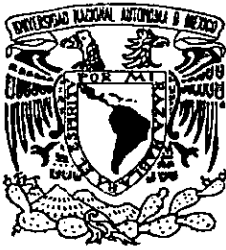


00551 5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

298885

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ALOSTÉRICAS DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE HOJA DE MAÍZ USANDO FOSFOMICINA COMO ACTIVADOR

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS
(BIOQUÍMICA)

P R E S E N T A
Q.A. ANTONIO CASTELLANOS MARTINEZ

ASESORA:
DRA. ROSARIO MUÑOZ CLARES



MÉXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

PRESIDENTE: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
VOCAL: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
SECRETARIO Dr. Miguel Lara Flores
SUPLENTE Dr. Enrique García Hernández
SUPLENTE Dr. Guillermo Mendoza Hernández

Este Trabajo se realizó en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM y financiado por DGAPA, UNAM, proyecto IN211694. El sustentante fue becario de CONACYT.

ASESORA: Dra. Rosario Muñoz Clares

SUSTENTANTE: Q. A . Antonio Castellanos Martínez

AGRADECIMIENTOS

Con todo el respeto, mi eterno y sincero agradecimiento a la Dra. Rosario Muñoz Clares por todo su apoyo y comprensión.

Mi sincero agradecimiento también al Biol. Carlos Mújica Jiménez.

A todos los que de alguna manera hicieron posible este trabajo.

ÍNDICE
RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas	2
2.2 Regulación de la PEPC de plantas	4
2.3 El sitio alostérico de Glc6P	8
2.4 Fosfomicina	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1 Reactivos	17
6.2 PEPC	17
6.3 Determinación de la actividad de PEPC	17
6.4 Análisis de los datos experimentales	18
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
7.1 Estudios de activación múltiple	20
7.2 Efecto de la fosfomicina sobre las cinéticas de saturación de PEPC por Mg-PEP.	23
7.2.1 Estudios a pH 7.3	23
7.2.2 Estudios a pH 8.3	26
7.3 Efecto de Mg-PEP, fPEP y fMg ²⁺ sobre las cinéticas de saturación de PEPC por fosfomicina.	28
7.4 Efecto del glicerol sobre la activación de fosfoenolpiruvato carboxilasa por fosfomicina.	32
8. DISCUSIÓN GENERAL	35
8.1 Relación estructura-función de los análogos de PEP y sus implicaciones fisiológicas.	35
8.2 Efecto de activadores sobre la inhibición por sustrato	36
8.3 Mecanismos de regulación alostérica de la PEPC de hoja de maíz.	36
9. CONCLUSIONES	38
10. BIBLIOGRAFÍA	39

ABREVIATURAS

Plantas C ₃	Plantas que fijan CO ₂ exclusivamente vía ciclo de Calvin.
Plantas C ₄	Plantas que poseen el ciclo de los ácidos dicarboxílicos C ₄ además del ciclo de Calvin.
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
EDTA	Acido etilén-diamino-tetracético.
DEPC	Dietilpirocarbonato
Glc6P	Glucosa-6-fosfato
MeCH ₂ PEP	2- dihidroxifosfinoilmetil-2-propenoato
Mg-fosfomicina	Complejo de fosfomicina con magnesio
Mg-Glc6P	Complejo de la glucosa- 6-fosfato con magnesio
Mg-PEP	Complejo de fosfoenolpiruvato con magnesio
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	NAD ⁺ reducido
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina-3-fosfato reducido.
OAA	Oxaloacetato
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PCMB	P- cloromercurio benzoato
PEG	Polietilenglicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PLP	Piridoxal- 5'-fosfato
RUBISCO	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TNBS	Sulfonato de trinitrobenzeno
apK _m	K _m aparente
apV _{max}	Velocidad máxima aparente
P _{myc}	Fosfomicina
Acp	Acetilfosfato
φ P	Fenilfosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
InsP	Mioinositolfosfato
F16bP	Fructosa-1,6-bisfosfato
F26bP	Fructosa-2,6-bisfosfato

RESUMEN

La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E. C. 4.1.1.31) cataliza la reacción de carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) produciendo oxaloacetato y fosfato inorgánico. Esta reacción requiere de iones Mg^{2+} . El antibiótico fosfomicina (ácido 1,2 epoxipropilfosfónico), un análogo del PEP, no se comporta como un inhibidor sino como un activador de la PEPC de hoja de maíz. Estudios de activación múltiple indican que el análogo se une al sitio alostérico de la glucosa-6-fosfato (Glc6P), produciendo una enzima aún más activa que la que produce la propia Glc6P. Debido a esto, nosotros usamos fosfomicina como una herramienta para ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos de regulación alostérica de PEPC de plantas C_4 . Los datos de velocidad inicial obtenidos en estudios cinéticos detallados, en los cuales las concentraciones de magnesio libre, del complejo Mg-PEP y de fosfomicina libre fueron controladas, son consistentes con: (1) El verdadero activador de PEPC es la fosfomicina libre, la cual compite con PEP libre por el sitio alostérico de Glc6P; y (2) El complejo Mg-fosfomicina provoca inhibición al unirse al sitio activo compitiendo con Mg-PEP. Por lo tanto, aunque el sitio alostérico de Glc6P y el sitio activo son capaces de unir los mismos ligandos, difieren en la forma del sustrato y activador que unen. Esta importante diferencia permite la expresión del potencial de activación y evita la inhibición por los activadores, incluyendo los fisiológicos, los cuales están comúnmente sin acomplejar a las concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} libre. A concentraciones de sustrato bajas, las cinéticas de saturación de la enzima por fosfomicina presentaron cooperatividad positiva a pH de 7.3 y 8.3, aunque en este último pH, la cinética de saturación por el sustrato fue hiperbólica. El cosoluto glicerol incrementa mucho la afinidad de la enzima por la fosfomicina y elimina la cooperatividad en esta unión, pero no elimina el efecto heterotrópico del activador. Por lo tanto, los efectos heterotrópicos y homotrópicos del activador no están siempre asociados a los efectos homotrópicos del sustrato, lo cual no es consistente con el modelo de dos estados previamente propuesto para explicar las propiedades alostéricas de PEPC de hoja de maíz.

ABSTRACT

The enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, E.C. 4.1.1.31) catalyses the essentially irreversible carboxylation of phosphoenolpyruvate (PEP) to yield oxaloacetate and inorganic phosphate. The reaction requires Mg^{2+} . The antibiotic phosphomycin (1,2-epoxypropylphosphonic acid), an analog of PEP, behaved not as an inhibitor but as an activator of PEPC from maize leaves. Multiple activation studies indicate that the analog binds to the glucose-6-phosphate (Glc6P) allosteric site producing a more activated enzyme than Glc6P itself. Because of this, we used phosphomycin as a tool to further extend our understanding of the mechanisms of allosteric regulation of PEPC from C_4 plants. Initial velocity data from detailed kinetic studies, in which the concentrations of free and Mg-complexed PEP and phosphomycin were controlled, are consistent with: (1) the true activator is free phosphomycin, which competes with free PEP for the Glc6P-allosteric site; and (2) the Mg-phosphomycin complex caused inhibition by binding to the active site in competition with MgPEP. Therefore, although the Glc6P-allosteric site and the active site are able to bind the same ligands they differ in the form of substrate and activator they bind. This important difference allows the full expression of the potential of activation and prevents inhibition by the activators, including the physiological ones, which are mostly uncomplexed at physiological free Mg^{2+} concentrations. At fixed low substrate concentrations, the saturation kinetics of the enzyme by phosphomycin showed positive cooperativity at pH 7.3 and 8.3, although at the latter pH the kinetics of saturation by the substrate was hyperbolic. The cosolute glycerol greatly increased the affinity of the enzyme for phosphomycin and abolished the cooperativity in its binding, but did not eliminate the heterotropic effects of the activator. Therefore, the heterotropic and homotropic effects of the activator are not always coupled to the homotropic effects of the substrate, which argues against the two-state model previously proposed to explain the allosteric properties of maize-leaf PEPC.

1. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente de un 90 a un 95% de la materia seca de un cultivo se deriva del CO₂ atmosférico asimilado durante la fotosíntesis. Por ello, la comprensión de los procesos bioquímicos responsables de la asimilación de este compuesto es del máximo interés, no sólo científico sino también económico, en momentos como los actuales en los que la preocupación por la conservación de las fuentes renovables de energía y el incremento de la producción mundial de alimentos crece día a día.

El maíz pertenece al grupo de plantas con fotosíntesis C₄ que se caracteriza por un alto nivel de eficiencia de crecimiento bajo condiciones extremas de luz, altas temperaturas y niveles elevados de oxígeno. Las bases moleculares de dichas características de las plantas C₄ estriban en la existencia de la ruta metabólica de los ácidos dicarboxílicos (ciclo C₄) que minimiza la pérdida de energía debida a la fotorrespiración [Leegood y Osmond, 1990].

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, E.C. 4.1.1.31) es conocida como una enzima clave en la asimilación de CO₂ de plantas de tipo C₄ y con metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). En maíz, una planta C₄, la PEPC es una enzima altamente regulada sujeta a modificación covalente reversible [Jiao y Chollet, 1990] y a un complejo control alostérico. Su actividad se incrementa por Glc6P [Coombs y col. 1973; Stiborová y Leblová 1985], glicina [Nishikido y Takanashi, 1973; Uedan y Sugiyama, 1976; Stiborová y Leblová, 1985] y es inhibida por malato [Huber y Edwards, 1975]. Estos tres tipos de compuestos tienen sitios de unión separados en la enzima.

En este trabajo, nosotros hemos investigado el efecto que sobre la actividad de PEPC de hoja de maíz tiene un análogo del PEP, el ácido 1,2-epoxipropilfosfónico (fosfomicina) [Christensen y col., 1969]. Encontramos que la fosfomicina actúa como un potente activador reversible no esencial de PEPC de hoja de maíz, al unirse al mismo sitio alostérico de la Glc6P y de otros análogos de PEP que se comportan como activadores. En vista de estos resultados utilizamos la fosfomicina como herramienta en estudios encaminados a entender mejor los mecanismos de regulación alostérica de PEPC de plantas C₄.

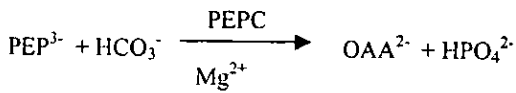
2. ANTECEDENTES

2.1 Fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas

A la fecha existen diferentes revisiones sobre la enzima PEPC de plantas [O'Leary, 1982; O'Leary, 1983; Andreo y col., 1987; Deroche y Carrayol, 1988; Jiao y Chollet, 1991; Rajagopalan y col., 1994; Chollet y col., 1996]. A continuación se resume lo más relevante para este trabajo de lo que se sabe sobre la enzima.

2.1.1 Reacción catalizada y propiedades cinéticas

PEPC cataliza la β -carboxilación irreversible de PEP a expensas de bicarbonato para producir oxalacetato y fosfato inorgánico [Bandurski y col., 1953; Bandurski y Greiner, 1953]:



$$\Delta G^\circ = -7.2 \text{ kcal/mol}$$

Esta reacción es altamente exergónica y requiere un catión divalente que fisiológicamente parece ser el Mg^{2+} [Bandurski, 1955; Tchen y Vennesland, 1955], aunque *in vitro* la enzima puede usar Mn^{2+} o Co^{2+} [Miziorko y col., 1974; O'Leary, 1981; Nguyen y col., 1988]. A diferencia de otras reacciones de carboxilación catalizadas enzimáticamente en las que el sustrato es bicarbonato, la reacción de PEPC no es dependiente de biotina [Cooper y Wood, 1971; Mukerji, 1977].

La enzima de hojas de plantas C_4 muestra cooperatividad homotrópica positiva en la cinética de saturación por PEP a pH 7 o cercanos a 7 [Uedan y Sugiyama, 1976; Hayakawa y col., 1981; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990]. El PEP libre se comporta como un activador de la enzima de hoja de maíz, por lo que se ha propuesto que existe un sitio alostérico regulatorio que fija PEP libre y el cual no puede unir Mg^{2+} [Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez y col., 1998].

2.1.2 Características moleculares

Se ha reportado una masa molecular de alrededor de 400 kDa para la PEPC purificada de hoja de maíz y otras plantas C_4 [Ting y Osmond, 1973a; Marés y Leblová,

1980]. En electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) la enzima de hoja de maíz presenta una banda de una masa molecular aproximada de 100 kDa, lo que indica que la enzima es un homotetrámero [Uedan y Sugiyama, 1976; Marès y Leblová, 1980]. Algunos autores proponen que la PEPC puede existir en diferentes formas oligoméricas *in vivo*; sin embargo, la forma activa de la PEPC es el homotetrámero, siendo el dímero mucho menos activo y el monómero totalmente inactivo [Uedan y Sugiyama, 1976; Marès y Leblová, 1980; Wu y Wedding, 1985; Stiborová y Leblová, 1986]. La forma tetramérica de la enzima se disocia a pHs alcalinos o ácidos [Stiborová y Leblová, 1986; Wagner y col., 1987]. La disociación de la PEPC también es promovida por dilución [Selinioti y col., 1987; Willeford y Wedding, 1992], fuerzas iónicas altas [Stiborová y Leblová, 1986; Walker y col., 1986; Wagner y col., 1987], bajas temperaturas [Selenioti y col., 1987], la ausencia de agentes reductores como el DTT [Iglesias y Andreo, 1984b] y por la presencia de malato [Wu y Wedding, 1985; Willeford y col., 1990]. Por el contrario, la forma tetramérica se estabiliza por el sustrato PEP, por el activador Glc6P [Willeford y Wedding, 1992] y por la presencia de glicerol [Podestá y Andreo, 1989].

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

Estudios de modificación química con la enzima de hoja de maíz sugieren que residuos de arginina [Iglesias y col., 1984], lisina [Andreo y col., 1986; Podestá y col., 1986; Ryslavá y col., 1988; Wagner y col., 1988], histidina [Iglesias y Andreo, 1983], cisteína [Raghavendra y Vallejos, 1982; Manetas y Gavalas, 1982; Iglesias y Andreo, 1984a] y un grupo carboxilo [Maralihalli y Bhagwat, 1993] son esenciales para la actividad catalítica.

2.1.3 Isoformas y funciones metabólicas.

Con base en la actividad específica de la enzima en los extractos crudos y en los valores de K_m PEP determinados a un pH de 7.8, se ha sugerido que las isoformas de la PEPC pueden clasificarse en cuatro grupos [Ting y Osmond, 1973b]: 1) PEPC de hojas de plantas C_3 con una baja K_m PEP y una baja actividad específica, 2) PEPC de hojas de plantas C_4 con una alta K_m PEP y una actividad específica elevada, 3) PEPC de hojas de plantas CAM con una baja K_m PEP y una elevada actividad específica y 4) PEPC de tipo no autotrófico o de tejidos no verdes con una K_m PEP y actividad específica baja.

Se ha encontrado que son de tres a cuatro las familias de genes nucleares que codifican para las diferentes isoformas de PEPC de plantas: la forma fotosintética de hoja de plantas C_4 y de hoja de plantas C_3 , la forma fotosintética de hoja de plantas CAM y la forma anaplerótica de raíz [Hudspeth y col., 1986; Hudspeth y Grula, 1989; Crétin y col., 1991; Schaffner y Sheen, 1992]. La isoforma PEPC fotosintética de plantas C_4 es codificada por genes múltiples en *Flaveria trinervia*, una planta dicotiledónea tipo C_4 [Hermans y Westhoff, 1990; Poetsch y col., 1991].

El estudio de la evolución molecular de la PEPC mediante el alineamiento asistido por computadora de todas las secuencias de PEPCs disponibles, apoyándose en otros datos como las familias de genes que codifican para las formas de PEPC, ha indicado que la isoforma C₃ de la enzima es la forma primitiva de las plantas y que tanto las isoformas C₄ como las CAM se originaron a partir de aquella y de forma independiente durante la evolución [Toh y col., 1994].

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

1.- En hojas de plantas C₃ y en los tejidos no fotosintéticos de todo tipo de plantas, PEPC está involucrada en funciones anapleróticas, es decir, en el reabastecimiento de oxaloacetato al ciclo del ácido cítrico para la síntesis de aminoácidos y porfirinas [King y col., 1986; Maxwell y col., 1984; Rosedhal, 1990]. Además, participa en mecanismos bioquímicos para el mantenimiento del pH [Davies, 1979], la regulación de la osmolaridad [Deroche y Carroyol, 1988], la fijación de nitrógeno [Quy y col., 1991], la generación de NADPH [Van y col., 1991] y la recaptura del CO₂ respirado [Hedley y col., 1975].

2.- En hojas de plantas C₄ y CAM la isoforma predominante está asociada a la asimilación fotosintética de CO₂. En plantas C₄, la enzima cataliza el primer paso de la ruta metabólica conocida como ruta C₄. La compartimentalización de las reacciones de fijación de CO₂ por PEPC y por RUBISCO favorece la eficiencia fotosintética de estas plantas [Hatch, 1987]. En plantas CAM la fijación del CO₂ atmosférico por PEPC ocurre durante la noche, acumulándose como malato en las vacuolas. Este mecanismo minimiza las pérdidas de agua en plantas de zonas áridas o semiáridas, en las cuales los estomas se abren sólo durante la noche [Hatch, 1987].

