



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES
REGULATORIAS DE LAS ENZIMAS
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA DE
HOJAS DE MAIZ Y DE AMARANTO**

T E S I S E X P E R I M E N T A L
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q U I M I C O
P R E S E N T A :
RODRIGO GÚEMEZ TORO



MÉXICO, D.F.



**EXAMENES PRONOMIALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2008



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Fuentes García, Guillerma

FECHA: 06/09/2008

FIRMA: FUENTES GARCIA

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE Rafael Moreno Esparza
VOCAL Rosario Muñoz Clares
SECRETARIO Mireya Rodríguez Penagos
1^{er} SUPLENTE María Eugenia Torres Marquez
2^o SUPLENTE Gloria Gutierrez Venegas

SITIO DONDE SE DESARROLLA EL TEMA: Facultad de Química, Conjunto E,
Departamento de Bioquímica, laboratorio 102

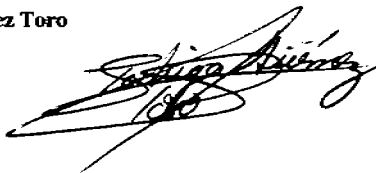
ASESORA DEL TEMA: Dra. Rosario A. Muñoz Clares



SUPERVISOR TÉCNICO: Carlos Májica Jiménez



SUSTENTANTE: Rodrigo Gámez Toro



Agradecimientos:

A mis padres, que gracias a su amor y esfuerzo para que me supere día a día, he llegado hasta aquí.

A mi familia cuya presencia ha sido determinante en mi vida. Gracias a todos mis hermanos, tíos, primos y abuelos.

A la Dra. Rosario, Carlos y demás amigos (Lilia, Lilian, Liliana, Fati, Mina, Alicia, Mariana, Ale, Ita, Angie, Daniel, Angel, Javier, Vic) por todas las aportaciones tan valiosas y por todos los momentos que sirvieron para tomar la inspiración necesaria para la culminación de este trabajo.

A los amigos de la facultad que siguieron este proceso y con los cuales compartí momentos de relajante inspiración y convivencia (Luz, Leti, Joyce, Dona, Kari, Carmen, Eli, Karen, Angel, Pato, Chucho, Ariel, Christian, Ruben en general a la banda química)

A mis hermanos putativos (Shizu, Fab, Karla, Lili, Itzel, Pam, Goya, Lucha, Dani, Male, José Julián, Alex, Luiggi, Jardzy, Adrian, Yortz, Gerry, Ernie) por todos los años de amistad, por el apoyo, consejos y relajos que hemos compartido a lo largo de este trabajo.

A otros amigos que también han estado presentes en este camino de dos años y un poco más (Dens, Fer, Brendi, Marce, Pietro) con cada uno he compartido cosas diferentes y muy significativas.

Finalmente a las personas del jurado que con sus aportaciones enriquecieron este trabajo.

ÍNDICE

	Pag.
ABREVIATURAS	6
I. RESUMEN	8
II. ANTECEDENTES	9
II.1. GENERALIDADES DE LA PEPC	9
II.2. PAPEL METABÓLICO DE LAS ISOFORMAS C ₄ Y CAM	9
II.3. CATÁLISIS Y REGULACIÓN ALOSTÉRICA	13
II.3.1. <u>Reacción catalizada</u>	13
II.3.2. <u>Mecanismo de reacción</u>	15
II.3.3. <u>Regulación alostérica</u>	17
II.3.3.1. Cooperatividad positiva de unión del sustrato	18
II.3.3.2. Inhibición alostérica	18
II.3.3.3. Activación alostérica	19
II.3.3.4. Regulación por fosforilación	22
II.4. ESTRUCTURA DE LA PEPC	23
II.4.1. <u>Estructura primaria</u>	23
II.4.2. <u>Estructura tridimensional</u>	24
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
IV. HIPÓTESIS	31
V. OBJETIVOS	31
V.1. OBJETIVO GENERAL	31
V.2. OBJETIVOS PARTICULARES	31
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	32
VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO	32
VI.2. REACTIVOS Y COLUMNAS DE CROMATOGRAFÍA	32
VI.3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PEPC	33
VI.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	34
VI.5. CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS ESPECIES LIBRES Y EN COMPLEJO CON Mg ²⁺	36
VI.6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA	37
VI.7. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	40

VI.8. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE VELOCIDAD INICIAL	42
VI.9. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS	
DE LAS ZmC4PEPC Y AhC4PEPC	43
VI.10. CONSTRUCCIÓN DEL MODELO DE LA ESTRUCTURA	
DE LA AhC4PEPC	44
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
VII.1. PURIFICACIÓN DE LA AhC4PEPC y ZmC4PEPC	44
VII.2. ESTUDIOS CINÉTICOS COMPARATIVOS ENTRE	
LA ZmC4PEPC Y LA AhC4PEPC	48
VII.2.1. <u>Determinación de los valores de I_{50} para malato de AhC4PEPC y</u>	
<u>ZmC4PEPC</u>	48
VII.2.2. <u>Saturación por PEP</u>	49
VII.2.3. <u>Regulación por efectores alostéricos</u>	50
VII.2.3.1. Inhibición por malato	50
VII.2.3.2. Activación por Glc6P	52
VII.2.3.3. Activación por glicina	57
VII.2.4. <u>Resumen de los resultados de los estudios de velocidad inicial</u>	62
VII.3. COMPARACIONES ESTRUCTURALES ENTRE LA ZmC4PEPC Y LA	
AhC4PEPC	63
VII.3.1. <u>Comparación de las estructuras primarias</u>	63
VII.3.2. <u>Comparación de la estructura terciaria</u>	66
VIII. CONCLUSIONES	69
IX. PERSPECTIVAS	70
X. BIBLIOGRAFÍA	72

ABREVIATURAS

3-PGA	3-fosfoglicerato
AbC4PEPC	PEPC de hojas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i>
BSA	albúmina de suero de bovino
C4-PEPC	PEPC de hojas de plantas C ₄
CAM	metabolismo ácido de <i>Crasulaceas</i>
CAM-PEPC	PEPC de hojas de plantas CAM
CO ₂	dióxido de carbono
DCDP	3,3-dicloro-2-dihidroxifosfoenil metil-2-propenoato
DEAE	dietilaminoetil
DTT	DL-ditiotreitol
EcPEPC	PEPC de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	sal disódica dihidratada de etilendiaminotetraacético
Fruc2,6P ₂	fructosa-2,6-bifosfato
Fruc6P	fructosa-6-fosfato
Gluc1P	glucosa-1-fosfato
Glc6P	glucosa-6-fosfato
Gly	glicina
HCO ₃ ⁻	bicarbonato
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etanosulfónico
MDH	malato deshidrogenasa
NAD ⁺	nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
NAD ⁺ -ME	enzima málico dependiente de NAD ⁺
NADH	nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NADP ⁺	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato oxidado
NADP ⁺ -MDH	malato deshidrogenasa dependiente de NADP ⁺
NADP ⁺ -ME	enzima málico dependiente de NADP ⁺
OAA	oxaloacetato
PEPCK	PEP carboxicinasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa

PEPC-K	PEPC cinasa
Pi	fósforo inorgánico
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo o fluoruro de α -toluensulfonilo
PPdK	piruvato-fosfato dicinasa
QFF	Q fast flow
R _f	factor de retención
Rubisco	ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
SDS	dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
triosa-P	triosa fosfato
ZmC4PEPC	PEPC de hojas de <i>Zea mays</i>

I. RESUMEN

La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) cataliza la carboxilación de fosfoenolpiruvato (PEP), a expensas de bicarbonato (HCO_3^-) en la presencia de un catión divalente. En las hojas de plantas con metabolismo C_4 (C_4 -PEPC), esta enzima participa en la ruta fotosintética de asimilación del dióxido de carbono (CO_2) atmosférico. Esta reacción es irreversible y la actividad de la isoenzima fotosintética está muy regulada por efectores alostéricos (activadores e inhibidores) y por modificación covalente reversible (fosforilación de un residuo de serina), la que a su vez modula la acción de los efectores alostéricos. Los efectores heterotrópicos positivos más significativos son los azúcares fosforilados y los aminoácidos neutros, de los cuales la glucosa-6-fosfato (Glc6P) y la glicina (Gly) son, respectivamente, los más representativos.

Se ha reportado que los aminoácidos neutros sólo activan a la C_4 -PEPC de plantas monocotiledóneas, pero estos estudios se realizaron en condiciones que no son las fisiológicas. En este trabajo hemos llevado a cabo un estudio cinético comparativo de dos C_4 -PEPC, las obtenidas de la planta dicotiledónea *Amaranthus hypochondriacus* (AhC4PEPC) y de la monocotiledónea *Zea mays* (ZmC4PEPC), en condiciones cercanas a las fisiológicas prevalentes durante la oscuridad, para corroborar si la primera se activa con aminoácidos neutros en estas condiciones, y de no ser así buscar si la activación por azúcares fosforilados es suficiente para mantener el flujo de la ruta de asimilación del CO_2 en niveles adecuados. Los resultados obtenidos mostraron que, aun en estas condiciones de reacción, los aminoácidos neutros no activan a la AhC4PEPC. La AhC4PEPC es más afin por el sustrato PEP y por el activador Glc6P que la ZmC4PEPC, mientras que es menos afin por el inhibidor malato. Estas diferencias, pudieran hacer innecesaria la regulación por aminoácidos neutros de la AhC4PEPC. También se realizaron análisis estructurales de ambas PEPCs para investigar la relación entre la estructura de cada una de ellas y las diferencias observadas en su regulación alostérica. Un alineamiento de las secuencias de aminoácidos mostró que los residuos reportados como esenciales para la catálisis y la regulación alostérica se encuentran conservados en las secuencias de ambas enzimas. El modelo de la estructura tridimensional de la AhC4PEPC obtenido, tomando como base la estructura cristalográfica reportada de la ZmC4PEPC, sólo mostró diferencias significativas en el sitio de unión a glicina. Concretamente se encontraron tres aminoácidos cambiados, lo que pudiera explicar la diferencia en la regulación por aminoácidos neutros entre las enzimas ZmC4PEPC y AhC4PEPC.

II. ANTECEDENTES

II.1. GENERALIDADES DE LA PEPC

Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31)) es una enzima citosólica que se encuentra ampliamente distribuida en organismos fotosintéticos como plantas, bacterias fotosintéticas, cianobacterias y algas verdes y en organismos no fotosintéticos como bacterias y protozoarios, pero que no está presente en animales, hongos y levaduras (Chollet *et al.*, 1996; Izui *et al.*, 2004). Existen diversas isoformas de la enzima que se pueden agrupar en dos tipos: 1) PEPCs de hojas de plantas C_3 y de tejidos no fotosintéticos de todo tipo de plantas, las cuales están involucradas en funciones anapleróticas como el reabastecimiento de oxalacetato al ciclo de Krebs y la aportación de esqueletos carbonados para el metabolismo de fijación de nitrógeno en raíz (Lepiniec *et al.*, 2003), y 2) PEPCs de tejido fotosintético de plantas C_4 o con metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), en los cuales cataliza la reacción que es el primer paso en la ruta metabólica C_4 (Hatch & Slack, 1970; Hatch, 1987) o CAM (Dodd *et al.*, 2002; Borland & Taybi, 2004) para fijar CO_2 en estos tipos de plantas.

II.2. PAPEL METABÓLICO DE LAS ISOFORMAS C_4 Y CAM

En todos los organismos fotosintéticos se lleva a cabo la fijación de CO_2 atmosférico que es el sustrato para obtener los esqueletos carbonados que el organismo aprovechará para su desarrollo. En las plantas C_3 , la ruta metabólica encargada de este proceso se conoce como el ciclo Benson-Calvin, ciclo de reducción del carbono o ciclo C_3 (Figura II.1.A). En el ciclo C_3 la enzima ribulosa-1,5- bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) es la encargada de catalizar la fijación del CO_2 produciendo dos moléculas de tres carbonos, el 3-fosfoglicerato (3-PGA), lo que le da el nombre a este tipo de plantas y a la ruta de fijación del CO_2 .

La Rubisco también usa como sustrato al oxígeno molecular (O_2) en una reacción de condensación que compete con la de carboxilación (Parry *et al.* 2003), produciéndose una molécula de 3-fosfoglicerato y una de 2- fosfoglicolato, éste último no es útil para la planta. Por ello es necesario invertir cantidades significativas de energía y perder una molécula de CO_2 por cada dos de 2-fosfoglicolato en una ruta de recuperación de los carbonos del glicolato llamada

fotorrespiración para obtener una molécula de 3-fosfoglicerato. Todo este proceso es conocido como fotorrespiración por su semejanza con la respiración ya que consume O_2 y produce CO_2 ,

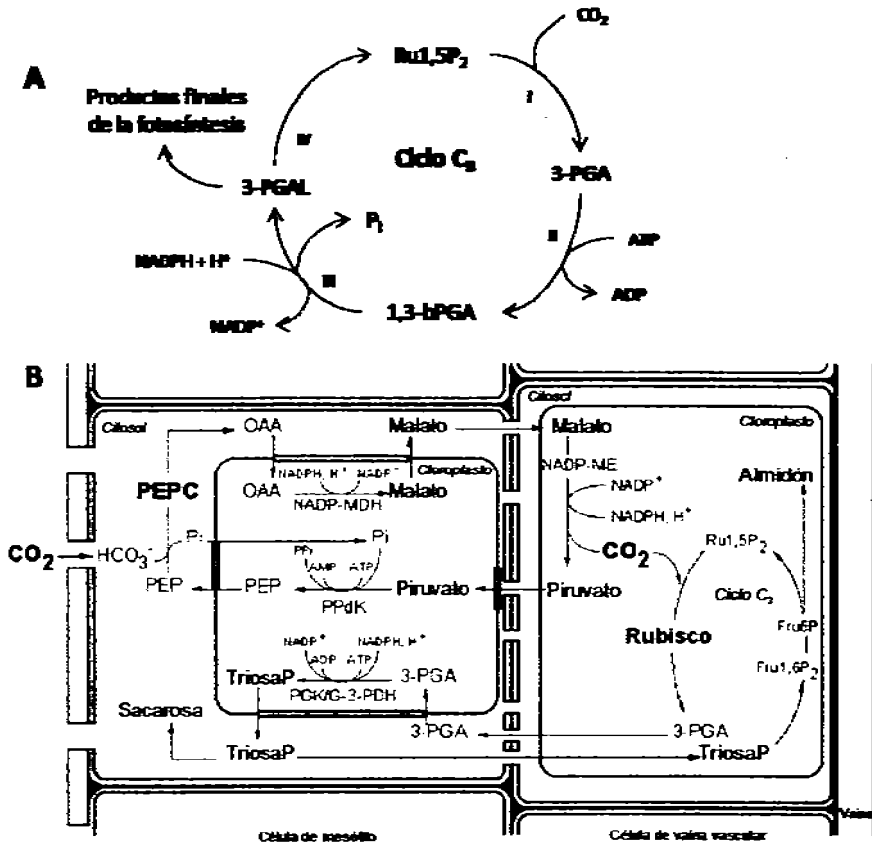


Figura II.1. Esquemas de los ciclos C_3 y C_4 . A) Ciclo C_3 , en donde I es la reacción catalizada por Rubisco, II es la catalizada por la 3-fosfoglicerato cinasa, III por la 3-fosfogliceraldehído deshidrogenasa y IV son varias reacciones catalizadas por diferentes enzimas a partir de 3-fosfogliceraldehído (3-PGAL) y otras azúcares fosforiladas para regenerar ribulosa-1,5-bisfosfato ($Ru1,5P_2$). B) Ciclo C_4 mostrando el flujo de metabolitos y la separación física de éste y del Ciclo C_3 en las células de mesófilo y de vaina vascular. El ciclo C_4 inicia con la fijación de CO_2 en PEP formando oxalacetato (OAA) que es un compuesto C_4 . Las enzimas y metabolitos que intervienen son: malato deshidrogenasa dependiente de $NADP^+$ ($NADP^+-MDH$), enzima málico dependiente de $NADP^+$ ($NADP^+-ME$), Rubisco, piruvato-fosfato dicinasa (PPdK), PEP, PEPK, OAA, 3-PGA, $Ru1,5P_2$, fructosa bifsfosfato ($Fru1,6P_2$).

pero a diferencia de la respiración no produce ATP sino que lo consume y esto, junto con la pérdida del CO_2 que había sido previamente incorporado a un compuesto orgánico, lleva a pérdidas en la formación neta de biomasa de hasta un 50 % (Nelson & Cox, 2005).

El resultado de las adaptaciones evolutivas en los procesos de asimilación de CO_2 fueron las plantas C_4 como el amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y el maíz (*Zea mays*). En el caso de las plantas C_4 la fijación de CO_2 tiene lugar a través del metabolismo C_4 o ciclo C_4 . Este proceso se realiza en dos tipos de células: las células de mesófilo y las de vaina vascular (Figura II.1). En el primer tipo de células se llevan a cabo las primeras reacciones del ciclo y en el segundo tipo se realizan las reacciones de descarboxilación y del ciclo C_3 . Los dos tipos de células forman parte de una anatomía muy característica conocida como tipo Kranz que se da en plantas con alta vascularización: cada vaina vascular está rodeada por un anillo de células de vaina vascular y éstas a su vez están rodeadas por un anillo de células de mesófilo (Figura II.2). En las plantas con metabolismo fotosintético de tipo C_4 se disminuyen los niveles de fotorrespiración, que puede incluso llegar a ser abolida, lo que aumenta la eficiencia fotosintética. Además en este tipo de planta se reasimila el CO_2 producido en la respiración celular. Todo ello permite hacer un uso mucho más eficiente del agua, porque hay un intercambio de gases menor en los estomas, que pueden estar casi cerrados, evitándose la pérdida de agua por transpiración. Esta adaptación metabólica, resulta por tanto en una mayor formación de biomasa, por lo que a las plantas C_4 se las conoce como de “alta productividad” (Nelson & Cox, 2005).

Es en el metabolismo C_4 donde participa la enzima estudiada en este trabajo. La PEPC cataliza en el citoplasma de la célula de mesófilo la primera reacción donde se fija el CO_2 . El OAA producido ingresa al cloroplasto y, dependiendo del tipo de planta C_4 , puede tomar dos caminos: 1) se reduce a malato, reacción que cataliza NADP^+ -MDH, que pasa a las células de vaina vascular por medio de los plasmodesmos o 2) por medio de una transaminación catalizada por aspartato aminotransferasa se forma aspartato el cual pasa a la célula de vaina vascular por la misma vía que el malato. En el primer caso el malato es descarboxilado por la enzima málico dependiente de NADP^+ -ME generando piruvato, y en el segundo caso el aspartato es convertido a OAA por medio de la aspartato aminotransferasa, el cual puede seguir dos caminos de descarboxilación según el tipo de planta C_4 . Estos pueden ser la descarboxilación por medio de NAD^+ -ME o por PEP carboxicinasa (PEPCK). El CO_2 liberado es tomado por la Rubisco y así se incorpora a un compuesto de la ruta del ciclo C_3 . El piruvato regresa al cloroplasto de la célula de

mesófilo donde es fosforilado por medio de la PPdK produciendo PEP para ser utilizado nuevamente y cerrar así el ciclo (Nelson & Cox, 2005).

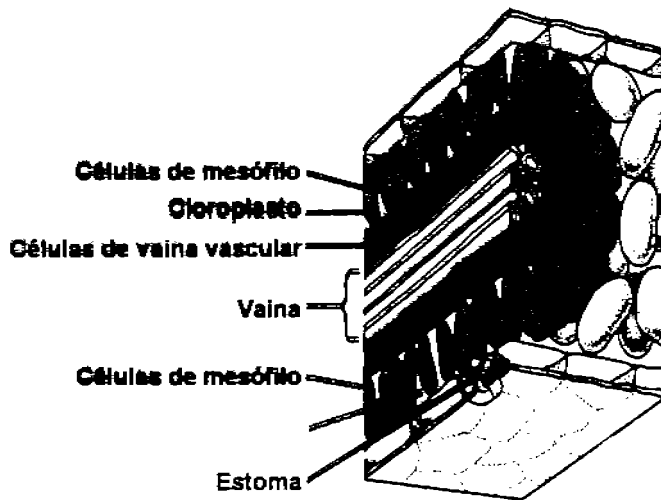


Figura II.2. Sección transversal de una hoja con anatomía C₄. Se muestran los estomas, el arreglo radial de las células de mesófilo bajo la epidermis de la hoja. Adyacente a las células de mesófilo, se encuentra el estrato de las células de la vaina vascular, alrededor del anillo del haz vascular o vaina

En plantas CAM el metabolismo difiere en que la fijación de CO₂ por la PEPC y por la Rubisco en el ciclo C₃ están temporalmente separados. Como se da en plantas de regiones áridas o semiáridas, estas plantas deben conservar el agua y para esto cierran sus estomas durante el día. En la noche los abren asimilando CO₂ mediante la reacción catalizada por la PEPC. El oxalacetato producido se transforma a malato y éste se guarda en vacuolas para proteger a la célula del bajo pH que se genera por la disociación del ácido málico. En el día se libera el malato al citoplasma, donde es descarboxilado por el enzima málico. La Rubisco toma el CO₂ liberado para continuar con su asimilación definitiva en el cloroplasto a través del Ciclo de Calvin o ciclo C₃ (Nelson & Cox, 2005).

II.3. CATÁLISIS Y REGULACIÓN ALOSTÉRICA

II.3.1. Reacción catalizada

La PEPC cataliza la β -carboxilación irreversible de PEP a expensas de HCO_3^- en la presencia de un catión divalente (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}) (Bandurski, 1955; Tchen & Vennesland, 1955; Mizioroko *et al.*, 1974; Nguyen *et al.*, 1988), produciendo OAA y fósforo inorgánico (Pi , HPO_4^{2-}) (Figura II.3). Esta reacción es muy exergónica con valores calculados de ΔG de -6 a -8 Kcal/mol (O'Leary, 1982). Además esta carboxilación del PEP por la PEPC es independiente del cofactor biotina (Cooper & Wood, 1971; Mukerji, 1977), siendo la única carboxilasa dependiente de bicarbonato que no necesita este cofactor debido a que no es necesario que transporte el CO_2 de un sitio a otro dentro de la misma enzima, además de que no es necesario el uso de moléculas de alta energía que cedan un fosfato para la formación del carboxifosfato, ya que el mismo PEP contiene un grupo fosfato que es usado con este fin.

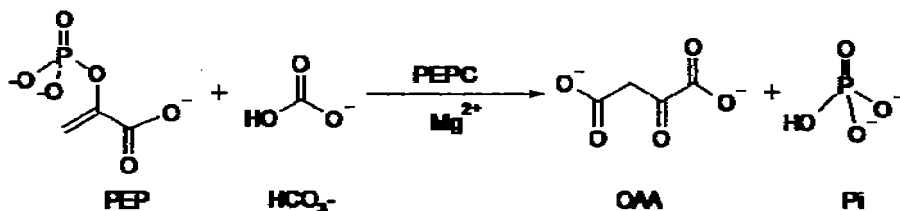


Figura II.3. Reacción catalizada por PEPC

Durante los primeros estudios de caracterización de esta enzima se encontró que necesitaba de la presencia de un catión divalente como cofactor para realizar catálisis y que el grado de carboxilación dependía directamente de la concentración del metal (Bandursky, 1955). De los cationes estudiados el que funge como cofactor *in vivo* es Mg^{2+} , pudiendo ser sustituido *in vitro* por Mn^{2+} (Andreo *et al.*, 1987). En trabajos posteriores se propuso que el papel del catión era actuar como puente entre la enzima y el PEP formando un complejo E- Mg^{2+} -PEP para estabilizar el intermediario (Mizioroko *et al.*, 1974; O'Leary *et al.*, 1981; Janc *et al.*, 1992). Este papel fue confirmado posteriormente cuando se determinaron las estructuras tridimensionales de la PEPC de *E. coli* (EcPEPC). El catión también se puede unir a la enzima sin que PEP esté

presente, lo cual también se confirmó gracias a las estructuras cristalinas de EcPEPC y además por estudios cinéticos (Tovar-Méndez *et al.* 1998; Matsumura *et al.* 1999). Por esto se había propuesto que el verdadero sustrato de la reacción era el PEP, ya que el metal y el sustrato se unían por separado (Miziorko *et al.*, 1974; O'Leary *et al.*, 1981). Además se encontró en estudios cinéticos que la unión del metal está en equilibrio y precede a la unión de PEP (Janc *et al.* 1992). Otros estudios realizados a concentraciones fisiológicas, a pH 7.3 y en ausencia de activadores sugieren que los datos obtenidos de los patrones de velocidad inicial eran compatibles con la unión exclusiva al sitio activo del complejo Mg^{2+} -PEP, mientras que a pH 8.3 las especies libres también se unían al sitio activo, pero con menor afinidad que Mg^{2+} -PEP (Wedding *et al.*, 1988; Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez *et al.*, 1998; Tovar-Méndez *et al.*, 2000). En el estudio donde se propone que los sustratos se unen a la enzima por separado se sugiere que las observaciones, anteriormente mencionadas, hechas sobre la unión del complejo Mg^{2+} -PEP al sitio activo se deben al gran sinergismo en la unión del PEP al complejo E- Mg^{2+} .

