unión de este compuesto se refuerza notablemente cuando el sitio activo se encuentra ocupado (figuras 8a y b, 9a y b, tabla 6), esto es, la constante de disociación aparente disminuye 5 veces cuando se añade sólo el magnesio y hasta casi 100 veces cuando se añade además el fosfoglicolato.

El caso del fenilarsónico merece una consideración especial, ya que a pH 7.3, valor de pH al que se realizaron los estudios de unión, este ligando se encuentra parcialmente ionizado y, como ya se dijo, su efecto es claramente dependiente del pH. De manera que los valores de las constantes reportadas en la tabla 7, los cuales son aproximadamente 10 veces superiores a los obtenidos para el ácido 2-sulfobenzoico, se vuelven comparables a los que presenta este último compuesto cuando se corrigen para la concentración de la especie totalmente ionizada (tabla 7).

Otro de los factores que son importantes en la unión de los ligandos al sitio alostérico activador para la G6P es la deslocalización de los electrones (y por lo tanto de las cargas formales), gracias a los dobles enlaces presentes en la molécula. Sin embargo, los datos presentados en este estudio indican que este factor no es indispensable, ya que el ácido sulfoacético fue un activador moderado, capaz de aumentar la afinidad de la enzima por el sustrato; ya que como se ve comparando la figura 13 con la 14a, la adición de este compuesto a concentraciones subsaturantes de sustrato resulta en un aumento de la actividad (figura 13), no así a concentraciones saturantes cuando el efecto es una ligera inhibición (figura 14a). El mecanismo de este

último efecto inhibitorio observado a concentraciones saturantes de sustrato podría deberse a un efecto indirecto relacionado con la inhibición que se observa en esta enzima por exceso de sustrato y que está siendo estudiado por el grupo de la Dra. Rosario A. Muñoz-Clares (resultados aún no publicados) o a la unión de este compuesto a otro sitio no identificado. Lo que sí resulta común a todos estos compuestos, es la comunicación existente entre las cargas formales, ya que en el ácido sulfoacético, a pesar de no ser aromático, la distancia entre los grupos es tan pequeña que las nubes de electrones sobre los oxígenos del grupo sulfonato y del carboxilato se encuentran parcialmente sobrelapadas (Chávez-Montes *et al.*, manuscrito en preparación). En este sentido, la misma G6P y la fosfomicina, parecen salirse de este patrón, ya que en ambas moléculas las cargas formales se localizan sobre el grupo fosfato y por lo tanto la localización de estas cargas está polarizada sobre una zona de la molécula. Sin embargo, en este caso los oxígenos del anillo de pirano y de epóxido, respectivamente, parecen jugar un papel importante (Chávez-Montes *et al.*, manuscrito en preparación). Otro caso que parece no encajar en este modelo, es el caso del ácido fenilarsónico, sin embargo, el arsonato, es un grupo con muchos orbitales electrónicos desocupados y con distancia de enlace As-O mucho mayores que las distancias P-O en el grupo fosfato. Por lo tanto, en este caso la carga se puede deslocalizar parcialmente sobre el anillo de fenilo.

La unión de estos ligandos al sitio activo produce reacomodos de la enzima que se traducen en un aumento en la velocidad máxima de la PEPC (efecto V) y un aumento de la afinidad del sitio activo por su sustrato (efecto

K), ó solamente en este último. La clara separación de estos efectos indica que el alosterismo que presenta esta enzima no puede explicarse mediante un modelo clásico de dos estados (como el propuesto por Monod, Wyman y Changeaux, 1965), sino que se requiren al menos tres estados: El estado basal con baja afinidad por Mg-PEP y baja $V_{max}$, un estado con alta afinidad por el sustrato y un estado con alta afinidad y alta Velocidad máxima (el estado con alta $V_{max}$ y baja afinidad no es requerido, ya que los ligandos que aumentan $V_{max}$ siempre presentan algún efecto K).

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

## 10. CONCLUSIONES

El sitio alostérico activador para la D-glucosa-6-fosfato de la enzima fosfo*enol*piruvato carboxilasa parece requerir moléculas que presenten las siguientes características:

Dos cargas formales parcial o totalemte comunicadas entre si.

Deslocalización de las cargas formales sobre dos zonas relativamente separadas de las moléculas.