2.2 Regulación de la PEPC de plantas

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

2.2.1. A nivel de la cantidad de enzima

Las condiciones en las que las plantas crecen determinan el grado de síntesis de la enzima, como se indica a continuación.

2.2.1.1. Disponibilidad y fuente de nitrógeno

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

Se ha reportado que en hojas de frijol la proporción de las dos enzimas carboxilantes (PEPC y RUBISCO) depende de la fuente de nitrógeno utilizada en el cultivo de las plantas. La relación RUBISCO/PEPC en plantas cultivadas en nitrato fue menor que las cultivadas en amonio/nitrato, independiente de la nodulación de las plantas [Marques y col., 1983; Schweizer y Erisman, 1985].

El trigo responde a la demanda de esqueletos de carbono creada por altos consumos de nitrógeno con aumentos en la actividad de PEPC y disminución en la actividad de sacarosa fosfato sintetasa [Van y col., 1991]. Este efecto parece ser producido por glutamina, producto de la asimilación de nitrógeno, pues la glutamina en plantas de trigo estimula la fosforilación de la PEPC e incrementa la cantidad de RNA_m de esta enzima [Manh y col., 1993].

Igualmente, hojas de maíz crecidas en ausencia de nitrógeno y suplementadas con nitrato o glutamina acumulan selectivamente a la PEPC [Sugiharto y col., 1990, Sugiharto y col., 1992]. El suplemento de nitrógeno incrementa el nivel de RNA_m y de proteína de PEPC, siendo este incremento más pronunciado con el suplemento de amonio o de glutamina que con nitrato [Sugiharto y Sugiyama, 1992]. La inducción de la isoforma C₄ de PEPC por nitrato, amonio o glutamina está de acuerdo con la elevada eficiencia de uso de nitrógeno que presentan las plantas C₄ [Hatch, 1987].

2.2.1.2. Déficit de agua

Se ha reportado que la actividad de la PEPC se incrementa en nódulos de alfalfa sometidos a un estrés de agua severo, siendo la PEPC al parecer la única enzima de nódulo cuya actividad se incrementa en estas condiciones [Irigoyen y col., 1992].

Por otra parte, se ha observado que el cambio (provocado por déficit de agua) del metabolismo C₃ a CAM en la planta *Mesembryanthemum crystallinum* va acompañado de un incremento en la actividad de la PEPC y de un aumento en la cantidad del RNA_m de esta enzima [Pipenbrock y Schmitt, 1991].

Recientemente en nuestro laboratorio se ha encontrado que la actividad y la proteína de PEPC se incrementan en hojas de maíz sometidas a estrés hídrico por tratamiento con polietilenglicol (PEG) [Rodríguez-Penagos y Muñoz-Clares, 1999].

2.2.1.3. Luz

Usando un sistema de traducción libre de células de germen de trigo, Sims y Hague (1981) encontraron que durante el enverdecimiento de plántulas etioladas de maíz los niveles de RNA_m traducible para PEPC se incrementan tras la iluminación.

En hojas etioladas de sorgo se observa sólo una forma de PEPC con propiedades funcionales y regulatorias correspondientes a la isoenzima de plantas C₃. En hojas enverdecidas ocurre un incremento significativo en la actividad de PEPC, incremento que se debe a la aparición de una nueva forma de la enzima con propiedades que son típicas de las de hoja de una planta C₄ [Vidal y Gadal, 1983].

2.2.2. A nivel de la actividad

La actividad de la enzima se modifica a corto plazo por modificación covalente reversible (fosforilación), por el pH y por cambios en la concentración de ciertos metabolitos del medio intracelular.

2.2.2.1. Regulación por fosforilación

Estudios realizados con hojas verdes de plantas C₃, C₄ y CAM tratadas por periodos cortos de iluminación y oscuridad indican que la luz está involucrada en la regulación a corto plazo de la actividad de esta enzima [Karabourniotis y col., 1983; Wu y Wedding, 1985; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1987; Jiao y Chollet, 1988; Duff y Chollet, 1995; Wadham y col., 1996; Gao y Woo, 1996; Law y col., 1997]. Esta regulación se lleva a cabo por fosforilación y desfosforilación del grupo hidroxilo de la serina-15 en PEPC de maíz [Jiao y Chollet, 1989] y de serina-8 en el caso de la enzima de sorgo [Lepiniec y col., 1994]. La fosforilación de una serina del extremo amino terminal se ha documentado también para la enzima tipo CAM [Nimmo y col., 1986; Nimmo y col., 1987] y tipo C₃ [Zhang y col., 1995; Duff y Chollet, 1995].

Las formas fosforiladas y no fosforiladas difieren en sus propiedades cinéticas. La enzima fosforilada de hoja de maíz presenta una afinidad por el sustrato PEP mayor que la forma no fosforilada [I'ovar-Méndez y col., 1998]. La afinidad aparente de PEPC para ambos efectores alostéricos malato y Glc6P cambian dramáticamente cuando la enzima es fosforilada, disminuyendo en el caso de malato e incrementándose en el caso de Glc6P [Huber y col., 1986; Doncaster y Leegood, 1987; Rodríguez-Sotres y col., 1987; Duff y col., 1995].

La fosforilación y desfosforilación de PEPC son catalizadas por una PEPC-cinasa [Carter y col., 1991; Jiao y Chollet, 1991; Law y Plaxton, 1997] y una proteína fosfatasa tipo A2 [Carter y col., 1990; McNaughton y col., 1991], respectivamente.

En hojas de plantas C₃ y C₄ la forma fosforilada está presente durante el día [Jiao y col., 1991; Jiao y Chollet, 1991; Duff y Chollet, 1995], en plantas CAM dicha forma prevalece durante la noche [Nimmo y col., 1986] y en nódulo se presenta cuando la planta transporta fotosintatos a la raíz [Zhang y col., 1995].

2.2.2.2. Regulación por metabolitos

Se han descrito diversos metabolitos efectores de la actividad de PEPC con sitios alostéricos diferentes para cada uno de ellos. Por su posible relevancia fisiológica destacan

la Glc6P [Uedan y Sugiyama, 1976; Stiborová y Leblová, 1985] y la glicina [Nishikido y Takanashi, 1973; Uedan y Sugiyama, 1976; Stiborová y Leblová, 1985] como buenos activadores, así como el inhibidor malato [Huber y Edwards, 1975; O'Leary, 1982]. Su efecto es más pronunciado a valores neutros de pH.

Malato. Se ha reportado como un inhibidor mixto para la PEPC, ya que incrementa la K_m PEP y disminuye la V_{max} [O'Leary, 1982]. Además, aumenta la cooperatividad para el sustrato [Wu y Wedding, 1985]. Otros estudios indican que el malato produce inhibición competitiva o no competitiva dependiendo del pH del ensayo [González y col., 1984].

2-Fosfoglicolato. Es un inhibidor de la enzima análogo del sustrato. La inhibición por este metabolito es competitiva para PEP y acompetitiva para Mg^{2+} , independientemente del pH [Jawali y Bhagwat, 1987].

Glicina. Activa a la PEPC de hoja de plantas C_4 monocotiledóneas incrementando V_{max} y disminuyendo la K_m PEP, independientemente del pH del ensayo. Sin embargo, no afecta a la enzima de hoja de plantas C_4 dicotiledóneas o de plantas C_3 [Nishikido y Takanashi, 1973; Uedan y Sugiyama, 1976; Stiborová y Leblová, 1985].

Glc6P. Se ha reportado como un activador alostérico, particularmente efectivo a pH neutro [Huber y Edwards, 1975]. Su principal efecto es bajar considerablemente la K_m PEP y aumentar ligeramente la V_{max} [Coombs y col., 1973; Uedan y Sugiyama, 1976; Marés y Leblová, 1980; Stiborová y Leblová, 1985]. Adicionalmente, la Glc6P convierte la cinética de saturación sigmoideal por sustrato a una cinética hiperbólica [Coombs y col., 1973; Uedan y Sugiyama, 1976]. Por otra parte, la Glc6P disminuye fuertemente la inhibición de la enzima por malato [Ting y Osmond, 1973b; Huber y Edwards, 1975; Nott y Osmond, 1982; González y col., 1984; Wedding y Black, 1986].

2.2.3. Mecanismo de regulación alostérica.

Como se ha mencionado anteriormente, la isoforma fotosintética de PEPC de hoja de plantas C_4 es una enzima alostérica que a valores de pH cercanos a la neutralidad presenta efectos homotrópicos y heterotrópicos. Sin embargo a la fecha existen pocos estudios sobre el mecanismo subyacente a estos efectos, aún cuando se han propuesto los modelos siguientes:

A) Modelo de asociación-disociación oligomérica [Podestá y Andreo, 1989; Willeford y col., 1990]. Este modelo plantea que la enzima PEPC de hoja de maíz puede ser regulada *in vivo* vía un equilibrio dímero-tetramero, donde la forma tetramérica sería la forma totalmente activa y con la mayor afinidad por el sustrato. El modelo se basa en las siguientes observaciones: 1) La enzima diluida (a concentraciones menores de 0.1 mg/ml) es una mezcla de dímeros y tetrameros [Wagner y col., 1987; Willeford y col., 1990]. 2) El sustrato PEP desplaza el equilibrio hacia la forma tetramérica, lo cual explicaría la cooperatividad positiva observada en las cinéticas de saturación por PEP [Uedan y Sugiyama, 1976; Hayakawa y col., 1981; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990]. 3) La Glc6P también favorece la forma tetramérica, lo que explicaría la ausencia de

cooperatividad positiva y el aumento de la afinidad por PEP en la presencia de Glc6P [Coombs y col., 1973; Uedan y Sugiyama, 1976; Marés y Leblová, 1980; Stiborová y Leblová, 1985]. 4) El malato, que favorece la disociación del tetrámero en dímero, tiene efectos contrarios a Glc6P, es decir, disminuye la afinidad por el sustrato y aumenta la cooperatividad positiva por el sustrato [O'Leary, 1982; González y col., 1984; Wu y Wedding, 1985]. 5) El glicerol elimina la cooperatividad positiva de la enzima en la cinética de saturación por PEP [Uedan y Sugiyama, 1976; Podestá y Andreo, 1989], lo que concuerda con que la enzima diluida, en la presencia de glicerol al 20% (v:v) se encuentra principalmente en forma tetramérica [Podestá y Andreo, 1989]. Igualmente, es consistente con estos datos el hallazgo de que los cosolutos orgánicos como el glicerol [Uedan y Sugiyama, 1976; Manetas y col., 1986; Podestá y Andreo, 1989], polietilenglicol, betaína, prolina y sorbitol [Manetas y col., 1986; Stamatakis y col., 1988] aumentan la afinidad de la PEPC por PEP.

B) Jawali (1990) ha planteado el modelo concertado de acuerdo con Monod-Wyman-Changeux [Monod y col., 1965], como el mecanismo de regulación alostérica de la PEPC, sin embargo los resultados experimentales en los que el autor se basa para concluir esto no son claros.

2.3 El sitio alostérico de Glc6P

Se ha reportado que la activación de la PEPC de hoja de maíz por Glc6P no se afecta por Mg^{2+} y que la mayor activación se da a pH 7. Otros autores, por el contrario, proponen que el verdadero activador es el complejo Mg-Glc6P [Wedding y Black, 1988]. A pH 7 o menor, las curvas de saturación por Glc6P son sigmoidales, pero a pH 8 o mayor las curvas de saturación son hiperbólicas [Stiborová y Leblová, 1985].

La respuesta de la PEPC de diferentes orígenes (plantas C_3 , C_4 y CAM) a Glc6P en función del pH del medio de ensayo indica que la forma de respuesta a este activador es esencialmente la misma para las tres enzimas; sin embargo, el grado de activación inducida por Glc6P es diferente siendo aproximadamente el doble en la hoja de maíz (C_4) que en trigo (C_3) y crásula (CAM) [Wedding y col., 1989].

A pH de 7.3 la forma fosforilada de la PEPC tiene mayor afinidad por Glc6P que la forma no fosforilada [Duff y col., 1995]; sin embargo, la afinidad de la enzima por Glc6P a pH 8 es independiente del estado de fosforilación [Wang y col., 1992; Duff y col., 1995]. Otro factor que afecta la afinidad de la PEPC por Glc6P es el estado de saturación del sitio activo. Así, la enzima con el sitio activo saturado tiene una K_a (concentración de activador que produce la mitad de la activación máxima) para Glc6P menor que la enzima en presencia de concentraciones de sustrato subsaturantes [Duff y col., 1995; Tovar-Méndez y col., 1998].

En la Tabla 1 se muestran los valores de la constante de activación (K_a) de Glc6P reportados a la fecha.

Tabla 1. Parámetros cinéticos y de unión reportados para Glc6P.
 Los valores para K_a y $L_{0.5}$ se expresan en mM. n indica el número de Hill.

ESPECIE	PARÁMETRO	CONDICIONES	REFERENCIA
Maíz (<i>Z. mays</i>)	$n=2$	Activación a diferente pH:	Stiborova y Leblová, 1985
	$n=1.7$	7.0	
	$n=1$	7.5	
		8.1	
		Sustrato subsaturante.	
Maíz (<i>Z. mays</i>)	$K_a=0.68\pm 0.12$	Sustrato saturante	Wedding y col., 1989
Trigo (<i>Triticum Aestivum</i>)	$K_a=0.33\pm 0.09$		
Crásula (<i>C. argentea</i>)	$K_a=0.28\pm 0.10$		
Maíz (<i>Z. mays</i>)	$L_{0.5}=4.71\pm 0.16$ $n=3.99\pm 0.38$	Ausencia de sustrato medido por protección frente modificación química.	Tovar-Méndez y col., 1995
Sorgo (<i>Sorghum vulgare</i>)	$K_a=1.3$ $K_a=0.55$	Activación a pH 7.3 sustrato subsaturante sustrato saturante.	Duff y col., 1995
Nódulo de soya (<i>Glycine max</i>)	$K_a=1.3$ Sin efecto	Activación a diferente pH: 7.0 8.0 Sustrato subsaturante.	Schuller y col., 1990
Crásula (<i>C. argentea</i>)	$L_{0.5}=0.24\pm 0.42$ $n=1.87\pm 0.86$	Medida por cambios en la fluorescencia intrínseca de triptófano inducidos por la unión de Glc6P a pH 7.0	Wedding y Black, 1988
Crásula (<i>C. argentea</i>)	$K_a=0.083\pm 0.03$ $L_{0.5}=0.82\pm 0.03$	Activación a pH 7.0 y sustrato subsaturante. Medida por cambios en la fluorescencia extrínseca del complejo enzima-(8-anilino-1-naphthaleno-sulfonato a pH 7.0	Rustin y col., 1988.
Crásula (<i>C. argentea</i>)	$K_a=0.12\pm 0.01$ $n=1.14\pm 0.07$	Activación a pH 7 Sustrato subsaturante	Bandarian y col., 1992.

2.3.2. Estudios de unión

Los estudios de unión de Glc6P a la enzima son escasos y se dividen en dos tipos a) aquellos que se basan en determinar los cambios de fluorescencia intrínseca y extrínseca de la enzima provocados por la unión de Glc6P y b) aquellos basados en la protección ejercida por Glc6P frente a insensibilización por modificación química.

En el primer caso, a partir de los cambios en la fluorescencia intrínseca de triptófano se ha concluido que la Glc6P requiere de magnesio para unirse a la enzima nativa y que la unión del sustrato PEP al sitio activo no es necesaria para la unión de Glc6P a su sitio alostérico [Wedding y Black, 1988]. Por otra parte, estudios de unión siguiendo los cambios en la fluorescencia extrínseca del complejo enzima-(8-anilino-1-naphtalenesulfonato) sugieren que el PEP se une tanto al sitio activo como al sitio alostérico para Glc6P [Rustin y col., 1988; Rustin y col., 1991].

En el segundo caso, se encontró que la PEPC de hoja de maíz no es capaz de unir a Glc6P, o lo hace con una afinidad extremadamente baja, si el sitio activo no está ocupado por el sustrato o si la enzima está en ausencia de altas concentraciones de glicerol o polietilenglicol (PEG). En presencia de estos compuestos, la afinidad de la enzima por Glc6P se incrementa unas cuatro veces cuando se satura el sitio activo (Tovar-Méndez y col., 1995).

En la Tabla 1 se muestran los valores de las K_a y $L_{0.5}$ (concentración de Glc6P que produce la mitad del cambio máximo observado).

2.3.3 Mapeo del sitio

Con el fin de determinar los residuos de aminoácidos involucrados en la unión de la Glc6P a la PEPC se han realizado los estudios de modificación química que se describen a continuación:

Arginina. La incubación de la enzima de hoja de *C. argentea* (planta CAM) con butanodiona (reactivo específico para la modificación química de la arginina) no insensibiliza a la enzima de la activación por Glc6P, por lo que los autores excluyen la posibilidad de que residuos de arginina estén involucrados en la activación de la enzima por Glc6P, en cambio sí participan en la unión de PEP y malato [Rustin y col., 1988; Rustin y col., 1991].

