



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**MÚLTIPLES ESTADOS CONFORMACIONALES DE LA FOSFOENOLPIRUVATO
CARBOXILASA C₄ DE MAÍZ INDUCIDOS POR LA UNIÓN DE SU SUSTRATO
FOSFOENOLPIRUVATO Y DE SUS EFECTORES ALOSTÉRICOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. C. FÁTIMA BARREDA HUERTA

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES

Facultad de Medicina

DR. ALEJANDRO SOSA PEINADO

Facultad de Medicina

Ciudad de México. Diciembre del 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

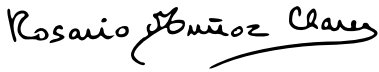
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado Asignado

PRESIDENTE: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
VOCAL: Dr. Eleazar Martínez Barajas
VOCAL: Dr. Luis Olguín Contreras
VOCAL: Dra. Adela Rodríguez Romero
SECRETARIO: Dra. Georgina Regina Garza Ramos Martínez

Tutor principal

Dra. Rosario A. Muñoz Clares



Sustentante

M.C. Fátima Barreda Huerta



AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a la Facultad de Química y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por la formación académica que se me brindó y por permitirme concluir con este proyecto.

Al programa de Apoyo al Posgrado y la Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), UNAM, por el apoyo financiero otorgado para el desarrollo del proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de posgrado que se me otorgó bajo el número de becario 49936 durante el periodo de febrero del 2008 hasta enero del 2011.

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares por darme la oportunidad de ingresar y trabajar en su grupo de investigación, su invaluable apoyo, su paciencia y sus enseñanzas durante todos estos años.

Al Dr. Ismael Bustos Jaimes por su generosidad y su permanente disposición a asesorarme, brindarme su tiempo en atender mis preguntas, por compartir su experiencia y conocimiento. Y finalmente, por su invaluable apoyo en la experimentación necesaria para concluir este proyecto. ¡Más gracias!

Al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz por su generoso apoyo en los alineamientos de las secuencias, tanto del gen como de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.

Al Dr. Guillermo Mendoza de la Facultad de Medicina (*q.e.p.d.*) por haber realizado los estudios preliminares de espectrometría de masas de la fosfoenolpiruvato carboxilasa.

Al Biol. Carlos Mújica Jiménez por su gentileza, generoso y siempre solidario apoyo, sus enseñanzas, asesoría técnica en el laboratorio y apoyo incondicional en el trabajo experimental hasta el final de este proyecto.

A los miembros del jurado por las observaciones puntuales y sugerencias para mejorar la versión final del manuscrito de tesis.

A los señores Leticia García Gutiérrez y Julio Ignacio Palacios Ordóñez por su apoyo con los trámites durante la realización y término del doctorado, respectivamente.

A los compañeros del laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química: Víctor Zaldívar, Carmina Montiel, Rodrigo Güemez, Ángel Gabriel Díaz, Alicia Sánchez Izquierdo, y a la Dra. Lilian González, por los momentos compartidos y por haber sido mi familia por mucho tiempo.

DEDICATORIAS:

“Busqué a mi Dios, mi Dios me eludió; busqué a mi alma, a mi alma no la pude ver; busqué a mi hermano y encontré a los tres”.

A mis padres Rufina y Delfino por su infinito apoyo, sin condiciones, y en todos los momentos de mi existencia. Mi gratitud no es suficiente, pero les agradezco darme la vida y enseñarme a ser un ser humano independiente y útil a otras personas:

“Esta noche han venido en sueños y me han dado unas cuantas monedas en mis manos. No recuerdo si eran muchas o pocas. Tampoco sé de qué metal estaban hechas, si eran monedas de un metal precioso o no. Pero no importa, porque me siento plena y contenta. Y quiero decirles ¡Gracias!, son suficientes, son las monedas que necesito y las que merezco. Así que las tomo con gusto porque vienen de ustedes. Con ellas seré capaz de recorrer mi propio camino”

A mi hermano Miguel Ángel porque me enseñaste el camino al departamento de Bioquímica de la UNAM.

A mi cuñada Nelina por ser testigo importante en esta etapa de mi vida.

A Christopher y Miguelito. Cuando pensé en renunciar recordé que para pedirles que terminen algo, debo terminarlo yo primero.

A mi querido amigo Bob Johnson Bundy (q.e.p.d). Siempre estás en mi mente.

A la Dra. Rosario Adelaida porque no creo que haberla conocido fuera coincidencia.

Paloma:

Este manuscrito es el resultado del proyecto por el que no estuvimos juntas durante semanas, meses y años. No podré reponer mis ausencias, pero quiero decirte que tú eres la razón por la que terminé este ciclo. Recuerda que somos compañeras de eones de tiempo y, por lo tanto, las semanas, meses y años son sólo un minuto en la eternidad.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	12
<i>I. 1. Asimilación fotosintética del CO₂</i>	12
<i>I. 2. Regulación de la actividad de las enzimas PEPC-C₄</i>	16
<i>I. 3. Estructura tridimensional de las enzimas PEPC-C₄</i>	19
<i>I. 4. Estructura del sitio activo de las enzimas PEPC-C₄</i>	22
<i>I. 5. Estructura de los sitios alostéricos de las enzimas PEPC-C₄</i>	23
II. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
III. HIPÓTESIS	33
IV. OBJETIVOS	33
<i>IV.1. Objetivo general</i>	33
<i>IV.2. Objetivos particulares</i>	33
V. MATERIALES Y MÉTODOS	34
<i>V.1. Subclonación del gen ppc-C₄</i>	34
<i>V.2. Expresión, purificación y caracterización cinética de la enzima recombinante</i>	35
<i>V.3. Experimentos de unión al equilibrio del sustrato y efectores alostéricos a la ZmPEPC-C₄</i>	38
<i>V.4. Experimentos de dicroísmo circular en el UV cercano con la ZmPEPC-C₄</i>	39
<i>V.5. Experimentos de proteólisis limitada de la ZmPEPC-C₄ con tripsina</i>	39
<i>V.6. Análisis bioinformáticos estructurales de la ZmPEPC-C₄</i>	40