Al menos una de las cargas debe localizarse sobre un grupo altamente oxidado y con geometría tetrahédrica tal como el sulfato, el fosfato o el arsonato.

La unión de estos ligandos a la enzima inducen una transición alostérica que se traduce en un aumento en la velocidad máxima de la PEPC (efecto V) y un aumento de la afinidad del sitio activo por su sustrato (efecto K), o solamente en este último, lo que indica que la PEPC se conforma a un modelo de alosterismo de más de dos estados.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS


Andreo, C.S., González, D.H., Iglesias, A.A. (1987). Higher plant phospho*enol*pyruvate carboxylase : structure and regulation. *FEBS Lett.* **213** : 1-8.

Arrio-Dupont M., Bakrim N., Echeverria C., Gadal P., Le Maréchal P., Vidal J. (1992). Compared properties of phospho*enol*pyruvate carboxylase from dark- and light- adapted *Sorghum* leaves: use of a rapid purification technique by immunochromatography. *Plant Sci.* **81** : 37-46.

Ausenhus, S.L., O'Leary, M.H. (1992). Hydrolysis of phospho*enol*pyruvate catalyzed by phospho*enol*pyruvate carboxylase from *Zea mays*. *Biochemistry.* **31** : 6427-6431.

Badger, M.R., Price, G.D. (1994). The role of carbonic anhydrase in photosyntesis. *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 $C_4$ phospho*enol*pyruvate 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.

Blanke, M.M., Lenz, F. (1989). Fruit photosynthesis. *Plant Cell Environ.* **12** : 31-46

Bort, J., Brown, R.H., Araus, J.L. (1996). Refixation of respiratory $CO_2$ in the ears of $C_3$ cereals. *J. Exp. Bot.* **47** : 1567-1575.

Brulfert, J., Guclu, S., Taybi, T., Pierre, J.N. (1993). Enzymatic responses to water-stress in detached leaves of the CAM plant *Kalanchoe blossfeldiana* poelln. *Plant Physiol. Biochem.* 31 : 491-497.

Champigny, M.L., Foyer C. (1992). Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis. *Plant Physiol.* **100** : 7-12.

Champigny, M.L. (1995). Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. *Photosynth. Res.* **46** : 117-127.

Chardot, T.P., Wedding, R.T. (1991). Role of cysteine in activation and allosteric regulation of maize phospho*enol*pyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **98** : 780-783.

Chavez-Montes, R.A. (1997). "Papel de la carga del carboxilato de análogos del fosfo*enol*piruvato en la selectividad de dos del los sitios de unión de la enzima fosfo*enol*piruvato carboxilasa $C_4$ de maíz". Tesis de licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Chollet, R., Vidal, J., O'Leary, M.N. (1996). Phospho*enol*pyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plant. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47** : 273-298.

da Silva, F., Williams . The biological chemistry of elements. The inorganic chemistry of life. Clarendon Press. Oxford, E.U. pp. 243-268. (1991).

Davies, D.D. (1979). The role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **30** : 131-158.

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

Denis, D.T., Turpin, D.H. (Eds.) Plant physiology biochemistry and molecular biology. Longman Group UK Ltd. Londres.

Deroche, M.E., Carrayol, E. (1988). Nodule phospho*enol*pyruvate carboxylase: a review. *Physiol. Plant.* **74** : 775-782.

Dixon, M., Webb, E. (1979). "Enzymes". Longman Group limited. 3° edición. Gran Bretaña.

Doncaster, H.D., Leegood, R.C. (1987). Regulation of phospho*enol*pyruvate carboxylase activity in maize leaves. *Plant Physiol.* **84** : 82-87.

Duff, S.M.G., Chollet, R. (1995). *In vivo* regulation of wheat-leaf phospho*enol*pyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. *Plant Physiol.* **107** : 775-782.

Duffy, T.H., Nowak, T. (1984). Stereoselectivity of interaction of phospho*enol*pyruvate analogues with varius phospho*enol*pyruvate utilizing enzymes. *Biochemistry.* **23** : 661-670.

Eidhin, M.D., Cinneide, S.O. (1968). *J. Inorg. Nucl. Chem.* **30** : 3209.

Gao, Y., Woo, W.C. (1995). Site-directed mutagenesis of Lys (600) in phospho*enol*pyruvate carboxylase of *Flaveria trinervia* : its roles in catalytic and regulatory fuctions. *FEBS Lett.* **375** : 95-98.