Estudios a diferentes valores de pH muestran que posiblemente la enzima se une preferentemente a la forma trianiónica del PEP (O'Leary, 1982). Aunque por medio de estudios de EPR se determinó que PEP es un quelante bidentado del Mn^{2+} en el complejo E- Mn^{2+} -PEP (Chollet *et al.*, 1996).

El PEP también es susceptible de hidrolizarse al reaccionar con HCO_3^- , aunque este proceso se da en una baja proporción en comparación con la reacción de carboxilación, representando menos del 5 % del flujo general de la reacción en condiciones fisiológicas (Chollet *et al.*, 1996).

Cabe mencionar que las concentraciones fisiológicamente relevantes de PEP están dentro del intervalo de 0.1 a 3 mM, de estas, las concentraciones más altas están presentes en condiciones de iluminación y las más bajas en condiciones de oscuridad (Leegood, 1985; Stitt & Heldt, 1985a; Stitt & Heldt, 1985b; Doncaster & Leegood, 1987). La concentración fisiológica de HCO_3^- en el citosol de las plantas es de 77 μM (Jenkins *et al.*, 1989), lo cual ha representado una cierta dificultad para hacer estudios con este sustrato a concentraciones fisiológicas debido a que existe disuelto en las disoluciones acuosas que se encuentran en contacto con el aire. En estas condiciones la concentración de este sustrato es de aproximadamente 0.1 mM a pH 8 (O'Leary, 1982). Por lo cual esto no ha sido un obstáculo infranqueable, ya que para estudios en condiciones cercanas a las fisiológicas no se agrega bicarbonato al medio de reacción. Finalmente la concentración fisiológica del Mg^{2+} libre es de 0.4 mM y se creó que se mantiene constante en todo momentos (Yazaki *et al.*, 1988).

II.3.2. Mecanismo de reacción de la PEPC

Se ha propuesto un mecanismo de reacción de la PEPC de tres pasos (Figura II.4) siendo el primero la formación del carboxifosfato y el enolato de piruvato, el segundo es la formación de CO_2 y Pi y el tercero es el ataque nucleofílico del CO_2 al enolato para formar el producto final de la reacción (Janc *et al.*, 1992; Chollet *et al.*, 1996). Para que la reacción se lleve a cabo se propone que los sustratos se deben unir a la enzima en el siguiente orden: el Mg^{2+} primero, dando paso a la unión del PEP y finalmente se une el HCO_3^- (Janc *et al.*, 1992), aunque, como ya se mencionó, se ha demostrado que a pH 7.3 el sustrato preferente de la reacción es el complejo Mg^{2+} -PEP (Wedding *et al.* 1988; Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez *et al.*, 1998). A pH de 8.3, o en la presencia de los activadores alostéricos Glc6P o glicina, las especies libres de PEP y Mg^{2+} también se unen al sitio activo, aunque con menor afinidad que el complejo con el metal (Tovar-Méndez *et al.*, 1998).

La catálisis es del tipo ácido-básica, ya que existe un intercambio de protones necesario para la activación del carboxifosfato con la consecuente formación de CO_2 y de Pi en donde interviene un residuo básico que se propone que es la H177 en la numeración de ZmC4PEPC, el cual posteriormente cede el protón al Pi (Janc *et al.* 1992; Kai *et al.* 2003). En el primer paso HCO_3^- es activado por una histidina que funge como residuo básico al formar un puente de hidrógeno con este, el cual posteriormente efectúa un ataque nucleofílico sobre el fosfato en el plano *si* del PEP, que a su vez está activado por las interacciones del PEP con el metal y otro residuo básico que interactúa con un oxígeno del fosfato. Éste se escinde uniéndose al HCO_3^- formando así el carboxifosfato, el cual se estabiliza por el puente de hidrógeno formado con la H177 (Figura II.4), mientras que el enolato se encuentra unido al metal. El segundo paso es la formación de CO_2 y de Pi que se producen debido a que el carboxifosfato cede el hidrógeno con el que formaba el puente de hidrógeno con la H177, escindiéndose el carboxifosfato en los productos de este segundo paso. En este punto la reacción puede tomar dos caminos: uno es la hidrólisis del PEP produciendo piruvato, Pi y HCO_3^- (Chollet *et al.*, 1996); el otro camino es la carboxilación a través del ataque nucleofílico del enolato sobre el CO_2 formando OAA (Janc *et al.*, 1992). Finalmente el Pi toma el protón que la H177 había tomado del carboxifosfato. Esta desprotonación de la histidina se ve favorecida por R647 que estabiliza la carga negativa del fosfato.

Los primeros pasos de la reacción son reversibles, lo cual se determinó por estudios donde se siguió el intercambio isotópico de O^{18} (O'Leary *et al.*, 1981; Fujita *et al.*, 1984a).

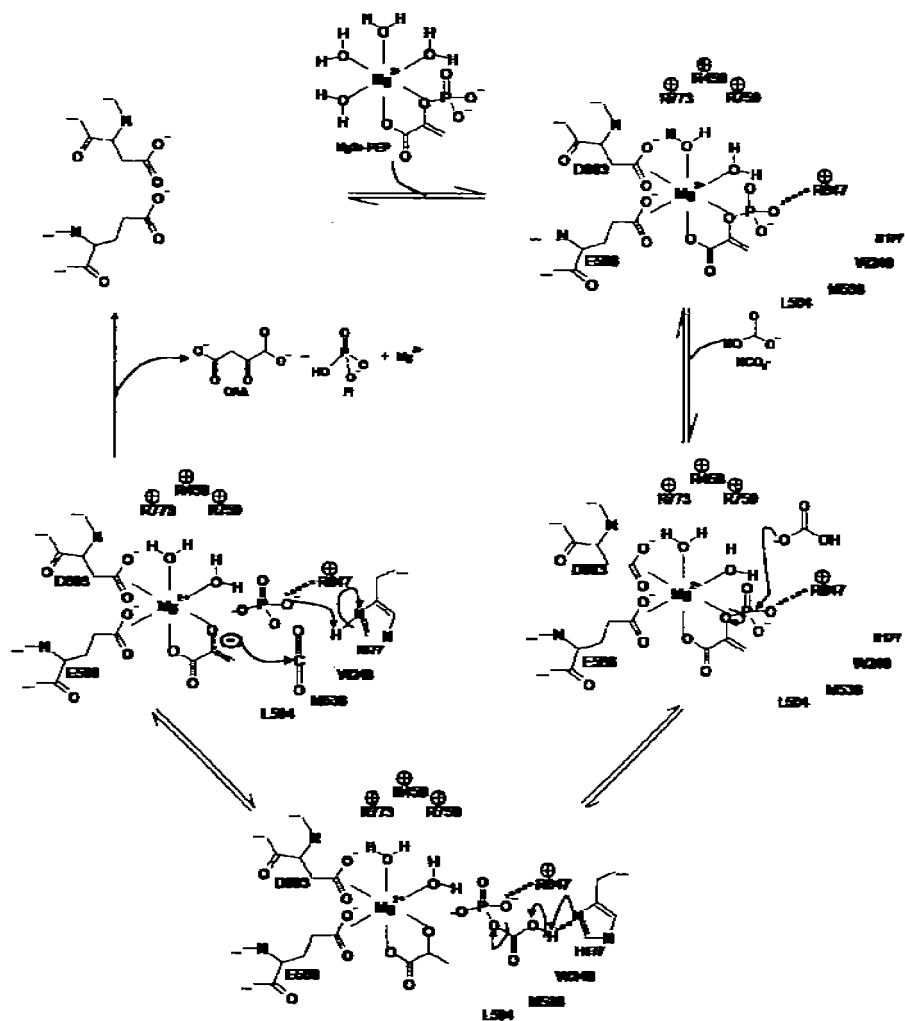


Figura II.4. Mecanismo de la reacción catalizada por PEPC. Se presentan los pasos de unión de sustratos a la enzima y los tres pasos de reacción con el respectivo movimiento de electrones, rompimiento y formación de enlaces y algunos aminoácidos que intervienen en la catálisis y en la estabilización de los sustratos e intermedios.

II.3.3. Regulación alostérica

La operación coordinada de los ciclos C_4 y de Calvin en las plantas C_4 requiere de complejos mecanismos de regulación, muchos de los cuales se dan a nivel de la C4-PEPC. La isoforma C_4 de PEPC debe tener una actividad tal que permita la velocidad de flujo de asimilación de CO_2 . Para ello es necesaria la existencia de un balance entre la activación y la inhibición de la enzima en la célula, lo que se da mediante la regulación alostérica y por fosforilación reversible de C4-PEPC, lo cual refleja su actividad las condiciones existentes en la hoja. En estudios *in vitro*, en los que se simulan condiciones fisiológicas, se ha estimado que la actividad basal de la C4-PEPC *in vivo* sería muy baja a no ser porque la acción conjunta de los activadores y la fosforilación, que activan a la enzima de tal forma, que permite que tenga la actividad necesaria para que su función fisiológica sea óptima (Tovar-Méndez *et al.*, 2000).

La regulación alostérica de C4-PEPC es de vital importancia para la regulación del ciclo C_4 . Se da a diferentes temperaturas y a diferentes concentraciones de CO_2 de tal forma que la asimilación de CO_2 , y por ende la fotosíntesis, se lleva a cabo eficientemente (Furbank & Leegood, 1985). Esta vía está sincronizada con el ciclo C_3 , y con la vía de síntesis de sacarosa (Doncaster & Leegood, 1987). Además es de vital importancia frenar el uso de PEP en el ciclo C_4 , ya que también es utilizado en otras vías metabólicas; por esta razón la actividad de PEPC en condiciones de oscuridad es muy baja. Así la ZmC4PEPC en condiciones fisiológicas de iluminación tiene mayor afinidad por PEP que en condiciones de oscuridad (Karabourniotis *et al.*, 1985; Rodríguez-Sotres *et al.*, 1987).

De las teorías existentes sobre los mecanismos de regulación alostérica de la ZmC4PEPC se ha propuesto que la enzima se encuentra en dos estados, uno con mayor afinidad por el sustrato (R) que el otro (T), de acuerdo con el modelo de Monod-Wyman-Changeux (MWC) (Monod *et al.*, 1965). Todas las subunidades que conforman a la proteína existen simultáneamente en alguno de estos dos estados conformacionales, a uno de los cuales los ligandos se unen preferentemente. Algunos autores proponen que el estado T de ZmC4PEPC está dado por los homodímeros de la enzima y el estado R por la asociación de estos dímeros para dar los homotetrámeros (Jawali, 1990; Podesta & Andreo, 1989), mientras que otros proponen que es el tetrámero el que sufre una isomerización concertada (Frank *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 2001). En ambos casos, los dos estados conformacionales se encuentran en equilibrio, que se desplaza en un sentido u otro cuando se une un ligando, dependiendo de que éste sea sustrato, activador o inhibidor. Una tercera propuesta—que está basada en los resultados obtenidos sobre los efectos

heterotrópicos de dos tipos diferentes de activadores alostéricos (Mújica-Jiménez *et al.*, 1998; Tovar-Méndez *et al.*, 2000)—es que existen múltiples estados conformacionales inducidos o estabilizados por los diferentes ligandos de la enzima (sustrato y efectores alostéricos).

II.3.3.1. Cooperatividad positiva de unión del sustrato

En concentraciones fisiológicas del catión libre (0.4 mM) y a pH cercano al fisiológico, las saturaciones con PEP muestran cooperatividad, mientras que a concentraciones altas del catión (10 mM) la cooperatividad disminuye (Tovar-Méndez *et al.*, 2000). Además, la $S_{0.5(MgPEP)}$, que es la concentración de sustrato a la cual se llega a la mitad del valor de la velocidad máxima, es aproximadamente cuatro veces mayor a concentraciones fisiológicas del catión libre que a concentraciones altas del metal (Tovar-Méndez *et al.* 2000). Estos efectos eran de esperarse debido a que la concentración del sustrato propuesto Mg^{2+} -PEP, que tiene una constante de estabilidad del complejo de 0.18 mM (Wold & Ballou, 1957), depende directamente de la concentración del catión. Cabe mencionar que a pH 8.3 no se observa cooperatividad de unión del sustrato a la enzima (Uedan & Sugiyama, 1976; Hayakawa *et al.*, 1981; Tovar-Méndez *et al.*, 1998).

En experimentos hechos con concentraciones de HCO_3^- cercanas a las fisiológicas se determinó que la $S_{0.5(PEP)}$ era mayor que la obtenida a concentraciones altas de este anión, además de que la V_{max} en las saturaciones con PEP disminuía en comparación a experimentos hechos a concentraciones mayores de HCO_3^- (Ogawa *et al.*, 1997; Parvathi *et al.*, 1998; Tovar-Méndez *et al.*, 2000). Estos efectos se explican porque dado que HCO_3^- se une después del PEP (Janc *et al.*, 1992), el valor de la V_{max} depende de la concentración de HCO_3^- (Tovar-Méndez *et al.*, 2000). Además se reporta que el grado de cooperatividad de PEP no se pierde a pesar del cambio de concentración de bicarbonato, lo que implica que este sustrato no se une cooperativamente (Tovar-Méndez *et al.*, 2000).

II.3.3.2. Inhibición alostérica

Los metabolitos inhibidores son ácidos dicarboxílicos, siendo los principales el L-malato y el L-aspartato ya que son los que inhiben más a la enzima, aunque también se han reportado

como inhibidores al fosfato inorgánico (Pi), al L-glutamato y al 2-oxoglutarato (Doncaster & Leegood, 1987). En general la inhibición produce la disminución de la $V_{max(PEP)}$ y el aumento de la $S_{0.5(PEP)}$. Además la presencia de malato disminuye la unión de los aminoácidos neutros y viceversa, siendo estos ligantes mutuamente excluyentes, mientras que la Glc6P y el malato parecen unirse simultáneamente a la enzima, aunque son ligeramente competitivos entre sí (Tovar-Méndez *et al.* 2000). La presencia de malato en los experimentos de saturación de la ZmC4PEPC por glicina y Glc6P acentúa las diferencias cinéticas entre estos activadores, ya que en condiciones cercanas a las fisiológicas la Glc6P sólo produce el 2 % de la activación total producida por glicina ó alanina. Además, en presencia de malato, la $A_{0.5}$, que es la concentración del activador a la cual se llega a la mitad de la activación máxima, aumenta mucho más para glicina que para Glc6P (Tovar-Méndez *et al.* 2000).

Malato es relevante como metabolito en las plantas C₄, debido a que su presencia activa el transporte de éste a las células de vaina vascular y su concentración cambia a lo largo del tiempo llegando a ser de hasta 35 mM (Leegood, 1985; Stitt & Heldt, 1985b; Rodríguez-Sotres *et al.*, 1987).

También se ha reportado como inhibidor de PEPC de *Amaranthus viridis* al shikimato, que es un precursor de metabolitos aromáticos en general, el cual es un potente inhibidor competitivo de esta enzima y se observó que el efecto inhibitorio dependía del estado de fosforilación, para la enzima fosforilada la I_{50} tiene un valor de 71 μ M y para la enzima sin fosforilar de 12 μ M (Colombo *et al.*, 1998).

II.3.3.3. Activación alostérica

En general, el efecto de activación se observa como un aumento en la V_{max} , que es la velocidad máxima alcanzada por la enzima, y una disminución en la $S_{0.5}$ de PEP (Doncaster & Leegood, 1987). La activación se da primordialmente por: a) hexosas y triosas fosfato, siendo de entre ellas la glucosa-6-fosfato (Glc6P) la más relevante fisiológicamente (Wong & Davies, 1973; Coombs *et al.* 1973; Mukerji, 1977; Doncaster & Leegood, 1987) uniéndose al sitio alostérico de Glc6P (Tovar-Méndez *et al.* 1997), y b) los aminoácidos neutros, de los cuales los principales son glicina, L-alanina y L-serina (Doncaster & Leegood, 1987; Nishikido & Takanashi, 1973; Garson & Gray, 1991; Bandarian *et al.* 1992; Giffinta & Grover, 1995) que se unen al sitio alostérico de glicina (Bandarian *et al.* 1992). Los aminoácidos neutros se han

reportado como activadores solamente para las plantas monocotiledóneas (Nishikido & Takanashi, 1973).

Azúcares fosforilados

La Glc6P activa disminuyendo marcadamente la $S_{0.5(PEP)}$ y aumentando ligeramente la V_{max} (Coombs *et al.* 1973; Uedan & Sugiyama, 1976). En forma recíproca, concentraciones saturantes de los sustratos disminuyen el valor de $A_{0.5(Glc6P)}$, es decir que la concentración de Glc6P a la que se satura el sitio alostérico depende del grado de saturación del sitio activo y viceversa (Duff *et al.* 1995). La Glc6P también reduce la cooperatividad en la unión de los sustratos al sitio activo (Uedan & Sugiyama, 1976; Hayakawa *et al.* 1981; Gillinta & Grover, 1995; Tovar-Méndez *et al.* 1998). El efecto de Glc6P es doble: por una parte favorece la unión del complejo Mg^{2+} -PEP al sitio activo y por otra parte compite con el PEP libre por su unión al sitio alostérico de los azúcares fosforilados (Tovar-Méndez *et al.* 1998). A este respecto, la Glc6P libre es la especie que se une al sitio alostérico compitiendo por la unión a este sitio con PEP y otros azúcares fosforilados, mientras que la unión del complejo Mg^{2+} -Glc6P al sitio activo se da a concentraciones que generalmente son superiores a 15 o 20 mM del efector, compitiendo con Mg^{2+} -PEP (Mújica-Jiménez *et al.*, 1998; Tovar-Méndez *et al.*, 2000). Las triosas-P producen inhibición después de una concentración determinada por las mismas razones que Glc6P (Doncaster & Leegood, 1987; Mújica-Jiménez *et al.*, 1998), por esto se llegaron a reportar como inhibidores (Coombs & Baldry, 1975). La diferente afinidad del sitio activo y del sitio alostérico por las especies libres y los complejos con Mg^{2+} permite la plena expresión del potencial de activación de la enzima en presencia de estos activadores, ya que a las concentraciones fisiológicas de estos azúcares y las bajas concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} libre, las concentraciones de los complejos que compiten por la unión al sitio activo formados por estos compuestos no son significativas en comparación con las especies libres que se unen al sitio alostérico (Mújica-Jiménez *et al.*, 1998; Tovar-Méndez *et al.*, 2000).

Se reportó que Glc6P puede contrarrestar el efecto inhibitorio de malato (Ting & Osmond, 1973; Huber & Edwards, 1975), lo cual se observa en un aumento en el valor de la $I_{0.5(mal)}$, que es la concentración del inhibidor a la cual se tiene un 50% de inhibición, de aproximadamente 30 veces, que se traduce en una disminución de la afinidad de la enzima por malato (Gillinta & Grover, 1995). Estos experimentos se llevaron a cabo con ZmC4PEPC cuidando que no se proteolizara para conservar las propiedades regulatorias de la fosforilación, pero a concentraciones no fisiológicas de Mg^{2+} y $NaHCO_3$ (Gillinta & Grover, 1995). Sin embargo, se

ha encontrado que en condiciones cercanas a las fisiológicas de estos compuestos, la Glc6P no es muy efectiva en reducir la inhibición por malato (Tovar-Méndez *et al.* 2000).

A través de experimentos cinéticos y de unión al equilibrio, se determinó que el PEP funge también como activador no esencial, uniéndose al sitio alostérico de la enzima para Glc6P (Rustin *et al.* 1988; Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez *et al.* 1998). La unión de PEP libre al sitio alostérico se da cuando hay Mg^{2+} , PEP o el complejo Mg^{2+} -PEP unidos al sitio activo y no se observa esta unión con la enzima libre (Tovar-Méndez *et al.* 1998). Además la activación por PEP libre no se ve afectada por el estado de fosforilación de la enzima, por el pH o por la presencia de activadores, excepto por aquellos que unen al sitio de unión de Glc6P (Tovar-Méndez *et al.* 1998).

Algunos análogos de PEP actúan como activadores y otros como inhibidores competitivos. Inclusive hay algunos compuestos análogos al PEP que activan o inactivan dependiendo de las condiciones del ensayo. La razón del comportamiento de unos y de otros no parece estar relacionada con su afinidad por el Mg^{2+} y por tanto con su capacidad de formar complejos estables con éste (Mújica-Jiménez *et al.* 1998).

Aminoácidos neutros

Al igual que la Glc6P, los efectos observados en estudios de activación con glicina son un aumento en la V_{max} y una disminución en la $S_{0.5(PEP)}$ (Nishikido & Takanashi, 1973; Uedan & Sugiyama, 1976; Bandarian *et al.* 1992) o $S_{0.5(MgPEP)}$ (Tovar-Méndez, 1998), tanto en la forma fosforilada como en la no fosforilada de la enzima. Glicina elimina la cooperatividad en la unión de los sustratos al sitio activo, en condiciones fisiológicas es el único activador que logra este efecto (Tovar-Méndez, 1998; Tovar-Méndez *et al.* 2000).

También aumenta la afinidad por la unión de Mg^{2+} al sitio activo, esto se observa por la disminución de la $K_{m(Mg^{2+})}$ en aproximadamente tres veces sin alterar significativamente la V_{max} (Gillinta & Grover, 1995; Tovar-Méndez *et al.*, 1998). Los aumentos en la afinidad por el PEP y por el Mg^{2+} se dan en la misma proporción debido a que la unión de PEP al complejo de enzima- Mg^{2+} es altamente sinérgica si se considera que la unión de estos sustratos se da por separado (Janc *et al.* 1992). Considerando que el sustrato preferente es el complejo Mg^{2+} -PEP entonces dichos aumentos se dan proporcionalmente debido a que los dos se unen al simultaneamente. A pesar de los cambios que se dan en la afinidad de la enzima por el PEP y el Mg^{2+} en la presencia de glicina, este ligando no produce cambios significativos en lo que se refiere a la afinidad por HCO_3^- manteniendo prácticamente constante la $K_{m(HCO_3^-)}$ (Gillinta & Grover, 1995). La presencia

de este activador también aumenta el valor de la $I_{0.5(mal)}$ aproximadamente 10 veces, lo que se traduce en una disminución en la afinidad de la enzima por el inhibidor malato (Gillinta & Grover, 1995; Tovar-Méndez *et al.*, 2000).

La glicina aumenta la afinidad aparente de la enzima por la Glc6P disminuyendo la $A_{0.5(Glc6P)}$ (Gillinta & Grover, 1995; Bandarian *et al.* 1992; Tovar-Méndez *et al.* 1998; Tovar-Méndez *et al.* 2000).

En condiciones fisiológicas, la velocidad máxima aparente obtenida con glicina bajo condiciones parecidas a las fisiológicas es aproximadamente 3 veces mayor que la obtenida con Glc6P también en las mismas condiciones, y en presencia de 20 mM de malato la glicina disminuye los efectos de la inhibición dada por este efector negativo con mucha mayor eficiencia que la Glc6P, aumentando la velocidad hasta 150 veces, mientras que la Glc6P sólo la aumenta 3 veces (Tovar-Méndez *et al.* 2000).

La alanina en condiciones fisiológicas activa significativamente a la ZmC4PEPC, inclusive es mejor activador que la glicina (Tovar-Méndez *et al.* 2000), y puesto que es el aminoácido más abundante en el citosol de las células de mesófilo (Weiner & Heldt, 1992) pudiera ser este aminoácido el más importante en la regulación de esta enzima. Sin embargo, a bajas concentraciones de CO₂ cuando se da la fotorrespiración, la concentración de glicina aumenta lo suficiente para poder activar a la PEPC, mientras que la concentración de alanina disminuye (Leegood & vonCaemmerer, 1994). Es por ello que se ha propuesto que sea Gly el activador fisiológico de la PEPC en estas condiciones de fotorrespiración, aumentando el abastecimiento de CO₂ al ciclo de Calvin mediante el incremento en el flujo del ciclo C₄ (Tovar-Méndez *et al.*, 2000).