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
<i>VI.1. Subclonación del gen que codifica para la ZmPEPC-C₄</i>	40
<i>VI.2. Obtención de la ZmPEPC-C₄ recombinante</i>	46
<i>VI.3. Purificación de la ZmPEPC-C₄ recombinante</i>	46
<i>VI.4. Determinación de los parámetros de unión al equilibrio del sustrato y efectores de la ZmPEPC-C₄ mediante cambios en la fluorescencia extrínseca del complejo ANS-ZmPEPC-C₄</i>	48
<i>VI.5. Efecto de los ligandos de la ZmPEPC-C₄ sobre su espectro de dicroísmo circular en el UV cercano</i>	53
<i>VI.6. Proteólisis parcial de la ZmPEPC-C₄ libre y en complejo con sus ligandos</i>	55
<i>VI.7. Efecto de la incubación con tripsina de la ZmPEPC-C₄ sobre su actividad y sensibilidad a los efectores alostéricos</i>	58
<i>VI.8. Posibles sitios de corte de la ZmPEPC-C₄ por la tripsina</i>	60
VII. CONCLUSIONES	67
VIII. PERSPECTIVAS	69
IX. REFERENCIAS	70
X. APÉNDICES	79
<i>I. Alineamiento de secuencias de nucleótidos del gen ppc-C₄ reportadas en el Genbank.</i>	79
<i>II. Análisis mediante SDS-PAGE de los fragmentos de digestión por tripsina de la ZmPEPC-C₄ libre y unida a ligandos</i>	82
<i>III. Predicción de sitios de corte de tripsina en la estructura cristalina de la ZmPEPC-C₄ 1JQO</i>	83
<i>IV. Predicción de sitios de corte de tripsina en la estructura cristalina de la ZmPEPC-C₄ 6MGI</i>	84
<i>V. Área de superficie accesible (ASA) y concavidad (cx) de residuos en sitios potenciales de corte por tripsina en las estructuras cristalinas</i>	

<i>ZmPEPC-C₄ 1JQO, 5VYJ y 6MGI</i>	85
<i>VI. Artículo publicado</i>	95

ABREVIATURAS

ANS	Sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno
C₃	Plantas que fijan CO ₂ exclusivamente vía ciclo de Calvin
C₄	Plantas que fijan CO ₂ mediante el ciclo C ₄ y el ciclo de Calvin
DCDP	3,3-dicloro-2-dihidroxifosfinoilmetil-2-propenoato
DTT	Ditiotreitol
EcPEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Sal disódica de etilendiaminotetraacético
FtPEPC-C₄	Isoforma C ₄ de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de <i>Flaveria trinervia</i>
G6P	Glucosa-6-fosfato
Gly	Glicina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanesulfónico
Mr	Masa molecular
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MWC	Monod, Wyman y Changeux
NAD⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido reducido
OAA	Oxalacetato
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PEPC-C₄	Fosfoenolpiruvato carboxilasa isoforma C ₄
3-PGA	3-fosfoglicerato
P_i	fósforo inorgánico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RMN	Resonancia magnética nuclear
RUBISCO	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
ZmPEPC-C₄	Isoforma C ₄ de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de maíz

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de Calvin-Benson, también llamado ciclo C₃.	12
Figura 2. Reacciones catalizadas por la enzima ribulosa-1,5- bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco).	13
Figura 3. Reacciones de la fotorrespiración, organelos involucrados y metabolitos que se forman.	14
Figura 4. Reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC).	15
Figura 5. Anatomía kranz de las hojas de plantas C₄ y ciclo C₄.	16
Figura 6. Representación esquemática de la regulación alostérica de <i>ZmPEPC-C₄</i>.	18
Figura 7. Estructura tridimensional de <i>ZmPEPC-C₄</i>.	21
Figura 8. Estructuras tridimensionales de los estados T y R de <i>ZmPEPC-C₄</i>	22
Figura 9. Residuos del sitio activo de <i>ZmPEPC-C₄</i>.	23
Figura 10. Sitio alostérico de los ácidos dicarboxílicos de <i>ZmPEPC-C₄</i>.	24
Figura 11. Sitio alostérico los azúcares fosforilados de <i>ZmPEPC-C₄</i>.	25
Figura 12. Sitio alostérico de los aminoácidos neutros de <i>ZmPEPC-C₄</i>.	27
Figura 13. Efectos de los activadores sobre la actividad de <i>ZmPEPC-C₄</i>	29
Figura 14. Representación esquemática de los estados conformacionales mínimos propuestos para <i>ZmPEPC-C₄</i>.	30
Figura 15. Mapa del vector pET32a(+) en el que se subclonó el gen <i>ppc-C₄</i>.	35
Figura 16. Subclonación del gen <i>ppc-C₄</i>.	42
Figura 17. Resultados de la secuenciación del plásmido pET-102 usando nucleótidos específicos para el promotor y terminador T7.	43
Figura 18. Alineamiento de residuos de aminoácidos deducidas de las secuencias de nucleótidos de los genes <i>pepc-C₄</i> reportados en el GenBank.	45
Figura 19. Cambios en la fluorescencia del ANS en presencia <i>ZmPEPC-C₄</i>.	49
Figura 20. Efectos de PEP y malato sobre la fluorescencia del complejo <i>ZmPEPC-C₄</i>/ANS.	51
Figura 21. Efecto de los ligandos sobre el espectro CD en el UV-cercano de la <i>ZmPEPC-C₄</i>.	55
Figura 22. Patrones de digestión por tripsina de la <i>ZmPEPC-C₄</i> libre y unida a	

ligandos.	56
Figura 23. Efecto de la incubación con tripsina sobre la actividad y sensibilidad a efectores alostéricos de la <i>ZmPEPC-C₄</i> .	59
Figura 24. Predicción de sitios de corte por tripsina en la estructura cristalina de la <i>ZmPEPC-C₄</i> .	62
Figura 25. Mapeo de los sitios de corte por tripsina predichos en la estructura cristalina <i>ZmPEPC-C₄</i> 5VYJ.	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos activadores de las enzimas PEPC que se unen al sitio alostérico de fosfoazúcares.	26
Tabla 2. Parámetros cinéticos aparentes de la <i>ZmPEPC-C₄</i> recombinante con y sin etiqueta de histidinas.	48
Tabla 3. Masas moleculares de los posibles péptidos obtenidos tras la digestión triptica de <i>ZmPEPC-C₄</i>.	66