Gao, Y., Woo, W.C. (1996). Site-directed mutagenesis of *Flaveria trinervia* phospho*enol*pyruvate carboxylase : Arg (450) and Arg (767) are essential for catalytic activity and Lys (829) affects substrate binding. *FEBS Lett.* **392** : 285-288.

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

González, D.H., Iglesias, A.A., Andreo, C.S. (1986). Active site inhibition of phospho*enol*pyruvate carboxylase from maizes leaves by bromopyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.* **245** : 179-186.

González, D.H., Iglesias, A.A., Andreo, C.S. (1987). Interaction of acetyl phosphate and carbamyl phosphate with plant phospho*enol*pyruvate carboxylase. *Biochem. J.*. **241** : 543-548.

González, D.H., Andreo, C.S. (1988). Stereoselectivity of the interaction of E- and Z-2-phospho*enol*butyrate with maize leaf phospho*enol*pyruvate carboxylase. *Eur. J. Biochem.* **173** : 339-343.

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.

Hague, D.R., Sims, T.L. (1980). Evidence for light-stimulated synthesis of phospho*enol*pyruvate carboxylase in leaves of maize. *Plant Physiol.* **66** : 505-509.

Hayakawa, S., Matsunaga, K., Sugiyama, T. (1981). Light induction of phospho*enol*pyruvate carboxylase in etiolated maize leaf tissue. *Plant Physiol.* **67** : 133-138.

Holum, J.R.H. (1994). "Fundamentals of general, organic and biological chemistry". John Willey & Sons, Inc. New York.

Huber, S.C., Edwards, G.E. (1975). Inhibition of phospho*enol*pyruvate carboxylase from $C_4$ 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.* **445** : 577-607.

Iglesias , A.A., Andreo, C.S. (1983). The presence of essential histidine residues in phospho*enol*pyruvate carboxylase from maize leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* **749** : 9-17.

Israel, D.W., Jackson, W.A. (1982). Ion balance, uptake, and transport processes in $N_2$-fixing and nitrate- and urea- dependent soybean plants. *Plant Physiol.* **69** : 171-178.

Izui, K., Matsuda, Y., Kameshita, I., Katsuki, H., Woods, E.A. (1983).

Phospho*enol*pyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Inhibition by varios analogs and homologs of phospho*enol*pyruvate. *J. Biochem.* **94** : 1789-1795.

Janc W.J., Cleland W.W., O'Leary H.M. (1992). Mechanistic studies of phospho*enol*pyruvate carboxylase from *Zea mays* utilizing formate as an alternate substrate for bicarbonate. *Biochemistry.* **21** : 6441-6446.

Jenkings, C.L.D., Hiris, R.L.N., y McFadden, H.G. (1986). Activation of maize leaf phospho*enol*pyruvate carboxylase by the non-physiological substrate analogue methyl-2-dihydrohyphosphinoylmethyl-2-propenoate. *Biochem. Int.* **12** : 619-625.

Jiao, J.A., Chollet, R. (1988). Light/dark regulation of maize leaf phospho*enol*pyruvate carboxylase by *in vivo* phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **261** : 409-417.

Jiao, J.A., Chollet, R. (1989). Regulatory seryl-phosphorylation of $C_4$ phospho*enol*pyruvate carboxylase by a soluble protein kinase from maize leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **269** : 526-535.

Jiao, J.A., Chollet, R. (1990). Regulatory phosphorylation of serine-15 in maize phospho*enol*pyruvate carboxylase by a $C_4$-leaf protein serine kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **283** : 300-305.

Jiao, J.A., Chollet, R. (1991). Posttranslational regulation of phospho*enol*pyruvate carboxylase in $C_4$ and crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* **95** : 981-985.

Jiao, J.A., Chollet, R. (1992). Light activation of maize phospho*enol*pyruvate carboxylase protein-serine kinase activity is inhibited by mesophyll and bundle sheath-directed photosynthesis inhibitors. *Plant Physiol.* **98** : 152-156.

Jiao, J.A., Podestá, F.E., Chollet, R., O'Leary, M., Andreo, C.S. (1990). Isolation and sequence of an active-site peptide from maize leaf phospho*enol*pyruvate carboxylase inactived by pyridoxal 5'-phosphate. *Biochem. Biophys. Acta.* **1041** : 291-295.