La glicina tiene efectos sinérgicos con Glc6P y con otros activadores que se unen al sitio de los azúcares fosforilados, disminuyendo la $S_{0.5(PEP)}$ y aumentando la V_{max} en mayor grado que en condiciones saturantes de cada activador por separado (Bandarian *et al.* 1992; Gillinta & Grover, 1995; Mújica-Jiménez *et al.*, 1998; Tovar-Méndez *et al.*, 2000).

II.3.3.4. Regulación por fosforilación

La PEPC tiene una regulación por medio de modificación covalente reversible que en el caso de la isoenzima de hojas de plantas C₄ responde al nivel de iluminación al que se encuentre sometida la planta (Jiao & Chollet, 1991; Bakrim *et al.*, 1993; Chollet *et al.*, 1996). Esta

modificación está dada por la fosforilación-desfosforilación de un residuo de serina en el extremo amino terminal de cada subunidad, que en el caso de ZmC4PEPC es S15 (Jiao *et al.*, 1991). La fosforilación de PEPC la lleva a cabo la PEPC cinasa (PEPC-K). Se ha demostrado que inhibidores citosólicos de síntesis de proteínas inhiben la fosforilación de PEPC y la actividad de PEPC-K, lo que sugiere que la actividad de PEPC-K, y por lo tanto con la fosforilación de PEPC, está relacionada con un proceso de biosíntesis de proteínas dependiente de luz (Jiao *et al.*, 1991; Bakrim *et al.*, 1993). Por medio de marcaje con ^{32}P se ha encontrado que la C₄-PEPC purificada a partir de hojas sometidas a iluminación está 14 veces más fosforilada que la purificada de hojas bajo condiciones de oscuridad (Jiao *et al.*, 1991). La inhibición de la fosforilación lleva a las plantas a un régimen de asimilación de CO₂ tipo C₃ (Bakrim *et al.*, 1993).

La fosforilación que ocurre en periodos de iluminación en plantas C₄ tiene efectos tales como disminuir la sensibilidad a malato aumentando el valor de la $K_{i(\text{malato})}$ (Jiao & Chollet, 1991). También aumenta la afinidad por PEP que se observa por la disminución de los valores de la $K_{m(\text{PEP})}$ y se refleja en un aumento de actividad catalítica a concentraciones subsaturantes de sustrato como son las fisiológicas. La respuesta de la enzima a los activadores alostéricos no se ve afectada significativamente (Jiao & Chollet, 1991; Tovar-Méndez *et al.*, 1998). También se ha reportado que en AhC4PEPC la fosforilación produce un aumento en la afinidad por HCO₃⁻ al disminuir la $K_{m(\text{HCO}_3)}$ un 50 % (Parvathi *et al.*, 2000).

En contraste con la regulación de la fosforilación de las CAM-PEPC y C₄-PEPC, la fosforilación en PEPC de tejidos C₃ (C₃-PEPC) y de células guarda de los estomas no se regula por los ciclos de luz y oscuridad (Jiao & Chollet, 1991).

II.4. ESTRUCTURA DE PEPC

II.4.1. Estructura primaria

Las primeras estructuras primarias que se dedujeron a partir de estudios de DNA complementario (cDNA) fueron las de la EcPEPC (Fujita *et al.*, 1984b), de la PEPC de *Anaebaena variabilis* (Katagari *et al.*, 1985) y de la ZmC4PEPC (Izui *et al.*, 1986). Ahora se conocen más de 20 secuencias de la PEPC de plantas, de cianobacterias y de bacterias termófilas extremas a partir de las cuales se ha obtenido información importante acerca de la filogenia de

esta enzima. De los estudios filogenéticos iniciales se dedujo que todas las PEPC proceden de un ancestro común (Yasushi *et al.*, 1999).

En base a alineamientos múltiples de las secuencias conocidas se determinó que el extremo carboxilo terminal está muy conservado, mientras que el amino terminal es variable (Ishijima *et al.*, 1985; Izui *et al.*, 1986). Esto llevó a pensar que en la región carboxilo terminal se encontraba el sitio activo, lo cual se confirmó posteriormente con las estructuras cristalográficas de la EcPEPC y de la ZmC4PEPC. También se sabe que hay aproximadamente 100 residuos conservados y 100 cambios conservadores, y que la identidad entre secuencias de plantas terrestres es de más del 70%, las principales diferencias se encuentran en la región amino terminal (Izui *et al.*, 2004).

Antes de que se obtuvieran las estructuras cristalográficas, por estudios de modificación química, se determinaron algunos de los residuos importantes para la catálisis y para la regulación alostérica de la enzima (Lepiniec *et al.*, 1994) que están conservados en todas las PEPC. Por ejemplo se encontró que los residuos de His y Lys de las secuencias TAHPT y QxVMxGYSDSxKDxG eran importantes para la catálisis (Jiao *et al.*, 1990). También se propuso que la secuencia FHGRGxxxxRGxxP intervenía en la unión de HCO_3^- , siendo la arginina marcada en negritas el residuo que interviene en esta unión (Yano *et al.*, 1995). En cuanto a la región de fosforilación, ED/RKxxSIDAQLMR es la secuencia conservada donde se lleva a cabo esta (en negritas se marca el residuo de serina que se fosforila) (Jiao *et al.*, 1991). En las secuencias mostradas los aminoácidos relevantes que intervienen en el sitio activo o en la regulación están marcados en negritas.

II.4.2. Estructura tridimensional

La mayor parte de las PEPC son homotetrámeros con un peso molecular característico de aproximadamente 400 kDa con la excepción de una isoforma de la PEPC de semillas de ricino y de algas verdes que es heterooctamérica, debido a que al homotetrámero característico se encuentran unidas cuatro subunidades más de un peso molecular de entre 57 y 64 kDa (Blonde & Plaxton, 2003). Esta forma heterooctamérica difiere con la isoforma homotetramérica de las semillas de ricino en que es más termoestable, tiene una mayor afinidad por activadores e inhibidores y facilita el flujo de malato para la síntesis de ácidos grasos, mientras que el

homotetrámero surte de ácidos dicarboxílicos a las reacciones de transaminación necesarias en la síntesis de proteínas (Blonde & Plaxton, 2003).

Hasta la fecha se han determinado las estructuras tridimensionales de las EcPEPC y ZmC4PEPC con diversos ligandos unidos (Tabla II.1). Estas estructuras son dímeros de dímeros y nos dan información importante acerca de la ubicación y composición del sitio activo y de algunos sitios alostéricos. En base a esto, se ha ampliado el conocimiento de los mecanismos de reacción y de regulación alostérica (Matsumura *et al.*, 2002; Kai *et al.*, 1999; Matsumura *et al.*, 1999; Kai *et al.*, 2003). Estas estructuras confirmaron observaciones previamente hechas por comparaciones de la estructura primaria, por modificaciones químicas y por mutagénesis sitio-dirigida.

Tabla II.1. Estructuras tridimensionales resueltas de PEPC. Se muestran los números de acceso del Banco de Datos de Proteínas (PDB por sus siglas en inglés), el organismo de origen y los ligandos unidos a la estructura.

Complejo	Organismo de origen	Número de acceso PDB
E-Aspartato	<i>E. coli</i>	1FIY
E-Aspartato-Mn ²⁺	<i>E. coli</i>	1QB4
E-Aspartato-Mn ²⁺ -DCDP	<i>E. coli</i>	1JQN
E-SO ₄ ²⁻	<i>Z. maize</i>	1JQO

Debido a diferencias conformacionales observadas entre las estructuras de la ZmC4PEPC y la EcPEPC se ha propuesto que la primera se encuentra en el estado R que es el más activo y la segunda en el estado T que es el menos activo (Matsumura *et al.*, 2002).

Se puede observar (Figura II.5) que la superficie de contacto entre el monómero A (azul) y el monómero B (morado) pertenecientes a una unidad dimérica, al igual que entre los monómeros C (rojo) y D (verde) pertenecientes a la otra unidad dimérica, es mayor que la superficie de contacto entre A y C o B y D. El área de la intercara entre monómeros de un dímero calculada para la enzima de *E. coli* es 1610 Å², mientras que la superficie de contacto entre monómero de diferentes dímeros es de 520 Å² (Kai *et al.*, 1999). Un enlace importante entre los dímeros, que es el área de contacto con menor superficie, es un puente salino entre los aminoácidos E493(463) y R498(468), en la numeración de ZmC4PEPC(EcPEPC), pertenecientes a dos subunidades adyacentes (Figura II.6 B).

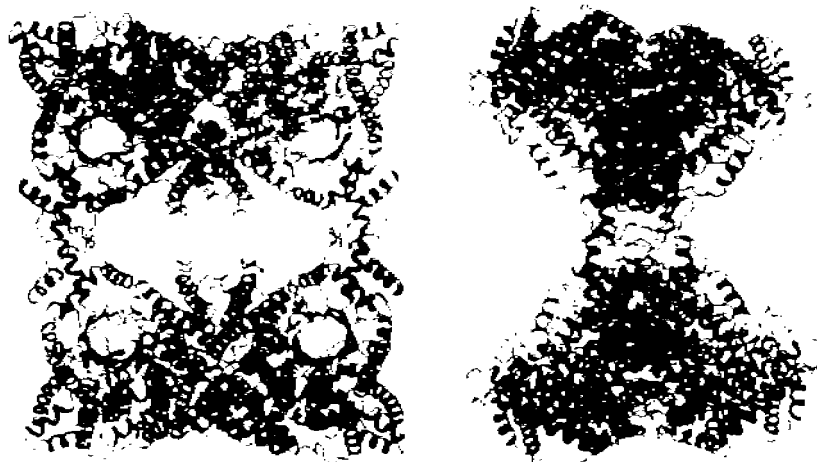


Figura II.5. Estructura tridimensional de ZmC4PEPC (Matsumura *et al.*, 2002)

Cada monómero está formado por un barril α/β que consta de ocho hebras β formando una hoja β que es una especie de cilindro torcido rodeado por aproximadamente 42 α -hélices en la ZmC4PEPC y 40 en la EcPEPC (Figuras II.6 A y II.7 A). En la región carboxilo terminal del barril β se encuentra el sitio activo (Figuras II.6 D, II.7 B) encontrado en el cristal de la EcPEPC con el catión divalente unido (Matsumura *et al.*, 1999). Este cristal se sumergió en una disolución de 3,3-dicloro-2-dihidroxifosfoenil metil-2-propenoato (DCDP) (Figura II.7 D), un compuesto análogo del PEP que se unió al sitio activo de la enzima. A pesar de que el estado T tiene una baja afinidad por los sustratos se ha encontrado que el DCDP tiene una alta afinidad por la EcPEPC, siendo los valores de K_i en presencia de Mg^{2+} y Mn^{2+} de 80 y 3 μM respectivamente (Jenkins *et al.*, 1987; Kai *et al.*, 2003) (Figura II.7), este comportamiento de la enzima con el DCDP se explica por la interacción que tienen los cloros del análogo con una bolsa hidrofóbica existente en el sitio activo.

En el sitio activo los aminoácidos responsables de la unión del metal son el E566(506) y el D603(543), los cuales se ubican en un asa ubicada en el extremo carboxilo terminal del barril. Forman un complejo enzima-metal con una geometría octaédrica ocupando dos de las seis posiciones posibles alrededor del metal, mientras que las otras cuatro están ocupadas por aguas en el complejo E-aspartato- Mn^{2+} , o por aguas y el análogo del PEP en el complejo E-aspartato- Mn^{2+} -DCDP (Matsumura *et al.* 1999). Además de unirse al metal, el grupo fosfato del análogo de PEP está unido por interacciones iónicas a los residuos R456(396) de la hebra $\beta 3$, a R759(699)

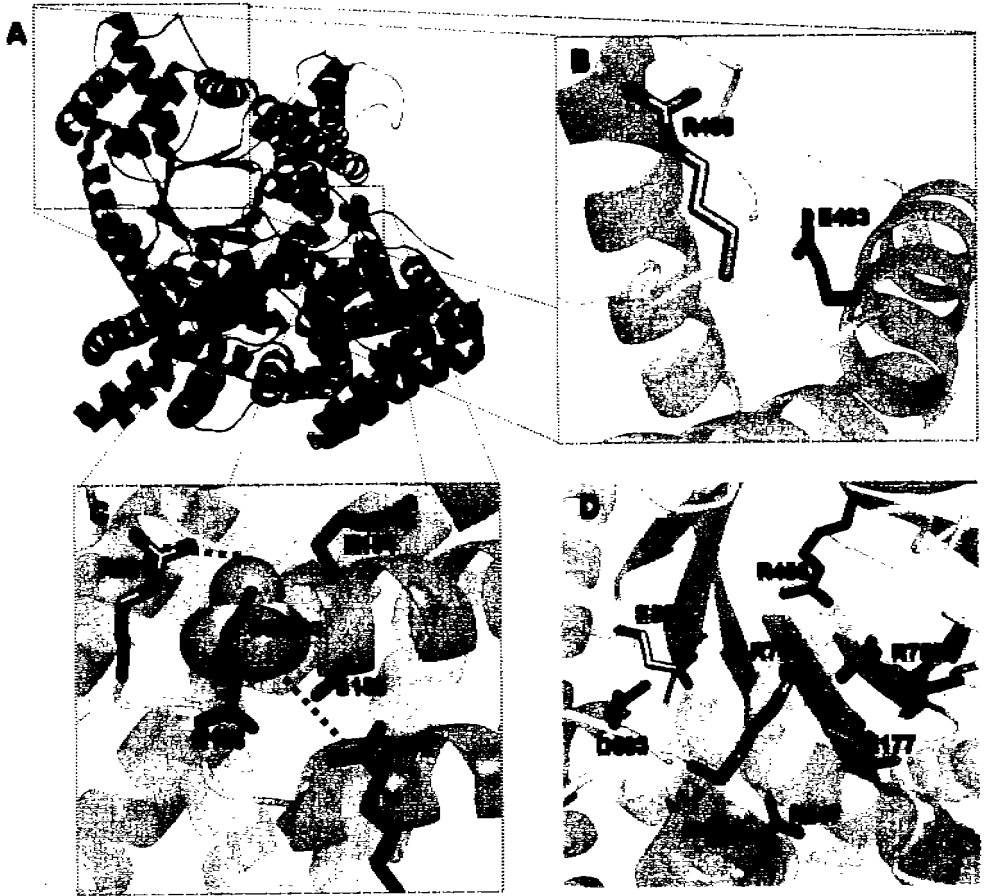


Figura 11.6. Estructuras del monómero, del sitio activo, del sitio de unión de los dímeros y del sitio alostérico para azúcares fosforilados de la ZmC4PEPC. A) Monómero de ZmC4PEPC donde están enmarcados los sitios de interés y se muestra en lila el barril β , en azul las α -hélices y en mamey las asas. B) Aminoácidos que intervienen en la unión de los dímeros. C) Sitio de unión del ion sulfato propuesto como el sitio de unión de Glc6P y en líneas rojas punteadas se representan los puentes salinos. D) Sitio activo con la histidina catalítica y los aminoácidos que unen al metal divalente y a PEP.

y R773(713), ambas ubicadas en el asa flexible rica en glicinas (GRGGXXGR⁶⁴⁷⁽⁵⁸⁷⁾GG (XX = TS o VI), que sale de la hélice α 32 (α 31 en EcPEPC). La R647(587), un residuo que por mutación sitio dirigida se ha comprobado que es esencial para la catálisis (Yano et. al. 1995), también podría unirse al PEP. En la estructura tridimensional de la EcPEPC, R647(587) está alejada del sitio activo porque está unida al efector negativo aspartato (Figura 11.7 C) (Kai *et al.*,

1999; Matsumura *et al.*, 2002). En la estructura de la ZmC4PEPC que se obtuvo en ausencia del inhibidor, el átomo N_ε de R647(587) se mueve 15 Å aproximadamente hacia el sitio activo y en esta posición se supone que ayuda a estabilizar la unión del PEP (Figura II.6 D) (Matsumura *et al.*, 2002).

En la estructura de la ZmC4PEPC se halló un sulfato unido en la intercara de mayor área formada por los monómeros en la región del amino terminal de α7 (Figura II.6 C) (Matsumura *et al.*, 2002), que se encuentra rodeado por los residuos R183(144), R184(145), R231(192) y R372(313). Debido a esto, se propuso a este sitio como el sitio de unión de los azúcares fosforilados, ya que se ha reportado que en los sitios donde se une un grupo fosforilo se puede unir un grupo sulfato (Pai *et al.*, 1977).

El HCO₃⁻ no se encuentra en ninguna de las estructuras determinadas, pero por estudios de mutagénesis sitio dirigida (Kai *et al.*, 1999) se sabe que los aminoácidos K762(702), R763(703) y R764(704) ubicados en un asa de la que no se observa densidad electrónica por su alta flexibilidad en ninguna de las estructuras resueltas, son esenciales para la catálisis y posiblemente sirvan para unir el bicarbonato. Esta asa está formada por los aminoácidos AK⁷⁶²⁽⁷⁰²⁾P⁷⁶³⁽⁷⁰³⁾R⁷⁶⁴⁽⁷⁰⁴⁾PG^(T)GGI y se cree que su función es cerrar el sitio activo para evitar que entren moléculas de agua y se dé la reacción de hidrólisis del PEP (Kai *et al.*, 1999). Aun cuando no se observa densidad electrónica en las estructuras resueltas, la posición que debe ocupar esta asa es sobre el barril α/β en la región carboxilo terminal, una posición que es congruente con el papel propuesto para esta asa. En la figura II.6 A se pueden observar los dos extremos de la parte móvil del asa.

El aspartato se encontró unido a la EcPEPC (Figura II.7 C) por medio de puentes salinos a los residuos R587, K773, R832 y de un puente de hidrógeno con N881 (Kai *et al.*, 1999), equivalentes a los residuos R647, K835, R894 y N968 de la ZmC4PEPC.

El sitio de unión de los aminoácidos neutros, los cuales se reportan como activadores únicamente de la isoforma C₄ de la PEPC de plantas monocotiledóneas, como lo es *Zea mays*, no se ha encontrado hasta la fecha. Por medio de mutagénesis sitio dirigida se encontró que las mutantes K927Q y G937D provocan la insensibilización de la enzima por el efector. Se ha propuesto que K927 y G937 forman parte de una bolsa en donde se podría encontrar el sitio de unión de glicina. Parte de esta bolsa está formada por un asa móvil de siete residuos que van de F929 a P935 la cual se ha propuesto que contribuye a la unión de este efector positivo (Gonzalez *et al.*, 2007). Además en las mutantes K934Q y K940Q se debilita la unión de glicina, mientras que al quitar cargas negativas con la mutante E932Q de la misma asa se aumenta la afinidad por la misma

(Gonzalez *et al.*, 2007). También se ha reportado que las mutaciones D228N y R232Q producen una disminución en la afinidad de la ZmC4PEPC por glicina, medida por el valor de $A_{0.5}$, de 20 y 60 veces, respectivamente, y por lo tanto se cree que estos aminoácidos también participan en la unión de glicina (Yuan *et al.*, 2006). Las mutaciones R226Q y E229A tienen una activación escasa a glicina en esta misma enzima, de tal forma que no se obtuvieron estimados confiables de los parámetros cinéticos de estas mutantes. Debido a esto se propuso que R226 y E229 intervienen en la regulación por glicina, los cuales se encuentran ubicados entre el sitio de

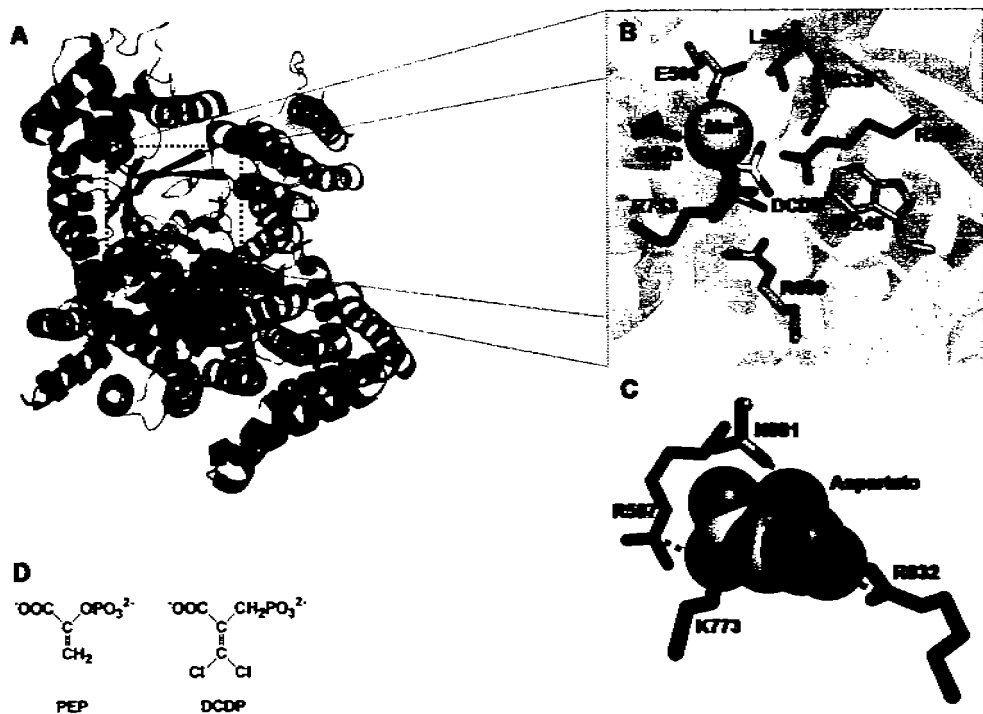


Figura II.7. Estructuras del monómero, del sitio activo y del sitio alostérico para el inhibidor de la EcPEPC, junto con las estructuras de PEP y DCDP. A) Monómero con el sitio activo encerrados en el recuadro rojo donde se encuentra el catión divalente y el DCDP y el sitio de unión del inhibidor encerrado en el recuadro naranja donde se encuentra unido el aspartato. B) Aminoácidos del sitio activo que unen al metal, al DCDP y los que forman la bolsa hidrofóbica. C) Aminoácidos que intervienen en la unión del aspartato. D) Estructura de PEP y de su molécula análoga DCDP.

unión de Glc6P y el sitio propuesto para la unión de glicina (Figura VII.17 C y E) (Yuan *et al.*, 2006). Además, en la mutante E229A se disminuye la afinidad por el inhibidor malato (Yuan *et al.*, 2006).

al., 2006), dado que el C_α de E229(224) está situado a 10 Å del sitio de unión del inhibidor, lo que sugiere que este aminoácido juega un papel importante en la comunicación entre estos dos sitios alostéricos. Esto es además congruente con la propuesta de que la glicina y el malato se unen a la enzima de forma mutuamente excluyente (Tovar-Méndez *et al.*, 2000).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el trabajo de tesis se llevó a cabo el estudio de las propiedades alostéricas de la PEPC de hojas de la planta dicotiledónea *Amaranthus hypochondriacus* (AbC4PEPC) para poder realizar una comparación con la regulación de esta enzima en plantas monocotiledóneas, concretamente con la enzima de hojas de *Zea mays* (ZmC4PEPC).

Los resultados más importantes obtenidos hasta la fecha por el grupo de la Dra. Muñoz Clares en estudios encaminados a entender la regulación integrada de la actividad de la ZmC4PEPC, es decir la forma en que interactúan los diferentes factores involucrados en esta regulación, son: 1) El verdadero sustrato de la reacción es el complejo del PEP con el ion Mg²⁺ (Tovar-Méndez *et al.*, 1998), cuyas concentraciones intracelulares en condiciones fisiológicas son muy bajas (Tovar-Méndez *et al.*, 2000); 2) el PEP libre es un activador que se une al mismo sitio alostérico que los azúcares fosforilados, como Glc6P y triosas fosfato (Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990); 3) los efectos de estos activadores son sinérgicos con los de otro tipo de activadores alostéricos, por ejemplo los aminoácidos neutros glicina o alanina (Tovar-Méndez *et al.*, 2000); 4) en condiciones cercanas a las que se proponen existen durante el periodo de luz, el efecto del inhibidor alostérico, malato, no puede ser contrarrestado por Glc6P, pero sí por glicina o alanina (Tovar-Méndez *et al.*, 2000). Estos últimos resultados indican que la activación de la C₄PEPC de plantas monocotiledóneas por los aminoácidos neutros es fundamental para su funcionamiento *in vivo*, dado que durante el periodo de luz, cuando la enzima debe ser activa, los niveles intracelulares del inhibidor malato son muy elevados (Rodríguez-Sotres *et al.*, 1987). Se desconoce cuál es el papel de los efectores alostéricos, si es que existe alguno, en la regulación de la enzima durante el periodo de oscuridad.