RESUMEN

Las isoenzimas fotosintéticas de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas C_4 (PEPC- C_4) juegan un papel crítico en la asimilación del CO_2 atmosférico y, por tanto, en la elevada productividad de estas plantas. Estas enzimas poseen una compleja regulación alostérica, exhibiendo cooperatividad positiva en la unión del sustrato fosfoenolpiruvato así como activación por fosfoazúcares, como D-glucosa-6-fosfato, e inhibición por ácidos dicarboxílicos como L-malato o L-aspartato. Además, las isoenzimas PEPC- C_4 de cereales se activan por los aminoácidos neutros glicina, serina y alanina. Se ha propuesto que esta regulación alostérica ocurre de acuerdo al modelo de simetría de dos estados, que postula que el sustrato y los activadores alostéricos desplazan el equilibrio preexistente entre un estado T de muy baja afinidad por ellos hacia un estado R de alta afinidad, mientras que los inhibidores desplazan el equilibrio hacia el estado T. Sin embargo, resultados cinéticos previos obtenidos con la enzima del maíz (*ZmPEPC- C_4*) sugieren que existen diferentes estados R funcionalmente relevantes inducidos por la unión de fosfoenolpiruvato (PEP) o de alguno de sus dos tipos de activadores, glucosa 6-fosfato o glicina. Para detectar y probar la existencia en solución de estas diferentes conformaciones de *ZmPEPC- C_4* , utilizamos como sondas conformacionales la fluorescencia del sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS), la espectroscopía de dicroísmo circular (CD) de UV cercano y la proteólisis limitada por tripsina. La unión de fosfoenolpiruvato y malato causó distintos cambios de fluorescencia en el complejo *ZmPEPC- C_4* /ANS dependientes de la concentración de los ligandos, lo que sugiere que estos complejos poseen estados conformacionales diferentes a los de la enzima libre, mientras que la unión de glucosa 6-fosfato o glicina no produjo cambios en la fluorescencia, por lo que esta técnica no sirvió para detectar diferencias en los estados conformacionales de la enzima unida a los activadores. Sí se observaron diferencias en los espectros de CD de UV cercano de la enzima, libre o unida con su sustrato o cualquiera de sus efectores alostéricos, que reflejan diferentes estados conformacionales. Las diferencias en los patrones de fragmentación de la digestión con tripsina, así como en la susceptibilidad de la enzima libre y de los complejos enzima-ligandos a la digestión y a la pérdida de actividad provocada por esta digestión, proporcionaron evidencia adicional de varias conformaciones de *ZmPEPC- C_4* en solución provocadas por el sustrato y efectores alostéricos. Usando las estructuras cristalinas reportadas de la *ZmPEPC- C_4* y diversos métodos bioinformáticos encontramos que los sitios de escisión por tripsina más probables se encuentran

en regiones flexibles superficiales de la proteína. Estas regiones flexibles parecen ser importantes para la dinámica de la enzima que subyace a su función catalítica y su regulación alostérica. En resumen, nuestros hallazgos concuerdan con los resultados cinéticos previos, arrojan luz sobre la compleja regulación alostérica de esta enzima y colocan a *ZmPEPC-C₄* en la creciente lista de enzimas alostéricas que poseen un conjunto de conformaciones de los estados R y T energéticamente cercanas y por tanto fácilmente interconvertibles.

ABSTRACT

The photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase isozymes from C₄ plants (PEPC-C₄) play a critical role in the atmospheric CO₂ assimilation and, therefore, in the high productivity of these plants. These enzymes exhibit a complex allosteric regulation, involving positive cooperativity in binding the substrate phosphoenolpyruvate as well as activation by phospho-sugars, such as D-glucose-6-phosphate, and inhibition by dicarboxylic acids, such as L-malate or L-aspartate. Additionally, PEPC-C₄ isozymes from grasses are activated by neutral amino acids, such as glycine. The allosteric regulation of PEPC enzymes has been proposed to conform to the symmetry two-state model, which postulates that the substrate and allosteric activators shift the pre-existent equilibrium between the T-state of low affinity towards these ligands to the R-state of high affinity. However, previous kinetic results obtained with the maize enzyme (*ZmPEPC-C₄*) suggested that, in addition to the R- and T-states proposed in this model, there are functionally-relevant different R-states elicited by phosphoenolpyruvate (PEP) or its two kinds of allosteric activators, glucose 6-phosphate or glycine. To detect and probe the existence in solution of these different R-state conformations, we used as conformational probes the fluorescence of 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS), near-UV circular dichroism (CD) spectroscopy, and limited proteolysis by trypsin. Phosphoenolpyruvate and malate binding caused distinct concentration-dependent fluorescence changes of the *ZmPEPC-C₄*/ANS complex, suggesting that they elicited conformational states different from that of the free enzyme, while glucose 6-phosphate or glycine binding did not produce fluorescence changes. Therefore, this technique was not useful to detect differences in the conformational state of the enzyme bound to the activators. We did observe differences in the near UV CD spectrum of the free enzyme when compared with the spectrum of the enzyme complexed with its substrate or allosteric effectors. Additionally, differences in the trypsin-digestion fragmentation patterns, as well as in the susceptibility of the free and complexed

enzyme to digestion and digestion-provoked loss of activity, provided further evidence of several *ZmPEPC-C₄* conformations in solution elicited by the substrate and the allosteric effectors. Using the already reported *ZmPEPC-C₄* crystal structures and bioinformatics methods, we predicted that the most probable trypsin-cleavage sites are located in superficial flexible regions, which seems relevant for the protein dynamics underlying the function and allosteric regulation of this enzyme. Together, our findings agree with previous kinetic results, shed light on this enzyme's complex allosteric regulation, and place *ZmPEPC-C₄* in the growing list of allosteric enzymes possessing an ensemble of energetically closely related R-state conformations.