Jiao, J.A., Echeverría, C., Vidal, J., Chollet, R. (1991). Protein turnover as a component in the light/dark regulation of phospho*enol*pyruvate carboxylase protein-serin kinase activity in $C_4$ plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88** : 2712-2715.

Knowles, J.R. (1989). The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **58** : 195-221.

Lepiniec, L., Kreyer, E., Philippe, H., Gadal, P., Crêtin, C. (1994). Phospho*enol*pyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution. *Plant Sci.* **99** : 111-124.

Lopez-Valentin, D.M. (1997). "Estudio del mecanismo cinético de la enzima fosfo*enol*piruvato carboxilasa de hoja de maíz (*Zea mays*) modificada con piridoxal 5´-fosfato". Tesis de licenciatura. facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Macnicol, P.K., Jacobsen, J.V. (1992). Endosperm acidification and related metabolic changes in the developing barley grain. *Plant Physiol.* **98** : 1098-1104.

Mancera, R.L., Gómez, A.G., Pisanty, A. (1995). Quantitative structure-activity relationships of competitive inhibitors of phospho*enol*pyruvate carboxylase. *Bioorganic & -Medicinal Chem.* **3** : 217-225.

Manh, C.T., Bismuth, E., Boutin, J.P., Provot, M., Champigny, M.L. (1993). Metabolite effector of shorterm nitrogen-dependent enhacement of phospho*enol*pyruvate activity and decrease of net sucrose synthesis in wheat leaves. *Physiol. Plant.* **89** : 460-466.

Maruyama, H., Easterday, R.L., Chang, H-C., Lane, M.D. (1966). The enzymatic carboxylation of phospho*enol*piruvate. I. Purification and properties of phospho*enol*pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **241** : 2405-2412.

McNaughton, G.A., Fewson, C.A., Wilkins, M.B., Nimmo, H.G. (1989). Purification, oligomerization state and malate sensitivity of maize leaf phospho*enol*pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **261** : 349-355.

Melzer, E., O´Leary, M. (1987). Anaplerotic fixation by phospho*enol*pyruvate carboxylase in $C_3$ plants. *Plant Physiol.* **12** : 31-46.

Mújica-Jiménez, C., Castellanos-Martinez, A., Muñoz-Clares, R.A. (1998). Activation of phospho*enol*pyruvate carboxylase by the antibiotic phosphomycin. *Biochem. Biophys Acta.*

Monod, J., Wyman, J., Changeux, J-P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **12** : 378-389.

O´Leary, M.H., Rife, J.E., Slater, H. (1981) Kinetic and isotope effect studies of maize phospho*enol*pyruvate carboxylase. *Biochemistry.* **20** : 7308-7314.

O´Leary, M.H. (1982) Phospho*enol*pyruvate carboxylase: An enzymologist´s view.

*Ann. Rev. Plant Physiol.* **33** : 297-315.

O'Sullivan, W.J., Smithers, G.W. Stability constants for biologically important metal-ligand complexes. En Colowick, S.P. and Klapan, N.O. (Editors), "Methods in enzymology", Academic Press, New York, Vol. 63, pp. 294-336. (1979).

Outlaw, W.H., Kennedy, J. (1978). Enzymic and substrate basis for the anaplerotic step in guard cells. *Plant Physiol.* **62** : 648-652.

Pairoba, C.F., Colombo, S.L., Andreo, C.S. (1996). Flavonoids as inhibition of NADP-malic enzyme and PEP carboxylase from C4 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.

Pipenbrock, M., Schmitt, J.M. (1991). Environmental control of phospho*enol*pyruvate carboxilase, Induction in mature *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol.* **97** : 998-1003.

Podestá, F. E., Iglesias, A.A., Andreo C.S. (1986). Modification of essential amino group of phospho*enol*pyruvate 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 phospho*enol*pyruvate carboxylase. Oligomeric state and activity in the presence of glycerol. *Plant Physiol.* **90** : 427-733.

Rajagopalan, A.V., Devi, M.T., Raghavendra, A.S. (1994). Molecular biology of $C_4$ phospho*enol*pyruvate carboxylase: Structure, regulation and genetic engineering. *Photosynth. Res.* **39** : 115-135.