Histidina. La modificación de PEPC de hoja de *C. argentea* con un reactivo específico para la modificación de histidinas, dietilpircarbonato (DEPC), no la insensibiliza a la activación por Glc6P [Rustin y col., 1991]; sin embargo, otros autores reportan que la modificación con DEPC en presencia de $MgCl_2$ 5 mM y fosfoglicolato 5 mM (para proteger al sitio activo con el complejo Mg-fosfoglicolato) insensibiliza a la enzima frente a Glc6P sin pérdida de actividad [Taghizadeh y col., 1991]. La Glc6P a una elevada concentración (9.8 mM) no protege frente a la insensibilización, lo

que sugirió que DEPC puede estar modificando a la proteína en un sitio cercano, pero no en el sitio de unión para Glc6P [Taghizadeh y col., 1991].

Aspártico o glutámico. PEPC de hoja de maíz modificada con N-etil-5-fenilisooxazolio-3-sulfonato (reactivo utilizado para la modificación química de grupos carboxilo de proteínas) se insensibiliza frente a Glc6P, indicando que un(os) grupo(s) carboxilo puede(n) estar localizado(s) en el sitio de unión para Glc6P [Maralihalli y Bhagwat, 1993], pero dado que en este estudio no se realizaron experimentos de protección, esta observación no es concluyente.

Cisteína. La incubación de PEPC de hoja de *C. argentea* con p-cloromercuriobenzoato (PCMB) provoca la pérdida de la activación por Glc6P. Glc6P protege frente a la insensibilización sólo en presencia de Mg^{2+} , por lo que los autores de este estudio sugieren que la forma que se une al sitio alostérico es el complejo Mg-Glc6P, y que un grupo -SH está involucrado en su unión. Se reporta que si se incluye Mg-Glc6P 4.33 mM en el medio de modificación, hay una protección aproximada del 50%; sin embargo, no indican si existe protección total a concentraciones más altas del activador [Wedding y col. 1989].

Lisina. La modificación de PEPC de hoja de *C. argentea* con sulfonato de trinitrobenzeno (TNBS) insensibiliza a la enzima frente a Glc6P, pero dicha modificación no afecta al cambio en la fluorescencia extrínseca del complejo enzima-(8-anilino-1-naphthalen sulfonato) inducido por la unión de Glc6P con la enzima, observándose una discrepancia entre estudios cinéticos y cambios de fluorescencia, lo que sugiere que los residuos de lisina modificados responsables de la insensibilización no están involucrados en la unión de Glc6P [Rustin y col., 1991].

PEPC de hoja de *Z. mays* se inactiva y se insensibiliza frente a Glc6P por modificación con otro reactivo específico para lisinas, el isotiocianato. Dado que la insensibilización presenta una cinética diferente a la de inactivación, se concluye que el residuo de lisina involucrado en la inactivación es diferente al involucrado en la insensibilización a Glc6P [Wu y Wedding, 1994]. Puesto que en estos estudios no se llevaron a cabo experimentos de protección con ligandos del sitio alostérico de Glc6P, no es posible concluir si la(s) lisina(s) modificadas están en o cerca de este sitio o están involucradas en la transmisión de la transición alostérica que acompaña a la unión de Glc6P.

Sin embargo, todos estos estudios no reflejan las características alostéricas de la PEPC nativa dado que en muchos de ellos han sido realizados usando enzima purificada en condiciones en las que se proteoliza el extremo NH_2 -terminal [Aussenhus y O'Leary, 1992; Wang y col., 1992]. que incluye el sitio de fosforilación [Jiao y Chollet, 1989; Lepiniec y col., 1994]. Dicha proteólisis disminuye la sensibilidad de PEPC frente a malato [Aussenhus y O'Leary, 1992; Wang y col., 1992] y aumenta la sensibilidad a Glc6P [Qun y Jiao-nai, 1988]. Por lo que en nuestro laboratorio, usando una enzima de hoja de maíz no proteolizada se encontró que la modificación química de un residuo de lisina con piridoxal-5'-fosfato (PLP) anula la capacidad de la PEPC a ser activada por Glc6P y se aportó

evidencia experimental que sugiere que esta lisina pertenece al dominio de unión de Glc6P [Tovar-Méndez y col., 1997].

2.3.4. Compuestos fosforilados que activan a la PEPC

Además de la Glc6P, otras moléculas (todas con un grupo fosfato o fosfónico en su estructura) activan la PEPC, presumiblemente por unión al sitio alostérico para Glc6P.

A) Análogos de Glc6P

La activación que análogos de la Glc6P (manosa-6-fosfato, galactosa-6-fosfato, 5-tio-glucosa-6-fosfato, mioinositol-1-fosfato, 2-deoxiglucosa-6-fosfato, glucosa-1-fosfato, glucosamina-6-fosfato) tienen sobre la PEPC de hoja de *C. argentea* reveló que la identidad del anillo heteroatómico es una característica estructural que afecta significativamente la activación. La activación no fue muy sensible a la orientación del grupo hidroxilo en el segundo carbono; sin embargo, la posición del grupo fosfato es un factor significativo [Bandarian y col., 1992].

Fructosa-6-bisfosfato activa la PEPC de hojas de plantas C₄ [Coombs y col., 1973; Wong y Davies, 1973; Selinoti y col., 1985; Doncaster y Leegood, 1987] y de plantas C₃ [Singal y Singh, 1986].

B) Triosas fosfato

El 3-fosfoglicerato se ha descrito como activador alostérico de la PEPC de hojas de plantas C₄ [Coombs y col., 1973; Wong y Davies, 1973; Selinoti y col., 1985] y de plantas C₃ [Singal y Singh, 1986]. La dihidroxiacetona fosfato [Schuller y col., 1990] y el glicerol fosfato [Singal y Singh, 1986] activan la enzima de plantas C₃ [Singal y Singh, 1986] y C₄ [Doncaster y Leegood, 1987; Bandarian y col., 1992].

B) Otros metabolitos

El AMP actúa como activador moderado de la PEPC de hoja de *C. argentea* y su efecto no es aditivo a la activación por Glc6P, además, AMP incrementa la K_a de Glc6P sugiriendo que AMP se une al sitio de Glc6P [Wedding y Black, 1986]. Dos análogos de los intermediarios propuestos para la reacción de la PEPC (acetilfosfato y carbamilfosfato) activan a la PEPC de hoja de maíz. Los autores suponen que el efecto activador se produce por unión al sitio para Glc6P. El carbamilfosfato además es capaz de unirse al sitio activo y ser desfosforilado [González y col., 1987]. Como el carbamilfosfato es sustrato y activador a concentraciones similares, es muy probable que exista gran similitud entre el sitio activo y el sitio activador para Glc6P, a los cuales ambos ésteres de fosfato se unirían.

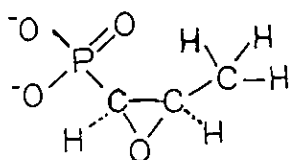
D) Compuestos no fisiológicos análogos de PEP

Un análogo de PEP como el 2-dihidroxifosfinoilmetil-2-propenoato (MeCH₂PEP) (con el carboxilo metilado y con un fosfonato en lugar de fosfato) actúa como activador de la enzima de maíz [Jenkins y col., 1986], por lo cual los autores sugieren que la PEPC posee dos sitios a los que el PEP se une: el sitio activo y un sitio regulatorio, y que el

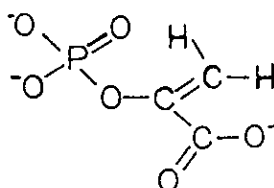
MeCH₂PEP se une preferencialmente al sitio regulatorio. En nuestro laboratorio se ha descrito que otro análogo del PEP, el fenilfosfato, es activador de la PEPC de hoja de maíz [Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990] y que su efecto activante es competitivo con respecto al PEP, lo que de nuevo sugiere la existencia de un sitio regulatorio al que puede unirse el propio PEP y que posiblemente sea el sitio para la Glc6P. Otro análogo de PEP, el sulfoenolpiruvato y en el que ha sido sustituido el éster fosfato por un éster sulfato no se comporta como un inhibidor de PEPC de hoja de maíz sino como un activador y se une al mismo sitio alostérico de Glc6P [Peliska y O'Leary, 1989] y sugieren que esto posiblemente es por que estos activadores son dianiones.

2.4 Fosfomicina

La fosfomicina (ácido 1,2 epoxipropilfosfónico) es un análogo del PEP ampliamente utilizado como agente antibacteriano. Su estructura se compara con la del PEP en el esquema siguiente:



Fosfomicina



Fosfoenolpiruvato

El efecto antibacteriano de la fosfomicina se basa en su habilidad para unirse al sitio activo de la enzima UDP-N-acetilglucosamina 1- carboxiviniltransferasa (E.C. 2.5.1.7), que cataliza el primer paso en la biosíntesis de precursores de la pared celular en bacterias, usando PEP como sustrato. Una vez que la fosfomicina se ha unido al sitio activo, modifica covalentemente a un residuo de Cys [Kahan y col., 1974; Wanke y Amrhein, 1993] inactivando así irreversiblemente a la enzima. Dado que se ha reportado que un residuo de Cys se encuentra en el sitio activo de PEPC de hoja de maíz [Iglesias y Andreo., 1984; González y col., 1986], en un principio nosotros habíamos estado interesados en usar a la fosfomicina como un posible marcador para mapear el sitio activo de la PEPC. Sin embargo, en estudios preliminares la fosfomicina no se comportó como un inhibidor reversible o irreversible de PEPC, sino más bien como un potente activador. Por esta razón, decidimos usarla para estudiar la activación alostérica de la PEPC.

En la tabla 2 se pueden observar algunos análogos de PEP, inhibidores y activadores de PEPC.

Tabla 2. Análogos de PEP que actúan como inhibidores y activadores de PEPC de maíz.

Inhibidores	K_i (μM)	Fórmula	Referencia
Ácido-1- carboxílico-di (hidroxi) fosfonoxi ciclopropano	7		O'Leary y col., 1981
Fosfoenol-3- bromopiruvato	7		O'leary y col., 1982
Z-Metilfosfoenolpiruvato	17		González y Andreo, 1988
3,3-Dicloro-Z-dihidroxifosfinoil metil-2-propeonato	80		Jenkins y col., 1987
L-Fosfolactato	100		O'Leary 1982
Activadores	K_a (mM)		Referencia
Metil-2-dihidroxifosfinoil metil-2-propeonato	0.32		Jenkins y col., 1986
Sulfoenolpiruvato	N.D		Peliska y O'Leary, 1989
Fenilfosfato	0.23		Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990

N.D = No determinado

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Algunos análogos del PEP, tales como el metil 2-dihidroxifosfinoilmetil-2-propeonato (MeCH_2PEP) [Jenkins y col., 1986], el sulfoenolpiruvato [Peliska y O' Leary, 1989] y el fenilfosfato [Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990] son conocidos como activadores de PEPC, mientras que otros análogos de PEP se comportan como inhibidores competitivos de esta enzima [González y Andreo, 1989] (Tabla 2). La distinción entre activadores e inhibidores no está claramente definida, dado que ciertos compuestos fosforilados, tales como el carbamifosfato [González y col., 1987] y 3-fosfoglicerato [Doncaster y Leegood, 1987], pueden comportarse como activadores o inhibidores. PEP por sí mismo se une al sitio alostérico de Glc6P y de este modo se comporta como sustrato y activador alostérico de la reacción catalizada por PEPC [Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Rustin y col., 1988; Tovar-Méndez y col., 1998]. Cabe preguntarse: ¿por qué razón algunos de los análogos de PEP se comportan como activadores y otros como inhibidores?. El establecimiento de las bases moleculares del diferente comportamiento de los análogos de PEP podría arrojar mucha luz sobre los mecanismos de catálisis y regulación de la enzima PEPC. De aquí nuestro interés de investigar el efecto sobre la cinética de la enzima de otro análogo de PEP, el antibiótico fosfomicina.

Las cinéticas de activación de PEPC por Glc6P, o de cualquier otro ligando del sitio alostérico de Glc6P, hasta ahora se habían estudiado usando PEP total como el sustrato variable y concentraciones fijas altas de iones metálicos, Mg^{2+} o Mn^{2+} . Aunque se ha reportado que PEP se une al sitio activo de PEPC de hoja de maíz después que el Mg^{2+} ha sido ligado [Janc y col., 1992], otros reportes indican que el sustrato preferencial de esta enzima es el complejo Mg-PEP [Mukerji, 1977; Wedding y col., 1988; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez y col., 1998]. Dada la constante de estabilidad del complejo Mg-PEP [Wold y Ballou, 1957; Manchester, 1980], los niveles intracelulares de Mg-PEP pueden ser menores que el 10% del PEP total a 0.4 mM de Mg^{2+} libre que es la concentración estimada de Mg^{2+} en el citoplasma de las células vegetales [Yazaki y col., 1988]. De forma semejante, los activadores fisiológicos pueden estar sin acomplejar bajo condiciones intracelulares, dado que sus constantes de estabilidad son aún más bajas que las de PEP. Sin embargo, se ha propuesto que el complejo Mg-Glc6P es el verdadero activador de la enzima [Wedding y Black, 1988]. Por ello, consideramos de interés llevar a cabo los experimentos cinéticos para la caracterización de la activación por fosfomicina utilizando Mg-PEP como sustrato variable y controlando variables tales como la concentración de PEP libre ($f\text{PEP}$), de magnesio libre ($f\text{Mg}^{2+}$) y de activador libre o acomplejado, las cuales no se tomaron en cuenta en los estudios cinéticos previos para investigar las propiedades del sitio alostérico de la Glc6P.

4. HIPÓTESIS

Si el análogo de PEP fosfomicina se comporta como un activador de la PEPC de hoja de maíz y no como un inhibidor competitivo, ello se deberá a que se une preferentemente al sitio alostérico para Glc6P.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar cinéticamente el efecto de fosfomicina sobre la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz, con el fin de profundizar en nuestro conocimiento de la regulación alostérica de esta enzima.

5.2 Objetivos particulares

- 1.- Determinar si la fosfomicina se une a alguno(s) de los sitios alostéricos de los activadores conocidos de la PEPC.
- 2.- Caracterizar el efecto de fosfomicina sobre la cinética de saturación de la enzima por su sustrato Mg-PEP a pH cercano al fisiológico 7.3 y a un pH de 8.3 en el que la enzima no presente cooperatividad positiva de unión de Mg-PEP.
- 3.- Determinar el efecto de Mg-PEP, PEP libre y Mg^{2+} libre sobre las cinéticas de saturación de PEPC por fosfomicina.
- 4.- Estudiar el efecto del glicerol sobre la activación de PEP por fosfomicina.

4. HIPÓTESIS

Si el análogo de PEP fosfomicina se comporta como un activador de la PEPC de hoja de maíz y no como un inhibidor competitivo, ello se deberá a que se une preferentemente al sitio alostérico para Glc6P.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar cinéticamente el efecto de fosfomicina sobre la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz, con el fin de profundizar en nuestro conocimiento de la regulación alostérica de esta enzima.

5.2 Objetivos particulares

- 1.- Determinar si la fosfomicina se une a alguno(s) de los sitios alostéricos de los activadores conocidos de la PEPC.
- 2.- Caracterizar el efecto de fosfomicina sobre la cinética de saturación de la enzima por su sustrato Mg-PEP a pH cercano al fisiológico 7.3 y a un pH de 8.3 en el que la enzima no presente cooperatividad positiva de unión de Mg-PEP.
- 3.- Determinar el efecto de Mg-PEP, PEP libre y Mg^{2+} libre sobre las cinéticas de saturación de PEPC por fosfomicina.
- 4.- Estudiar el efecto del glicerol sobre la activación de PEP por fosfomicina.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

PEP, NADH, málico deshidrogenasa de corazón de cerdo y fosfomicina fueron adquiridos de Sigma Chemical Co; glicerol y EDTA de Merck. Todos los otros reactivos de grado analítico se adquirieron de proveedores reconocidos.

6.2 PEPC

La enzima utilizada en este trabajo fue extraída, purificada y caracterizada en nuestro laboratorio por el Biólogo Carlos Mújica Jiménez tal y como se describe en Tovar-Méndez y col., (1997).

La extracción fue hecha de hojas totalmente expandidas de hojas de maíz (*Z. mays* L., cv. Chalqueño) de 6 a 8 semanas de edad, previamente sometidas a 24 horas de oscuridad.

Esta enzima tenía una pureza mayor de 99% y su actividad específica era de 33 $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

El I_{50} para malato de la enzima fue de 0.14 ± 0.01 mM y su valor no disminuyó después de una incubación exhaustiva con fosfatasa alcalina. Además, la incubación de la enzima con proteín cinasa A incrementó el I_{50} para malato a 2.2 ± 0.02 mM, indicando la integridad de la región NH_2 - terminal de la proteína. En conjunto, estos datos nos indican que la enzima PEPC utilizada estaba completa (no proteolizada) y que no estaba fosforilada (forma de oscuridad), de acuerdo con lo reportado por Wang y col. (1992) y por Duff y col. (1995).