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. Asimilación fotosintética del CO₂

La asimilación fotosintética del CO₂ en las plantas es fundamental para la generación de su biomasa y para la vida en la biosfera. En este proceso, conocido como las reacciones oscuras de la fotosíntesis, se fija y reduce el carbono sintetizándose azúcares sencillos, para lo cual se usan el ATP y el NADPH producidos en las llamadas reacciones luminosas de la fotosíntesis (Hatch, 1971, 1987, 1992). En muchas especies de plantas, conocidas como plantas C₃, las reacciones de asimilación del CO₂ ocurren exclusivamente en los cloroplastos y forman una ruta cíclica llamada ciclo de Calvin o ciclo C₃ (Figura 1).

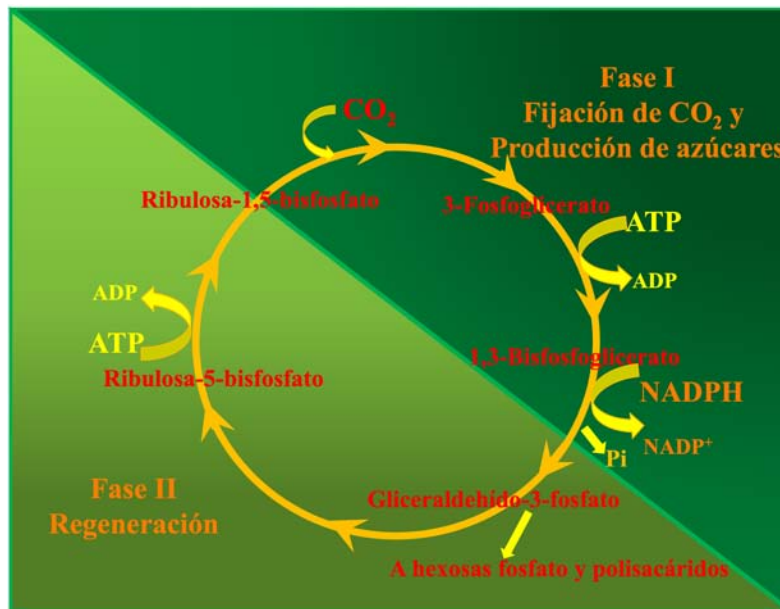


Figura 1. Ciclo de Calvin-Benson, también llamado ciclo C₃.

El compuesto inicial y final del ciclo de Calvin es la ribulosa 1,5-bisfosfato, cuya carboxilación a expensas del CO₂ atmosférico es catalizada por la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxygenasa (llamada en forma abreviada Rubisco) (Hatch, 1971, 1987, 1992). En esta reacción se forman dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA), un compuesto de 3 carbonos y de ahí el nombre C₃ que se les da a estas plantas. Rubisco también cataliza la incorporación de una molécula de O₂ a la ribulosa-1,5-bisfosfato, produciéndose una molécula de 3-fosfoglicerato y otra

de 2-fosfoglicolato (Figura 2) (Hatch, 1971, 1992).

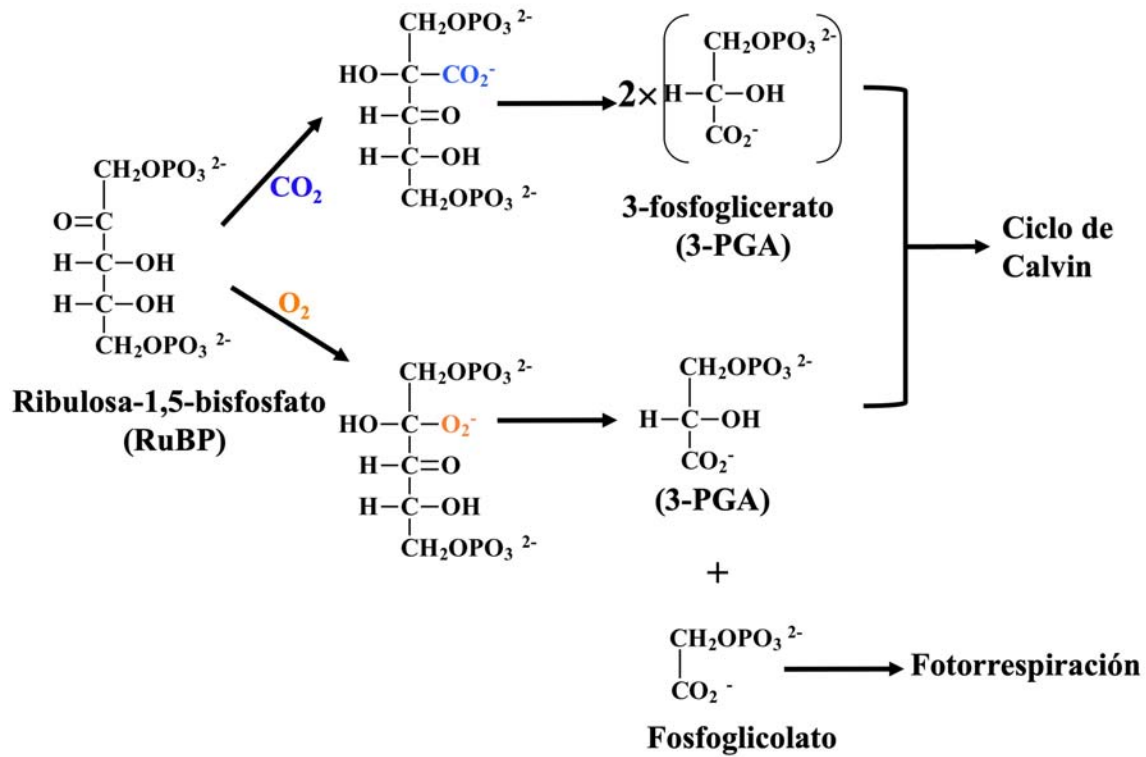


Figura 2. Reacciones catalizadas por la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco).