Rodríguez-Sotres, R. (1990). Características cinéticas y moleculares de la enzima fosfo*enol*piruvato carboxilasa en relación con la regulación de su actividad *in vivo* en hoja de maiz. tesis doctoral. U.N.A.M.

Rodríguez-Sotres, R. y Muñoz-Clares, R.A. (1987). Short-term regulation of maize leaf phospho*enol*pyruvate carboxylase by light. *J. Plant Physiol.* **128** : 361-369.

Rodríguez-Sotres, R. y Muñoz-Clares, R.A. (1990). Kinetic evidence of the existence of a regulatory phospho*enol*pyruvate binding site in maize leaf phospho*enol*pyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* **276** : 180-190.

Rustin, P., Meyer C.R., Wedding, R. (1988). Identification of substrate and efector

binding sites of phospho*enol*pyruvate carboxylase from *crassula argentea*. A possible role of phospho*enol*pyruvate as substrate and activator. *J. Biol. Chem.* **263** : 17611-17614.

Schuller, K.A., Turpin, D.H., Plaxton, W.C. (1990). Metabolite regulation of partially purified soybean nodule phospho*enol*pyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **94** : 1429-1435.

Segel, I.H. Enzyme kinetics. John Willey & Sons. U.S.A., 1975.

Sigel, H., Sigel, A. Metal ions biological systems. Compendium on magnesium and its role in biology nutrition and physiology. Marcel Dekker Inc. N.Y. and Basel. Vol. 26. 1990.

Sims, T.L., Hague, D.R. (1981). Light stimulated increase of translatable mRNA for phospho*enol*pyruvate carboxylase in leaves of maize. *J. Biol. Chem.* **256** : 8252-8255.

Smith, C.A., Wood, E.J. (1992). Biosynthesis, Chapman & Hall. Honk Kong. pp. 43 y 45.

Stiborová, M., Leblová, S. (1986). Structure of phospho*enol*pyruvate carboxylase from maize leaves. *FEBS Lett.* **205** : 32 34.

Sugiharto, B., Miyata, K., Nakamoto, H., Sasakawa, H., Sugiyama, T. (1990). Glutamine induces the N-dependent acumulation of mRNAs encoding phospho*enol*pyruvate carboxylase and carbonic anhidrase in detached maize leaf tissue. *Plant Physiol.* **92** : 963-969.

Sugiharto, B., Suzuki, Y., Burnell, J.N., Sugiyama, T. (1992). Glutamine induces the N-dependent acumulation of mRNAs encoding phospho*enol*pyruvate carboxylase and carbonic anhidrase in detached maize leaf tissue. *Plant Physiol.* **100** : 2066-2070.

Tarczynski, M.C., Outlaw, Jr. W. H. (1993). The interactive effects of pH, L-malate and glucose-6-phosphate on guard-cell phospho*enol*pyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **103** : 1189-11944.

Ting, I.P., Osmond, C.B. (1973). Photosynthetic phospho*enol*pyruvate carboxylase. Characteristics of alloenzymes from leaves of $C_3$ and $C_4$ plants. *Plant Physiol.* **57** : 906-910.

Toh, H., Kawamura, T., Izui, K. (1994). Molecular evolution of phospho*enol*pyruvate carboxylase. *Plant Cell Environ.* **17** : 31-43.

Tovar-Mendez, A., Mújica-Jimenez, C. y Muñoz-Clares, R.A. (1997). Desensitization

to glucosa 6-phosphate of phospho*enol*pyruvate carboxylase from maize leaves by pyridoxal 5´-phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **1337** : 207-216.

Tovar-Mendez, A. (1997). "Insensibilización de la enzima fosfo*enol*piruvato carboxilasa al activador glucosa-6-fosfato por modificación química con piridoxal-5´-fosfato". Tesis de maestria. Facultad de Quimica, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F.

Tovar-Mendez, A., Rodriguez-Sotres, R., Lopez-Valentin, D.M. y Muñoz-Clares, R.A. (1998). Re-examination of the roles PEP and $Mg^{2+}$ in the reaction catalysed by the phosphorylated and non-phosphoryated forms of phospho*enol*pyruvate carboxylase from leaves of Zea mays: Effects of the activators glucose 6-phosphate and glycine. *J. Biochem.* **332** : 632-642.

Uedan, K., Sugiyama T. (1976). Purification and characterization of phospho*enol*pyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiol.* **57** : 906-910.