6.3 Determinación de la actividad de PEPC

La actividad de PEPC se midió espectrofotométricamente en un volumen final de 0.5 ml mediante un ensayo acoplado, usando málico deshidrogenasa y siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm con un espectrofotómetro Beckman DU-7500 equipado con un programa para cinética. La temperatura del ensayo se mantuvo a 30 ± 0.1 °C con un equipo de circulación de agua con temperatura controlada. La mezcla de reacción estándar consistió en un amortiguador de trietanolamina-HCl 100 mM (pH 7.3 o 8.3) conteniendo EDTA 1mM, NaHCO_3 10 mM, NADH 0.2 mM, 2 unidades de málico deshidrogenasa y las cantidades de Mg^{2+} total (MgCl_2), PEP total y fosfomicina total necesarias para dar la concentración deseada de Mg-PEP, Mg-fosfomicina y de cualquier especie libre. Estas concentraciones se calcularon utilizando el programa de cómputo desarrollado por Rodríguez-Sotres (1990). La constante de estabilidad de Mg-fosfomicina utilizada

(0.237 mM⁻¹) fue determinada por nosotros bajo las condiciones de ensayo enzimático, por el método de competencia con 8-hidroxiquinolina como lo describe O'sullivan y Smithers (1979). La constante de estabilidad para el complejo Mg-PEP se consideró de 0.180 mM⁻¹ [Wold y Ballou, 1957] valor que es muy cercano al determinado por nosotros bajo las condiciones de nuestro ensayo. Otros valores de constantes de estabilidad utilizados fueron los empleados por Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares (1990).

La reacción se inició por la adición de la enzima. Las determinaciones se realizaron por triplicado, siendo la desviación estándar menor al ± 10% en todos los casos. Una unidad de actividad corresponde a la cantidad de enzima capaz de producir 1 μmol de NADH por minuto. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

6.4 Análisis de los datos experimentales.

Los datos se analizaron utilizando el programa de regresión no lineal MicroCal Origin (Microcal Software, Inc. Northhampton, MA, USA). Los datos cinéticos obtenidos al variar la concentración de sustrato se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 1) para cinéticas hiperbólicas, a la ecuación de Hill (ecuación 2) para cinéticas sigmoidales o a la ecuación con inhibición por sustrato (ecuación 3).

$$v = V_{\max} \times S / (K_m + S) \quad (1)$$

$$v = V_{\max} \times S^n / (S_{0.5}^n + S^n) \quad (2)$$

$$v = V_{\max} \times S / (K_m + S + S^2 / K_{IS}) \quad (3)$$

En estas ecuaciones v es la velocidad inicial determinada experimentalmente; V_{\max} la velocidad máxima; S la concentración de sustrato variable; K_m la constante de Michaelis-Menten para el sustrato S ; $S_{0.5}$ la concentración de sustrato a la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima; n es el número de Hill y K_{IS} es la constante de inhibición del sustrato.

En los experimentos en los que fue variada la concentración del activador, manteniendo constantes las concentraciones de sustrato, se usaron las ecuaciones 4-6 para ajustar los datos a curvas de saturación hiperbólicas o sigmoidales, y las ecuaciones 7-9 cuando se observó desactivación.

$$v = \{(v_{\max} - v_0) A / (A_{0.5} + A)\} + v_0, \quad (4)$$

$$(v_a - v_0) / v_0 = \text{Act}_{\max} \times A / (A_{0.5} + A), \quad (5)$$

$$(v_a - v_0) / v_0 = \text{Act}_{\max} \times A^n / (A_{0.5}^n + A^n), \quad (6)$$

$$v = \{(v_{\max} - v_0) A / (A_{0.5} + A + A^2 / Ki)\} + v_0, \quad (7)$$

$$v = \{(v_{\max} - v_0) A^n / (A_{0.5}^n + A^n + A^{(n+1)} / K_i)\} + v_0, \quad (8)$$

$$(v_a - v_0) / v_0 = \text{Act}_{\max} \times A / (A_{0.5} + A + A^2 / K_i), \quad (9)$$

en donde v_0 y v_a son velocidades iniciales en la ausencia y presencia de activador respectivamente; v_{\max} es la velocidad inicial más alta obtenida a concentraciones saturantes de activador; Act_{\max} es la activación máxima (es decir, las veces de incremento máximo en la actividad enzimática activada sobre la actividad enzimática sin activar); A es la concentración del activador y $A_{0.5}$ es la concentración de activador que produce la mitad de la activación máxima a concentraciones fijas de sustrato (es por tanto una constante de disociación aparente para el activador, dependiente del cociente $[S]/K_m$ por un factor que varía con el mecanismo de activación).

A un pH de 8.3, la constante de activación, K_a , y los valores limitantes βV_{\max} y αK_m fueron determinadas por las ecuaciones 10 y 11 respectivamente [Segel, 1975].

$$\text{ap}V_{\max} = V_{\max}(1 + \beta A / \alpha K_a) / (1 + A / \alpha K_a) \quad (10)$$

$$\text{ap}K_m = K_m(1 + A / K_a) / (1 + A / \alpha K_a), \quad (11)$$

dónde β y α son factores de interacción que describen la influencia que la unión del activador tiene sobre el paso catalítico o sobre la unión del sustrato, respectivamente. βV_{\max} y αK_m son la velocidad máxima y la constante de Michaelis-Menten a concentraciones saturantes de activador, y αK_a la constante de activación limitante a concentraciones saturantes del sustrato.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Estudios de activación múltiple

En la Figura 1 se puede observar que la fosfomicina a una concentración de 5 mM fue un activador más potente que 5 mM de Glc6P o 5 mM de otros compuestos fosforilados, los cuales ya se había demostrado que se unen al sitio alostérico de Glc6P, tales como el acetilfosfato, fenilfosfato, fructosa-6-fosfato, mioinositol fosfato, fructosa 1,6-bisfosfato y fructosa-2,6 bisfosfato.

En la misma figura también se puede apreciar que el grado de activación de PEPC por fosfomicina disminuyó cuando se ensayó junto con otro activador menos potente. Algunos de ellos, como los ésteres bisfosfato de fructosa, fueron activadores muy débiles, pero muy eficientes en disminuir la activación inducida por la fosfomicina. Estos resultados sugieren que los activadores se unen al mismo sitio y que las diferencias entre fosfomicina y otros activadores podría ser principalmente debidas a la alta potencia de la fosfomicina como activador una vez que se ha unido a la enzima, más bien que a un alto grado de saturación de la enzima por la concentración de fosfomicina usada en estos experimentos.

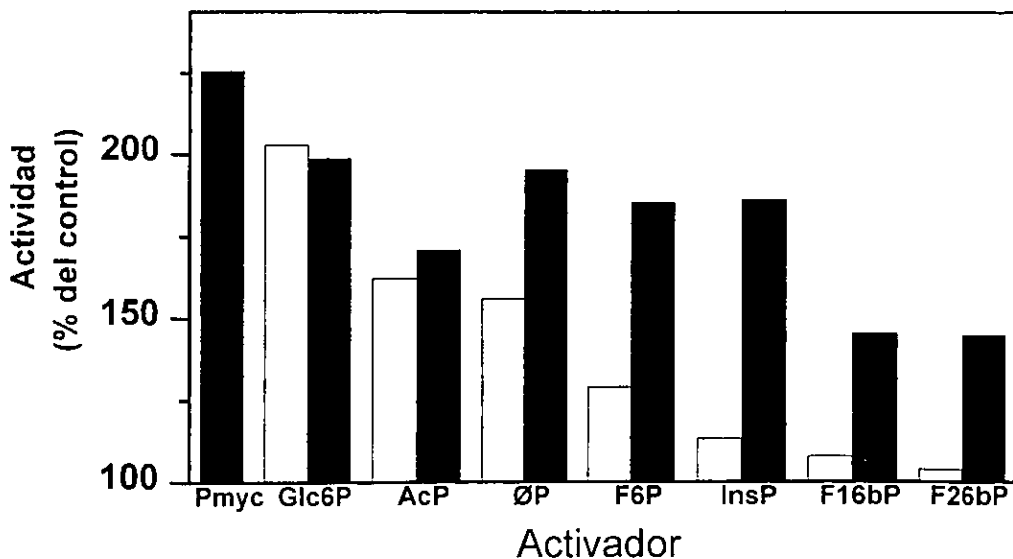


Figura 1.- Activación múltiple de PEPC de hoja de maíz por varios compuestos fosforilados. Activación relativa por 5 mM de los siguientes compuestos: Fosfomicina (Pmyc), Glucosa-6-fosfato (Glc6P), acetilfosfato (AcP), fenilfosfato (ϕ P), fructosa-6-fosfato (F6P), mioinositol fosfato (InsP), fructosa-1,6-bisfosfato (F16bP) y fructosa-2,6 bisfosfato (F26bP), en la ausencia (barras blancas) y presencia (barras negras) de fosfomicina 5 mM. La enzima pura se ensayó a 30° C en 100 mM de trietanolamina-HCl, pH 7.3, conteniendo 3.27 mM de PEP total y 1.5 mM de Mg^{2+} total. La actividad del control (v.o. sin activador) fue de 8.1 unidades/mg de proteína.

Para investigar este punto, determinamos la saturación de la enzima por fosfomicina y el activador fisiológico Glc6P a un pH de 7.3, concentraciones saturantes de HCO_3^- (10 mM) y no saturantes de Mg^{2+} y PEP (concentraciones totales de 0.5 y 1.5 mM, respectivamente) los resultados se muestran en la figura 2A. Encontramos que la afinidad de la enzima por la fosfomicina es casi idéntica que la afinidad para la Glc6P (valores de $A_{0.5}$ de 2.8 ± 0.3 y 2.7 ± 0.3 mM, respectivamente), pero la fosfomicina produce una enzima mucho más activa que la Glc6P. Así, los valores de activación máxima estimados por el ajuste de datos de la Figura 2A a la ecuación 9 para la fosfomicina y para la Glc6P fueron 33.3 ± 2.4 y 12.5 ± 1.0 veces respectivamente la actividad del control.

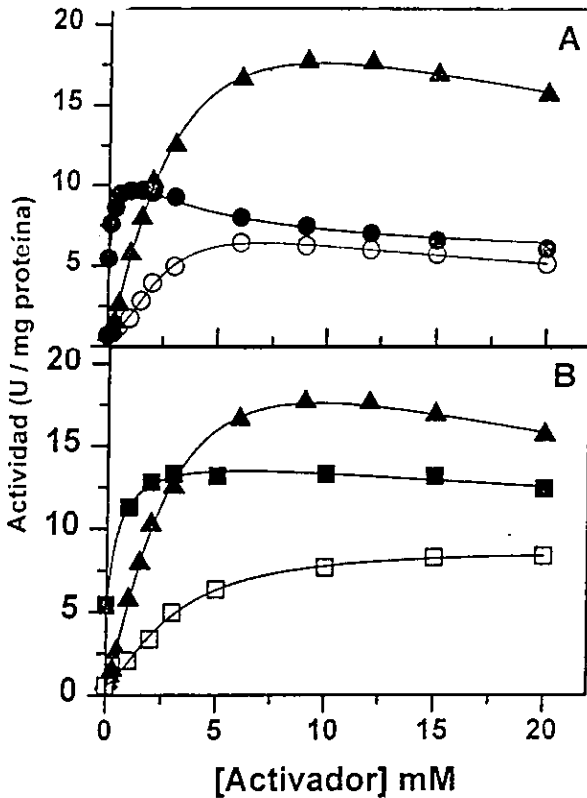


Figura 2.- Activación múltiple de PEPC de hoja de maíz por glucosa-6-P y fosfomicina.

(A) Activación por Glc6P (O), fosfomicina (▲) y Glc6P en presencia de 1 mM de fosfomicina (●) a un pH de 7.3. La actividad enzimática fue medida como en la Figura 1, pero a 1.5 mM de PEP total y 0.5 mM de Mg^{2+} total. (B) Activación por glicina en la ausencia (□) y presencia (■) de 1 mM de fosfomicina. Con fines comparativos se muestra la curva de saturación por fosfomicina (▲) de la Figura 2 A. Los ensayos se hicieron como en (A). Los datos de velocidad inicial en (A) y en (B) fueron ajustados a la ecuación 7(●, ■), ecuación 8 (O, ▲) o ecuación 4 (□). La actividad de los controles (vo, sin activador) fue 0.74 unidades/mg proteína para (A) y (B).

Cuando se determinó la respuesta de la enzima a la Glc6P en presencia de 1 mM de fosfomicina (Figura 2 A), observamos efectos aditivos de ambos activadores a bajas concentraciones de Glc6P, pero a medida que la concentración de Glc6P se fue incrementando, la actividad de la enzima fue disminuyendo hasta alcanzar el nivel de activación de la enzima saturada con Glc6P, lo que sugiere un sitio de unión común para ambos activadores. Este resultado es además consistente con que fosfomicina produce una enzima más activa que Glc6P.

En experimentos independientes, en los cuales se midió la protección proporcionada por ligandos de la enzima contra la insensibilización a Glc6P causada por piridoxal 5-fosfato, se estableció que 10 mM de fosfomicina proporciona una protección total frente a la insensibilización, mientras que 10 mM de Glc6P proporciona sólo alrededor de un 60% de protección [Tovar y col. 1997]. Estos experimentos constituyen una prueba adicional que apoya nuestras conclusiones de que la fosfomicina se une al sitio alostérico de Glc6P y que las diferencias entre la Glc6P y la fosfomicina estriban en el cambio conformacional que cada activador provoca sobre la enzima.

La fosfomicina es también un activador más potente de la PEPC de hoja de maíz que la glicina, puesto que la activación máxima provocada por la glicina fue de 14.8 ± 0.4 veces la actividad del control, como se observa en la Figura 2B, donde los datos se ajustaron a la ecuación 6. Contrariamente a lo observado con Glc6P, encontramos un efecto aditivo de la glicina y fosfomicina, cuando estudiamos la respuesta de la enzima a la glicina en presencia de 1 mM de fosfomicina (Figura 2 B), indicando claramente que ambos activadores se unen a diferentes sitios alostéricos. Esta concentración de fosfomicina reduce mucho la $A_{0.5}$ para la glicina, de 4.1 ± 0.6 mM en su ausencia a 0.6 ± 0.1 mM en su presencia, y también la $A_{0.5}$ para la Glc6P, de 2.7 ± 0.3 mM a 0.3 ± 0.1 mM. El primer resultado está de acuerdo con el reporte de que la glicina induce un incremento en la afinidad de la enzima por Glc6P [Gillinta y Grover, 1995], pero el último resultado puede parecer sorprendente dado que la unión competitiva de la fosfomicina y Glc6P para el mismo sitio alostérico podría tener efectos opuestos. Sin embargo, tomando en cuenta que la fosfomicina disminuye enormemente la K_m para el sustrato y que los valores estimados de $A_{0.5}$ de un ajuste de datos a las ecuaciones 4-9 son, en realidad, constantes de disociación aparentes que disminuyen cuando la relación $[S]/K_m$ se incrementa, los efectos de la fosfomicina sobre la afinidad aparente de los otros activadores son debidos muy probablemente a la saturación incrementada de la enzima por el sustrato en la presencia de fosfomicina. Por lo tanto, se necesitan hacer experimentos de unión de los activadores a la enzima en ausencia de sustrato a fin de conocer si los ligandos del sitio alostérico de Glc6P incrementan directamente la afinidad del sitio alostérico de la glicina por sus ligandos y viceversa.

En nuestras condiciones experimentales, la fosfomicina no produce cambio alguno en el estado de activación de la enzima después de una prolongada incubación, ni tampoco provoca la insensibilidad a Glc6P (datos no mostrados). Esto es, parece que el sitio alostérico de Glc6P no tiene un residuo capaz de reaccionar covalentemente con este compuesto, aunque un residuo de Cys ha sido involucrado en la respuesta de PEPC de maíz a Glc6P [Wedding y col., 1989].

7.2 Efecto de la fosfomicina sobre las cinéticas de saturación de PEPC por Mg-PEP.

7.2.1 Estudios a pH 7.3

A fin de caracterizar en forma más completa la activación de PEPC por fosfomicina, y para tratar de entender mejor el mecanismo de regulación alostérica de la enzima, estudiamos el efecto de varias concentraciones de fosfomicina (0.25, 0.5 y 1 mM) sobre las cinéticas de saturación de PEPC de hoja de maíz por Mg-PEP a concentraciones saturantes de HCO_3^- (10 mM) y a un pH de 7.3. La concentración de Mg-PEP se varió en un intervalo de 0.1 a 4 mM, a dos concentraciones fijas de PEP libre, 5 y 0.5 mM (Figura 3) y a dos concentraciones fijas de Mg^{2+} libre 1 y 0.1 mM (Figura 4).