Por otra parte, se ha reportado que los aminoácidos neutros no son activadores de la isoenzima fotosintética PEPC de plantas C₄ dicotiledóneas (Nishikido & Takanashi, 1973). Sin embargo, los estudios en los que se basa esta aseveración no fueron hechos en condiciones similares a las fisiológicas, por lo que se repitieron en estas condiciones para confirmar o

descartar esta afirmación. De confirmarse, habría que estudiar entonces si el papel que en la regulación de la PEPC fotosintética de las monocotiledóneas juegan los aminoácidos neutros, es en las dicotiledóneas jugado por los azúcares fosforilados.

En este contexto, se investigó por medio de alineamientos múltiples y modelaje molecular si los residuos de aminoácidos que han sido involucrados en la regulación alostérica de la enzima, particularmente los que se ha propuesto forman el sitio que une a glicina, están conservados en la enzima AhC4PEPC y podrían conformar dichos sitios.

IV. HIPÓTESIS

La activación de AhC4PEPC por medio de aminoácidos neutros será mucho menor a la de ZmC4PEPC y esto se deberá a diferencias estructurales entre ambas enzimas y no a las condiciones en que se realizan los ensayos. Por otra parte, los azúcares fosforilados serán los activadores principales de la AhC4PEPC y sustituirán en este papel a los aminoácidos neutros.

V. OBJETIVOS

V.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar las diferencias en la regulación alostérica entre las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas monocotiledóneas (*Zea mays*) y de plantas dicotiledóneas (*Amaranthus hypochondriacus*).

V.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar las propiedades cinéticas de las enzimas ZmC4PEPC y AhC4PEPC en su estado no fosforilado en condiciones cercanas a las prevalecientes durante el periodo de oscuridad.
2. Investigar si la enzima AhC4PEPC se activa por aminoácidos neutros en estas condiciones, igual que lo hace en plantas monocotiledóneas.

3. Estudiar el mecanismo de activación por azúcares fosforilados de la AhC4PEPC, mecanismo que pudiera ser diferente al que presenta la enzima de plantas monocotiledóneas.
4. Comparar las estructuras primaria y tridimensional de las dos enzimas para tratar de explicar las diferencias de regulación alostérica entre ellas, en caso de encontrarse éstas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO

La enzima se extrajo de las hojas de *Zea mays* o de *Amaranthus hypochondriacus*, las cuales crecieron en invernadero iluminado con luz natural a una temperatura de entre 20 y 30 °C. Se usaron plantas de 6 a 8 semanas de crecimiento. Para la purificación de la enzima se dejaron a las plantas en oscuridad durante un periodo de aproximadamente 11 horas, y las hojas colectadas se almacenaron a -78°C hasta su uso.

VI.2. REACTIVOS Y COLUMNAS DE CROMATOGRAFÍA

Reactivos:

De Sigma: Glicina (ácido aminoacético, pureza > 99%), HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-piperazina-1-etanosulfónico, 99.5%), málico deshidrogenasa, Glc6P sal monosódica (pureza 99%), Ácido málico (sal disódica, pureza 98%), β -NADH (sal disódica, pureza 98%), EDTA (sal disódica dihidratada de etilendiaminotetraacético, pureza 99+%), β -mercaptoetanol, TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina, pureza 99%), SDS (dodecilsulfato de sodio, pureza > 99%), PEP (sal de ciclohexilamonio de fosfoenolpiruvato o sal de ciclohexilamonio de 2-(fosfonooxi)-2-propanato, pureza 99%), DTT (DL-ditiotreitol, pureza 99%), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo o fluoruro de α -toluensulfonilo, pureza \geq 98.5%).

De J.T.Baker: Fosfato de potasio dibásico (pureza 99.5%), fosfato de potasio monobásico (pureza 99.1%), cloruro de magnesio, sulfato de amonio granular (pureza 99%), metanol (pureza > 99.5%), glicerol anhidro (pureza 99.9%).

De MERCK: Tris (hidroximetil) aminometano (pureza 99.8%).

De BIO-RAD: Albúmina de suero de bovino (BSA) liofilizada, reactivo Bradford concentrado, bisacrilamida (N,N'-metilen-bis-acrilamida), acrilamida (pureza 99.9 %).

De Química JVC: Bicarbonato de sodio (pureza 99.7%), persulfato de amonio (pureza $\geq 98\%$), azul de Coomassie R-250, hidróxido de potasio (pureza $\geq 85\%$).

Columnas de cromatografía:

General Electric: Sefadex G25, DEAE-Sephacel, Sefarosa QFF, Superdex 200 HR 10/30.

VL3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PEPC

Purificación de AhC4PEPC

Se licuaron 200 g de hoja en 1 litro de amortiguador A (HEPES-KOH 50 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM; glicerol 10 % (v/v); β -mercaptoetanol 10 mM; fosfatos 25 mM; $MgCl_2$ 10 mM; malato 5 mM; PMSF 1 mM; benzamidina 2 mM) a 4° C. El extracto libre de células se filtró a través de cuatro capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 10,733 g durante 15 minutos. Con el fin de eliminar la gran cantidad de pigmentos que contienen las hojas de amaranto, al sobrenadante se le agregó lentamente y con agitación la cantidad necesaria de sulfato de amonio para llegar al 30% (p/v) de saturación (176 g/l) tras lo cual se centrifugó a 123,158 g durante 30 minutos. Al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio necesario para llegar a 70% (p/v) de saturación (273 g/l); se centrifugó de nuevo a 123,158 g durante 30 minutos y el sedimento se resuspendió con amortiguador A. La resuspensión se aplicó a una columna (2.7 \times 30 cm) de Sefadex G25 equilibrada con amortiguador A y se eluyó con el mismo amortiguador a una velocidad de flujo de 2 ml/min. Las fracciones colectadas se agregaron a una columna (2.7 \times 11 cm) de DEAE-Sephacel equilibrada con amortiguador A y se eluyó con un gradiente de fosfatos de 25-350 mM a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Las fracciones colectadas se agregaron a una columna (2.7 \times 30 cm) de Sefadex G25 bajo el mismo procedimiento para esta columna usando ahora un amortiguador igual al A pero sin $MgCl_2$, benzamidina ni PMSF (amortiguador B). Las fracciones colectadas se agregaron a una columna (2.5 \times 12.5 cm) de Sefarosa Q de flujo rápido (Sefarosa QFF) equilibrada con amortiguador B y se eluyó con un gradiente de fosfatos de 25-350 mM a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Las fracciones colectadas se agregaron a un Centricón 100 (Amicon, Inc.) donde se centrifugaron a 10,733 g durante 15 minutos para concentrar. El concentrado se llevó a un volumen de 100 μ l por Centricón 100, los cuales se agregaron a una columna de exclusión molecular Superdex 200 HR 10/30 acoplada a un sistema

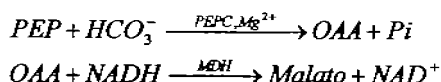
HPLC Waters 616/626. Esta columna se equilibró con amortiguador C (igual al amortiguador B pero sin fosfatos ni malato) y se eluyó con el mismo amortiguador a una velocidad de flujo de 0.3 ml/min. Las alícuotas obtenidas se juntaron, se les midió actividad y se dividieron en alícuotas que se almacenaron a -78°C hasta su uso.

Purificación de ZmCAPEPC

Se realizó usando el protocolo puesto a punto en nuestro laboratorio (Tovar-Méndez *et al.*, 1997). Las hojas se homogeneizaron en una licuadora comercial a 4°C con 3 mL de amortiguador A1 por cada gramo de tejido (amortiguador A1: HEPES-KOH 50 mM, pH 7.3, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v), DTT 5 mM, MgCl_2 10 mM, malato 5 mM, PMSF 1mM, benzamidina 2 mM, quimostatina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 mM de fosfato de potasio). El homogenizado se filtró a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó a 137,000 g por 30 min a 4°C . El sobrenadante se aplicó a una columna (13 \times 11 cm) de DEAE-Sephacel equilibrada con el amortiguador A1. Posteriormente la columna se eluyó con 200 mL de gradiente lineal de 25-500 mM de fosfato de potasio en el amortiguador A1, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Las fracciones resultantes de la elución que contenían actividad PEPC se agregaron a una columna (1.5 \times 7 cm) de Sefarosa QFF equilibrada con el amortiguador B1 (amortiguador B1: amortiguador A1 excepto quimostatina y PMSF). Posteriormente, la columna se eluyó con 50 ml de un gradiente lineal de 25-500 mM de fosfato de potasio en el amortiguador B1 a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Las fracciones resultantes de la elución que contenían a PEPC se reunieron y se concentraron en Centricon 100 (Amicon) y se aplicaron posteriormente a una columna de exclusión molecular Superdex 200 HR 10/30 acoplada al sistema de HPLC Waters 616/626; esta columna fue equilibrada con amortiguador C1 (amortiguador C1: HEPES-KOH 500 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v), DTT 5 mM). La cromatografía se realizó a una velocidad de flujo de 0.3 ml/min. Las fracciones que contenían la enzima tetramérica se reunieron y se almacenaron en alícuotas a -78°C .

VI.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se realizó por medio de un ensayo acoplado en el cual el producto de la carboxilación del PEP, el oxaloacetato, es sustrato de la malato deshidrogenasa (MDH), la cual lo reduce a malato con la concomitante oxidación del NADH a NAD^+ :



El seguimiento de esta oxidación se llevó a cabo espectrofotométricamente con el equipo PERKIN ELMER UV/VIS Spectrometer Lambda Bio 10 por la desaparición de NADH a 340 nm, ya que a esta longitud de onda el NADH absorbe mientras que el NAD⁺ no. Las condiciones del ensayo estándar para la determinación de actividad de la enzima al purificarla y para los controles de actividad de la enzima fueron: 100 mM de HEPES-KOH, pH 7.3, 0.1 mM de EDTA, 0.2 mM de NADH, 9 U de MDH, 5 mM de PEP, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de NaHCO₃ a 30 °C. El volumen total del medio de reacción en la cubeta del espectrofotómetro fue de 500 µl. La reacción se dispara con 10 µl de la preparación enzimática. La unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un micromol de producto por minuto en las condiciones especificadas en cada caso.

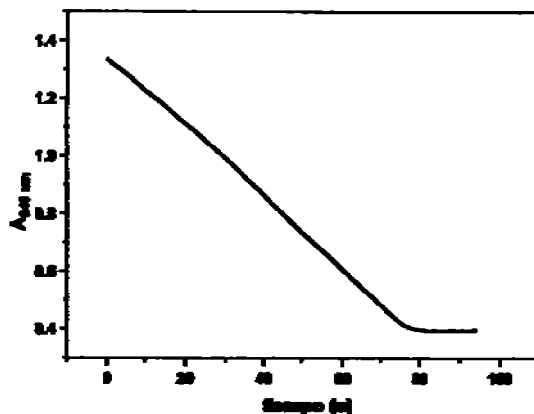


Figura VI.1. Curso temporal de la reacción catalizada por PEPC. Se observa la conversión de NADH a NAD⁺ siguiendo el cambio de absorbancia a 340 nm.

Este ensayo, en el intervalo lineal que se da aproximadamente en los primeros 60 segundos de la reacción (Figura VI.1), nos da el valor del cambio de absorbancia con respecto al tiempo (ΔA) con el cual se calculó el valor de actividad enzimática a partir de la siguiente ecuación.

$$AE = \frac{\Delta A}{\epsilon v}$$

En donde:

AE es la actividad enzimática (U/ml)

ΔA es la diferencia de absorbancia a 340 nm/min con respecto al tiempo

ϵ es el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm ($6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

v es el volumen de la preparación de enzima usado en el ensayo, expresado en mililitros

Descripción del experimento

Para las saturaciones de la AhC4PEPC y de la ZmC4PEPC con los diferentes ligandos se varió la concentración del ligando con el que se saturó, manteniendo constantes las demás condiciones de reacción. La temperatura (30 °C), el pH (7.3) y la concentración del amortiguador así como de los reactivos de la reacción acoplada fueron los mismos que en el ensayo estándar; la concentración del magnesio libre (0.4 mM) se mantuvo constante en todos los experimentos (Tabla VI.1), mientras que la concentración del NaHCO₃ y del PEP, así como de los efectores alostéricos (malato, Glc6P y glicina) variaron como se indica en cada experimento. La determinación de $I_{0.5}$ para comprobar el grado de fosforilación e integridad de la enzima se realizó en las siguientes condiciones: HEPES-KOH 100 mM, PEP 2.5 mM, NaHCO₃ 1 mM y MgCl₂ 5 mM, pH 7.3 y 30 °C.

Tabla VI.1. Compuestos con concentración constante en el medio de ensayo.

	Concentración
HEPES-KOH	100 mM
EDTA	0.1 mM
NADH	0.2 mM
Mg ²⁺ libre	0.4 mM
MDH	4 U

VI.5. CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS ESPECIES LIBRES Y EN COMPLEJO CON Mg²⁺

Cuando el experimento requiere que el magnesio libre se encuentre a una concentración de 0.4 mM es necesario calcular la concentración total a usar en cada punto de la saturación para

cada concentración de PEP. Para ello se usó el programa de cómputo “Metal Complex” (Rodríguez-Sotres & Muñoz-Clares, 1990), que a partir de las concentraciones totales de cada sustancia que se encuentra en la disolución y la constante de disociación de su complejo con el magnesio (Tabla VI.2) determina las concentraciones de las diferentes especies.

Tabla VI.2. Constantes de disociación de los complejos con Mg^{2+} o constantes ácido-base de las sustancias en el medio de reacción. A partir de estos valores se calcularon las concentraciones de las diferentes especies libres y acomplejadas con el metal de cada una de ellas de magnesio libre.

	Constante de disociación (mM)		Constante de disociación (mM)
MgMal	3.500×10^{-2}	MgCO ₃	2.340×10^{-1}
MgPEP	1.800×10^{-1}	MgHCO ₃	7.430×10^4
MgGlc6P	6.494×10^{-2}	MgEDTA	3.980×10^5
MgGly	1.995×10^{-2}	HEDTA	2.190×10^7
HPEP	2.240×10^3	MgHEDTA	3.980×10^9
HCO ₃	1.259×10^7	MgNADH	1.000×10^{-1}

VI.6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Se cuantificó la concentración de proteína usando un método espectrofotométrico y un método colorimétrico.

Método espectrofotométrico

El fundamento del método espectrofotométrico se basa en la relación entre la absorbancia de los residuos aromáticos a 280 nm y la concentración de proteína. Cada proteína tiene un valor de absorbancia a una concentración de 1 mg/ml (Tabla VI.3) que se obtiene de la base de datos en internet del Swiss Institute of Informatics (<http://expasy.org>). El procedimiento de búsqueda es el siguiente: en la ventana del buscador se introduce el número de acceso (Tabla VI.3) y se despliega un portal donde se encuentra información sobre la enzima. En la parte inferior del portal se encuentran ligas de herramientas para el análisis de proteínas y en el grupo de herramientas de análisis de secuencias usamos la liga a ProtParam.

Tabla VI.3. Valores de absorbancia a 280 nm. Los valores están dados para las ZmC4PEPC y AhC4PEPC puras a una concentración de 1 mg/ml.

	Absorbancia de la proteína sin cistinas	Absorbancia de la proteína con cistinas	Número de acceso UniProtKB/Swiss-Prot
ZmC4PEPC	1.022	1.028	P04711
AhC4PEPC	1.061	1.065	Q43299

Para determinar la absorbancia experimental de la preparación de enzima a la cual le determinamos la concentración de proteína se procedió de la siguiente manera: con el mismo espectrofotómetro usado para la determinación de actividad, se realizó un barrido de longitud de onda de 200 nm a 400 nm y se tomó el valor de absorbancia a 280 nm. Para realizar esta medición se usó una cubeta de cuarzo de un volumen de 50 μ l. El blanco se hizo con 50 μ l del amortiguador en que está la enzima, asegurándonos de que a lo largo del barrido de longitud de onda la absorbancia del blanco fuera cero. De ser necesario, la preparación se diluía 1:5 o 1:10 con el mismo amortiguador y con la dilución se hacía el barrido con el fin de obtener valores confiables de absorbancia. El cálculo se hizo dividiendo los valores de absorbancia por el factor que arroja el programa considerando que en la enzima no hay cistinas debido a que en el amortiguador hay β -mercaptoetanol y las cisteínas están por tanto reducidas.

Método colorimétrico

Se usó el descrito por Bradford (Bradford, 1976). El procedimiento que se siguió es el siguiente: se realizó una curva patrón (Figura VI.2) con BSA a una concentración de 2.72 mg/ml. En siete tubos de ensayo se realizaron las preparaciones para cada punto de la curva patrón (Tabla VI.4). A los 50 μ l de cada tubo de la preparación (Tabla VI.2) se agregaron 50 μ l de HEPES-KOH 50 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v), DTT 1 mM y benzamidina 1 mM (amortiguador D). A estos 100 μ l se les añadieron 5 ml de disolución de Bradford, la cual se diluye 5 veces con agua desionizada y se filtra previamente. Finalmente se determinaron las absorbancias de cada tubo a 595 nm, para lo cual se utilizó el espectrofotómetro Beckman DU-7500 (Beckman Instruments, Fullerton, CA).

Tabla VL4. Condiciones de la curva patrón usadas para la determinación de concentración de proteína por el método de Bradford.

Tubo	[BSA] (μg)	Volumen de disolución de BSA (μl)	Agua (μl)
1	0	0	50
2	5	1.84	48.16
3	10	3.68	46.32
4	15	5.51	44.49
5	20	7.35	42.65
6	25	9.19	40.81
7	30	11.03	39.97

Las muestras problema se prepararon agregando un volumen igual o menor a 50 μl de la preparación de la enzima almacenada, de manera que la absorbancia resultante quedara dentro del intervalo de valores de la curva patrón. Por ejemplo, si los valores de absorbancia en la curva iban de cero a 0.359 (Figura VL2), el valor de la muestra a determinar debía quedar dentro de este intervalo. De ser necesario, se agrega el volumen faltante de amortiguador D para completar los 50 μl . Posteriormente se agregaron 50 μl de agua desionizada y los 5 ml de la disolución de Bradford, para finalmente realizar la determinación de absorbancia de la muestra. Los valores de absorbancia de las muestras se interpolaron en la curva patrón, obteniéndose así los gramos de proteína de la muestra. La cantidad de gramos resultante se dividió entre el volumen de muestra agregado para obtener la concentración de proteína.

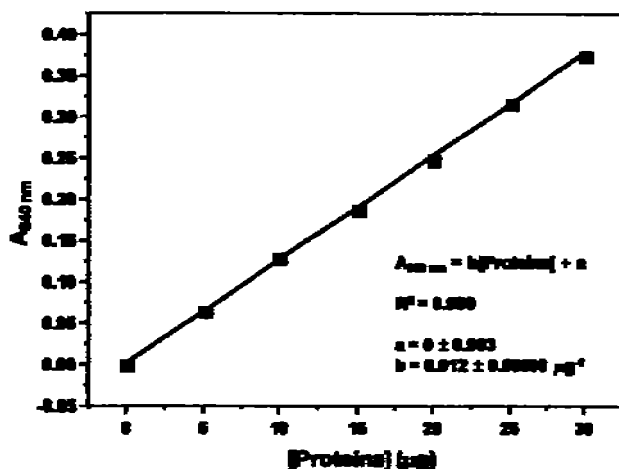


Figura VL2. Curva patrón para la determinación de proteínas por el método de Bradford.

VI.7. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Para determinar la pureza de la enzima se realizó esta técnica de acuerdo al procedimiento descrito por Laemli (Laemli, 1970).

Tabla VI.5. Cantidades necesarias para preparar las disoluciones del gel apilador y del gel separación.

	Gel separador (ml)	Gel apilador (ml)
Acrilamida (1)	3.33	0.67
Amortiguador para gel separador (2)	2.50	—
Amortiguador para gel apilador (3)	—	1.25
SDS (4)	0.10	0.05
Agua desionizada	4.00	3.00
Persulfato de amonio (5)	0.10	0.10
TEMED	0.013	0.013
Volumen total	10	5

Donde las disoluciones usadas tienen la siguiente composición:

1. Acrilamida 30 % (p/v), bisacrilamida 2.7 % (p/v).
2. Tris 1.5 M, ajustado a pH 8.8 con HCl concentrado.
3. Tris 0.5 M, ajustado a pH 6.8 con HCl concentrado.
4. SDS 10 % (p/v).
5. Persulfato de amonio 10 % (p/v).
6. Amortiguador para las muestras: Tris 0.125 M, SDS 4 % (p/v), glicerol 20 % (v/v), β -mercaptoetanol 10 % (v/v) y azul de bromofenol.
7. Disolución de azul brillante de Coomasie: Azul Coomasie R-250 0.125 % (p/v), metanol 50 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v).

El gel consta de dos zonas: una de concentración de las proteínas (acrilamida 4 % (p/v), pH 6.8) conocido como gel apilador, y otra donde se lleva a cabo la separación de éstas por peso molecular (acrilamida 10 % (p/v), pH 8.8) conocido como gel separador. Con los componentes necesarios (Tabla VI.5) se prepararon dos disoluciones, que posteriormente se gelificaron.

El TEMED se agregó hasta el momento en que la disolución se agregó a la cámara de electroforesis, ya que éste promueve la polimerización de la acrilamida la cual debe suceder en la cámara. Primero se agregó la disolución para formar el gel separador, y una vez gelificado se agregó la disolución para formar el gel apilador junto con el peine para formar los pozos donde se adicionan las muestras de proteína.

Para preparar las muestras se tomó el volumen necesario para que tener 5 µg de proteína en la disolución y se añadió el mismo volumen del amortiguador para muestras, el cual está formado por Tris 125 mM, pH 6.8, SDS 4 % (p/v), glicerol 20 % (v/v), 2-mercaptoetanol 10 % (v/v) y lo suficiente de azul de bromofenol para desarrollar color. Se calentó a Baño María por quince minutos y se vertió cada muestra en un pozo.

Con las muestras cargadas en cada carril se aplicó una corriente eléctrica (115-120 V, 3-5 W y 20 mA) por medio de una fuente de poder por un tiempo aproximado de dos horas. La corriente eléctrica fluye a través del sistema por medio de un amortiguador cuya composición es Tris 25 mM, pH 8.3, glicina 192 mM y SDS 0.1 % (p/v).

Para teñir el gel se colocó en una disolución de agua-metanol (1:1) para quitar el exceso de SDS y fijar las bandas de proteína. Posteriormente se puso en la disolución de azul brillante de Coomassie por cinco minutos y después se dejó en agua hasta que se decolora lo suficiente para que se pudieran observar las bandas.

El grado de pureza de las preparaciones de enzima se estimó mediante densitometría de geles de electroforesis digitalizados. Las imágenes de estos geles se obtuvieron a través de fotografías digitales tomadas con la cámara NIKON Coolpix L4. El procedimiento que se siguió para obtener los valores de densidad relativa de las bandas de interés de cada gel fue el siguiente: se seleccionó el área correspondiente a cada banda y se midió su densidad en píxeles, utilizando el programa de cómputo ImageJ 1.38X (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Con estos valores se calculó el porcentaje de pureza sumando el valor de densidad de cada una de las bandas del carril de muestra de cada gel. El valor de la suma se toma como el 100 % y los porcentajes de pureza de cada banda se obtienen dividiendo el valor de densidad en píxeles de cada una entre el valor de la suma.

Para obtener el valor de peso molecular se calculan los factores de retención (R_f), el cual se define como la distancia de migración de cada banda de proteína entre la distancia de migración del frente de corrida dado por el azul de bromofenol. La distancia de migración se obtuvo midiendo la distancia entre la mitad de cada banda y el inicio del gel. Graficando el logaritmo en base 10 de los valores de R_f de las proteínas marcadoras frente a su masa molecular se obtiene una recta, la que se usa como curva patrón (Figuras VII.1 B y VII.2 B) para calcular por extrapolación o interpolación los pesos moleculares de las bandas de los carriles de muestra.

VI.8. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE VELOCIDAD INICIAL

El análisis de resultados se realizó por regresiones no lineales de los datos utilizando el programa de cómputo comercial "MicroCal Origin 6.0" (MicroCal Software, Inc. Northampton, MA, USA) y las siguientes ecuaciones:

Para las saturaciones con el sustrato se usaron las siguientes ecuaciones:

$$v = \frac{V_{\max} \times S^{n_H}}{S_{0.5}^{n_H} + S^{n_H}} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{S^{n_H}}{S_{0.5}^{n_H} + S^{n_H}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde v es la velocidad inicial a cada concentración de sustrato, V_{\max} es la velocidad máxima alcanzada por la enzima en las condiciones de reacción, S es la concentración del sustrato, $S_{0.5}$ es la concentración de sustrato a la cual se llega a la mitad de la velocidad máxima y n_H es el número de Hill. La Ecuación 1 se usó para determinar el valor de V_{\max} que se usó para estandarizar los valores, que entonces se ajustaron usando la Ecuación 2.