El 2-fosfoglicolato no es un compuesto útil para la planta, por lo que es convertido a 3-fosfoglicerato en una ruta compleja conocida como fotorrespiración que se lleva a cabo en tres compartimentos celulares: cloroplasto, peroxisoma y mitocondria (Figura 3).

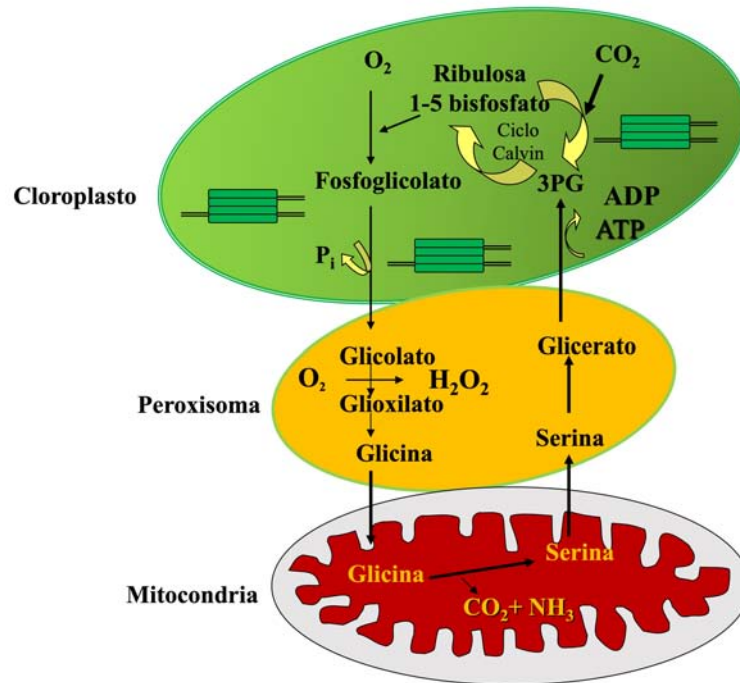


Figura 3. Reacciones de la fotorrespiración, organelos involucrados y metabolitos que se forman.

En la fotorrespiración, se pierde parte del CO_2 previamente asimilado y se invierte parte del ATP y del NADPH producidos en las reacciones luminosas de la fotosíntesis, por lo que esta ruta compite directamente con la fijación de CO_2 . Aproximadamente, por cada tres moléculas de CO_2 fijadas por Rubisco para formar en forma neta una molécula de 3-fosfoglicerato, se fija una molécula de oxígeno produciendo una molécula de 3-fosfoglicerato y 2,3-fosfoglicolato (Hatch, 1987). Esta competencia entre O_2 y CO_2 y los costos energéticos asociados con el reciclaje del 2,3-fosfoglicolato, limitan la eficiencia de la asimilación de CO_2 en las plantas C_3 y produce pérdidas en la formación neta de biomasa de hasta un 50% (Nelson y Cox, 2005).

La mayor parte de las angiospermas son plantas C_3 , pero existe otro tipo de plantas llamadas C_4 en las que la asimilación del CO_2 involucra a dos rutas metabólicas: el ciclo C_3 y el ciclo C_4 (Hatch, 1970; 1987). Al grupo de plantas C_4 pertenecen cultivos de gran interés agronómico—particularmente en México—como el maíz, el sorgo, la caña de azúcar y el amaranto, así como diversas especies de pastizales y malezas. El ciclo C_4 es un mecanismo bioquímico que asegura altos niveles de CO_2 en los cloroplastos de las células de las plantas C_4 donde se lleva a cabo la reacción de carboxilación catalizada por Rubisco. De esta manera, se

satura la enzima con CO₂ y se evita su actividad oxigenante y en consecuencia la fotorrespiración. Por ello las plantas C₄ tienen una productividad, medida como biomasa formada, mucho mayor que las plantas C₃. Pero el ciclo C₄ requiere un aporte extra de energía, por lo que esta adaptación evolutiva surgió en zonas geográficas sometidas a elevadas temperaturas y alta luminosidad. Además, dada su mayor eficiencia en la asimilación del CO₂, las plantas C₄ usan mejor el agua que tienen disponible, por lo que pueden crecer en ambientes secos o con precipitaciones esporádicas.

El paso inicial y el más regulado del ciclo C₄ consiste en la carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) a expensas del bicarbonato, que se forma en las células de mesófilo en la reacción catalizada por la anhidrasa carbónica a partir del CO₂ que entró a la célula por los estomas. Los productos de esta reacción son P_i y oxalacetato, un ácido dicarboxílico de 4 carbonos del que proviene el nombre C₄ que se les da a estas plantas. Esta reacción de carboxilación es catalizada por la isoenzima C₄ de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC-C₄) (Figura 4).

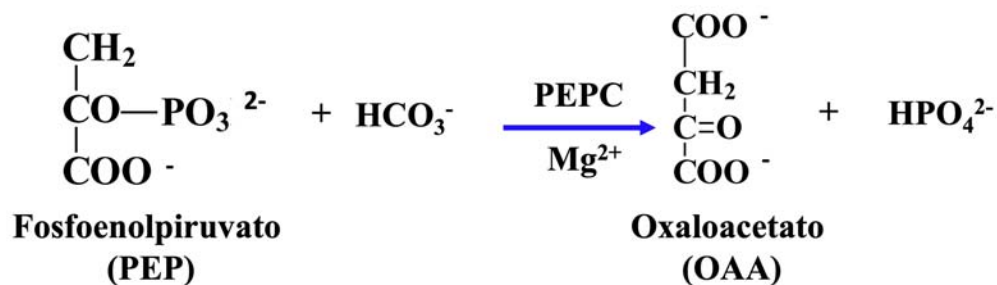


Figura 4. Reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC).