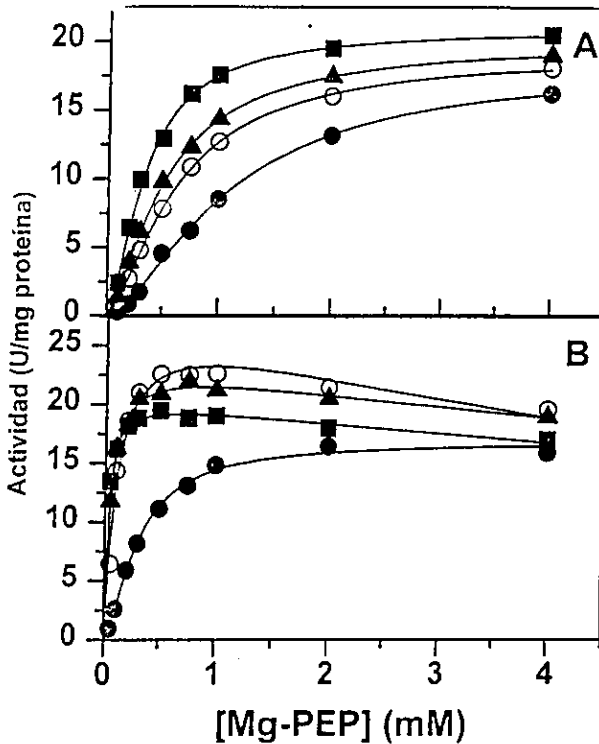


Figura 3.- Efecto de fosfomicina sobre la cinética de saturación por Mg-PEP de PEPC de hoja de maíz a PEP libre constante.

Los ensayos se hicieron a un pH de 7.3 en la ausencia (●) y presencia de 0.25 (○), 0.5 (▲) y 1 (■) mM de fosfomicina, manteniendo constante la concentración de PEP libre a 5 mM (A) ó 0.5 mM (B) y variando la concentración de Mg-PEP como se indica. La concentración de Mg^{2+} libre fue variada de 0.11 a 4.44 mM en (A) y de 1.11 a 44.4 mM en (B). Las otras condiciones de ensayo fueron las indicadas en la Figura 1. Los puntos son los valores de velocidad inicial determinados experimentalmente y las líneas trazadas a través de estos puntos fueron calculadas a partir del mejor ajuste de los datos a las ecuaciones 1, 2 ó 3.

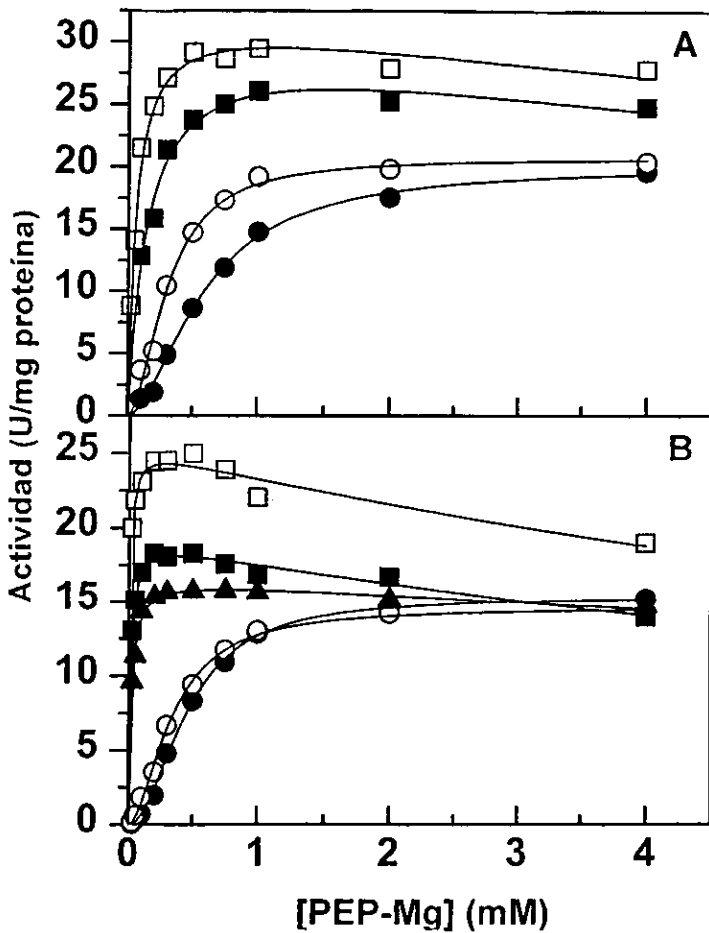


Figura 4.- Efecto de fosfomicina sobre la cinética de saturación por Mg-PEP de PEPC de hoja de maíz a Mg^{2+} libre constante.

Los ensayos se hicieron a un pH de 7.3 en la ausencia (\bullet) y presencia de 0.25 (O), 0.5 (\blacktriangle), 1 (\blacksquare) y 5 (\square) mM de fosfomicina, manteniendo constante la concentración de Mg^{2+} libre a 1 mM (A) y 0.1 mM (B) y variando la concentración de Mg-PEP como se indica. La concentración de PEP libre fue variada de 0.55 a 22 mM en (A) y de 1.5 a 196.5 mM en (B). Las otras condiciones del ensayo fueron las indicadas en la Figura 1. Los puntos son los valores de velocidad inicial determinados experimentalmente y las líneas trazadas a través de estos puntos fueron calculadas a partir del mejor ajuste de los datos a las ecuaciones 1, 2 ó 3.

Los patrones de velocidad inicial de las Figuras 3 y 4 muestran que la fosfomicina tiene cualitativamente efectos similares independientemente de la concentración de PEP libre o Mg^{2+} libre; esto es, disminuye significativamente la $apK_m(Mg-PEP)$ e incrementa la apV_{max} en un grado mucho menor. Sin embargo, se encontraron diferencias cuantitativamente importantes entre los parámetros cinéticos obtenidos a dos concentraciones fijas de PEP libre. Esto es, los efectos de 0.25 mM de fosfomicina fueron mucho mayores a 0.5 mM que a 5 mM de PEP libre (Figura 3, círculos abiertos) sugiriendo una unión competitiva de la fosfomicina y PEP libre al mismo sitio alostérico.

En el primer caso (Figura 3B), 0.25 mM de fosfomicina incrementó la $apV_{max}/K_m(Mg-PEP)$ alrededor de 4 veces, de 61.9 a 257.3 unidades $\times mg$ de proteína $^{-1} \times mM^{-1}$ y eliminó la cooperatividad homotrópica positiva observada en su ausencia; mientras que en el segundo (Figura 3A), 0.25 mM de fosfomicina solamente incrementó la $apV_{max}/K_m(Mg-PEP)$ alrededor de dos veces de 81.7 a 178.1 unidades $\times mg$ proteína $^{-1} \times mM^{-1}$, y la unión del sustrato fue aún cooperativa ($n = 1.35 \pm 0.08$) en la presencia del activador. Conclusiones similares pueden hacerse a partir de los datos en la Figura 4. Así 0.25 mM de fosfomicina no produce activación apreciable cuando la concentración fija de Mg^{2+} libre es muy baja (0.1 mM, Figura 4B) y por tanto la de PEP libre es muy alta.

Es interesante que mientras que a 5 mM de PEP libre (Figura 3A) incrementando la concentración de fosfomicina por arriba de 0.25 mM conduce a un incremento progresivo en el valor aparente de $V_{max}/K_m(Mg-PEP)$ como resultado del incremento de la apV_{max} y de la reducción de la $apK_m(Mg-PEP)$, a una concentración de 0.5 mM de PEP libre (Figura 3B), las concentraciones de fosfomicina más altas que 0.25 mM no solamente reducen los valores de la apK_m sino también los valores de la apV_{max} .

Este comportamiento anómalo de la fosfomicina bajo estas condiciones en las cuales las concentraciones de Mg^{2+} son altas (de un intervalo de 1.11 a 44.4 mM) es probablemente la consecuencia de la presencia de niveles cinéticamente significativos del complejo Mg-fosfomicina, el cual podría ser un inhibidor competitivo del sustrato Mg-PEP. Si éste es el caso, los valores de la apV_{max} y de la apK_m deberían ser reducidos por el mismo factor cuando la concentración fija de la fosfomicina total se aumenta, puesto que la concentración del supuesto inhibidor competitivo, Mg-fosfomicina, incrementa simultáneamente y en una proporción constante a la del sustrato Mg-PEP [Segel, 1975]. Sin embargo, nuestros resultados muestran una mayor reducción en la $apK_m(Mg-PEP)$ que en la apV_{max} cuando la fosfomicina total fija se incrementa, lo que conduce a importantes incrementos en la $apV_{max}/K_m(Mg-PEP)$. Esta discrepancia con los resultados esperados puede ser explicada por la suma de los efectos de fosfomicina bajo estas condiciones: La gran reducción en la $apK_m(Mg-PEP)$ y los pequeños incrementos en la apV_{max} debidos a la unión de la fosfomicina al sitio alostérico, y la disminución en la $apK_m(Mg-PEP)$ y la apV_{max} producida por la unión de Mg-fosfomicina al sitio activo. Tanto en las cinéticas de saturación obtenidas a PEP constante como en los obtenidos a Mg^{2+} constante se observa inhibición por sustrato cuando la especie libre variada alcanza concentraciones altas (Figuras 3B y 4B), lo que sugiere que las especies libres de PEP y Mg^{2+} puedan ser inhibidores acompetitivos o mixtos de la PEPC de hoja de maíz.

7.2.2 Estudios a pH 8.3

A un pH de 8.3, la fosfomicina produjo efectos similares sobre las cinéticas de saturación de la enzima por Mg-PEP que los producidos a pH 7.3, a pesar de que a este pH no hay efectos homotrópicos del sustrato (la saturación por Mg-PEP sigue una cinética Michaeliana).

La Figura 5 presenta la grafica lineal de dobles recíprocos $1/v$ contra $1/[Mg-PEP]$ obtenida variando la concentración de Mg-PEP de 0.025 a 4 mM a una concentración fija de Mg^{2+} libre de 1 mM y a varias concentraciones fijas de fosfomicina (de 0.25 a 5 mM). Este patrón es indicativo de una activación mixta no esencial y en realidad nosotros obtuvimos un buen ajuste de los regráficos de la αV_{max} y la αK_m de la Figura 5 contra la concentración de fosfomicina con las ecuaciones 10 y 11; obteniéndose de este modo valores estimados de $V_{max} = 24.5 \pm 0.5$ unidades/mg proteína, $K_m(Mg-PEP) = 0.20 \pm 0.02$ mM, $K_a = 3.32 \pm 0.60$ mM, $\alpha = 0.08 \pm 0.01$ y $\beta = 1.46 \pm 0.04$. Usando estos estimados, calculamos un valor limitante para la constante de activación a concentraciones saturantes de sustrato, αK_a , de 0.25 mM y valores limitantes de velocidad máxima βV_{max} , de 35.8 unidades/mg proteína y $\alpha K_m(Mg-PEP)$ de 0.016 mM, ambos a concentración de activador infinitas. El valor estimado para el factor de interacción α sugiere que, bajo estas condiciones experimentales, hay un incremento de 13 veces en la unión del activador para el sitio alostérico cuando el sitio activo ya ha sido ocupado y viceversa.

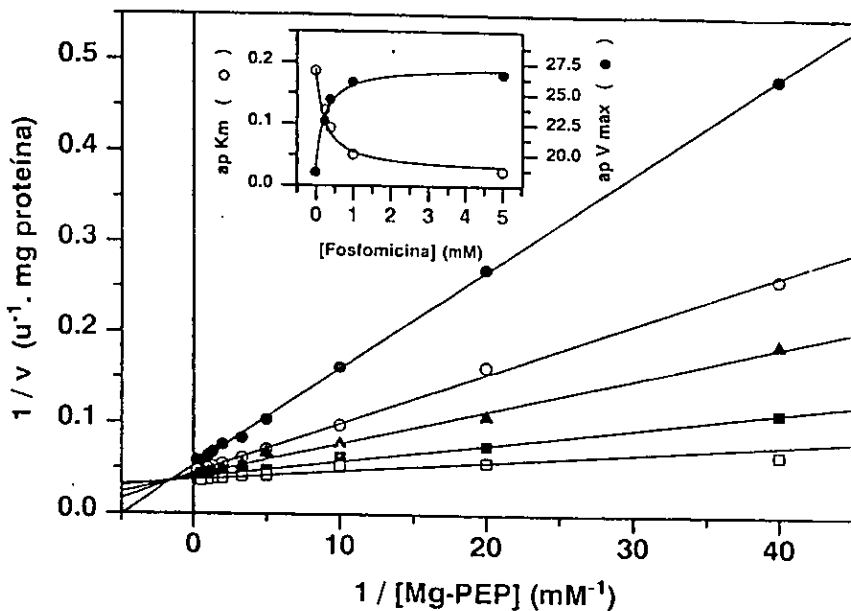


Figura 5. Cinéticas de activación por fosfomicina de PEPC de hoja de maíz.

Se determinó la saturación de la enzima por Mg-PEP en la ausencia (●) o presencia de 0.25 (○), 0.5 (▲), 1 (■) y 5 (□) mM de fosfomicina. Los ensayos se hicieron a un pH de 8.3, manteniendo constante la concentración de Mg^{2+} libre a 1 mM y variando la concentración de Mg-PEP como se indica (PEP libre se varió de 0.13 a 22.2 mM). Las otras condiciones de ensayo fueron las indicadas en la Figura 1. Las líneas son el resultado del ajuste individual por regresión lineal de cada grupo de datos experimentales correspondientes a cada curva de saturación. Inserto: Re gráfico de $ap V_{max}$ (●) y $ap K_m$ (Mg-PEP) (○) contra la concentración de fosfomicina. Las líneas son el mejor ajuste a las ecuaciones 10 y 11, respectivamente.

7.3 Efecto de Mg-PEP, PEP libre y Mg^{2+} libre sobre las cinéticas de saturación de PEPC por fosfomicina

Los resultados descritos anteriormente sugieren una competencia entre el PEP libre y la fosfomicina por el sitio activador. Para probar esta posibilidad, la saturación de PEPC por fosfomicina en un intervalo de concentración de 0 a 5 mM se estudió a niveles subsaturantes (0.1 mM) y casi saturantes (2 mM) de Mg-PEP, y a valores de pH de 7.3 y 8.3. En estos experimentos, las concentraciones de PEP libre fueron de 0.5 y 5 mM y por lo tanto, las concentraciones de Mg^{2+} libre variaron en un intervalo de 0.11 a 22.2 mM. Los resultados obtenidos a ambos valores de pH fueron muy similares y están resumidos en la Tabla 3.

La activación máxima obtenida por la fosfomicina fue dependiente de las concentraciones de Mg-PEP, siendo similar a la misma $[Mg-PEP]$, independientemente de la concentración de las especies libres, y mucho más grande a bajas que a altas concentraciones de Mg-PEP. Estos resultados son consistentes con los efectos observados en los experimentos anteriores de fosfomicina que son mucho mayores sobre K_m (Mg-PEP) que sobre V_{max} . Sin embargo, la $A_{0.5}$ presenta una clara dependencia no sólo de la concentración de Mg-PEP sino también de las concentraciones de las especies libres. Esto es, la $A_{0.5}$ decrece mucho cuando la concentración de Mg-PEP se incrementa, en total acuerdo con los principios de reciprocidad termodinámica [Wyman, 1964], pero a Mg-PEP constante la $A_{0.5}$ es mucho más pequeña a concentraciones bajas que a concentraciones altas de PEP libre. Esto explica los diferentes efectos causados por el activador sobre las cinéticas de saturación por Mg-PEP a altas y bajas concentraciones de PEP libre (Figuras 3B y 4). Además, sugiere una competencia entre la fosfomicina libre y PEP libre por el sitio alostérico de acuerdo con la evidencia experimental previa de un sitio regulatorio para PEP [Jenkins y col., 1986], que es el sitio alostérico de Glc6P [Rustin y col., 1988; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez y col., 1998].

Alternativamente, este resultado puede ser indicativo de una mejor unión al sitio alostérico del complejo Mg-fosfomicina que de la fosfomicina libre, puesto que a Mg-PEP fijos la concentración de Mg^{2+} libre y PEP libre están inversamente relacionados por un factor fijo y, por lo tanto, la concentración de Mg-fosfomicina es mucho mayor a bajas que a altas concentraciones de PEP libre.

Tabla 3. Efecto de Mg-PEP, PEP libre y Mg²⁺ libre sobre las cinéticas de saturación de PEPC de hoja de maíz por fosfomicina.

Condiciones de ensayo			Parámetros cinéticos ^a			
[Mg-PEP] (mM)	[PEP _f] (mM)	[Mg ²⁺] (mM)	v ₀ (U/mg de proteína)	Activación máxima. (veces)	A _{0.5} (mM)	n
<i>pH 7.3</i>						
0.1	0.5	1.11	1.3	16.2 ± 0.9	0.39 ± 0.06	1.43 ± 0.26
0.1	5.0	0.11	1.3	15.3 ± 1.6	1.34 ± 0.30	1.28 ± 0.18
2.0	0.5	22.2	18.2	0.67 ± 0.02	0.02 ± 0.00	1
2.0	5.0	2.22	17.4	0.85 ± 0.08	0.48 ± 0.01	1
<i>pH 8.3</i>						
0.1	0.5	1.11	2.8	5.9 ± 0.1	0.23 ± 0.02	1.69 ± 0.20
0.1	5.0	0.11	2.8	5.7 ± 0.2	0.86 ± 0.06	1.68 ± 0.14
2.0	0.5	22.2	14.1	0.52 ± 0.01	0.02 ± 0.01	1
2.0	5.0	2.22	15.2	0.05 ± 0.02	0.28 ± 0.04	1

^aLos valores de los parámetros cinéticos se estimaron por medio de ajustes de regresión no lineal de los datos experimentales a las ecuaciones 5 ó 6.