Para ajustar los datos de velocidad inicial de las saturaciones con el inhibidor se usó la siguiente ecuación:

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{I_{0.5}}{I_{0.5} + I} + \frac{v_R}{v_0} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde v_i es la velocidad inicial obtenida en presencia de las diferentes concentraciones del inhibidor; v_0 es la velocidad inicial en ausencia del inhibidor, $I_{0,5}$ es la concentración de inhibidor a la cual se tiene un 50% de inhibición, e I es la concentración del inhibidor.

Para los ajustes de los de los datos de velocidad inicial de las saturaciones con los activadores se usaron las siguientes ecuaciones:

$$\frac{v_a}{v_0} = \frac{Act_{max} \times A^{n_H}}{A_{0,5}^{n_H} + A^{n_H}} + 1 \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\frac{v_a}{v_0} = \frac{Act_{max} \times A^{n_H}}{A_{0,5}^{n_H} + A^{n_H} \left(1 + \frac{A}{K_{IA}} \right)} + 1 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde v_a es la velocidad inicial obtenida en presencia de las diferentes concentraciones del activador; v_0 es la velocidad inicial en ausencia del activador, Act_{max} es la activación máxima expresada en número de veces sobre la velocidad en ausencia del activador; $A_{0,5}$ es la concentración de activador a la cual se llega a la mitad de la activación máxima; y K_{IA} es la constante de inhibición del activador.

VI.9. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LAS ZmC4PEPC Y AhC4PEPC

El alineamiento se realizó con las herramientas bioinformáticas de la página <http://expasy.org> en cuyo portal principal en el apartado de “Tools and software packages” se selecciona la entrada a “Alignments” y en el apartado de “Binary” se puede usar cualquiera de los tres software propuestos. Se usó el programa “LALIGN” que marca los aminácidos conservados y los aminoácidos que sufren cambios conservadores (Huang & Miller, 1991). Las secuencias de aminoácidos se obtuvieron de la base de datos de este portal por medio de los números de acceso UniProtKB/Swiss-Prot reportados en la Tabla VI.1.

VI.10. CONSTRUCCIÓN DEL MODELO DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE AhC4PEPC

El modelo se obtuvo por medio del servidor de SWISS-MODEL (Guex & Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2006) a través de la página <http://expasy.org>. Las imágenes fueron generadas por medio del programa Pymol (Copyright © 2008 DeLano Scientific LLC).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1. PURIFICACIÓN DE LA AhC4PEPC y ZmC4PEPC

En las Tablas VII.1 y VII.2 se muestran los resultados de cada paso de purificación de la AhC4PEPC y la ZmC4PEPC, respectivamente. A la preparación de la AhC4PEPC obtenida después de la cromatografía con Superdex 200 se le realizó una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) (Figura VII.1 A). Los pesos moleculares esperados para las enzimas AhC4PEPC y ZmC4PEPC de acuerdo a su composición aminoacídica son 109.5 kDa y 109.3 kDa, respectivamente. Estos valores fueron calculados por el programa ProtParam en expasy.org.

Además de la banda correspondiente a AhC4PEPC, identificada por su masa molecular que resultó ser de 101.3 kDa (Figura VII.1 B), observamos varias impurezas que no logramos eliminar con una cromatografía de intercambio iónico (Tabla VII.1). La impureza más abundante tiene un peso molecular aproximado de 59.7 kDa. Mediante una densitometría de este gel, estimamos que el porcentaje de pureza de la preparación final de la enzima es del 57 %.

Tabla VII.1. Resultados de la purificación de la AhC4PEPC.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	7634	2595	0.34	1.0	100
Sulfato de amonio	871	1177	1.35	4.0	40
Sephadex G25	563	784	1.39	4.1	30
DEAE	259	599	2.31	6.8	23
QFF	170	469	2.76	8.1	18
Centricones 50 kDa	91	303	3.33	9.8	11
Superdex 200	15	126	8.61	25.3	5
Mono Q	13	120	9.11	26.8	5

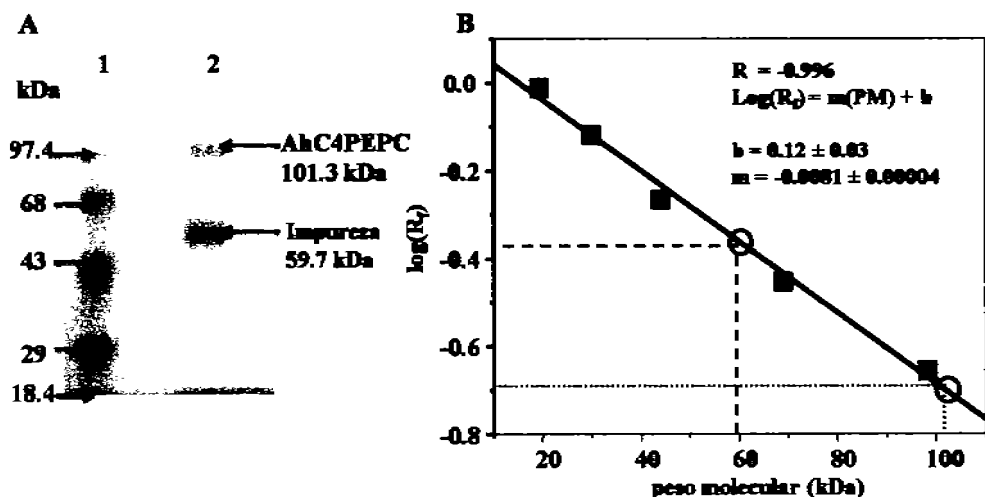


Figura VII.1. SDS-PAGE y gráfica para calcular el peso molecular de la AhC4PEPC. A) Gel teñido con azul de Coomassie. Carril 1, proteínas utilizadas como estándares de masa molecular (kDa): miosina (200), fosforilasa b (97.4), albúmina de suero de bovino (68), ovoalbúmina (43), anhidrasa carbónica (29) y β -lactoglobulina (18.4). Carril 2 la enzima PEPC purificada (1 μ g proteína total aplicada en el carril). B) Regresión lineal para calcular el peso molecular de las proteínas del carril 2, los círculos abiertos son los puntos inter y extrapolados para obtener los pesos moleculares de las bandas del carril 2.

De la purificación de la ZmC4PEPC por medio de una electroforesis desnaturizante y la densitometría del gel se observó que el porcentaje de pureza de la preparación final de la ZmC4PEPC es del 73%. La banda asignada a la ZmC4PEPC tiene una masa de 100.5 kDa que corresponde aproximadamente a la esperada. La única impureza que se aprecia en el SDS-PAGE es de un peso de 57 kDa.

Tabla VII.2. Resultados de la purificación de la ZmC4PEPC.

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	887	1685	1.9	1.0	100
DEAE	256	1609	6.3	3.3	95
QFF	138	1592	11.5	6.1	94
Superdex 200	32	1221	37.8	17.9	69

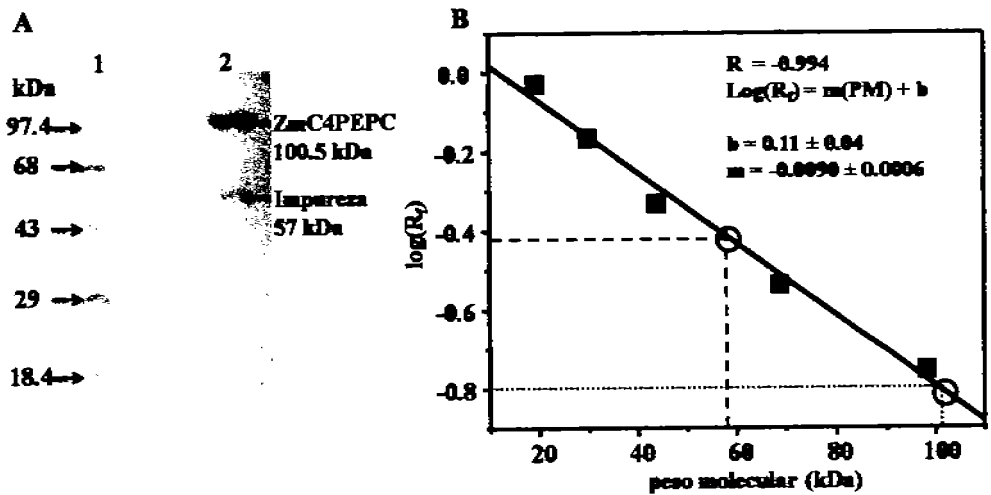


Figura VII.2. SDS-PAGE y gráfica para calcular el peso molecular de la ZmC4PEPC. A) Gel teñido con azul de Coomassie. Carril 1 proteínas utilizadas como estándares de masa molecular (kDa): miosina (200), fosforilasa b (97.4), albúmina de suero de bovino (68), ovoalbúmina (43), anhidrasa carbónica (29) y β -lactoglobulina (18.4). Carril 2 la enzima PEPC purificada (1 μ g proteína total aplicada en el carril). B) Regresión lineal para calcular el peso molecular de las proteínas observadas en el carril 2, los círculos abiertos son los puntos inter y extrapolados para obtener los pesos moleculares de las bandas del carril 2.

En la purificación de la AhC4PEPC los resultados (Tabla VII.2) muestran que el rendimiento es bajo, siendo sólo del 5%. La actividad específica es de 9 U/mg proteína y es baja comparada con la reportada de 54 U/mg proteína (Gayathri *et al.*, 2000). Además, estos autores obtuvieron un rendimiento del 50% y un grado pureza aproximadamente del 100% (Gayathri *et al.*, 2000), lo que comparado con el bajo rendimiento y el grado de pureza del 57% obtenidos en este trabajo indica que el protocolo de purificación usado en este trabajo no es eficiente.

Los resultados de la purificación de ZmC4PEPC (Tabla VII.2) nos indican que se obtuvo una enzima con un rendimiento considerablemente alto, del 69%. El valor reportado de actividad específica es de 33 U/mg proteína (Tovar-Méndez *et al.*, 1998) que es similar al obtenido en este trabajo de 37.8 U/mg proteína. Además para esta enzima se reporta un grado de pureza del 99% determinado por SDS-PAGE (Tovar-Méndez *et al.* 1997). Esto nos indica que el procedimiento de purificación llevado a cabo en este trabajo es eficiente, aun cuando sigue existiendo una impureza.

Algo importante que se debe considerar es que la impureza no interfiera con los ensayos que se realizarán. Por esto es necesario que la preparación final, aunque sea el resultado de una purificación parcial como es nuestro caso, para ser apta para los estudios cinéticos que realizamos, no tenga actividad de fosfatasa ni de deshidrogenasa. Comprobamos que éste era el caso, es decir que no existía ninguna actividad contaminante de fosfatasa ni de deshidrogenasa que pudiese alterar los resultados de nuestros ensayos. Tomando en cuenta el peso molecular calculado de la impureza y pensando que la principal impureza de cualquier proteína que se quiera purificar a partir de hojas es Rubisco, dada su abundancia en la hoja, se obtuvieron los pesos de las subunidades de esta enzima en *Z. mays* y *A. hypochondriacus* por medio de expasy.org y son bastante parecidos a los pesos estimados de las impurezas. En el caso de la impureza en la preparación de la AhC4PEPC el peso estimado de 59.7 kDa es parecido al peso de la subunidad grande que teóricamente sería 52.6 kDa. En el caso de la impureza en la preparación de ZmC4PEPC el peso estimado de 57 kDa es similar al peso de la subunidad grande que para este caso se reporta de 52.7 kDa. Con esto se puede suponer que la impureza observada en ambos casos es alguna subunidad de la Rubisco, lo cual es consistente con que la impureza que tenemos no tiene las actividades que interferirían en los ensayos de actividad de la PEPC, debido a que la carboxilación que lleva a cabo la Rubisco no usa como sustratos ni al PEP ni al bicarbonato. Otra posibilidad es que la impureza sea una subunidad de una isoforma de la PEPC heterooctamérica, ya que se ha reportado que en semillas de ricino y de algas verdes se encuentra esta isoforma, debido a que al homotetrámero característico se encuentra unidas cuatro subunidades más de un peso molecular de entre 57 y 64 kDa (Blonde & Plaxton, 2003). Esta última propuesta, la cual es más probable, debido a que los pesos moleculares de las impurezas caen dentro de los valores de peso molecular reportados para las subunidades pequeñas de los heterooctámeros.

Es interesante el hallazgo de que la actividad específica de la ZmC4PEPC en extractos crudos es 5.4 veces mayor que la de AhC4PEPC. Estos datos sugieren que la enzima es mucho

menos abundante en hojas de amaranto que en hojas de maíz, lo que explica parcialmente el que presentara mayores dificultades para su purificación.

VII.2. ESTUDIOS CINÉTICOS COMPARATIVOS ENTRE LA ZmC4PEPC Y LA AhC4PEPC

VII.2.1. Determinación de los valores de $I_{0.5}$ para malato de AhC4PEPC y ZmC4PEPC

Antes de realizar los estudios cinéticos, determinamos el valor de la $I_{0.5}$ para malato de ambas enzimas en condiciones que se han usado en otros grupos de investigación y en el nuestro (descritas en Materiales y Métodos) para estimar el grado de fosforilación y/o la integridad de la enzima (Wang *et al.*, 1992; Duff *et al.*, 1995; Tovar-Méndez *et al.*, 1997; Tovar-Méndez *et al.*, 1998; Mújica-Jiménez *et al.*, 1998), ya que se sabe que la afinidad por el inhibidor malato depende no sólo de la fosforilación sino también de la integridad del amino terminal de la proteína (McNaughton *et al.*, 1989).

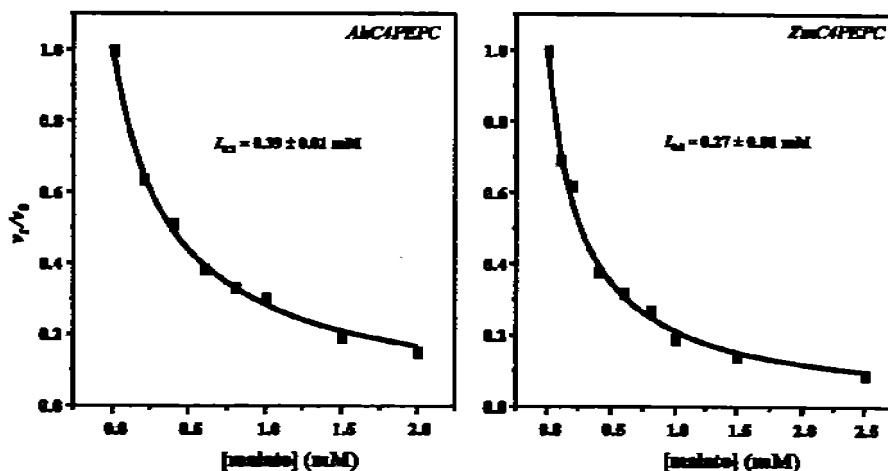


Figura VII.3. Determinación de la sensibilidad a malato ($I_{0.5}$) de las enzimas purificadas. Medio de ensayo con PEP 2.5 mM, NaHCO_3 1 mM y MgCl_2 5 mM, pH 7.3. Los datos normalizados se ajustaron con la Ecuación 3.

Los datos experimentales y los resultados obtenidos del ajuste de estos datos con la Ecuación 3 se muestran en la Figura IV.3. En las condiciones de ensayo que nosotros usamos, se ha reportado un valor de la $I_{0.5}$ para la forma desfosforilada de la ZmC4PEPC de 0.18 mM y de 1.54 mM para la forma fosforilada (Jiao *et al.*, 1991, Tovar-Méndez *et al.*, 1998). No hay valores de la I_{50} reportados para AhC4PEPC que se hayan determinado en las mismas condiciones de reacción usadas por nosotros, por lo que carecemos de valores de referencia. En el caso de enzimas truncadas el valor de $I_{0.5}$ es superior a 8 mM (Mújica-Jiménez C., comunicación personal).

Los bajos valores de $I_{0.5}$ obtenidos tanto para ZmC4PEPC como AhC4PEPC indican que no se encuentran fosforiladas y que no han sufrido proteólisis, es decir están íntegras, por lo que procedimos a realizar los experimentos cinéticos planteados en los objetivos de esta tesis.

VII.2.2. Saturación con PEP

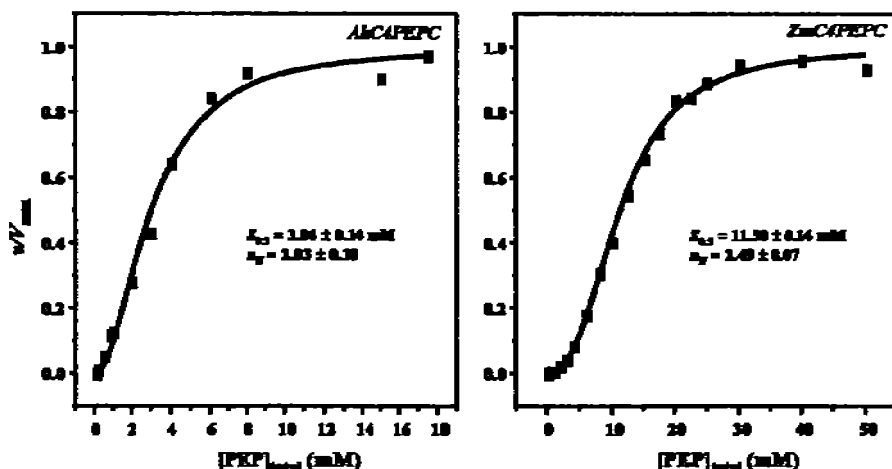


Figura VII.4. Saturación por PEP de las enzimas AhC4PEPC y ZmC4PEPC en condiciones cercanas a las fisiológicas. El ensayo se realizó a pH 7.3 y 30 °C como se describe en Materiales y Métodos. Para facilitar la comparación entre ambas enzimas los valores de velocidad inicial se han normalizado con respecto a la V_{max} encontrada en cada saturación, para el caso de la AhC4PEPC el valor de la V_{max} es 1.15 ± 0.05 U/mg de proteína y para el caso de la ZmC4PEPC es de 16.35 ± 0.24 U/mg de proteína. Los datos normalizados se ajustaron usando el método de regresión no lineal con la Ecuación 2.

La saturación con el sustrato PEP de ambas enzimas a concentraciones de bicarbonato y Mg^{2+} libre cercanas a las fisiológicas arrojó valores de $S_{0.5}$ y n_H diferentes para AhC4PEPC y ZmC4PEPC (Figura VII.4). El valor de $S_{0.5}$ de la ZmC4PEPC para PEP es muy similar al obtenido anteriormente en iguales condiciones (Tovar-Méndez *et al.*, 2000). En el caso de la AhC4PEPC, no es posible hacer una comparación de este tipo porque el único valor reportado se obtuvo en condiciones diferentes, concretamente a concentraciones de Mg^{2+} y bicarbonato mucho mayores (Murnu *et al.*, 2003). La enzima de amaranto tiene una $S_{0.5(PEP)}$ casi cuatro veces menor que la de maíz, y mucho menor (44 veces) si se tiene en cuenta las diferencias de cooperatividad indicadas por el número de Hill, es decir si comparamos los valores de $S_{0.5}^{nH}$. Esto indica una afinidad de la AhC4PEPC por el sustrato PEP mucho mayor que la de la ZmC4PEPC. De cualquier forma, el grado de saturación de ambas enzimas a la concentración de PEP que se estima es la que está presente durante los periodos de oscuridad, 0.2 mM (Doncaster & Leegood, 1987), es muy bajo, lo que sugiere que son prácticamente inactivas en estas condiciones, a no ser que los activadores produzcan un incremento notable de actividad.

VII.2.3. Regulación por efectores alostéricos

Para probar las diferentes respuestas de las enzimas ZmC4PEPC y AhC4PEPC a los activadores e inhibidores a concentraciones de los sustratos cercanas a las fisiológicas durante el periodo de oscuridad, se realizaron saturaciones en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos. Utilizamos como activadores a la Glc6P y a la glicina y como inhibidor al malato y, dado que estamos trabajando con la enzima no fosforilada (forma de noche), se usó una concentración de PEP total de 0.2 mM que es la que se estima que existe durante el periodo de oscuridad (Doncaster & Leegood, 1987). Las concentraciones del Mg^{2+} libre y del bicarbonato no cambian en el ciclo noche-día y son cercanas a las que usamos en nuestros experimentos.

VII.2.3.1. Inhibición por malato

Para investigar si existían diferencias en la sensibilidad a malato de ambas enzimas, como habían sugerido los resultados de los experimentos preliminares ya mencionados en los que se determinó la $I_{0.5}$ en condiciones estándares, probamos la respuesta de ambas a este inhibidor en condiciones cercanas a las fisiológicas. Los resultados (Figura VII.5) muestran que la

sensibilidad de la AhC4PEPC al inhibidor es menor que la de la ZmC4PEPC, ya que el valor de la $I_{0.5}$ para la AhC4PEPC en estas condiciones es aproximadamente tres veces mayor que el de la ZmC4PEPC. En ninguna enzima se observó cooperatividad en la unión del inhibidor, lo que concuerda con resultados previos de nuestro grupo de trabajo (Tovar-Méndez *et al.*, 2000).

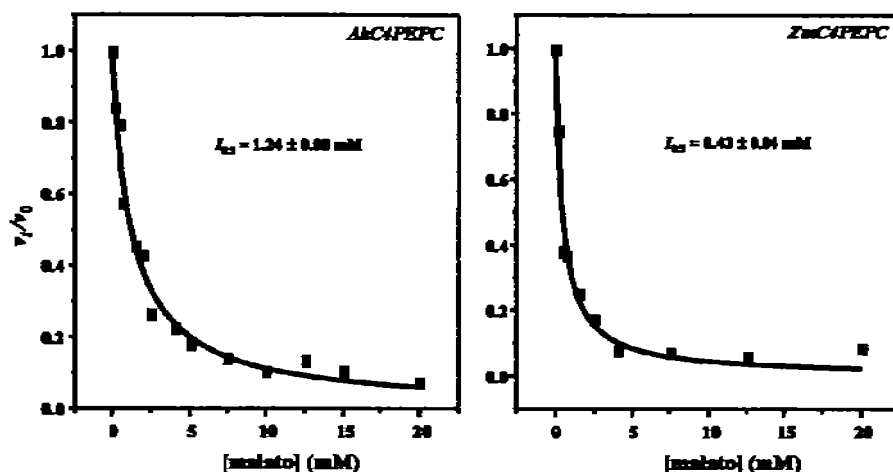


Figura VII.5. Saturación por malato en condiciones cercanas a las fisiológicas. Medio de ensayo a pH 7.3 con PEP 0.2 mM, NaHCO_3 0.1 mM y Mg^{2+} libre 0.4 mM. Para normalizar los datos de velocidad inicial, en este caso se dividieron los valores de velocidad en presencia del inhibidor (v) entre el valor de velocidad en su ausencia (v_0). Para la AhC4PEPC $v_0 = 0.36$ U/mg de proteína y para la ZmC4PEPC $v_0 = 0.02$ U/mg de proteína. Los datos normalizados se ajustaron a la Ecuación 3.

Para corroborar las diferencias en la sensibilidad a malato de ambas enzimas se realizó una saturación con el sustrato PEP a una concentración fija de malato (20 mM) (Figura VII.6) observándose que en la AhC4PEPC disminuye su afinidad aparente por el sustrato en presencia del inhibidor ligeramente menos que la ZmC4PEPC. Esto se traduce en diferencias en la sensibilidad a PEP en la presencia de malato de ambas enzimas de 4 veces en la $S_{0.5}$ por el sustrato. Como era de esperarse para un inhibidor alostérico (Segel, 1975), y como ya ha sido observado en otras condiciones de ensayo (Rodríguez-Sotres *et al.*, 1987; Tovar-Méndez *et al.*, 2000), en ambas enzimas, la presencia de malato en el medio de reacción aumentó la cooperatividad aparente de unión del sustrato. Este aumento es considerablemente mayor en la ZmC4PEPC, en la que el valor de n_H llega a ser casi el máximo que puede alcanzar esta enzima

tetramérica, que en la AhC4PEPC, lo que aunado al efecto sobre $S_{0.5}$ muestra una considerable y significativa menor sensibilidad al malato de la AhC4PEPC. Es de notar que debido a la gran cooperatividad de unión con el PEP y a la baja afinidad de la enzima por éste en presencia del malato, la ZmC4PEPC no tiene prácticamente actividad en concentraciones fisiológicas de PEP si hay malato presente, mientras que la AhC4PEPC sí tiene, aunque baja.