Las hojas de la mayoría de las plantas C₄ poseen una anatomía muy característica conocida como tipo Kranz (corona): los vasos están rodeados por un anillo de células llamadas vaina vascular y éstas a su vez están rodeadas por un anillo de células llamadas de mesófilo (Figura 5). Las reacciones de carboxilación catalizadas por la Rubisco y la PEPC-C₄ ocurren en tipos celulares y compartimentos diferentes de las hojas de plantas C₄: los cloroplastos de las células de la vaina vascular en el caso de Rubisco y el citosol de las células de mesófilo en el caso de la PEPC-C₄. Dependiendo del tipo de planta C₄, el oxalacetato formado por la PEPC-C₄ es convertido a malato por la malato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺, como es el caso de maíz, o transaminado a aspartato por la aspartato oxalacetato transaminasa. Cualquiera de estos dos compuestos se

transporta a favor de su gradiente de concentración desde las células de mesófilo hasta las de vaina vascular donde por descarboxilación producen el CO₂ que Rubisco usa en su reacción de carboxilación para dar inicio al ciclo de Calvin, que es la ruta en la que de forma definitiva se fija el CO₂ en un compuesto orgánico. En el caso de maíz, la descarboxilación de malato en el citosol de las células de vaina vascular, catalizada por la enzima málico dependiente de NADP⁺, produce piruvato que regresa a las células de mesófilo para formar PEP en una reacción catalizada por la piruvato ortofosfato dicinasa, cerrándose así el ciclo (Figura 5).

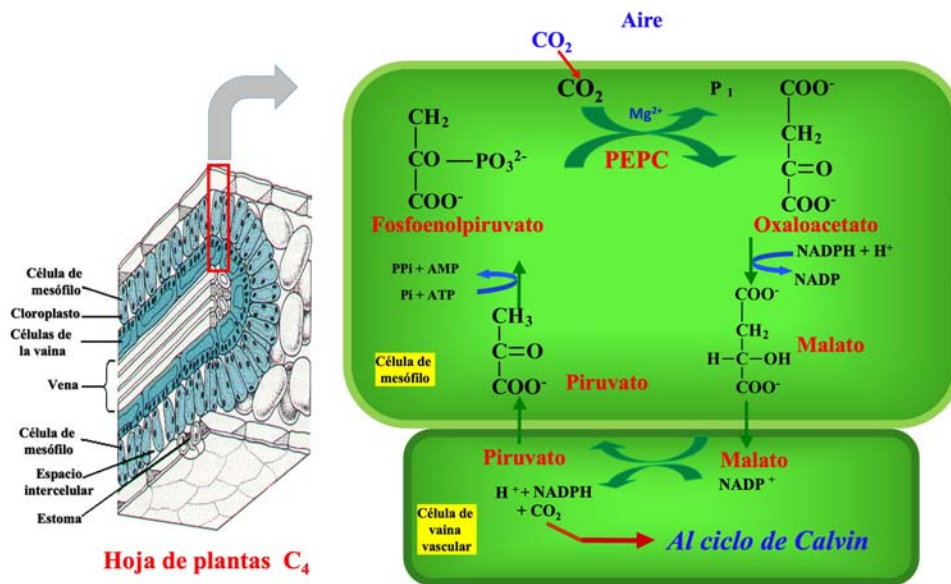


Figura 5. Anatomía Kranz de las hojas de plantas C₄ y ciclo C₄

I. 2. Regulación de la actividad de las enzimas PEPC-C₄

Para una asimilación del CO₂ eficiente, la operación coordinada de los ciclos C₄ y de Calvin en las plantas C₄ requiere de complejos mecanismos de regulación, que ocurren principalmente a nivel de la PEPC-C₄. La importancia de esta enzima en la asimilación fotosintética del CO₂ de las plantas C₄ se refleja en su compleja regulación que consiste en la modificación covalente reversible por fosforilación/desfosforilación de un residuo de serina en su extremo amino terminal y en regulación alostérica. La fosforilación responde al nivel de iluminación al que se encuentre sometida la planta (Jiao y Chollet, 1991; Bakrim *et al.*, 1993; Chollet *et al.*, 1996) y es catalizada por la enzima PEPC cinasa. La desfosforilación ocurre durante el periodo de oscuridad en una

reacción catalizada por una proteína fosfatasa tipo A2. La fosforilación modula la respuesta de la enzima a los efectores alostéricos, disminuyendo su afinidad por los inhibidores y aumentándola por el sustrato PEP y los activadores (Jiao y Chollet, 1991; Tovar-Méndez *et al.*, 1998). Pero la regulación alostérica, la ejercida por el sustrato PEP que presenta cooperatividad positiva de unión y por lo menos un tipo de activador, dos en el caso de las PEPC-C₄ de cereales, y un tipo de inhibidor, es el mecanismo más importante de regulación de la enzima (Tovar-Méndez *et al.*, 2000). A pH fisiológico, las enzimas PEPC-C₄ se activan alostéricamente por fosfoazúcares, como glucosa 6-fosfato (G6P) (Wong y Davies, 1973; Uedan y Sugiyama, 1976; Mukerji, 1977; Stiborová y Leblová, 1985; Doncaster y Leegood, 1987; Wedding *et al.*, 1989; Andreo *et al.*, 1987; Rustin *et al.*, 1988; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Bandarian *et al.*, 1992; Mújica-Jiménez *et al.*, 1998; Tovar-Méndez *et al.*, 1998), y en el caso de las enzimas de cereales como la *ZmPEPC-C₄* también por los aminoácidos neutros glicina (Gly) y serina (Ser) (Nishikido y Takanashi, 1973; Uedan y Sugiyama, 1976; Stiborová y Leblová, 1985; Doncaster y Leegood, 1987; Garson y Gray, 1991; Bandarian *et al.*, 1992; Gillinda y Grover, 1995; Tovar-Méndez *et al.*, 2000; Güemez-Toro *et al.*, 2012). Además, están sujetas a inhibición por retroalimentación por ácidos carboxílicos, lo que es una característica general de todas las enzimas PEPC, no sólo de las isoenzimas fotosintéticas (Huber y Edwards, 1975; O'Leary, 1982; Gonzalez *et al.*, 1984; Toh *et al.*, 1994; Yano e Izui, 1997; Kai *et al.*, 1999). La cooperatividad por el sustrato PEP es importante fisiológicamente porque permite que la enzima sea poco activa durante la noche, cuando los niveles de este importante metabolito son bajos, y tenga una actividad mucho mayor durante el día, cuando estos niveles se incrementan por la operación del ciclo C₄. Y la regulación por inhibidores y activadores alostéricos permite la operación coordinada de los ciclos C₄ y de Calvin. En el caso de las PEPC-C₄, la inhibición por malato tiene un claro sentido fisiológico, ya que disminuye la actividad de la enzima, y por tanto el flujo del ciclo C₄, cuando malato se acumula por no ser utilizado para proveer de CO₂ al ciclo de Calvin, que estará inactivo. Los dos tipos de activadores alostéricos de *ZmPEPC-C₄* no son redundantes; actúan como señales metabólicas separadas, indicando en ambos casos la necesidad de un ciclo C₄ más activo en diferentes condiciones fisiológicas. La activación de *ZmPEPC-C₄* por los fosfoazúcares aumenta el flujo del ciclo C₄ cuando el ciclo de Calvin, el cual produce la molécula precursora de los azúcares fosforilados, está activo, de modo que los flujos de ambos ciclos se coordinan y la velocidad del ciclo C₄ no limita la velocidad de asimilación del CO₂ por el ciclo de Calvin. La activación de *ZmPEPC-C₄* por los