Para elucidar cual forma de fosfomicina, si la libre o el complejo Mg-fosfomicina, es el verdadero activador, medimos la actividad enzimática a concentraciones fijas de Mg-PEP variando la fosfomicina libre y manteniendo constante Mg-fosfomicina, y viceversa. Con objeto de observar claramente los incrementos de actividad, utilizamos una concentración muy baja de sustrato (0.1 mM de Mg-PEP). Los resultados, presentados en la Figura 6, demuestran claramente que la fosfomicina libre es el verdadero activador de PEPC de hoja de maíz, dado que un incremento de 5 veces en Mg-fosfomicina no afecta la actividad enzimática ya incrementada por la presencia de fosfomicina libre 0.1 mM, mientras que un incremento de 5 veces en fosfomicina libre provocó un incremento adicional de 2 veces. Resultados similares fueron obtenidos con Glc6P (datos no mostrados), lo que fuertemente indica que el sitio alostérico de Glc6P une a los activadores en forma libre, es decir, sin acomplejar el Mg^{2+} , contrariamente a lo que había sido propuesto [Wedding y Black, 1988].

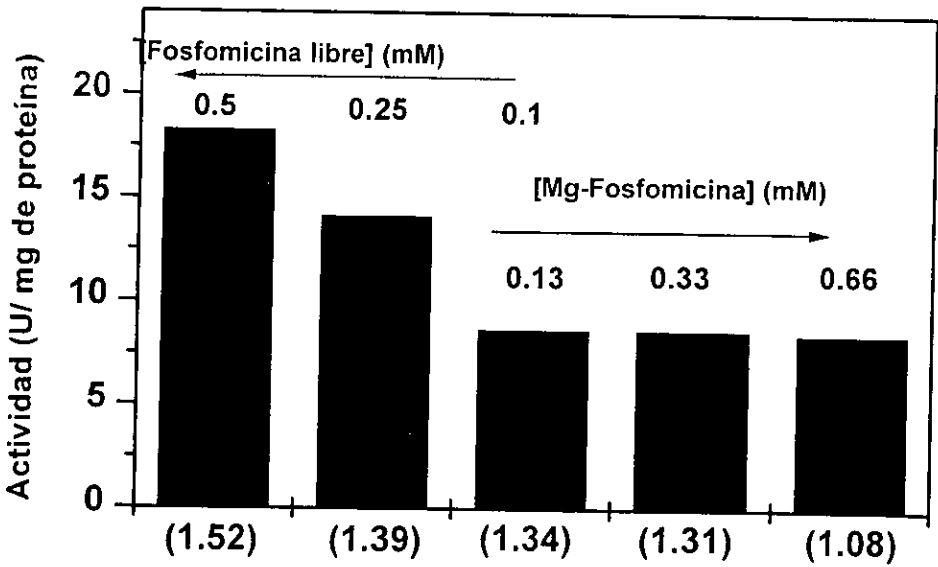


Figura 6.- Efecto de fosfomicina libre y Mg-fosfomicina sobre la actividad de PEPC de hoja de maíz.

Los ensayos se hicieron a un pH de 7.3, manteniendo constante la concentración de Mg-PEP a 0.1 mM y variando la concentración de fosfomicina libre y Mg-fosfomicina como se indica en la figura. Por consiguiente, la concentración de PEP libre se aumentó de 0.1 a 0.5 mM y la de Mg^{2+} libre disminuyó de 5.55 a 1.11 mM cuando la fosfomicina libre se aumentó, y viceversa, PEP libre se disminuyó de 0.1 a 0.02 mM y la de Mg^{2+} libre se incrementó de 5.55 a 27.75 mM cuando Mg-fosfomicina aumentó. Las otras condiciones de ensayo fueron como en la Figura 1. Los números en paréntesis debajo de cada barra indican la actividad enzimática (como unidades/mg proteína) en la ausencia de fosfomicina.

Las cinéticas de saturación de la enzima por fosfomicina libre, en un intervalo de concentración de cero a 10 mM, y a 0.1 mM de Mg-PEP muestran una desactivación a concentraciones de fosfomicina por arriba de 1 mM cuando la concentración de Mg^{2+} libre es alta, 22.2 mM (Figura 7, círculos abiertos y cerrados). Sin embargo, no se observó desactivación cuando la concentración de Mg^{2+} libre es baja, 0.11 mM (Figura 7, cuadros abiertos). Este resultado es consistente con la inhibición por Mg-fosfomicina, puesto que hay 20 veces más Mg-fosfomicina en la primera que en la última condición.

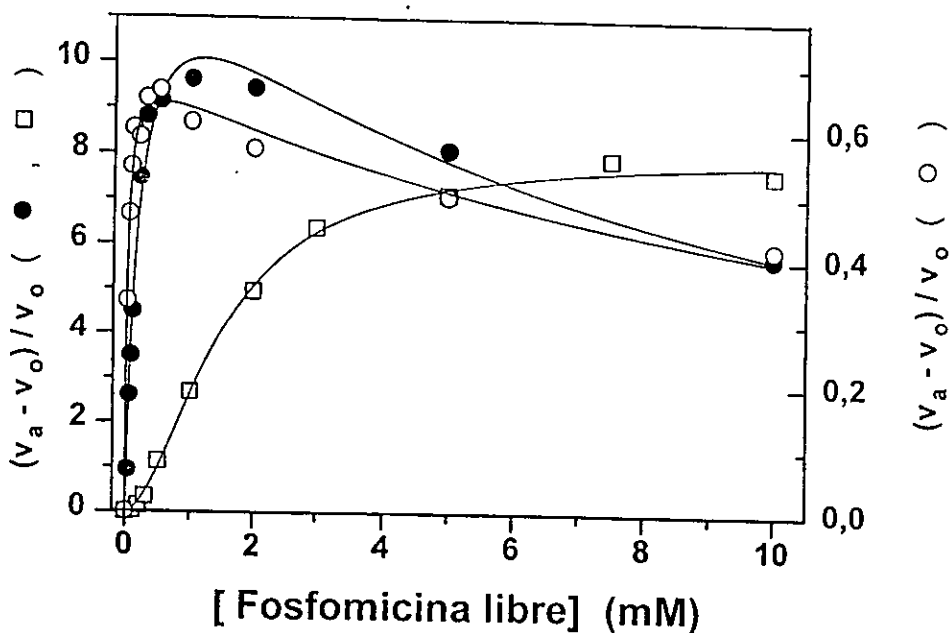


Figura 7. Cinéticas de saturación de PEPC de hoja de maíz por fosfomicina a un pH de 7.3 y a 0.11 (□) y 22.2 (○, ●) mM de Mg^{2+} libre.

Las concentraciones de Mg-PEP fueron 0.1 (●, □) ó 2 mM (○) y las de PEP libre fueron 5 (□), 0.025 (●), ó 0.5 mM (○). Las otras condiciones de ensayo fueron como en la Figura 1. Los puntos son los valores de velocidad inicial determinados experimentalmente y las líneas trazadas sobre estos puntos se calcularon a partir del mejor ajuste de los datos a la ecuación 6 (□) ó 9 (○, ●). Las velocidades iniciales de los controles (v_o , sin activador) fueron 1.17 (□), 0.60 (●) y 5.95 (○) unidades/mg de proteína. Los valores estimados de $A_{0.5}$ para la fosfomicina libre fueron: 1.49 ± 0.06 (□), 0.18 ± 0.02 (●) y 0.02 ± 0.00 (○) mM.

A bajas concentraciones de Mg^{2+} libre, los niveles de este complejo no parecen ser lo suficientemente altos para competir con Mg-PEP por el sitio activo y para producir niveles cinéticamente significativos del complejo sitio activo-Mg-fosfomicina, incluso a las más altas concentraciones de fosfomicina libre (10 mM). Sin embargo, a concentraciones altas de Mg^{2+} libre, el complejo Mg-fosfomicina alcanza concentraciones tan altas como de 50 mM, a 10 mM de fosfomicina libre, las cuales claramente son capaces de competir con el sustrato provocando una disminución en la activación máxima alcanzada por el activador. En efecto, la desactivación observada fue más pronunciada a 0.1 que a 2 mM de Mg-PEP (Figura 7), con unos valores de apK_i de 26.7 ± 3.7 y 44.8 ± 5.9 mM respectivamente. Estos resultados están totalmente de acuerdo con los obtenidos cuando la cinética de saturación por Mg-PEP se determinaron a altas concentraciones de Mg^{2+} libre (Figura 3B).

En conjunto, nuestros resultados sobre las diferentes formas con los que el activador se une al sitio alostérico y al sitio activo de PEPC, proporcionan una explicación a reportes previos [Selinioti y col., 1985; Doncaster y Leegood, 1987; González y col., 1987] que indicaban que los ésteres de fosfato se comportaban como activadores y como inhibidores. Esto podría depender de las concentraciones relativas de sus formas libres o complejos con el metal en las condiciones del ensayo y de la concentración de sustrato. Sin embargo, dados los bajos niveles de Mg^{2+} libre prevalecientes *in vivo* bajo cualquier condición fisiológica concebible [Yazaki y col., 1988] y las bajas constantes de estabilidad de los complejos de Mg^{2+} con los activadores fisiológicos de PEPC conocidos [O'sullivan y Smithers, 1979], la unión de estos activadores al sitio activo parece no ser relevante bajo las condiciones intracelulares.

7.4 Efecto del glicerol sobre la activación de fosfoenolpiruvato carboxilasa por fosfomicina.

Desde hace mucho tiempo se sabe que el glicerol reduce el valor de la $apK_m(PEP)$ de PEPC de hoja de maíz [Uedan y Sugiyama, 1976] y que su efecto activador es aditivo al de la Glc6P [Podestá y Andreo, 1989; Wedding y col., 1994]. De acuerdo con estos reportes, nosotros encontramos que la inclusión de glicerol al 20% (v/v) en el medio de ensayo provoca un incremento en la afinidad de la enzima por el sustrato Mg-PEP, eliminando la cooperatividad homotrópica positiva del sustrato observada en la ausencia del cosoluto a pH de 7.3, pero no cambia el efecto heterotrópico de la fosfomicina sobre las cinéticas de saturación por Mg-PEP (Figura 8). En realidad, el cosoluto incrementa mucho la afinidad de la enzima por el activador como está indicado por la reducción de 10 veces en el valor de $A_{0.5}$ observadas tanto a pH 7.3 como a 8.3 a bajas concentraciones de Mg-PEP y Mg^{2+} libre en la presencia del cosoluto (Tabla 4). La activación máxima producida por fosfomicina también disminuye fuertemente en presencia del glicerol (Tabla 4). Ello se debe a que en la presencia del cosoluto la saturación de la enzima por su sustrato a una misma concentración de Mg-PEP es mucho mayor que en su ausencia.

El glicerol también elimina la unión cooperativa de fosfomicina a pH de 7.3 y 8.3 (Figura 8 y Tabla 4). Esto es, los efectos del glicerol sobre las cinéticas de saturación de PEPC por fosfomicina son similares a sus efectos sobre las cinéticas de saturación por el sustrato Mg-PEP. Por ahora, no podemos concluir si ambos efectos son una consecuencia

de un supuesto cambio conformacional inducido por el glicerol que podría afectar el sitio activo y el sitio alostérico, o a sólo uno de ellos, puesto que el alto grado de saturación de la enzima por el sustrato o el activador en la presencia del cosoluto podrían conducir a una unión mayor del otro ligando a través de efectos heterotrópicos. Se requieren estudios de unión de ligandos del sitio activo y del sitio alostérico en ausencia y presencia de glicerol para esclarecer este punto.

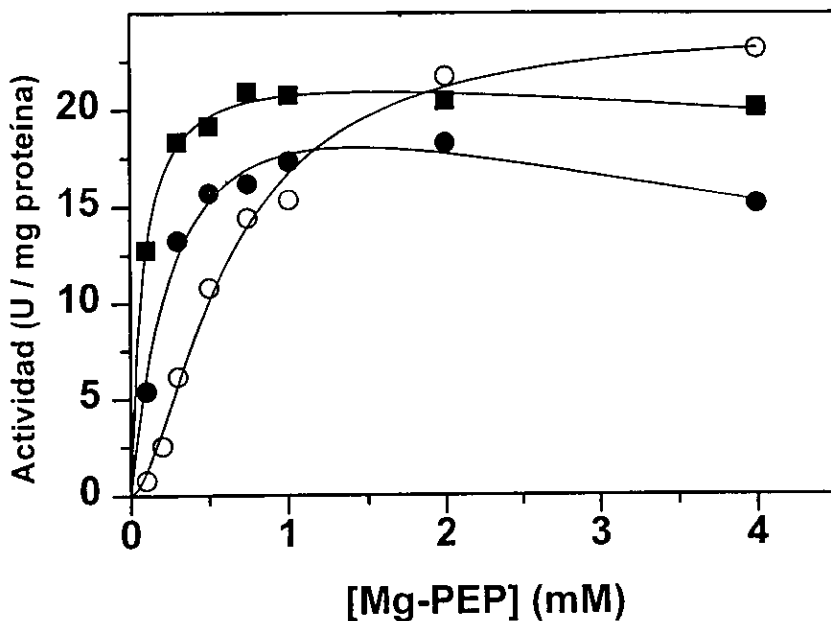


Figura 8. Efecto del glicerol sobre la activación por fosfomicina de PEPC de hoja de maíz.

Los ensayos fueron hechos a pH 7.3, en la ausencia (○) o presencia de glicerol 20% (v/v) (●) o glicerol 20% más 5 mM de fosfomicina (■), variando la concentración de Mg-PEP y PEP libre y manteniendo constante la concentración de Mg^{2+} libre a 1 mM. Las otras condiciones del ensayo fueron como en la Figura 1. Los puntos son los valores determinados experimentalmente y las líneas trazadas a través de los puntos son las calculadas a partir del mejor ajuste de los datos a la ecuación 2 (○) o ecuación 3 (●, ■). Los valores estimados de $K_m(Mg-PEP)$ fueron: 1.62 ± 0.18 (○), 0.31 ± 0.08 (●), y 0.08 ± 0.01 (■) mM.

Tabla 4.

Efecto del glicerol sobre las cinéticas de saturación de PEPC de hoja de maíz por fosfomicina ^a

Condiciones de ensayo ^b	Parámetros cinéticos ^c		
	Activación máxima (veces)	$A_{0.5}$ (μM)	n
<i>pH 7.3</i>			
Control	17.2 \pm 1.1	497 \pm 124	1.26 \pm 0.11
+ Glicerol 20 %	0.2 \pm 0.0	39 \pm 8	1
<i>pH 8.3</i>			
Control	13.1 \pm 0.2	286 \pm 13	1.87 \pm 0.13
+ Glicerol 20 %	0.4 \pm 0.0	27 \pm 6	1

^a Las concentraciones de fosfomicina total fueron variadas en un rango de 0.025 a 5.0 mM.

^b Los ensayos se hicieron a 0.1 mM de Mg-PEP, 1 mM de Mg^{2+} libre y 0.55 mM de PEP libre. ^c Los parámetros cinéticos de la activación se calcularon por medio del ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a las ecuaciones 5 ó 6.

8. DISCUSIÓN GENERAL

8.1 Relación estructura-función de los análogos de PEP y sus implicaciones fisiológicas

El esclarecimiento de las diferencias estructurales que permiten discernir a la enzima PEPC entre los análogos de PEP activadores e inhibidores es de especial relevancia para entender la regulación de la enzima, puesto que PEP por sí mismo actúa como un sustrato y activador [Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Rustin y col. 1988; Tovar-Méndez y col. 1998]. Nosotros reportamos aquí que otro análogo de PEP, la fosfomicina, es un buen activador de esta enzima.

Comparando las estructuras químicas de los análogos de PEP que se comportan como activadores de PEPC [Rustin y col. 1988; Peliska y O'Leary, 1989; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990], incluyendo la fosfomicina, con aquellos análogos conocidos de PEP que se comportan como inhibidores de PEPC [González y Andreo, 1989], es claro que los activadores son dianiones mientras que los inhibidores son trianiones (Tabla 2).

La estructura química de la fosfomicina es completamente diferente a la de los otros activadores conocidos, que son también análogos de PEP [Jenkins y col., 1986; Peliska y O'Leary, 1989; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990]. Resulta interesante que el inhibidor competitivo de PEPC más potente conocido hasta la fecha tiene una estructura similar a la de la fosfomicina, que es el activador más potente descrito (Tabla 2). Esto hace a este compuesto potencialmente valioso para estudios futuros sobre la relación estructura-función del sitio alostérico de la Glc6P.