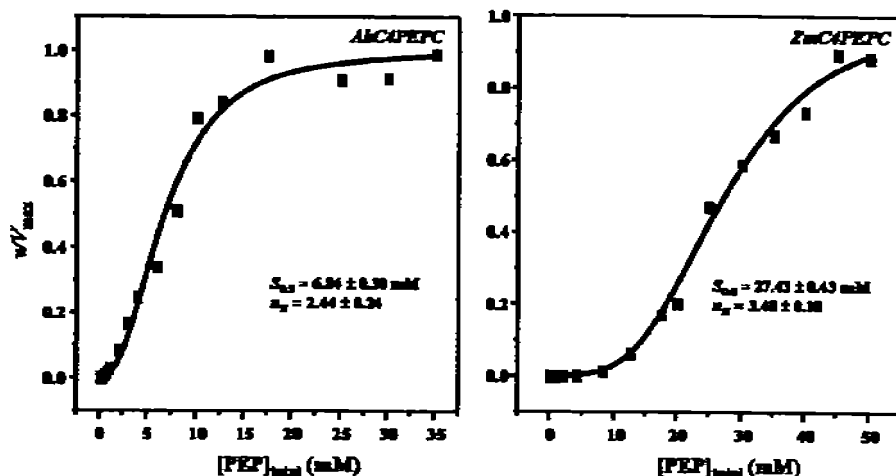


Figura VII.6. Efecto del malato sobre la saturación con PEP en condiciones cercanas a las fisiológicas. Medio de ensayo con NaHCO_3 0.1 mM, Mg^{2+} libre 0.4 mM, malato 20 mM. Para facilitar la comparación entre ambas enzimas los valores de velocidad inicial se han normalizado con respecto a la V_{max} encontrada en cada saturación. Para la AhC4PEPC el valor de la V_{max} es 2.31 ± 0.09 U/mg de proteína y para el caso de la ZmC4PEPC es de 19.4 ± 1.2 U/mg de proteína. Los datos normalizados se ajustaron a la Ecuación 2.

VII.2.3.2. Activación por Glc6P

Cuando se realizó la saturación por Glc6P en condiciones cercanas fisiológicas (Figura VII.7) se obtuvo una activación máxima, es decir la que se obtendría a concentración saturante del activador, 3 veces mayor para la ZmC4PEPC que para la AhC4PEPC, mientras que el valor de la $A_{0.5}$ para la Glc6P de la AhC4PEPC es casi diez veces menor que el de la ZmC4PEPC. Estos resultados nos indican que a pesar de que la Glc6P activa menos a la AhC4PEPC, esta

enzima tiene mucha mayor afinidad por el activador que la ZmC4PEPC. Con respecto a la cooperatividad de unión del activador el valor de n_H en ambos casos es cercano a dos, lo cual indica que la Glc6P se une a ambas enzimas cooperativamente en condiciones cercanas a las fisiológicas. En conjunto estos resultados implican que a las concentraciones fisiológicas de la Glc6P (0.1 mM en la noche, Doncaster & Leegood, 1987) la activación producida por este metabolito sería mayor en el caso de la enzima de amaranto que en el caso de la enzima de maíz.

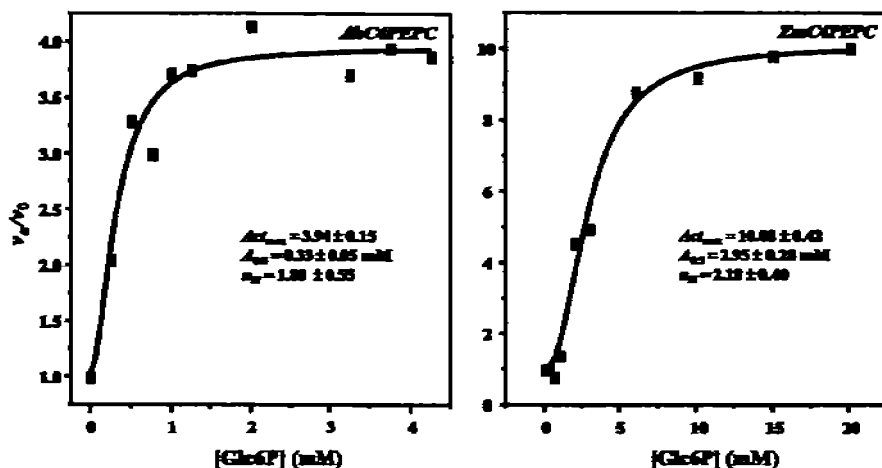


Figura VII.7. Saturación con Glc6P en condiciones cercanas a las fisiológicas. Medio de ensayo con PEP 0.2 mM, NaHCO_3 0.1 mM, Mg^{2+} libre 0.4 mM. Para normalizar los datos de velocidad inicial, en este caso se dividieron los valores de velocidad en presencia del activador (v_a) entre el valor de velocidad en su ausencia (v_0). Para la AhC4PEPC $v_0 = 0.54$ U/mg de proteína y para el caso de la ZmC4PEPC $v_0 = 0.01$ U/mg de proteína. Los datos normalizados se ajustaron a la Ecuación 4.

En presencia de malato, la saturación con Glc6P en condiciones de concentraciones de sustratos cercanas a las fisiológicas (Figura VII.8) produce en ambas enzimas una activación máxima prácticamente igual y menor a la que produce en ausencia del inhibidor. En el caso de la AhC4PEPC, en presencia de malato la Act_{max} es aproximadamente 2.5 veces menor, la $A_{0.5}$ 25 veces mayor y la cooperatividad aparente de unión del activador, medida por el valor de n_H , 1.3 veces mayor que en ausencia del inhibidor. Está claro entonces que la presencia de malato disminuye fuertemente la afinidad de la enzima de amaranto por el activador Glc6P. Sin embargo, si se toma en cuenta que en las concentraciones saturantes del activador en presencia de

malato no se alcanza la actividad que la enzima tiene cuando no hay malato, se puede concluir que ambos ligandos pueden estar simultáneamente unidos a la enzima, es decir que la unión del activador y el inhibidor no es mutuamente excluyente en esta enzima. El efecto principal del malato es disminuir la afinidad del sitio de la Glc6P por el activador, pero también tiene un efecto ligero sobre el cambio conformacional que el activador induce o estabiliza una vez unido. En cuanto a la ZmC4PEPC tampoco el malato y la Glc6P son mutuamente excluyentes; de hecho el malato estorba menos la unión de la Glc6P que lo que hacía en el caso de la enzima de amaranto. Pero en el caso de la ZmC4PEPC, el efecto mayor es sobre el cambio conformacional y es menor sobre la afinidad. En la enzima de maíz, en presencia de malato la activación máxima por la Glc6P disminuye 6.4 veces, el valor de la $A_{0.5}$ sólo aumenta aproximadamente 1.5 veces y el n_H se mantiene prácticamente igual. Los resultados obtenidos con la ZmC4PEPC concuerdan con los obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo a altas concentraciones de PEP (Tovar-Méndez *et al.*, 2000).

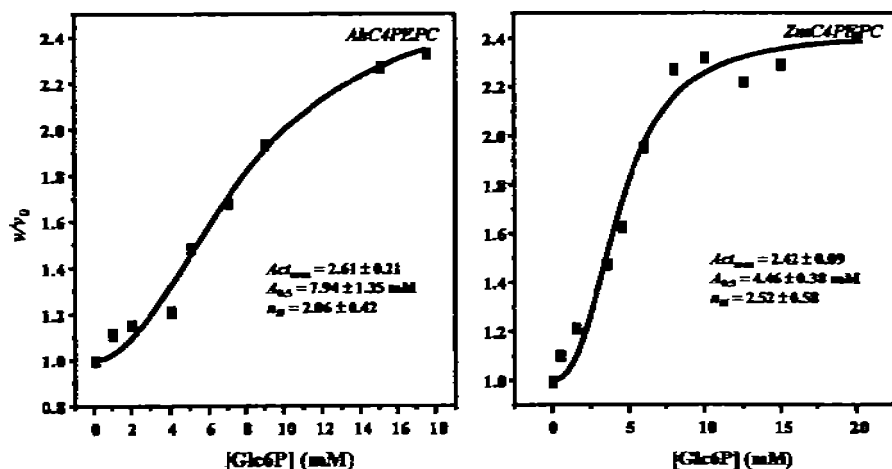


Figura VII.8. Efecto del malato sobre la saturación con Glc6P en condiciones cercanas a las fisiológicas. Medio de ensayo a pH 7.3 con PEP 0.2 mM, NaHCO₃ 0.1 mM, Mg²⁺ libre 0.4 mM y malato 20 mM. Para normalizar los datos de velocidad inicial, en este caso se dividieron los valores de velocidad en presencia del activador (v_a) entre el valor de velocidad en su ausencia (v_0). El valor de v_0 para la AbC4PEPC es 0.11 U/mg de proteína y para el caso de la ZmC4PEPC es de 0.002 U/mg de proteína. Los datos normalizados se ajustaron a la Ecuación 4.

Estas diferencias en el mecanismo de activación de ambas enzimas por la Glc6P en presencia del malato anulan las diferencias que se observan entre ellas en ausencia del inhibidor y

llevan a que la respuesta al activador en presencia del inhibidor sea prácticamente la misma en ambas enzimas. Efectivamente, se puede observar en la Figura VII.8, que en presencia de malato, la saturación con Glc6P en condiciones de concentraciones de sustratos cercanas a las fisiológicas produce en ambas enzimas una activación máxima prácticamente igual con valores similares de la $A_{0.5}$ y el n_H .

Con el fin de explorar más el mecanismo de activación por la Glc6P cuando está presente el malato en el medio de reacción, se llevaron a cabo saturaciones con el activador de las dos enzimas a una concentración mayor de PEP y HCO_3^- (Figura VII.9). En forma interesante y aunque hubiese sido de esperar lo contrario, las activaciones máximas obtenidas con ambas enzimas fueron significativamente más altas que las obtenidas a bajas concentraciones de los sustratos, 24 y 18 veces en la ZmC4PEPC y en la AhC4PEPC, respectivamente. Lo inesperado de este resultado es porque el efecto más reconocido del activador es incrementar la afinidad por el sustrato y por tanto los incrementos de actividad que produce a concentraciones bajas deben ser muy superiores a los que produce a concentraciones altas de éste. De nuevo en forma contraria a lo esperado, no se observaron incrementos en la afinidad de la ZmC4PEPC por el activador y en el caso de la AhC4PEPC este incremento fue menos del doble. Se observó además en ambas enzimas inhibición a altas concentraciones de activador, lo que no se había observado cuando las concentraciones de sustratos eran bajas. Esta inhibición por el activador se sabe que se debe a la unión del complejo activador- Mg^{2+} al sitio activo en competencia con el sustrato (Mújica-Jiménez *et al.*, 1998) y por tanto sería de esperar encontrar esta inhibición a bajas concentraciones del sustrato más que a altas. Por todo ello, y aunque con los experimentos realizados no podemos concluirlo de forma inequívoca, creemos que es posible que estos efectos inesperados se deben al aumento en la concentración de bicarbonato (de 100 veces) mas que al aumento en la concentración de PEP. De ser así, estos resultados estarían indicando que el bicarbonato tiene un efecto muy importante sobre la conformación activada de la enzima que resulta de la unión de la Glc6P y sobre la afinidad del sitio activo activo y alostérico para la Glc6P. También parece afectar la capacidad del sitio activo de discriminar entre la forma libre y la que forma complejo con el metal de sus ligandos, ya sean sustratos o activadores, por lo que sería de interés investigar si a las bajas concentraciones de este ion, que son las fisiológicas, el mecanismo cinético de la enzima sigue siendo el mismo que el reportado a altas concentraciones (Janc *et al.*, 1992); es decir, si el sustrato preferido sigue siendo el complejo Mg^{2+} -PEP o la enzima une en forma indistinta a la especie libre y acomplejada del sustrato. Nuestros resultados serían también congruentes con el reporte de que bicarbonato disminuye la afinidad de la enzima

por malato (Parvathi *et al.*, 2000), un efecto que probablemente sea mediado por el incremento que produce en la afinidad por el sustrato en complejo con el Mg^{2+} . Igualmente estos resultados indicarían que es la unión de este complejo al sitio activo lo que con mayor efectividad se opone a la unión del malato al sitio alostérico, y eso explicaría el incremento observado en la activación máxima en ambas enzimas.

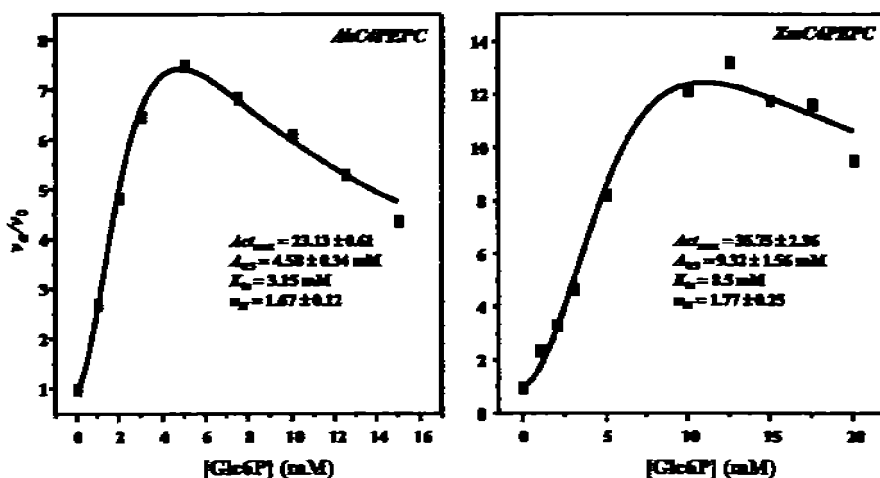


Figura VII.9. Efecto del malato sobre la saturación con Glc6P a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} libre y concentraciones altas de PEP y bicarbonato. Medio de ensayo a pH 7.3 con PEP 3 mM, $NaHCO_3$ 10 mM, Mg^{2+} libre 0.4 mM y malato 20 mM. Para normalizar los datos de velocidad inicial, en este caso se dividieron los valores de velocidad en presencia del activador (v_0) entre el valor de velocidad en su ausencia (v_0). El valor de v_0 para la AhC4PEPC es 0.56 U/mg de proteína y para el caso de la ZmC4PEPC es de 0.11 U/mg de proteína. Los datos normalizados se ajustaron con la Ecuación 5.

Para comprobar si éste es el comportamiento de las enzimas incluso en ausencia del malato, se llevó a cabo una saturación de la ZmC4PEPC a concentraciones altas de PEP y bicarbonato (Figura VII.10). Encontramos de nuevo inhibición por altas concentraciones de activador y una activación máxima que es cuatro veces mayor que la que se obtuvo a concentraciones menores de los sustratos (ver los datos de la Figura VII.7). El valor de la $A_{0.5}$ es el doble al encontrado a bajas concentraciones de los sustratos. Así pues, estas particularidades del mecanismo de activación por la Glc6P a altas concentraciones del bicarbonato no depende de

que haya o no malato en el medio de reacción, y merece la pena que sean exploradas a mayor profundidad en un futuro.

En resumen las diferencias encontradas entre ambas enzimas en su respuesta a la Glc6P y al malato pueden ser trascendentes a nivel fisiológico, porque a concentraciones fisiológicas del activador e inhibidor los efectos del primero pueden ser mayores para la AhC4PEPC que para la ZmC4PEPC, como esperamos que sea para plantas dicotiledóneas.

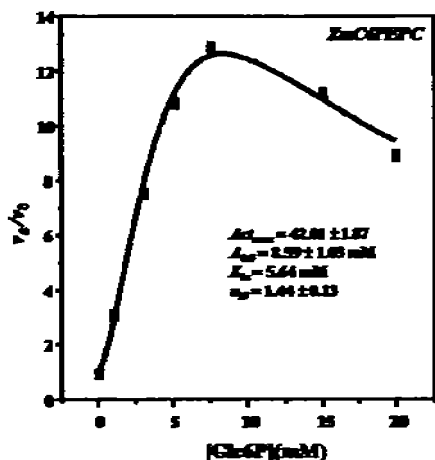


Figura VII.10. Saturación por Glc6P de la ZmC4PEPC a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} libre y concentraciones altas de PEP y bicarbonato. Medio de ensayo a pH 7.3 con PEP 3 mM, $NaHCO_3$ 10 mM, Mg^{2+} libre 0.4 mM. Para normalizar los datos de velocidad inicial, en este caso se dividieron los valores de velocidad en presencia del activador (v_a) entre el valor de velocidad en su ausencia (v_0). El valor de v_0 es de 1.24 U/mg de proteína. Los datos normalizados se ajustaron con la Ecuación 5.

VII.2.3.3. Activación por glicina

Las saturaciones de la AhC4PEPC con glicina corroboraron lo que se ha reportado en cuanto a la activación de este efector: que sólo activa en forma significativa a las PEPC de plantas monocotiledóneas (Nishikido & Takanashi, 1973; Bandarian *et al.*, 1992). En efecto, bajo condiciones de concentraciones de los sustratos y de Mg^{2+} libre cercanas a las fisiológicas la activación máxima observada para la ZmC4PEPC fue 90 veces mayor que la observada para la

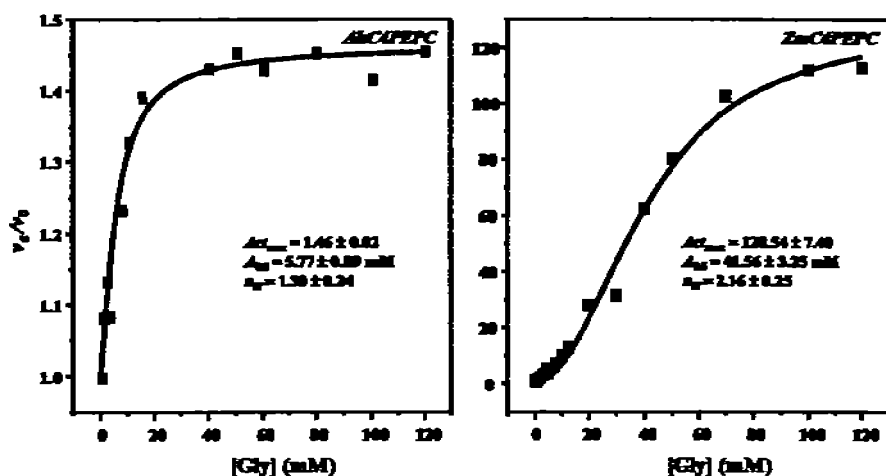


Figura VII.11. Saturación por Gly de las enzimas AhC4PEPC y ZmC4PEPC en condiciones cercanas a las fisiológicas. Medio de ensayo a pH 7.3 con PEP 0.2 mM, NaHCO_3 0.1 mM, Mg^{2+} libre 0.4 mM. Para normalizar los datos de velocidad inicial, en este caso se dividieron los valores de velocidad en presencia del activador (v_a) entre el valor de velocidad en su ausencia (v_0). El valor de v_0 para AhC4PEPC es 0.43 U/mg de proteína y para el caso de ZmC4PEPC es de 0.02 U/mg de proteína. Los datos normalizados se ajustaron con la Ecuación 4.

AhC4PEPC (Figura VII.11). En esta última enzima la activación máxima observada a saturación por la glicina es 2.5 veces menor que la activación máxima provocada por la Glc6P, lo que aunado a que el valor de la $A_{0.5}$ para la Gly es 13 veces superior al valor de la $A_{0.5}$ para la Glc6P, claramente indica que si bien la enzima de amaranto también responde a la Gly, éste es un activador muy pobre comparado con la Glc6P. Aunque para poder entender totalmente la importancia fisiológica de la activación por la Gly de la AhC4PEPC se necesitaría el conocer las concentraciones intracelulares de este aminoácido que se llegan a alcanzar en la hoja de amaranto, la activación máxima producida es demasiado baja como para suponer que esta activación sea de relevancia. La $A_{0.5}$ estimada para la ZmC4PEPC es 7 veces mayor que para la AhC4PEPC, lo cual podría representar una ventaja para esta última de la misma manera que la Glc6P, al tener una mayor afinidad relativa por el efector positivo. Pero debido a los bajos valores obtenidos de activación máxima es poco probable que ésta sea una ventaja real. Otra diferencia observada en la respuesta a la Gly de ambas enzimas es que la saturación de la

ZnC4PEPC por este activador presenta cooperatividad positiva, mientras que la saturación de la AhC4PEPC no la presenta.

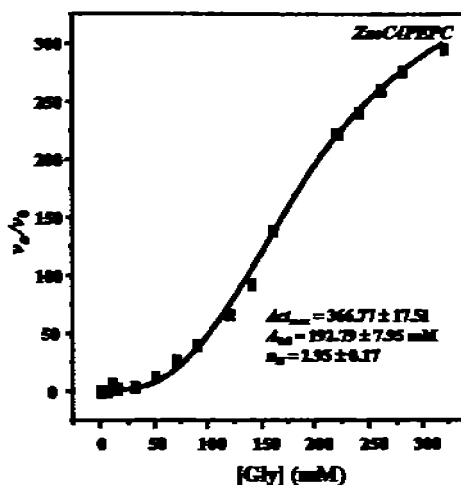


Figura VII.12. Efecto del malato sobre la saturación de la ZnC4PEPC por Gly en condiciones cercanas a las fisiológicas. Medio de ensayo a pH 7.3 con PEP 0.2 mM, NaHCO₃ 0.1 mM, Mg²⁺ libre 0.4 mM y malato 20 mM. Para normalizar los datos de velocidad inicial, en este caso se dividieron los valores de velocidad en presencia del activador (v_a) entre el valor de velocidad en su ausencia (v_0). El valor de v_0 es de 0.003 U/mg de proteína. Los datos normalizados se ajustaron con la Ecuación 4.

En presencia de malato 20 mM (Figura VII.12) no pudimos determinar la saturación por glicina para la AhC4PEPC como era de esperarse, ya que incluso en ausencia del inhibidor los incrementos en la velocidad producidos por glicina fueron muy bajos. En cuanto a la ZnC4PEPC, la activación máxima aumentó aproximadamente 3.5 veces en comparación con lo observado en ausencia del inhibidor (datos en la Figura VII.11) y el valor de la $A_{0.5}$ aumentó aproximadamente 5 veces. Se sabe que la concentración fisiológica de la glicina durante el día es de 2 mM o de 30 mM, siendo la segunda determinada a una concentración de HCO₃⁻ de 0.1 mM. Y durante la noche la concentración fisiológica de este efector es de 2 mM (Tovar-Méndez *et al.*, 2000). El altísimo valor de la $A_{0.5}$, mucho mayor que las concentraciones intracelulares de Gly, indica que Gly no sería un activador de la enzima de maíz cuando no está fosforilada, es decir durante el periodo de oscuridad, a diferencia de lo que ocurre con la enzima fosforilada presente durante el periodo de luz (Tovar-Méndez *et al.*, 2000). Por otra parte, la actividad de la enzima

alcanzada a saturación de Gly en presencia de malato indica que este activador puede revertir totalmente los efectos del inhibidor lo que significa que ambos efectores alostéricos son mutuamente excluyentes. Esta es una importante diferencia entre Gly y Glc6P.

Para explorar más a fondo el mecanismo de activación por Gly se hicieron saturaciones con este activador a concentraciones altas de los sustratos, y en presencia de malato 20 mM, condiciones que son iguales a las utilizadas con la enzima fosforilada en un trabajo previo (Tovar-Mendez...). Los resultados se muestran en la Figura VII.12. Se encontró que la activación máxima de la ZmC4PEPC es unas 85 veces mayor que la obtenida con la AhC4PEPC, que sigue siendo muy baja incluso en estas condiciones. El valor de la $A_{0.5}$ es solamente 1.5 veces mayor para la ZmC4PEPC que para la AhC4PEPC, lo que indica que no hay una gran diferencia en las afinidades de cada enzima por el activador en estas condiciones. La presencia del inhibidor genera cooperatividad positiva en la unión del activador a la ZmC4PEPC, mientras que éste se une con ligera cooperatividad negativa a la AhC4PEPC.