Van, Q.L., Foyer, C., Champigny, M.L. (1991). Light and $NO_3^-$ on wheat leaf phospho*enol*pyruvate carboxylase activity. *Plant Physiol.* **97** : 1476-1482.

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.

Vidal, J., Gadal, P. (1983). Influence of light on phospho*enol*pyruvate carboxylase in sorghum leaves. Identification and properties of two isoforms. *Physiol. Plant.* **57** : 119-123.

Walker, G.H., Ku, M.S.B., Edwards, G.E. (1986). Catalytic activity of maize leaf phospho*enol*pyruvate carboxylase in relation to oligomerization. *Plant Physiol.* **80** : 848-855.

Watson, A.A., Duffus C.M. (1988). Carbon dioxide fixation by detached cereal caryopses. *Plant Physiol.* **87** : 205-209.

Wedding, R.T., Black, M.K. (1988). Role of magnesium in the binding of substrate and effectors to phospho*enol*pyruvate carboxylase from a CAM plant. *Plant Physiol.* **87** : 443-446.

Wedding, R.T., Rustin, P., Meyer C.R., Black, M.K. (1988). Kinetic studies of the form of substrate bound by phospho*enol*pyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **88** : 976-979.

Wedding, R.T., Black, M.K., Meyer C.R., (1989). Activation of higher plant

phosphoenolpyruvate carboxylase by glucosa 6-phosphate. *Plant Physiol.* **90** : 648-652.

Wirsching, P., O'Leary, M.H. (1985). . *Biochemistry.* **24** : 7602-7606.

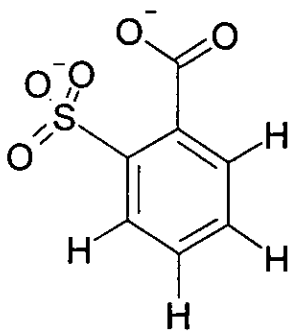
Wu, M.X., Meyer, C.R., Willeford, K.O., Wedding, R.T. (1990). Regulation of the agregation state of phospho*enol*pyruvate carboxylase: evidence from dynamic light-scattering measurements. *Arch. Bichem. Biphys.* **281** : 324-329.