Por otra parte nuestros resultados indican que mientras el sitio alostérico de la Glc6P une al activador en su forma no acomplejada con el metal, el sitio activo une preferencialmente el complejo metal-activador, de acuerdo con la unión preferencial del complejo metal-sustrato sobre el sustrato libre por este último [Mukerji, 1977; Wedding y col. 1988; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez y col. 1998]. Por lo tanto, parece que hay algunas diferencias críticas estructurales entre ambos sitios, a pesar de su aparente similitud [González y Andreo, 1987]. Por esta razón nosotros proponemos que un compuesto dado, con una estructura química idónea para unirse a los sitios activo y alostérico, puede inhibir o activar la enzima como resultado, al menos en parte, de: 1) su habilidad de formar complejos con el magnesio y 2) la estructura resultante del complejo con magnesio.

La relevancia fisiológica de las diferencias en las formas del sustrato y activadores capaces de unirse al sitio activo y al sitio alostérico de Glc6P estriba en que, bajo condiciones fisiológicas, estas diferencias minimizan la competencia entre sustrato y activadores por unirse al sitio activo. Por otra parte, el hecho de que el sitio alostérico para Glc6P una a las especies libres del activador (este trabajo y Tovar-Méndez y col., 1995 para el caso de PEP) permite que se exprese totalmente el potencial activador de los ligandos fisiológicos del sitio alostérico que se encuentran predominantemente como especies libres a las concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} . Así, se puede estimar que

solamente el 2.6 % de Glc6P se encuentra en forma libre a 0.4 mM de Mg^{2+} libre considerando que la constante de estabilidad del complejo Mg-Glc6P es de 0.065 mM^{-1}

8.2 Efecto de activadores sobre la inhibición por sustrato.

Un resultado interesante de este trabajo es el hallazgo de que la fosfomicina provoca incrementos en la inhibición aparente por sustrato de la enzima PEPC de hoja de maíz por Mg-PEP a concentraciones fijas de PEP libre (Figura 3B) y Mg^{2+} libre (Figura 4B). Un incremento en la inhibición por sustrato también se observó en la presencia de Glc6P (no se muestra) o de glicerol (Figura 8).

Actualmente, se desconoce el mecanismo de inhibición por sustrato de PEPC pero esta inhibición podría resultar de una unión no productiva de Mg-PEP a uno de los complejos enzima-producto. Alternativamente, si las especies libres, Mg^{2+} o PEP, son inhibidores incompetitivos o mixtos con respecto al complejo Mg-PEP, un patrón de inhibición aparente por sustrato puede observarse bajo las condiciones de nuestro ensayo, puesto que las especies libres se varían en una proporción constante con el sustrato [Segel, 1975]. En el último caso, la inhibición debería ser más pronunciada cuando se incrementa el cociente [Especies libres]/ [Mg-PEP], como en realidad se observó. Esto es, a 5 mM de PEP libre, cuando el cociente [Mg^{2+} libre]/[Mg-PEP] es de solamente 1.11, no se observó inhibición por sustrato, al menos en el rango de concentración usado de Mg-PEP y Mg^{2+} libre en este estudio, mientras que a 0.5 mM de PEP libre, cuando el cociente es de 11.1 fue clara la inhibición (Figura 3). Inhibiciones similares por sustrato se observaron a concentraciones fijas de Mg^{2+} libre, cuando el cociente [PEP libre]/ [Mg-PEP] fue mayor que 5.55 (Figura 4).

Este hallazgo sugiere que las especies causantes de la aparente inhibición por sustrato son PEP libre y/o Mg^{2+} libre, y no Mg-PEP. Si esto es verdad, los ligandos del sitio alostérico de la Glc6P o el glicerol podrían incrementar la unión al sitio activo no solamente del sustrato Mg-PEP, sino también de las especies libres PEP y Mg^{2+} , dando cuenta de la inhibición aparente de sustrato observada en presencia del cosoluto.

8.3 Mecanismos de regulación alostérica de la PEPC de hoja de maíz.

La fosfomicina se une cooperativamente a bajas concentraciones de sustrato a ambos pHs de 7.3 y 8.3 y con valores de n en un rango de 1.26 a 1.87. Los efectos heterotrópicos de la fosfomicina sobre las cinéticas de saturación por Mg-PEP fueron observados también a los dos pH, igual que en la presencia de glicerol. Estos descubrimientos son interesantes puesto que no hubo efectos homotrópicos del sustrato ni a un pH de 8.3, ni a un pH de 7.3 en la presencia de glicerol. El desacoplamiento de los efectos homotrópicos del sustrato y los efectos homotrópicos y heterotrópicos del activador es contrario a cualquier modelo de dos estados que intente explicar el comportamiento alostérico de PEPC de hoja de maíz. Sin embargo, hoy día, los dos mecanismos propuestos para explicar las propiedades alostéricas observadas en PEPC se basan en el supuesto de que la enzima existe en dos estados. Los mecanismos propuestos son: oligomerización, es decir, la conversión del dímero inactivo al tetrámero activo

inducida por el sustrato [Podestá y Andreo, 1989], y la isomerización concertada [Jawali, 1990], de acuerdo al modelo desarrollado por Monod y col. (1965).

En cuanto al primero de estos mecanismos propuestos, se conoce que la formación o estabilización de la forma tetramérica activa de la enzima se asocia con la activación por Glc6P [Meyer y col. 1991] o glicerol [Podestá y Andreo, 1989]. Estas observaciones concernientes a la activación y oligomerización han conducido a la suposición de que el cambio en la estructura cuaternaria puede estar directamente involucrado en los cambios en las cinéticas características. La oligomerización puede ser suficiente para la activación, en cuyo caso la fosfomicina podría funcionar aumentando la oligomerización, ya sea por la unión preferencial a oligómeros de valores bajos de K_m , o por la unión al dímero e induciendo cambios conformacionales que producen oligomerización. Sin embargo, la oligomerización por si sola no puede ser suficiente para originar la activación alostérica inducida por fosfomicina, puesto que nosotros encontramos una importante disminución inducida por fosfomicina en el valor de K_m (Mg-PEP) a un pH de 8.3 ó en la presencia de glicerol, cuando la enzima no exhibe ninguna cooperatividad en la unión del sustrato y se sabe que está predominantemente tetramérica [Podestá y Andreo, 1989].

De este modo, además de la posibilidad de afectar el estado de agregación de PEPC, la fosfomicina parece inducir un cambio conformacional que activa a la carboxilasa. Esto está de acuerdo con los hallazgos de efectos homotrópicos y heterotrópicos en la forma tetramérica de PEPC de hoja de maíz (Tovar-Méndez y col., 1995) y apoya el que un proceso de asociación-disociación de la enzima no es el causante de su regulación alostérica.

En cuanto a la propuesta de un mecanismo concertado de regulación alostérica [Jawali, 1990], nuestros resultados indican que los efectos de la fosfomicina son diferentes a los de un efector alostérico clásico que provoca una transición entre los estados R y T. El modelo de Monod-Wyman-Changeux [Monod y col., 1965] para el alosterismo asume que los efectores alostéricos solamente cambian el equilibrio entre los estados R y T, sin cambiar las propiedades de esos estados. El desacoplamiento de las interacciones alostéricas del sustrato y activador reportadas aquí, junto con las diferencias en el grado de activación provocado por ligandos del mismo sitio alostérico, como son la fosfomicina y Glc6P (Figura 2A), y la aditividad de los efectos de los dos tipos de activadores que se unen a diferentes sitios alostéricos, tales como la glicina y fosfomicina (Figura 1B), muestra que esto no puede ser cierto para la PEPC de hoja de maíz.

9. CONCLUSIONES

- 1.- La fosfomicina libre es un potente activador alostérico de la enzima PEPC de hoja de maíz que se une al mismo sitio alostérico que Glc6P.
- 2.- El complejo Mg-fosfomicina es un inhibidor de la enzima PEPC de hoja de maíz, uniéndose al sitio activo y compitiendo con el sustrato Mg-PEP.
- 3.- A pesar de sus similitudes, el sitio activo y el sitio alostérico para azúcares fosforilados de PEPC de hoja de maíz poseen diferencias estructurales importantes que les permiten distinguir en la especie, libre o acomplejada, del ligando que unen.
- 4.- El cosoluto glicerol tiene efectos similares sobre el sitio activo y el sitio alostérico para azúcares fosforilados de la enzima PEPC de hoja de maíz, incrementando la afinidad de ambos por sus ligandos.
- 5.- El mecanismo de regulación alostérica de la enzima PEPC de hoja de maíz no se basa en ninguno de los dos modelos sencillos de dos estados propuestos en la literatura.

10. BIBLIOGRAFÍA

Andreo, C.S., González, D.H. & Iglesias, A.A. (1987). Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase. Structure and regulation. *FEBS Lett.* **213**, 1-8.

Andreo, C.S., Iglesias, A.A., Podestá, F.E. & Wagner, R. (1986). Chemical modification of the phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves and its conformation in isotopic solution. Studies via triplet life time and rotational difusión using oesin isothiocyanate as label. *Biochim. Biophys. Acta* **870**, 292-301.

Ausenhuis, S. L. & O'leary, M. H. (1992). Hydrolysis of phosphoenolpyruvate catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*. *Biochemistry* **31**, 6427-6431.

Bandarian, V., Poehner, W.J. & Grover, S.D. (1992). Metabolite activation of crasulacean acid metabolism and C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **100**, 1411-1416.

Bandurski, R.S. (1955). Further studies on the enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphoenolpyruvate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* **217**, 137-150.

Bandurski, R.S., Greiner, C.M. & Bonner, J. (1953). Enzymic-synthesis of oxaloacetate from phosphoenolpyruvate and CO₂. *J. Biol. Chem.* **204**, 781-786.

Bandurski, R.S. & Greiner, C.M. (1953). Enzymatic carboxylation of PEP to oxalacetate. *Fed. Proc.* **12**, 17-23.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Carter, P.J., Nimmo, H.G., Fewson, C.A. & Wilkins, M.B. (1990). *Bryophyllum fedtschenkoi* protein phosphatase type 2A can dephosphorylate phosphoenolpyruvate carboxylase. *FEBS Lett.* **263**, 233-236.

Carter, P.J., Nimmo, H.G., Fewson, C.A. & Wilkins, M.B. (1991). Circadian rhythms in the activity of a plant protein kinase. *EMBO J.* **10**, 2063-2068.

Chollet, R. (1996). Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 273-298.

Christensen, B.G., Leanza W.J., Beattle, T.R., Patchett A.A., Arison, B.H., Ormond, R.E., Kuehl Jr., F.A., Albers, G., Schonberg, O., Jardetzky, O. (1969). Phosphonomycin: structure and synthesis. *Science* **166**. 123-125

- Coombs, J., Baldry, C.W. & Bucke, C. (1973). The pathway in *Pennisetum purpureum*. The allosteric nature of PEP carboxylase. *Planta* **110**, 95-107.
- Cooper, T.G. & Wood, H.G. (1971). The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate. The active species of CO₂ utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **246**, 5488-5490.
- Crétin, C., Santi, S., Keryer, E., Lepiniec, L., Tagu, D., Vidal, J. & Gadal, P. (1991). The phosphoenolpyruvate carboxylase gene family of Sorghum: promoter structures, amino acid sequences and expression of genes. *Gene* **99**, 87-94.
- Davies, D.D. (1979). The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **30**, 131-158.
- Deroche, M.E. & Carroyol, E. (1988). Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: a review. *Physiol. Plant.* **74**, 775-782.
- Doncaster, H.D. & Leegood, R.C. (1987). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity in maize leaves. *Plant Physiol.* **84**, 82-87.
- Duff, S.M.G., Andreo, C.S. Pacquit, V., Lepiniec, L., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, J., Gadal, P. & Chollet, R. (1995). Kinetic analysis of the non-phosphorylated, *in vitro* phosphorylated, and phosphorylation-site mutant (Asp8) forms of intact recombinant C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum. *Eur. J. Biochem.* **228**, 92-95.
- Duff, S.M.G. & Chollet, R. (1995). *In vivo* regulation of wheat-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. *Plant Physiol.* **107**, 775-782.
- Gao, Y. & Woo, K.C. (1996). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Zea mays* by protein phosphorylation and metabolites and their roles in photosynthesis. *Aust. J. Plant Physiol.* **23**, 25-32.
- Gillinta, J. & Grover S.D. (1995). Kinetic interactions of glycine with substrates and effectors of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Photosynth. Res.* **45**, 121-126.
- González, D.H., Iglesias, A. A. & Andreo, C.S. (1984). On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity from maize leaves by L-malate. Effect of pH. *J. Plant Physiol.* **116**, 425-434.
- González, D.H., Iglesias, A. A. & Andreo, C.S. (1987). Interaction of acetyl phosphate and carbamyl phosphate with plant phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **241**, 543-548.

- González, D. H., & Andreo, C. S. (1988). Stereoselectivity of the interaction of *E* and *Z*-2-phosphoenolpyruvate with maize leaf phosphoenolpyruvate 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 Biol. Sci.* **14**, 24-27.
- Hatch, M.D. (1987). C₄ photosynthesis: a unique blend as modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* **895**, 380-383.
- Hayakawa, S., Matsunaga, K. & Sugiyama, T. (1981). Light induction of phosphoenolpyruvate carboxylase in etiolated maize leaf tissue. *Plant Physiol.* **67**, 133-138.
- Hedley, C.L., Harvey, D.M. & Keely, R.J. (1975). Role of phosphoenolpyruvate carboxylase during seed development in *Pisum sativum*. *Nature* **258**, 352-354.
- Hendlin, D., Stapley, E.O., Jackson, M., Wallick H., Miller A.K., Chaiet, L., Kahan, F.M., Foltz, E.L., Woodruff, H.B., Mata, J.M., Hernández, S. & Mochales, S. (1969) Phosphonomycin a new antibiotic produced by strains of streptomyces. *Science* **166**, 121-122.
- Hermans, J. & Westhoff, P. (1990). Analysis of expression and evolutionary relationships of phosphoenolpyruvate carboxylase genes in *Flaveria trinerva* (C₄) and *F. pringlei* (C₃). *Mol. Gen. Genet.* **224**, 459-468.
- Huber, S.C., Sugiyama, T. & Akazawa, . (1986). Light modulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **82**, 550-554.
- Huber S.C. & Edwards, G.E. (1975). Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄ plants by malate and aspartate. *Can. J. Bot.* **53**, 1925-1933.
- Hudspeth, R.L., Glackin, C.A., Bonner, J. & Grula, J.W. (1986). Genomic and cDNA clones for maize phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate, orthophosphate dikinase: expression of different gene-family members in leaves and roots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 2884-2888.
- Hudspeth, R.L., & Grula, J. W. (1989). Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C₄ photosynthesis. *Plant Mol. Biol.* **12**, 579- 589.
- Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1983). The presence of essential histidine residues in phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **749**, 9-17.
- Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1984a). Involvement of thiol groups in the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Photosynth. Res.* **5**, 215-226.

- Iglesias, A.A. & Andreo, C.S. (1984b). On the molecular mechanism of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activation by thiol compounds. *Plant Physiol.* **75**, 983-987.
- Iglesias, A.A., González, D.H. & Andreo C.S. (1984). Inactivation of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by phenyl glyoxal. *Biochim. Biophys. Acta* **788**, 41-47.
- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. & Sánchez, D.M. (1992). Phosphoenolpyruvate carboxylase, malate and alcohol dehydrogenase activities in alfalfa (*Medicago sativa*) nodules under water stress. *Physiol. Plant* **84**, 61-66.
- Janc, J.W., O'Leary, M.H., & Cleland, W.W. (1992). A kinetic investigation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*. *Biochemistry* **31**, 6421-6426.
- Jawali, N. (1990). The dimeric form of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize: physical and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **277**, 61-68.
- Jenkins, C.L.D., Harris, R.L.N. & McFadden, H.G. (1986). Activation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by the non-physiological substrate analogue methyl-2-dihydroxyphosphinoylmethyl-2-propenoate. *Biochem. Int.* **12**, 619-625.
- Jenkins, C.L.D., Harris, R.L.N. & McFadden, H.G. (1987). 3,3-dicloro-2-dihydroxyphosphinoylmethyl-2-propenoate, a new specific inhibitor of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. Int.* **14**, 219-226.
- Jiao, J.A. & Chollet, R. (1988). Light/dark regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by *in vivo* phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **261**, 409-417.
- Jiao, J. A. & Chollet, R. (1989). Regulatory seryl-phosphorylation of a C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase by a solute protein kinase from maize leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **269**, 526-535.
- Jiao, J. A. & Chollet, R. (1990). Regulatory phosphorylation of serine-15 in maize phosphoenolpyruvate carboxylase by a C₄-leaf protein-serine kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 300-305.
- Jiao, J.A., Echevarría, C., Vidal, J. & Chollet, R. (1991). Protein turnover as a component in the light/dark regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase protein serine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 2712-2715.
- Jiao, J.A. & Chollet, R. (1991). Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄ and crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* **95**, 981-985.
- Karabourniotis, G., Manetas, Y. & Gavalas, N.A. (1983). Photoregulation of PEPC in *Salsola soda* L. and other C₄ plants. *Plant Physiol.* **73**, 735-739.