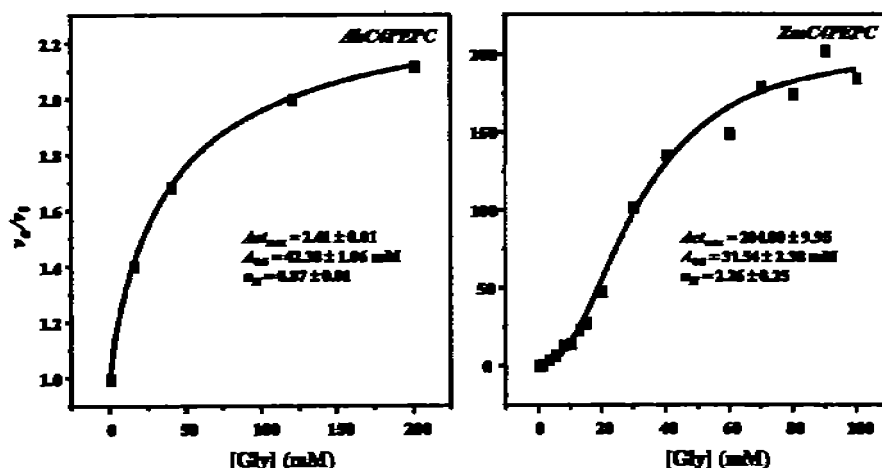


Figura VII.13. Efecto del malato sobre la saturación de las enzimas AhC4PEPC y ZmC4PEPC por Gly a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} libre y altas de PEP y bicarbonato. Medio de ensayo a pH 7.3 con PEP 3 mM, $NaHCO_3$ 10 mM, Mg^{2+} libre 0.4 mM, malato 20 mM. Para normalizar los datos de velocidad inicial, en este caso se dividieron los valores de velocidad en presencia del activador (v_0) entre el valor de velocidad en su ausencia (v_0). El valor de v_0 para la AhC4PEPC es 0.17 U/mg de proteína y para el caso de la ZmC4PEPC es de 0.08 U/mg de proteína. Los datos normalizados se ajustaron a la Ecuación 4.

Para corroborar las diferencias entre el mecanismo de activación por Gly y el mecanismo de activación por Glc6P, se llevó a cabo la saturación de la ZmC4PEPC con glicina a concentraciones más altas de los sustratos (PEP a 3 mM y HCO_3^- a 10 mM) y en ausencia del malato manteniendo la misma concentración del Mg^{2+} libre (Figura VII.14). Como se esperaba la $A_{0.5}$ para Gly tiene un valor mucho menor (30 veces) que el encontrado a las concentraciones bajas de los sustratos y la activación máxima estimada fue 41 veces menor (comparar con datos en Figura VII.11). Estos resultados son congruentes con lo ya sabido de que el efecto del activador es principalmente aumentar la afinidad de la enzima por su sustrato (Nishikido & Takanashi, 1973; Gillinta & Grover, 1995; Tovar-Méndez *et al.*, 1998; Tovar-Méndez *et al.*, 2000), pero contrastan fuertemente con los resultados anormales obtenidos en la saturación de la enzima con Glc6P en las mismas condiciones (Figura VII.10). Esto indica que el efecto de altas concentraciones de bicarbonato es sobre la activación por la Glc6P y no por la Gly. Otro resultado interesante de estos experimentos es que la unión de la Gly a la ZmC4PEPC en estas condiciones no sólo no muestra cooperatividad positiva, sino incluso una ligera cooperatividad negativa.

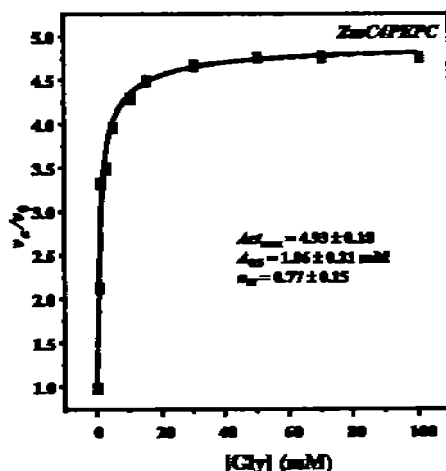


Figura VII.14. Saturación por Gly de la ZmC4PEPC a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} libre y concentraciones altas de PEP y bicarbonato. Medio de ensayo a pH 7.3 con PEP 3 mM, NaHCO_3 10 mM, Mg^{2+} libre 0.4 mM. Para normalizar los datos de velocidad inicial, en este caso se dividieron los valores de velocidad en presencia del activador (v_e) entre el valor de velocidad en su ausencia (v_0). El valor de v_0 es de 8.21 U/mg de proteína. Los datos normalizados se ajustaron con la Ecuación 4.

VII.2.4. Resumen de los resultados de los estudios de velocidad inicial

Para facilitar su comparación, los datos obtenidos en los estudios de velocidad inicial, ya descritos y discutidos, se resumen en la Tablas VII.3, VII.4 y VII.5. Pensamos que en el caso de la enzima de amaranto, su alta afinidad por el PEP y por la Glc6P, que será incluso mayor si la enzima está fosforilada, su menor grado de cooperatividad, unido a su menor sensibilidad por el malato, podrían hacer que no sea tan necesaria la activación por aminoácidos neutros como lo es en el caso de la enzima de maíz.

Tabla VII.3. Resultados de la saturación por PEP y de la inhibición por malato.

<u>Condiciones del ensayo</u>	AbC4PEPC		ZmC4PEPC	
	$S_{0.5}$ (mM)	n_H	$S_{0.5}$ (mM)	n_H
NaHCO ₃ 0.1 mM, Mg ²⁺ libre 0.4 mM	3.04	2.03	11.30	2.49
NaHCO ₃ 0.1 mM, Mg ²⁺ libre 0.4 mM + malato 20 mM	6.84	2.44	27.43	3.48
	$I_{0.5}$ (mM)		$I_{0.5}$ (mM)	
PEP 2.5 mM, NaHCO ₃ 1 mM, Mg ²⁺ 5 mM	0.39		0.27	
PEP 0.2 mM, NaHCO ₃ 0.1 mM, Mg ²⁺ libre 0.4 mM	1.24		0.43	

Tabla VII.4. Resultados de la activación por Glc6P. I son los experimentos realizados con PEP y NaHCO₃ a concentraciones bajas; II con PEP y NaHCO₃ a concentraciones bajas en presencia de malato; III con PEP y NaHCO₃ a concentraciones altas y IV con PEP y NaHCO₃ a concentraciones altas en presencia de malato. N.D. = no determinado.

	AbC4PEPC						ZmC4PEPC					
	v_0 (U/mg)	Act_{max}	v_{max} (U/mg)	$A_{0.5}$ (mM)	n_H	K_{is} (mM)	v_0 (U/mg)	Act_{max}	v_{max} (U/mg)	$A_{0.5}$ (mM)	n_H	K_{is} (mM)
I	0.54	3.94	2.13	0.33	1.88	-	0.01	10.08	0.10	2.95	2.18	-
II	0.11	2.61	0.29	7.94	2.06	-	0.002	2.42	0.005	4.46	2.52	-
III	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.24	42.01	52.09	8.59	1.44	5.64
IV	0.56	23.13	12.95	4.58	1.67	3.15	0.11	35.75	3.93	9.32	1.77	8.50

Tabla VII.5. Resultados de la activación por Gly. I, II, III y IV son las mismas condiciones que en la tabla VII.4.

	AhC4PEPC					ZmC4PEPC				
	v_0 (U/mg)	Act_{max}	v_{0max} (U/mg)	$A_{0.5}$ (mM)	n_H	v_0 (U/mg)	Act_{max}	v_{0max} (U/mg)	$A_{0.5}$ (mM)	n_H
I	0.43	1.46	0.63	5.77	1.30	0.02	128.54	2.57	41.56	2.16
II	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.003	366.77	1.1	192.79	2.95
III	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	8.21	4.93	32.27	1.06	0.77
IV	0.17	2.41	0.41	42.38	0.87	0.08	204.0	16.32	31.54	2.26

VII.3. COMPARACIONES ESTRUCTURALES ENTRE LA ZmC4PEPCY LA AhC4PEPC

El estudio de las diferencias estructurales entre ambas enzimas se abordó desde dos perspectivas. La primera fue comparar sus estructuras primarias mediante un alineamiento para corroborar que los aminoácidos que se reportan como esenciales para la actividad y regulación de la enzima se encuentran conservados en las secuencias de aminoácidos de las enzimas ZmC4PEPC y AhC4PEPC. Y la segunda fue obtener un modelo tridimensional de la AhC4PEPC para tratar de ver si las diferencias en la estructura primaria repercutían en la estructura tridimensional.

VII.3.1. Comparación de las estructuras primarias

En el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la ZmC4PEPC y de la AhC4PEPC (Figura VII.15) se obtuvo que ambas enzimas tienen un 76.8 % de identidad en los 965 aminoácidos alineados de los 970 aminoácidos de la ZmC4PEPC y de los 964 aminoácidos de la AhC4PEPC. El porcentaje de identidad tiene un valor esperado debido a que se ha reportado que la identidad entre las PEPC de plantas es de alrededor del 70 % (Izui *et al.*, 2004).

Los aminoácidos que se habían reportado como esenciales para la regulación o para la catálisis se encuentran conservados en ambas enzimas, excepto algunos de los aminoácidos propuestos como participantes en la regulación por glicina. Por ejemplo, las secuencias $^{175(170)}$ TAHPT $^{179(174)}$ y $^{595(589)}$ QQEVMV/IGYSDSGKDAG $^{609(603)}$, en las que la numeración es

ZmC4PEPC(AhC4PEPC) y los residuos marcados como X/Y, X es de ZmC4PEPC y Y es de AhC4PEPC. Se ha propuesto que la H177(172) marcada en la primera secuencia es importante para la catálisis, participando en la formación del CO₂ y el fosfato a partir del carboxifosfato, mientras que la K606(600) aparentemente participa en la unión de HCO₃⁻. Otra secuencia reportada como importante para la catálisis, específicamente para la unión de HCO₃⁻ es ⁶³⁸⁽⁶³²⁾FHGRGGTVGRGGG⁶⁵¹⁽⁶⁴⁵⁾ donde se reporta que la R647(641) participa en la unión de este sustrato en ausencia del inhibidor aproximándose al sitio activo y en presencia de este sirve para su unión. Los aminoácidos que se han mencionado como importantes para la unión del inhibidor en la secuencia de AhC4PEPC corresponden a los residuos R641, K829, R888 y N962, de los cuales todos están conservados.

		10	20	30	40	50	
Ama	2	ASGKVE	MAIDAQLRL	LAPKKVSEDDK	LVEYDALLLDR	FLDILESLHGS	GIRETVQELY 61
		A G E	IDAQLR	L P KVSEDDK	+EYDALL+DR	FL+IL+ LHG	+RE VQE Y
Maíz	6	APGPGE	HHIDAQLR	QLVPGKVS	EDDKLIEYDALL	VDRFLN	LQDLHGFS
		10	20	30	40	50	60
Ama	62	ERAAEYERT	HDTKKLEEL	GNLITSLD	AGDSIVIAK	SFQMLNLAN	LAEVQLAYRRRIKK 121
		E +A+YE	DT KL ELG	+T L D+I++A	S MLNLAN	LAEVQ+A+RRR	K
Maíz	66	EVSADYEG	KGGDTTKL	ELGAKLT	GAPADAILV	ASILEHMLN	LAEVQIAHRRNSK 125
		70	80	90	100	110	120
Ama	122	TKKGDFA	DESSAITES	DFEETL	RRLV-DL	KKSP	EIEFATLKNQTV
		KKG FADE	SA TESD	EETL+RLV	++ KSPEE	+F LKNQ	TVDLVLTAPTQSV
Maíz	126	LKGGFA	DESSAITES	DIEETL	KRLVSEV	GKSPEE	VFEALKNQTV
		130	140	150	160	170	180
Ama	181	LLQKHGR	IRIDCL	SQLYAK	DISPDDK	QELDEAL	QRAIQAAFR
		LLQK+ RIR	+CL+QL	AKDI+ DDK	QELDEAL	QRAIQAAFR	TVDLVLTAPTQSV
Maíz	186	LLQKNAR	IRNCLT	QLNARK	DITDDDK	QELDEAL	QREIQAAFR
		190	200	210	220	230	240
Ama	241	SYFHETI	NKGVPK	FLRRVDT	TALKNIG	INERVP	YNVPLIQFSS
		SY HET+NK	GVPKFL	RRVDTAL	KNIGINER	+PYNV	LI+FSS
Maíz	246	SYIHETV	NKGVPK	FLRRVDT	TALKNIG	INERL	PYNVSLIRFSS
		250	260	270	280	290	300
Ama	301	DVVL	LLARMAAN	MYETQIT	IDLMEF	LSMWR	CNDEVRARAQELH
		DV LLARMA	AN+Y QI	+LMEF	LSMWR	CNDE+R	RA+ELES S S
Maíz	306	DVCL	LLARMAAN	LYIDQIE	ELMEF	LSMWR	CNDELVRABE
		310	320	330	340	350	360
Ama	360	FLSEPY	VILGDV	RDKLYN	TREHAK	LLANGSS	DVPEESTFT
		P +EPY	VILG	VRDKLYN	TRE A	LLA+G	S++ES+FT I++
Maíz	366	PPNEPY	VILGHV	RDKLYN	TREHAK	LLASGV	SEISAE
		370	380	390	400	410	420
Ama	420	SGDQPI	ADGSL	LDLDM	FMRQVST	FGLSLV	KLDIQES
		GD+ IADG	SLD+RQV	TFGL	SLV	KLDIQES	+RHT+V+DAIT
Maíz	426	CGDKAI	ADGSL	LDLDR	QVET	FGLSLV	KLDIQES
		430	440	450	460	470	480

		490	500	510	520	530				
Ama	480	RQEWLLS	LRGK PL	PLFGSDLP	MSYEVADAIGT	FRVLAELP	NDSFGAYIISMATAPSDVLA 539			
		RQEWLLS	LRGK PL	DLP + E+AD	IG F VLAELP	DSEFG	YIISMATAPSDVLA			
Maiz	486	RQEWLLS	LRGK PLL	PLLPDL	PQTDEIADVIGAFH	VLAELP	PDSFGPYIISMATAPSDVLA 545			
		490	500	510	520	530	540			
		550	560	570	580	590				
Ama	540	VELLQRECGIKK	PLRVVPLF	KLADLQSA	AAASMTLRF	SIDWYK	NRINGTQEVHIGYS SG 599			
		VELLQRECG	+++PL	VVPLF	+LADLQSA	AS+ RLFS	+DWY +RI G Q+VM+GYS SG			
Maiz	546	VELLQRECG	RQPLRVVPLF	KLADLQSA	PASVERL	FSVDWYMDRI	KKGQVHIGYS SG 605			
		550	560	570	580	590	600			
		610	620	630	640	650				
Ama	600	DAGRLSAAW	QLYKVEQLI	QVAKEYGV	KLTMFHG	GGTVG	GGGPTHLALLSQPPDTIH 659			
		DAGRLSAAW	QLY+ QE++	QVAK YG	VKLT+FHG	GGTVG	GGGPTHLA+LSQPPDTI+			
Maiz	606	DAGRLSAAW	QLYRAQEEM	AQVAKRYG	VKLTLFHG	GGTVG	GGGPTHLALLSQPPDTIH 665			
		610	620	630	640	650	660			
		670	680	690	700	710				
Ama	660	GSLRVTIQ	QVEIEQS	FGEHLCF	RTRLERY	TAATLEH	GIDPPTSPKPEWRALMDEMVAVIT 719			
		GS+RVT+Q	QVEIE	FGEHLCF	+TL+R+TA	ATLEHG+	PP SPKPEWR LMDEMVAV+ T			
Maiz	666	GSIRVTV	QVEIEF	CFGEEHLC	FQTLQR	FRTAATLE	HGMHPVPSPKPEWRKLMDEMVAVAT 725			
		670	680	690	700	710	720			
		730	740	750	760	770				
Ama	720	KEYRSVVL	QEPFRF	VEYFRSAT	PELEYGR	MNIGS PA	PGGGITLRAIPWIFSWTQTR 779			
		+EYRSV	+E RF	VEYFRSAT	PE EYGR	MNIGS PA	PGGGI TLRAIPWIFSWTQTR			
Maiz	726	EEYRSV	VVKEAR	FVEYFR	SATPETEY	GRMNIGS	PA PGGGITLRAIPWIFSWTQTR 785			
		730	740	750	760	770	780			
		790	800	810	820	830				
Ama	780	FHLPVWL	GCGA	AFKHVIE	KDKINL	AMLKDM	YNQWFFRV	TIDLLEMVFA GDPGIAALYD 839		
		FBLPVWL	G	GAAFK	I+KD++N	+LK+MYN	+W FFRVT+DL	LEMVFA GDPGIA LYD		
Maiz	786	FHLPVWL	G	GAAFK	EIDK	DKVRN	FQVLKEM	YNWFFRV	TIDLLEMVFA GDPGIAGLYD 845	
		790	800	810	820	830	840			
		850	860	870	880	890				
Ama	840	KLLVKDEL	KPFGEN	LRSYSLE	AQKFLLE	IAGHKD	PLDADPYL	KQILRLDPYTTTLNVFQ 899		
		+LLV +EL	KPFG+ LR	Y+E Q+	LL+IAG	HKD L+ DP	+LKQ L L+PY	TTLNVFQ		
Maiz	846	ELLVAE	ELKPF	GKQLR	DKYVET	QQLLQI	AGHKDILE	GDPFLKQGLVLPNYITTLNVFQ 905		
		850	860	870	880	890	900			
		910	920	930	940	950				
Ama	900	VYTLKRIR	DP	FFVTVR	PHLSKEM	DANS	LAADLV	KLNP	SEYPPGLEDTLILTMKGIAAG 959	
		YTLKRIR	DP+ F	VT +P	LSKE +	A	LVKLN	P	SEYPPGLEDTLILTMKGIAAG	
Maiz	906	AYTLKRIR	DP	FNKVT	PQPPLS	K	FADE	NKPAGL	VKLN	PASEYPPGLEDTLILTMKGIAAG 965
		910	920	930	940	950	960			
Ama	960	MC	TG	964						
		MC	TG							
Maiz	966	MC	TG	970						

Figura VII.15. Alincamiento de las secuencias de ZmC4PEPC y AhC4PEPC. En la línea intermedia entre las dos secuencias alineadas, se indican los aminoácidos conservados y los no conservados pero con propiedades similares (con el símbolo +). Los aminoácidos que se reportan como importantes para la catálisis o la regulación alostérica se han sombreado: ■ residuos que participan en la unión del complejo Mg^{2+} -PEP, ■ residuos para la unión de HCO_3^- , X residuos de la bolsa hidrofóbica que une al sustrato, ■ residuos para la unión del sulfato (sitio propuesto para la unión de azúcares fosforilados), X residuos para la unión de glicina, ■ residuos para la unión del inhibidor, ■ residuos del sitio de fosforilación y ■ residuos para la unión de los dímeros. Los aminoácidos en color rojo (X) forman parte de un asa superficial en la interfase del dímero que parece ser importante para la regulación general de la enzima y los escritos en color azul (X) conforman un asa esencial para la regulación por glicina.

En cuanto a los aminoácidos que se ha reportado que afectan la regulación por Gly, los conservados en ambas enzimas son R226(221), D228(223), C335(330), K927(921) y K940(934). Hay un aminoácido que sufre un cambio conservador N933(S927) y dos que no están conservados: E932(N926) y G937(D931). Estos tres aminoácidos no conservados, particularmente los dos últimos, pueden jugar un papel relevante en la unión del aminoácido al sitio alostérico y ser punto importante en la diferencia en regulación por aminoácidos neutros entre las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Cabe mencionar que cuando se mutan algunos de los aminoácidos R226Q, D228N, E229A, R231A, R232Q, C335S, K927Q, E932Q, N933G, G937D y K940Q (Yuan *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2007) se producen cambios en la respuesta no sólo a glicina sino también a Glc6P, PEP, malato y aspartato. Por ejemplo la mutación D228N afecta la respuesta a glicina y a Glc6P. Esto pudiera deberse a que los sitios alostéricos para los efectores positivos están muy cerca como se ha propuesto (Yuan *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2007), lo que explicaría que el cambio de un aminoácido afecte ambos sitios y por ende la respuesta a los efectores que se unen a ellos. Pero no se puede llegar a una conclusión contundente acerca de cuáles aminoácidos participan en la unión de los aminoácidos neutros hasta que se logre obtener una estructura tridimensional cristalográfica con glicina unida a la enzima.

Por lo tanto, a partir de un análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos no es posible determinar con precisión cuáles son los aminoácidos que diferencian la respuesta de las PEPC de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas a glicina, aunque los aminoácidos que no se encuentran conservados e inclusive el residuo con un cambio conservador son fuertes candidatos a ser los determinantes en esta diferencia. Se requerirá mutar estos residuos para comprobar si efectivamente ellos son los responsables de las diferencias.

VII.3.2. Comparación de la estructura terciaria

El modelo tridimensional de la estructura de la AhC4PEPC se, obtuvo como se describe en Materiales y Métodos, tomando como molde la estructura cristalográfica de la ZmC4PEPC (número de acceso PDB 1JQO) y la secuencia de aminoácidos de la AhC4PEPC desde el aminoácido 31 al 964.

Los residuos esenciales para la catálisis en el modelo de la AhC4PEPC (Figura VII.16) se superponen casi en su totalidad con los aminoácidos de la ZmC4PEPC. Así podemos observar que los residuos esenciales para la unión del metal E566(560) y D603(597); para la unión del PEP R456(450), R647(641), R759(753) y R773(767), así como la histidina catalítica H177(172) están sobrepuestos (Figura VII.16 B). En estas figuras se muestran en naranja los aminoácidos de la ZmC4PEPC y en azul claro los de la AhC4PEPC. Como están encimados se puede apreciar que las cadenas laterales de los residuos de interés tienen una mezcla de ambos colores. Lo mismo se observa en el caso de los residuos que forman la bolsa hidrofóbica W288(283), L564(558) y M598(592) (Figura VII.16 C). Debido a que en la estructura de la ZmC4PEPC no se observa densidad electrónica de los residuos que unen al HCO_3^- , porque forman parte de un asa móvil, no se observa la mezcla de colores y al nombrarlos se puso en el número correspondiente a la numeración de la ZmC4PEPC con un asterisco para distinguir a los residuos que no aparecen en esta estructura. Estos residuos son R762*(757), K763*(758), P764*(759) excepto por K606(600) que sí se logró resolver en la estructura cristalina de ZmC4PEPC (Figura VII.16 C). En el modelo de la AhC4PEPC sí aparecen estos residuos y están en la posición adecuada para fungir como la compuerta que evitaría la entrada de agua y de esta forma evita la reacción de hidrólisis del PEP.

En los sitios alostéricos el modelo de la AhC4PEPC se puede observar que los residuos que participan en la regulación por Glc6P: R183(178), R184(179), D228(223), E229(224), I230(225), R231(226), R232(227) y R372(366), siendo este último el que interactúa con este sitio desde el monómero adyacente, se empalman perfectamente (Figura VII.17 B y C). Mientras que para el sitio de glicina hay ciertas diferencias. Los residuos de este sitio que se traslapan completamente en la estructura cristalográfica y el modelo son R226(221), D228(223), K927(921), V939(932), K940(933) y C335(330). Este último parece tener la misma función que R372(366) del sitio alostérico de Glc6P (Figura VII.17 B y E), ya que se encuentran en un sitio donde están lejos de los sitios alostéricos propuestos para glicina y Glc6P en la misma subunidad pero desde esa posición pueden interactuar con los sitios alostéricos correspondientes de la subunidad adyacente. El residuo no conservado G937(D931) podría afectar la unión del efector en la AhC4PEPC (Figura VII.17 E), ya que además de tener un mayor volumen le confiere carga negativa al sitio, la cual puede interactuar con la carga negativa del activador glicina y evitar la unión de éste, cabe mencionar que la mutación de este residuo en la ZmC4PEPC (G937D) disminuye significativamente la sensibilidad a glicina (Gonzalez *et al.*, 2007). En el sitio de glicina también están E932*(N926) y N933*(S927) que se muestran en el modelo de la

AhC4PEPC y que no aparecen en la estructura cristalográfica de la ZmC4PEPC. Estos aminoácidos no conservados pudieran también afectar la unión del efector al sitio alostérico.