aminoácidos neutros glicina y serina, ambos producidos durante la fotorrespiración y que por tanto son una señal de que ésta está ocurriendo, también aumenta el suministro de CO₂ a Rubisco, lo que disminuirá o anulará la fotorrespiración y conducirá a una mayor asimilación neta de CO₂. En la Figura 7 se muestra un esquema de la regulación alostérica de la *ZmPEPC-C₄*. Durante el período de iluminación, el L-malato se acumula en altas concentraciones en las células del mesófilo desde donde difunde pasivamente a las células de la vaina vascular. Los activadores alostéricos triosas-P y hexosas-P se producen principalmente en las células de la vaina vascular a partir del 3-fosfoglicerato (PGA) formado en la reacción catalizada por Rubisco y pasan a las células de mesófilo, pero también pueden formarse en las células del mesófilo dado que el 3-fosfoglicerato formado en el ciclo de Calvin puede ser transportado a estas células. Igualmente, los aminoácidos neutros (glicina y serina) formados en los peroxisomas durante la fotorrespiración son transportados a la célula del mesófilo.

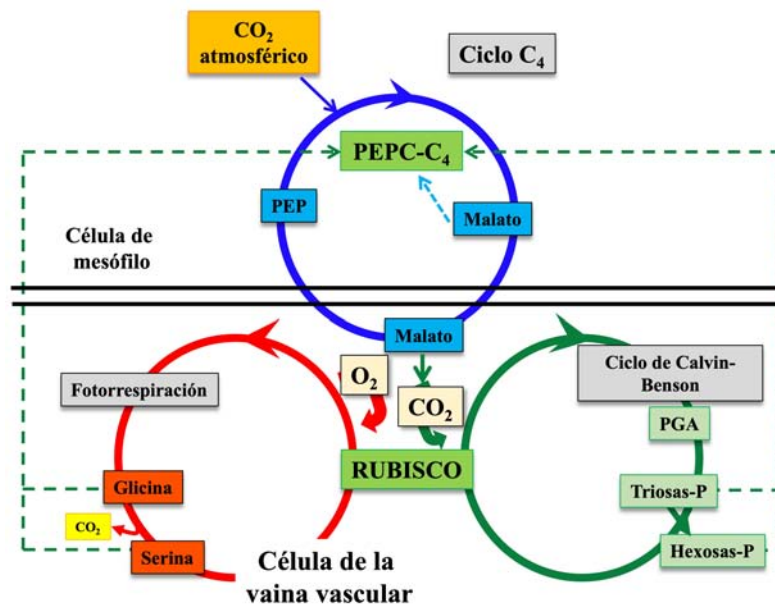


Figura 6. Representación esquemática de la regulación alostérica de *ZmPEPC-C₄*. Imagen tomada de González-Segura *et al.*, 2018.

Se ha sugerido que las enzimas PEPC de bacterias y plantas existen en dos estados, T y R, con diferente afinidad por el sustrato y por los efectores alostéricos, de acuerdo al modelo concertado o de simetría propuesto por Monod-Wyman-Changeux, (modelo MWC; Monod *et al.*,

1965). Este modelo postula que las proteínas alostéricas poseen dos conformaciones, T y R, que preexisten en ausencia de ligandos y que están en un equilibrio que es desplazado hacia un estado y otro por la unión de ligandos de la proteína. En el caso de la *ZmPEPC-C₄*, la prueba experimental de que su regulación alostérica se ajusta al modelo MWC se obtuvo en estudios de cinética rápida en los que se observaron los cambios en fluorescencia extrínseca de la proteína por la unión de PEP, lo que le llevó a los autores de este estudio a la conclusión de que la enzima existe en dos estados equivalentes a los T y R (Frank *et al.*, 1999). Estos autores encontraron que el cambio de fluorescencia que induce la unión del PEP presenta dos tiempos de relajación: uno rápido, asociado al proceso de unión de PEP, y otro más lento, atribuido al proceso de isomerización entre los estados T y R. La dependencia de la concentración del PEP de este segundo tiempo de relajación (aumenta su valor al aumentar la concentración del ligando) indica que el PEP está desplazando un equilibrio preexistente y no induciendo un cambio conformacional después de unirse a la enzima. Una conclusión similar obtuvieron usando los efectores alostéricos G6P y L-malato (Frank *et al.*, 2001). Por esta razón, el modelo MWC se ha usado como el marco conceptual para analizar y discutir resultados bioquímicos y estructurales de las enzimas PEPC en general y de las PEPC-C₄ en particular.