- Kahan, F.M., Kahan, J.S., Cassidy, P.J. & Kropp, H. (1974). The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **235**, 364-385.
- King, B. J., Layzell, D.B. & Calvin, D.T. (1986). The role of dark CO₂ fixation in root nodules of soybeans. *Plant Physiol.* **81**, 200-205.
- Lavergne, D. & Champigny M. L. (1983). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Penisetum americanum* by adenine nucleotides and energy charge. *Physiol. Veg.* **21**, 1021-1029.
- Law O. R. & Plaxton W. (1997). Regulatory phosphorylation of banana fruit phosphoenolpyruvate carboxylase by copurifying phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. *Eur. J. Biochem.* **247**, 642-651.
- Leegood, R. C. & Osmond C. B. (1990). The flux of metabolites in C₄ and CAM plants. In D. T. Dennis, D. H. Turpin, eds, *Plant physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Longman Scientific and Technical, Essex, U. K., pp 274-298.
- Lepiniec, L., Vidal, J., Chollet, R., Gadat, P. & Cretin, C. (1994). Phosphoenolpyruvate carboxylase: Structure, regulation and evolution. *Plant Sci.* **99**, 110-124.
- Manetas, Y. & Gavalas, N. A. (1982). Evidence for essential sulphhydryl group(s) in photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase: Protection by substrate, metal substrate and glucose-6-phosphate against p-chloromercuribenzoate inhibition. *Photosynthetica* **16**, 59-66.
- Manetas, Y., Petropoulou, Y. & Karabourniotis, G. (1986). Compatible solutes and their effects on phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄-halophytes. *Plant Cell Environ.* **9**, 145-151.
- Manchester, K. L. (1980). Determination of magnesium and potassium binding constants to phosphoenolpyruvate, 2-and 3-phosphoglycerate and a number of other anions. *Biochem. Biophys. Acta* **630**, 225-231.
- Manh, C.T., Bismuth, E., Boutin, J.P., Provot, M. & Champigny, M.L. (1993). Metabolite effectors for short-term nitrogen-dependent enhancement of phosphoenolpyruvate carboxylase activity and decrease of net sucrose synthesis in wheat leaves. *Physiol. Plant.* **89**, 460-466.
- Maralihalli, G.B., Bhagwat, A.S. (1993). Modification of maize phosphoenolpyruvate carboxylase by Woodward's reagent K. *J. Prot. Chem.* **12**, 451-457.
- Marês, J. & Lebová, S. (1980). Phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of maize, sorghum and millet. *Photosynthetica* **14**, 25-31.

- Marques, I. A., Oberholzer, M. J. & Erismann, K. H. (1983). Effects of different inorganic nitrogen sources on photosynthetic carbon metabolism in primary leaves of nonnodulated *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* **71**, 555-561.
- Maxwell, C. A., Vance, C. P., Heichel, G.H. & Stade, S. (1984). CO₂ fixation in alfalfa and birdsfoot trefoil root nodules and portioning of ¹⁴C to the plant. *Crop Sci.* **24**, 257-264.
- Meyer, C.R., Willeford, K.O. & Wedding, R.T. (1991). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*, effect of incubation with ligands and dilution on oligomeric state, activity and allosteric properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 343-349.
- McNaughton, G.A.L., MacKintosh, C., Fewson, C.A., Wilkins, M.B. & Nimmo, H.G. (1991). Illumination increases the phosphorylation state of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by causing an increase in the activity of a protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1093**, 189-195.
- Miziorko, H.W., Nowak, T. & Mildvan, A.S. (1974). Spinach leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: purification, properties, and kinetic studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 378-389.
- Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J.P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**, 88-118.
- Mukerji, S.K., (1977). Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylases. Inhibition of ¹⁴CO₂ fixation by SO₃²⁻ and activation by glucose-6-phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **182**, 360-365.
- Nguyen, T.T., Ngam, E.K., Jenkins, J. & Grover, S.D. (1988). Metal ions interactions with phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea* and *Zea mays*. *Plant Physiol.* **86**, 104-107.
- Nimmo, G.A., Nimmo, H. G., Hamilton, I.D., Fewson, C.A. & Wilkins, M.B. (1986). Purification of the phosphorylated night form and dephosphorylated day form of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Bryophyllum fedtschenkoi*. *Biochem. J.* **239**, 213-220.
- Nimmo, G.A., Wilkins, M.B., Fewson, C.A. & Nimmo, H.G. (1987). Persistent circadian rhythms in the phosphorylation state of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Bryophyllum fedtschenkoi* leaves on its sensitivity to inhibition by malate. *Planta* **170**, 408-415.
- Nishikido, T. & Takanashi, H. (1973). Glycine activation of PEP carboxylase from monocotyledonous C₄ plants. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **53**, 126-133.
- Nott, D.L. & Osmond, C.B. (1982). Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of CAM plants. *Aust. J. Plant Physiol.* **9**, 409-422.

O'Leary, M.H., DeGooyer, W. J., Douherty, T. M. and Anderson, V. (1981). 1-Hydroxycyclopropane carboxylic acid phosphate: A potent inhibitor of enzymes metabolizing phosphoenolpyruvate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **100**, 1320-1325.

O'Leary, M.H. (1981). Kinetic and isotope effect studies of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochemistry* **20**, 7308-7314.

O'Leary, M. H & Díaz, E. (1982). Phosphoenol-3-bromopyruvate. A mechanism-based inhibitor of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *J. Biol. Chem.* **257**, 14603-14605.

O'Leary, M.H. (1982). Phosphoenolpyruvate carboxylase: An enzymologist's view. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**, 297-315.

O'Leary M.H. (1983). Mechanism of action of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Physiol. Veg.* **21**, 883—888.

O'Sullivan, W. J. O. & Smithers, G.W. (1979). In: D.L. Purich (Ed.), *Methods in Enzymology*, vol. **63**, Academic Press, New York, 1979, pp. 294-336.

Peliska, J.M. & O'Leary M. H. (1989). Sulfuryl transfer catalyzed by pyruvate kinase. *Biochemistry* **28**, 1604-1611.

Pipenbrock, M. & Schmitt, J.M. (1991). Environmental control of phosphoenolpyruvate carboxylase induction in mature *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol.* **97**, 998-1003.

Podestá, E., Iglesias, A.A. & Andreo, C. S. (1986). Modification of an essential amino group of PEPC from maize leaves by pyridoxal phosphate and by pyridoxal phosphate-sensitized photooxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 546-553.

Podestá, F.E. & Andreo, C.S. (1989). Maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: Oligomeric state and activity in the presence of glycerol. *Plant Physiol.* **90**, 427-433.

Poetsch, W., Hermans, J. & Westhoff, P. (1991). Multiple cDNAs of phosphoenolpyruvate carboxylase in the C₄ dicot *Flaveria trinervia*. *FEBS Lett.* **292**, 133-136.

Qun, C., & Jiao-naï, (1988). Structural features of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. *Chin. J. Biochem. Biophys.* **20**, 47-56.

Quy, L.V., Foyer, C. & Champigny, M.L. (1991). Effect of light and NO₃⁻ on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *Plant Physiol.* **97**, 1476-1482.

- Raghavendra, A.S. & Vallejos, R. H. (1982). Regulation of PEP from C₄ involvement of thiol groups in the activity of the enzyme from *Amaranthus viridis*. *Indian J. Exp. Biol.* **20**, 619-622.
- Rajagopalan, A. V., Devi, M.T. & Raghavendra A.S. (1994). Molecular biology of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase: Structure, regulation and genetic engineering. *Photosynth. Res.* **39**, 115-135.
- Rodríguez-Penagos, M. & Muñoz-Clares, R.A. (1999). Response of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves to moderate water déficit. *J. Plant Physiol.* **155**, 631-638.
- Rodríguez-Sotres Rogelio. (1990). Tesis doctoral. Facultad de Química. UNAM, México.
- Rodríguez-Sotres, R., López-Pozos, R. & Muñoz-Clares, R.A. (1987). Short-term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by light. *J. Plant Physiol.* **128**, 361-369.
- Rodríguez-Sotres, R. & Muñoz- Clares, R. A. (1987). Further studies of the short-term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by light. *J. Plant Physiol.* **129**, 191-199.
- Rodríguez-Sotres R. & Muñoz-Clares R.A. (1990). Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys* **276**, 180-190.
- Rosendahl, L., Vance, C.P. & Pedersen, W.B. (1990). Products of dark CO₂ fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiol.* **93**, 12-19.
- Rustin, P., Meyer, C.R. & Wedding, R.T. (1991). Fluorescence study of chemical modification of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*. *Plant Physiol.* **97**, 1011-1016.
- Rustin, P., Meyer, Wedding, R.T. (1988). Identification of substrate and effector binding sites of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea* A possible role of phosphoenolpyruvate as substrate and activator. *J. Biol. Chem.* **263**, 17611-17614.
- Ryslavá, H., Stivorová, M. & Lebová, S. (1988) Inactivation of essential lysine residues in Phosphoenolpyruvate carboxylase from maize (*Zea mays* L.) leaves by pyridoxal-5'-phosphate. *Photosynthetica* **22**, 83-89.
- Schäffner, A.R. & Shenn, J. (1992). Maize C₄ photosynthesis involves differential regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase genes. *Plant J.* **2**, 221-232.
- Schuller, K.A., Plaxton, W.C. & Turpin, D.H. (1990). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the green alga *Selenastrum minutum*: Properties associated with the

replenishment of tricarboxylic acid cycle intermediates during ammonium assimilation. *Plant Physiol.* **93**, 1303-1311.

Schweizer, P. & Erisman, K.H. (1985). Effects of nitrate and ammonium nutrition of nonnodulated *Phaseolus vulgaris* L. on phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase activity. *Plant Physiol.* **78**, 455-458.

Segel, I.H. (1975) in: *Enzyme Kinetics*. Wiley Interscience. New York. pp. 227-272 and 147-151.

Selinioti, E., Karabourniotis, G., Manetas, Y. & Gavalas, N.A. (1985). Modulation of phosphoenolpyruvate carboxylase by 3-phosphoglycerate: probable physiological significance for C₄-photosynthesis. *J Plant Physiol.* **121**, 353-360.

Selinioti, E., Nikolopoulos, D. & Manetas, Y. (1987). Organic cosolutes as stabilizers of phosphoenolpyruvate carboxylase in storage: an interpretation of their action. *Aust. J. Plant Physiol.* **14**, 203-210.

Sims T. L. & Hague D. R. (1981). Light-stimulated increase of translatable RNA_m for phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of maize. *J. Biol. Chem.* **256**, 8252-8255.

Singal, H.R. & Singh, R. (1986). Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from immature pods of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Plant Physiol.* **80**, 369-373.

Stamatakis, Gavalas, N.A. & Manetas, Y. (1988). Organic cosolutes increase the catalytic efficiency of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Cynodon dactylon* (L.) Pers., apparently through self-association of the enzymic protein. *Aust. J. Plant Physiol.* **15**, 621-623.

Stiborová, M. & Leblová, S. (1985). Activation of maize (*Zea mays* L.) phosphoenolpyruvate carboxylase by glucose-6-phosphate and glycine: Effects of pH and Mg²⁺. *Photosynthetica* **19**, 177-182.

Stiborová, M. & Leblová, S. (1986). Structure of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *FEBS Lett.* **205**, 32-34.

Sugiharto, B., Miyata, K., Nakamoyo, H., Sasakawa, H. & Sugiyama, T. (1990). Regulation of expression of carbon assimilating enzymes by nitrogen in maize leaf. *Plant Physiol.* **92**, 963-969.

Sugiharto, B., Suzuki, I., Burnell, J.N. & Sugiyama, T. (1992). Cytokinin is required to induce the nitrogen-dependent accumulation of mRNAs for phosphoenolpyruvate carboxylase and carbonic anhydrase in detached maize leaves. *Plant Physiol.* **100**, 2066-2070.

Sugiharto, B. & Sugiyama, T. (1992). Effects of nitrate and ammonium on gene expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recovery from nitrogen stress. *Plant Physiol.* **98**, 1403-1408.

Taghizadeh, S.K., Jacoby, F.J. & Grover, S.D. (1991). Effect of diethylpyrocarbonate on the allosteric properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*. *Plant Physiol.* **95**, 1237-1242.

Tchen, T.T. & Vennesland, B. (1955). Enzymatic carbon dioxide fixation into oxaloacetate in wheat germ. *J. Biol. Chem.* **213**, 533-546.

Ting, I.P. & Osmond, C.B. (1973a). Photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylases. Characteristics of alloenzymes from leaves of C₃ and C₄ plants *Plant Physiol.* **51**, 439-447.

Ting, I.P. & Osmond, C.B. (1973b). Multiple forms of plant phosphoenolpyruvate carboxylase associated with different metabolic pathways. *Plant Physiol.* **51**, 448-453.

Toh, H., Kawamura, T. & Izui, K. (1994). Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Cell Environ.* **17**, 31-43.

Tovar-Méndez, A., Yampara-Iquise, H., Mújica-Jiménez, C. & Muñoz-Clares, R. A. (1995). Binding of ligands to the glucose-6-phosphate allosteric site in maize-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. In: P. Mathis (Ed.), *Photosynthesis: From light to Biosphere*, Vol. V, Kluwer, Dordrecht, pp. 155-158.

Tovar-Méndez, A., Mújica-Jiménez, C. & Muñoz-Clares, R.A. (1997). Desensitization to glucose-6-phosphate of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by pyridoxal 5'-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **1337**, 207-216.

Tovar-Méndez, A., Rodríguez-Sotres, R., López-Valentín, D. M. & Muñoz-Clares, R. A. (1998). Re-examination of the roles of PEP and Mg²⁺ in the reaction catalysed by the phosphorylated and non-phosphorylated forms of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of *Zea mays*. *Biochem. J.* **332**, 633-642.

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

Van, Q. L., Foyer, C. & Champigny, M. L. (1991). Effect of light and NO₃⁻ on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *Plant Physiol.* **97**, 1476-1482.

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

Wadham, C., Winter, H., & Shuller, K. (1996). Regulation of soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase *in vivo*. *Physiol. Plant.* **97**, 531-535.

Wagner, R., González, D.H., Podestá, F.E. & Andreo, C.S. (1987). Changes in the quaternary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase induced by ionic strength affect its catalytic activity. *Eur. J. Biochem.* **164**, 661-666.

Wagner, R., Podestá, F.E., González, D.H. & Andreo, C.S. (1988). Proximity between fluorescent probes attached to four essential lysyl residues in phosphoenolpyruvate carboxylase: a resonance energy transfer study. *Eur. J. Biochem.* **173**, 561-568.

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

Wang, Y.H., Duff, S.M.G., Lepiniec, L., Crétin, C., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, J., Gadal, P. & Chollet, R. (1992). Site-directed mutagenesis of the phosphorylated serine (ser 8) in C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum. The effect of negative charge at position 8. *J. Biol. Chem.* **267**, 16759-16762.

Wanke, C. & Amrhein N. (1993). Evidence that the reaction of the UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyl transferase proceeds through the O-phosphothioacetal of pyruvic acid bound to Cys 115 of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **218**, 861-870.

Wedding, R.T. & Black, M.K. (1986). Malate inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula*. *Plant Physiol.* **82**, 985-990.

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

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

Wedding, R.T., Black, M.K. & Meyer, C.R. (1989). Activation of higher plant phosphoenolpyruvate carboxylases by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol.* **90**, 648-652.

Willeford, K.O. & Wedding, R.T. (1992). Oligomerization and regulation of higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **99**, 755-758.

Willeford, K.O., Wu, M.X., Meyer, C.R. & Wedding, R.T. (1990). The role of oligomerization in regulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **168**, 778-785.

Wold, F. & Ballou, C.E. (1957). Studies on the enzyme enolase. Equilibrium studies. *J. Biochem. Chem.* **227**, 301-312.

Wong, K.F. & Davies, D.D. (1973). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Zea mays* by metabolites. *Biochem. J.* **131**, 451-455.

Wu, M.X. & Wedding, R.T. (1985). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula* by interconversion of oligomeric forms. *Arch. Biochem. Biophys.* **240**, 655-662.

Wu, M.X. & Wedding, R.T. (1994). Modification of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase with fluoerescein isothiocyantc. *Plant Cell Physiol.* **35**, 569-574.

Wyman, J. (1964). In: *Adv. Prot. Chem.* (Anfisen, C.B., Edsall, J.T., Anson, M.L. & Richards, F.M., Eds.) Vol 19, Academic Press, New York & London. pp 223-286.

Yazaki, Y., Asukagawa, N., Ishikawa, Y., Ohta, E. & Sakata, M. (1988). Estimation of cytoplasmic free Mg^{2+} levels and phosphorylation potentials in mung bean root tips by *in vivo* ^{31}P NMR spectroscopy. *Plant Cell Physiol.* **29**, 919-924

Zhang, X.Q., Li, B. & Chollet, R. (1995). *In vivo* regulatory phosphorylation of soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **108**, 1561-1568.