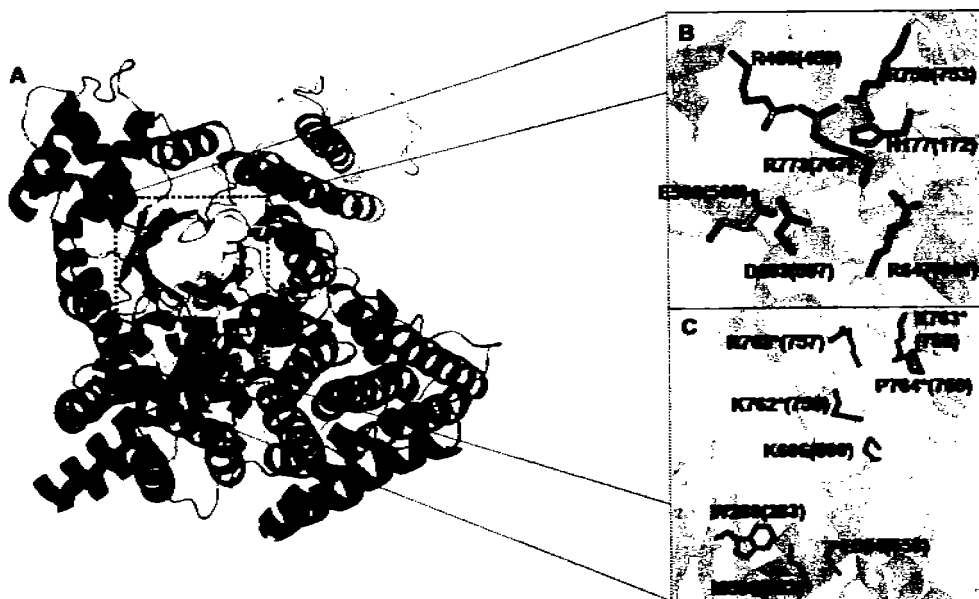


Figura VII.16. Modelo tridimensional de la AhC4PEPC. A) Monómero donde se enmarca la zona donde se encuentra el sitio activo. B) Aminoácidos del sitio activo que participan en la unión del metal, en la unión de PEP y la histidina catalítica. C) Aminoácidos de unión del HCO₃⁻ y residuos que participan en la formación de la bolsa hidrofóbica.

Los residuos E932*(N926) y N933*(S927) se encuentran en un asa que es muy importante para la regulación por Gly (Gonzalez *et al.*, 2007). La asparagina es más corta que el glutamato. Por ello el papel que juega el glutamato es formar un puente de hidrógeno con el grupo amino del activador Gly, éste no se podrá formar al ser más corto el residuo equivalente en la AhC4PEPC. La N933 en la ZmC4PEPC cuyo residuo equivalente en la AhC4PEPC es S927 puede tener un efecto similar que el anterior, N933 se ha propuesto que se une al grupo amino de la Gly formando también un puente de hidrógeno, pero en la AhC4PEPC al ser serina más corto se le dificultaría formar tal enlace.

Finalmente, los aminoácidos que unen al inhibidor se encuentran en el modelo totalmente traslapados con los residuos del template (Figura VII.17 D). Dado que es un modelo el que estamos analizando no esperamos ver cambios sutiles que darían cuentas de las diferencias de afinidad por el inhibidor de estas dos enzimas.

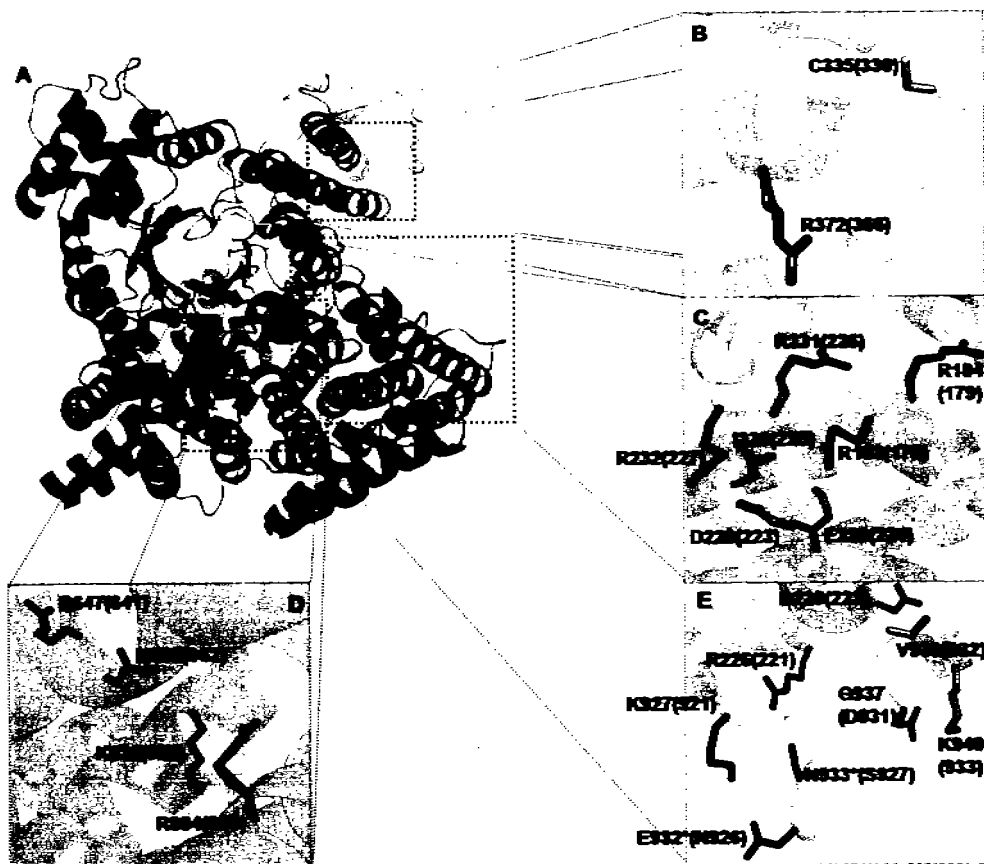


Figura VII.17. Modelo tridimensional de la AhC4PEPC. A) Monómero donde se enmarcan los sitios alostéricos que se han propuesto para la ZmC4PEPC. B) Aminoácidos de los sitios de unión de la Glc6P y la Gly que interactúan con los monómeros adyacentes. C) Sitio de unión de la Glc6P. D) Sitio de unión del aspartato. E) Sitio de unión de la glicina.

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir lo siguiente:

- En condiciones cercanas a las fisiológicas, la forma no fosforilada de la AhC4PEPC tiene mayor afinidad por el PEP y por los activadores alostéricos y una menor afinidad por malato que la forma no fosforilada de la ZmC4PEPC. Estas propiedades cinéticas la

hacen ser más activa que la enzima de maíz en las condiciones que se suponen prevalecen en la célula de mesófilo durante la noche.

- Gly es un activador muy pobre de la forma no fosforilada de la AhC4PEPC, tanto en condiciones cercanas a las fisiológicas, es decir a concentraciones bajas de PEP y bicarbonato, como en concentraciones altas de estos sustratos.
- La unión de Glc6P y malato tanto a la AhC4PEPC como a la ZmC4PEPC no es mutuamente excluyente, mientras que la unión de Gly y malato en el caso de la ZmC4PEPC si lo es.
- El ion bicarbonato afecta la activación de ambas enzimas por Glc6P pero no por Gly.
- Estructuralmente existen diferencias que podrían justificar las diferencias en la respuesta a glicina de ambas enzimas.

Y en forma general podemos concluir que parte de la hipótesis de este trabajo es cierta, dado que la respuesta de la AhC4PEPC a los aminoácidos neutros es muy pobre comparada con la de la ZmC4PEPC, muy probablemente por las diferencias estructurales entre ambas enzimas y no por las condiciones en que se realizan los ensayos. La mayor afinidad de la AhC4PEPC por el sustrato y los azúcares fosforilados y su baja afinidad por el inhibidor en comparación con la ZmC4PEPC, pudiera hacer innecesaria la activación por los aminoácidos neutros de la AhC4PEPC.

IX. PERSPECTIVAS

Quedan muchos estudios por hacer para entender mejor las propiedades alostéricas de las C4-PEPC. Entre ellos mencionaré los siguientes:

1. Repetir los estudios de velocidad inicial descritos en este trabajo de la AhC4PEPC usando ahora enzima fosforilada y condiciones cercanas a las que prevalecen durante el día.
2. Investigar más a fondo los mecanismos de activación por los efectores alostéricos en ambas enzimas por medio de estudios de velocidad inicial y de unión al equilibrio.
3. Obtener en *Escherichia coli* ambas enzimas recombinantes con colas de histidina, lo que nos aseguraría que no estuvieran fosforiladas ni proteolizadas eliminando la incertidumbre que existe a estos respectos cuando la enzima se obtiene directamente de las plantas.

4. Estudiar en ambas enzimas los efectos sinérgicos de Glc6P y Gly en diferentes condiciones de ensayo y con enzimas no fosforilada y fosforiladas de manera que se simulen las condiciones de la noche y del día.
5. Estudiar a mayor profundidad los efectos del HCO_3^- sobre la respuesta de las enzimas al activador Glc6P y al inhibidor malato.
6. Obtener la estructura tridimensional de la proteína con alguno o ambos efectores alostéricos positivos (Glc6P y Gly) para poder definir con claridad los sitios de unión.
7. Apoyándonos en la estructura cristalográfica se pueden realizar más estudios de mutagénesis para determinar la función de residuos que parezcan importantes para la regulación y la catálisis.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Andreo CS, Gonzalez DH, & Iglesias AA** (1987) Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase: Structure and regulation. *FEBS Lett.* **213**: 1-8.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, & Schwede T** (2006) The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for proteins structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195-201.
- Bakrim N, Prioul JL, Deleens E, Rocher JP, Arrio-Dupont M, Vidal J, Gadal P, & Chollet R** (1993) Regulatory phosphorylation of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. A cardinal event influencing the photosynthetic rate in sorghum and maize. *Plant Physiol.* **101**: 891-897.
- Bandarian V, Poehner WJ, & Grover SD** (1992) Metabolite activation of crassulacean acid metabolism and C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **100**: 1411-1416.
- Banduraki RS** (1955). Further studies on the enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphorylenolpyruvate and carbon dioxide. *J Biol. Chem.* **217**: 137-150.
- Blonde JD, & Plaxton WC** (2003) Structural and kinetic properties of high and low molecular mass phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms from the endosperm of developing castor oilseeds. *J. Biol. Chem.* **278**: 11867-11873.
- Borland AM, & Taybi T** (2004) Synchronization of metabolic processes in plants with Crassulacean acid metabolism. *J. Exp. Bot.* **55**: 1255-1265.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Chollet R, Vidal J, & O'Leary MH** (1996) Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 273-298.
- Colombo SL, Andreo CS, & Collet R** (1998) The interaction of shikimic acid and protein phosphorylation with PEP carboxylase from the C₄ dicot *Amaranthus viridis*. *Phytochemistry* **48**: 55-59.
- Coombs J, & Baldry CW** (1975) Metabolic regulation in C₄ photosynthesis: phosphoenolpyruvate carboxylase and 3C intermediates of the photosynthetic carbon reduction cycle. *Planta* **124**: 153-158
- Coombs J, Baldry CW, & Burke C** (1973) The C-4 pathway in *Pennisetum purpureum*. *Planta* **110**: 95-107.

- Cooper TG, & Wood HG** (1971) The carboxylation of phosphoenolpyruvate. The active species of CO₂ utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **246**: 5488-5490.
- Dodd AN, Borland AM, Haslam RP, Griffiths H, & Maxwell K** (2002) Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *J. Exp. Bot.* **53**: 569-580.
- Doncaster HD, & Leegood RC** (1987) Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Activity in Maize Leaves. *Plant Physiol.* **84**: 82-87.
- Duff SMG, Andreo CS, Pacquit V, Lepiniec L, Sarath G, Condon SA, 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.
- Frank J, Clarke RJ, Vater J, & Holzwarth JF** (2001) Influence of allosteric effectors on the kinetics and equilibrium binding of phosphoenolpyruvate (PEP) to phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) from *Zea mays*. *Biophys. Chem.* **92**: 53-64.
- Frank J, Vater J, & Holzwarth JF** (1999) Kinetics and equilibrium binding of phosphoenolpyruvate to phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1**: 455-461.
- Fujita N, Izai K, Nishino T, & Katsuki H** (1984a) Reaction mechanism of phosphoenolpyruvate carboxylase: bicarbonate-dependent dephosphorylation of phosphoenol-alpha-ketobutyrate. *Biochemistry* **23**: 1774-1779.
- Fujita N, Miwa T, Ishijima S, Izai K, & Katsuki H** (1984b) The primary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the *ppc* gene and deduced amino acid sequence. *J. Biochem. (Tokio)* **95**: 909-916.
- Furbank RT, & Leegood RC** (1984) Carbon metabolism and gas exchange in leaves of *Zea mays* L. Interaction between the C3 and C4 pathways during photosynthesis induction. *Planta* **162**: 457-462.
- Garson L, & Gray V** (1991) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by nitrate and alanine. *Biochem. Int.* **23**: 299-305.
- Gayathri J, Parvathi K, & Raghavendra AS** (2000) Purification and stability during storage of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus*, a NAD-ME type C₄ plant. *Photosynthetica* **38**: 45-52.
- Gillinta J, & Grover SD** (1995) Kinetic interactions of glycine with substrates and effectors of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Photosynth. Res.* **45**: 121-126.

- Gonzalez L, Sanchez S, Horne J, Kanzaki G, & Grover S** (2007) Mutational analysis of a proposed glycine binding site in PEP carboxylase. *FASEB J.* 21: 806-3.
- Guex N, & Peitsch MC** (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.
- Hatch MD** (1987) C4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* 895: 81-106.
- Hatch MD, & Slack CR** (1970) Photosynthetic CO₂ fixation pathways. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21: 141-162.
- Hayakawa S, Matsunaga K, & Sugiyama T** (1981) Light induction of phosphoenolpyruvate carboxylase in etiolated maize leaf tissue. *Plant Physiol.* 67: 133-138.
- Huang X, & Miller W** (1991) A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* 12: 337-357.
- Huber SC, & Edwards GE** (1975) Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄ plants by malate and aspartate. *Can. J. Bot.* 53: 1925-1933.
- Ishijima S, Katagari F, Kodaki T, Izai K, Katsuki H, Nishikawa H, & Ooi T** (1985) Comparison of amino acid sequences between phosphoenolpyruvate carboxylases from *Escherichia coli* (allosteric) and *Anacystis nidulans* (non-allosteric): identification of conserved and variable regions. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 133: 436-441.
- Izai K, Ishijima S, Yamaguchi Y, Katagari F, Murata T, Shigaseda K, Sugiyama T, & Katsuki H** (1986) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding active phosphoenolpyruvate carboxylase of the C₄-pathway from maize. *Nucleic Acids Res.* 14: 1615-1628.
- Izai K, Matsumura H, Furumoto T, & Kai Y** (2004) Phosphoenolpyruvate carboxylase: A new era of Structural Biology. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 69-84.
- Janc JW, O'Leary MH, & Cleland WW** (1992). A kinetic investigation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*. *Biochemistry* 31: 6421-6426.
- Jawali N** (1990) Histeretic nature of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize. *Arch. Biochem. Biophys.* 277: 69-73.
- Jenkins CLD, Furbank RT, & Hatch MD** (1989) Mechanism of C₄ photosynthesis. *Plant Physiol.* 91: 1372-1381.
- Jenkins CLD, Harris RLN, & McFadden HG** (1987) 3,3-dichloro-2-dihydroxyphosphinoylmethyl-2-propenoate, a new, specific inhibitor of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. Int.* 14: 219-226.

- Jiao J, & Chollet R (1991) Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C4 and Crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* **95**: 981-985.
- Jiao JA, Podesta FE, Chollet R, O'Leary MH, & Andreo CS (1990) Isolation and sequence of an active-site peptide from maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase inactivated by pyridoxal 5'-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **1041**: 291-295.
- Jiao JA, Vidal J, Echevarría C, & Chollet R (1991) In vivo regulatory phosphorylation site in C(4)-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase from maize and sorghum. *Plant Physiol.* **96**: 297-301.
- Kai Y, Matsumura H, Inoue T, Terada K, Nagara Y, Yoshinaga T, Kihara A, Tsumura K, & Izui K (1999) Three dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: a proposed mechanism for allosteric inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 823-828.
- Kai Y, Matsumura H, & Izui K (2003) Phosphoenolpyruvate carboxylase: three-dimensional structure and molecular mechanisms. *Arch Biochem. Biophys.* **414**:170-179.
- Karabourniotis G, Manetas Y, & Gavalas NA (1985) Detecting photoactivation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C(4) plants: An effect of pH. *Plant Physiol.* **77**: 300-302.
- Katagari F, Kodaki T, Izui K, & Katsuki H (1985) Nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Gene* **38**:265-269.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leegood RC (1985) The intercellular compartmentation of metabolites in leaves of *Zea mays* L. *Planta* **164**: 163-171.
- Leegood RC, & von Caemmerer S (1994) Regulation of photosynthetic carbon assimilation in leaves of C3-C4 intermediate species of *Moricandia* and *Flaveria*. *Planta* **192**: 232-238
- Lepiniec L, Thomas M, & Vidal J (2003) From enzyme activity to plant biotechnology: 30 years of research on phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol. Biochem.* **41**: 533-539.
- Lepiniec L, Vidal J, Chollet R, Gadal P, & Crétin C (1994) Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation, and evolution. *Plant Sci.* **99**: 111-124.
- Matsumura H, Terada M, Shirakata S, Inoue T, Yoshinaga T, Izui K, & Kai Y (1999) Plausible phosphoenolpyruvate binding site revealed by 2.6 Å structure of Mn²⁺-bound phosphoenolpyruvate carboxylase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **458**: 93-96.

- Matsumura H, Xie Y, Shirakata S, Inoue T, Yoshinaga T, Ueno Y, Izai K, & Kai Y (2002)** Crystal structures of C₄ form maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylases. *Struct.* **10**: 1721-1730.
- McNaughton GAL, Fewson CA, Wilkins MB, & Nimmo HG (1989)** Purification, oligomerization state and malate sensitivity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **261**: 349-355.
- Mizioro HM, Nowak T, & Mikhvan AS (1974)** Spinach leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: purification, properties, and kinetic studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**: 378-389.
- Monod J, Wyman J, & Changeux JPJ (1965)** On the nature of allosteric transitions. A plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**: 88-118.
- Mújica-Jiménez C, Castellanos-Martínez A, & Muñoz-Clares RA (1998)** Studies of the allosteric properties of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase with the phosphoenolpyruvate analog phosphomycin as activator. *Biochim. Biophys. Acta* **1386**: 132-144.
- Mukerji SK (1977)**. Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. The effect of divalent cations on activity. *Arch Biochem. Biophys.* **182**: 352-359.
- Murmu J, Chinthapalli B, & Raghavendra AS (2003)** Marked modulation by phosphate of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of *Amaranthus hypochondriacus*, a NAD-ME type C₄ plant: decrease in malate sensitivity but no change in phosphorylation status. *J. Exp. Bot.* **54**: 2661-2668.
- Nelson DL, & Cox MM (2005)** Carbohydrates biosynthesis in plants and bacteria. In: *Lehninger Principle of Biochemistry*, 4th edition, pp 751-782. W.H. Freeman and Company.
- Nguyen TT, Ngam EK, Jenkins J, & Scott DG (1988)** Metal ion interactions with phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea* and *Zea mays*. *Plant Physiol.* **86**: 104-107.
- Nishikido T, & Takanashi H (1973)** Glycine activation of PEP carboxylase from monocotyledonous C₄ plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **53**: 126-133.
- Ogawa N, Kai T, Yabuta N, & Izai K (1997)** Phosphoenolpyruvate carboxylase of maize leaves: an improved method for purification and reduction of the inhibitory effect of malate by ethylene glycol and bicarbonate. *Plant Cell Physiol.* **38**: 76-80.
- O'Leary MH (1982)** Phosphoenolpyruvate carboxylase: An enzymologist's view. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**: 297-315.

- O'Leary MH, Rife JE, & Slater JD (1981) Kinetic and isotope effect studies of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochemistry* 20: 7308-7314.
- Pai EF, Sachsenheimer W, Schrimmer RH, & Schulz GE (1977) Substrate positions an induced-fit in crystalline adenylate kinase. *J. Mol. Biol.* 114: 37-45.
- Parry MAJ, Andralojc PJ, Mitchell RAC, Madgwick PJ, & Keys AJ (2003) Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function, and regulation. *J. Exp. Bot.* 54: 1321-1333.
- Parvathi K, Bhagwat AS, & Raghavendra AS (1998) Modulation by bicarbonate of catalytic and regulatory properties of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from *Amaranthus hypochondriacus*: desensitization to malate and glucosa-6-phosphate and sensitization to Mg²⁺. *Plant Cell Physiol.* 39: 1294-1298.
- Parvathi K, Bhagwat AS, Ueno Y, Izai K, & Raghavendra AS (2000) Illumination increases the affinity of phosphoenolpyruvate carboxylase to bicarbonate in leaves of a C₄ plant, *Amaranthus hypochondriacus*. *Plant Cell Physiol.* 41: 905-910.
- Podesta FE, & Andreo CS (1989) Maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. Oligomeric state and activity in the presence of glycerol. *Plant Physiol.* 90: 427-433.
- Rodríguez-Sotres R, & Muñoz-Clares RA (1990). Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 276: 180-190.
- Rodríguez-Sotres R, López-Pozos R, & Muñoz-Clares RA (1987) Further studies of the short-term regulation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by light. *J. Plant Physiol.* 129: 191-199.
- Rustin P, Meyer CR, & Wedding RT (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.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, & Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology modelling server. *Nucleic Acid Res.* 31: 3381-3385.
- Segel IH Enzyme Kinetics. Edition published 1993. Wiley Interscience, New York
- Stitt M, & Heldt HW (1985a) Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-bisphosphate. Intercellular metabolite distribution and properties of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in leaves of *Zea mays L.* *Planta* 164: 179-188.
- Stitt M, & Heldt HW (1985b) Generation and maintenance of concentration gradients between the mesophyll and bundle sheath in maize leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 808: 400-414.

- Tchea TT, & Vennesland B** (1955) Enzymatic carbon dioxide fixation in to oxaloacetate in wheat germ. *J. Bio. Chem.* **213**: 533-546.
- Ting IP, & Osmond CB** (1973) Activation of plant P-enolpyruvate carboxylases by glucose-6-phosphate: a particular role in Crassulacean acid metabolism. *Plant Science Lett.* **1**: 123-128.
- Tovar-Méndez A, Mújica-Jiménez C, & Muñoz-Clares RA** (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, Mújica-Jiménez C, & Muñoz-Clares RA** (2000) Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* **123**: 149-160.
- Tovar-Méndez A, Rodríguez-Sotres R, López-Valentín D, & Muñoz-Clares RA** (1998) Re-examination of the roles of PEP and Mg^{2+} in the reaction catalysed by the phosphorylated and non-phosphorylated forms of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of *Zea mays*: Effects of the activators glucose 6-phosphate and glycine. *Biochem. J.* **332**: 633-642.
- Uedan K, & Sugiyama T** (1976) Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiol.* **57**: 906-910.
- Wang YH, Duff SMG, Lepiaiec L, Crétin C, Sarath G, Condon SA, Vidal J, Gadal P & Chollet R** (1992) Site-directed mutagenesis of the phosphorylated serine (Ser^b) in C₄ Phosphoenolpyruvate carboxylase from Sorghum. The effect of negative charge at position 8. *J. Biol. Chem.* **267**: 16759-16762.
- Wedding RT, Black MK, & Meyer CR** (1990) Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase by malate. *Plant Physiol.* **92**: 456-461.
- Wedding RT, Rustin P, Meyer CR, & Black MK** (1988) Kinetic studies of the form substrate bound by Phosphoenolpyruvate Carboxylase. *Plant Physiol.* **88**: 976-979.
- Weiner H, & Heldt HW** (1992) Inter- and intracellular distribution of amino acids and other metabolites in maize (*Zea mays*) leaves. *Planta* **187**: 242-246.
- Wold F, & Ballou CE** (1957). Studies on the enzyme enolase. *J. Biol. Chem.* **227**: 301-312.
- Wong KF, & Davies DD** (1973) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Zea mays* by metabolites. *Biochem. J.* **131**: 451-458
- Wu MX, & Wedding RT** (1985) Diurnal regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula*. *Plant. Physiol.* **77**: 667-675.
- Yano M, Terada K, Umiji K, & Izui K** (1995) Catalytic role of an arginine residue in the highly conserved and unique sequence of phosphoenolpyruvate carboxylase. *J. Biochem. (Tokyo)* **117**:1196-1200.

- Yasushi K, Matsumura H, Inoue T, Terada K, Nagara Y, Yoshinaga T, Kihara A, Tsumura K, & Izui K (1999)** Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: A proposed mechanism for allosteric inhibition. *Biochemistry* **96**: 823–828.
- 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* 31P NMR spectroscopy. *Plant Cell Physiol.* **29**: 919–924.
- Yuan J, Sayegh J, Mendez J, Sward L, Sanchez N, Sanchez S, Waldrop G, & Grover S (2006)** The regulatory role of residues 226–232 in phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Photosynth. Res.* **88**: 73–81.