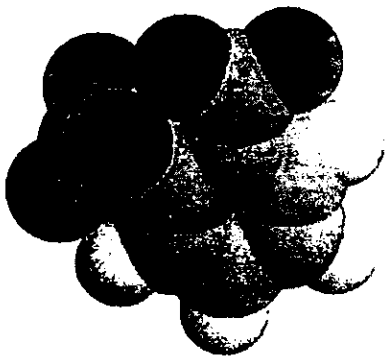
*ANEXO

NOMBRE: Ácido 2-sulfobenzoico

FÓRMULA MOLECULAR : $C_7H_4O_5S$

P.M. = 200.17

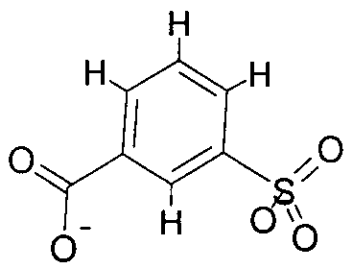


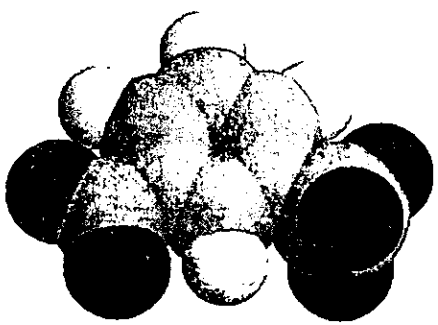


NOMBRE: Ácido 3-sulfobenzoico

FÓRMULA MOLECULAR : $C_7H_4O_5S$

P.M. = 200.17

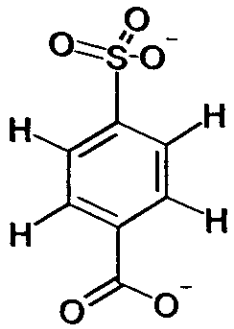


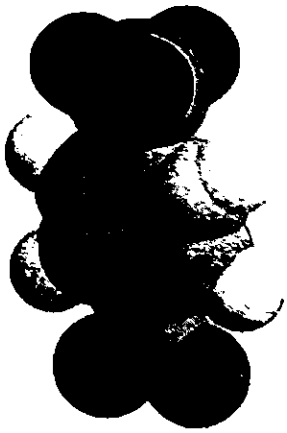


**NOMBRE: Ácido 4-sulfobenzoico**

**FÓRMULA MOLECULAR : $C_7H_4O_5S$**

**P.M. = 200.17**

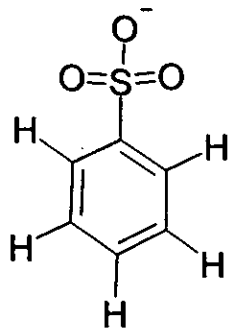


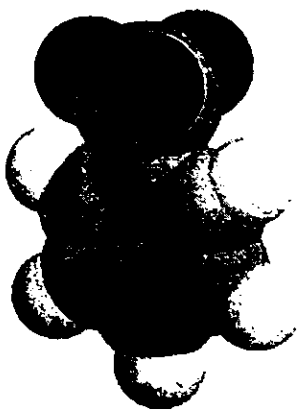


NOMBRE: Ácido bencensulfónico

FÓRMULA MOLECULAR : $C_6H_5O_3S$

P.M. = 157.16

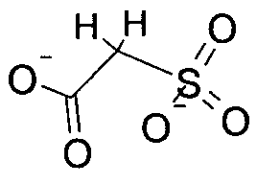




NOMBRE: Ácido sulfoacético

FÓRMULA MOLECULAR : $C_2H_2O_5S$

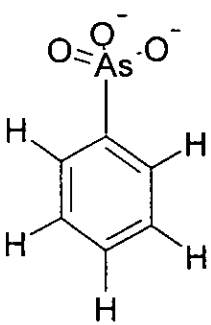
P.M. =138.12

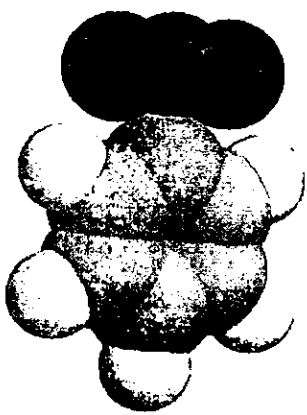


NOMBRE: Ácido fenilarsónico

FÓRMULA MOLECULAR: $C_6H_5O_3As$

P.M. = 200.03

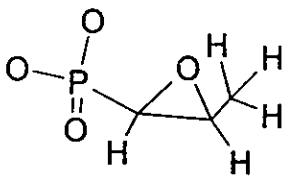


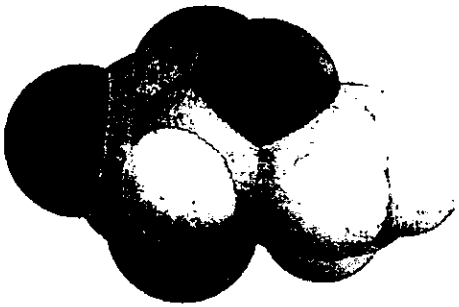


NOMBRE: Fosfomicina

FÓRMULA MOLECULAR : $C_3H_5O_4P$

P.M. = 136.04

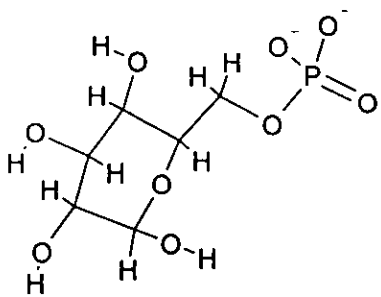


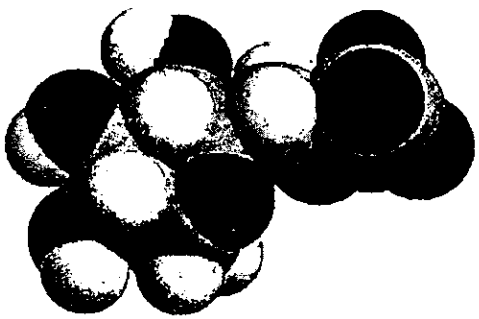


NOMBRE: Glucosa-6-fosfato

FÓRMULA MOLECULAR : $C_6H_{11}O_9P$

P.M. = 258.12





* Para todos los cálculos y representaciones de las moléculas se tomó a la especie totalmente desprotonada.