1. 3. Estructura tridimensional de las enzimas PEPC-C₄

Las PEPC-C₄ son enzimas tetraméricas cuyo monómero, de acuerdo con las secuencias de aminoácidos reportadas, tiene una masa cercana a los 100 kDa, concretamente 109345 Da en el caso de la *ZmPEPC-C₄* (Fujita *et al.*, 1984). La primera estructura cristalográfica reportada de una PEPC de plantas fue la de la *ZmPEPC-C₄* (PDB IJQO; Matsumura *et al.*, 2002). Cada monómero consiste de un barril α/β con 8 hebras β y 38 hélices α que las conectan. Aunque encontraron un dímero en la unidad asimétrica del cristal, por simetría cristalográfica construyeron el tetrámero, que corresponde a la unidad biológica de la enzima. El tetrámero obtenido posee un arreglo de “dímero de dímeros”, en el que hay una extensa intercara entre dos monómeros con múltiples interacciones y una intercara pequeña entre los “dímeros” con muy pocas interacciones (Figura 7). La misma conclusión se había llegado al analizar las estructuras cristalográficas de la enzima de *E. coli* (*EcPEPC*; PDB 1FIY, 1QB4, 1JQN) (Yasushi *et al.*, 1999; Matsumura *et al.*, 1999, 2002; Kai *et al.*, 1999) reportadas previamente por el mismo grupo de investigación. A diferencia de la estructura cristalográfica de la *ZmPEPC-C₄* que corresponde a una enzima en el estado R activo,

las estructuras cristalográficas de la *Ec*PEPC corresponden al estado T inactivo, por lo que se concluyó que no hay diferencias entre R y T en cuanto al estado oligomérico de la proteína. Sin embargo, años después, a la estructura de la enzima de *Flaveria trinervia* (*Ft*PEPC-C₄, PDB 3ZGE, 4BXC, 4BXH) (Paulus *et al.*, 2013; Schlieper *et al.*, 2014) se le asignó un arreglo tetramérico diferente, obtenido también por una operación de simetría cristalográfica del dímero que estos autores encontraron en la unidad asimétrica, y se propuso que este arreglo era el correspondiente al estado T de las enzimas PEPC-C₄ de plantas. En nuestro grupo de trabajo se obtuvo una nueva estructura cristalográfica de la *Zm*PEPC-C₄ en el estado R (PDB 5VYJ; González-Segura *et al.*, 2018) y otra de la *Zm*PEPC-C₄ en el estado T PDB 6U2T; Carrizosa EI, González-Segura L y Muñoz-Clares RA, manuscrito en preparación) con una unidad asimétrica igual al tetrámero que se había obtenido antes para el estado T de la *Ec*PEPC por una operación de simetría cristalográfica y para el estado R de la *Zm*PEPC-C₄, tanto por simetría cristalográfica (PDBs 1JQO y 6MGI) como en la unida asimétrica (PDB 5VYJ), confirmando que este arreglo es el que existe en la enzima de maíz y que no cambia al pasar del estado R al estado T (Figura 8). Probablemente es también el arreglo cuaternario que existe en otras enzimas PEPC que poseen una inserción que imposibilita la formación del tetrámero propuesto para las PEPC de *Flaveria*.

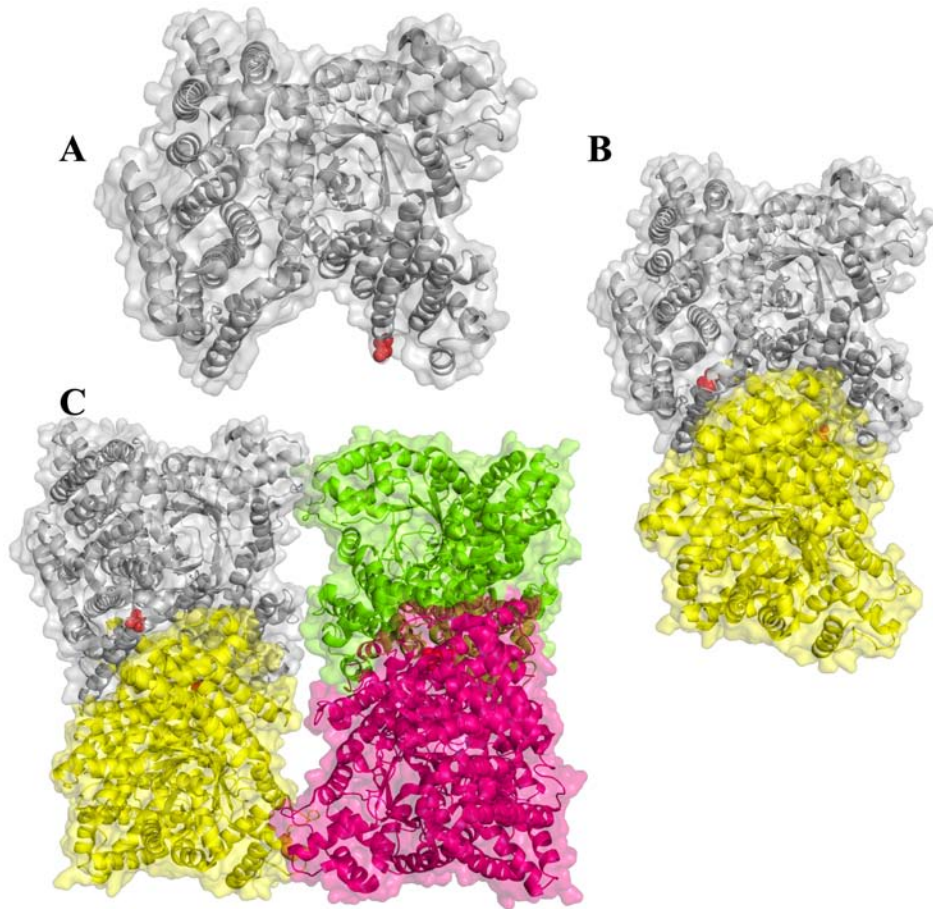


Figura 7. Estructura tridimensional de *ZmPEPC-C4*. Representación en listones y en superficie del plegamiento y elementos de estructura secundaria del monómero (A), dímero (B) y tetramero de *ZmPEPC-C4* (C) en complejo con Gly (*ZmPEPC-C4*-Gly). El activador Gly se muestra en esferas rojas. Las figuras se realizaron con el programa de cómputo Pymol utilizando la estructura cristalográfica con código PDB 5VYJ.

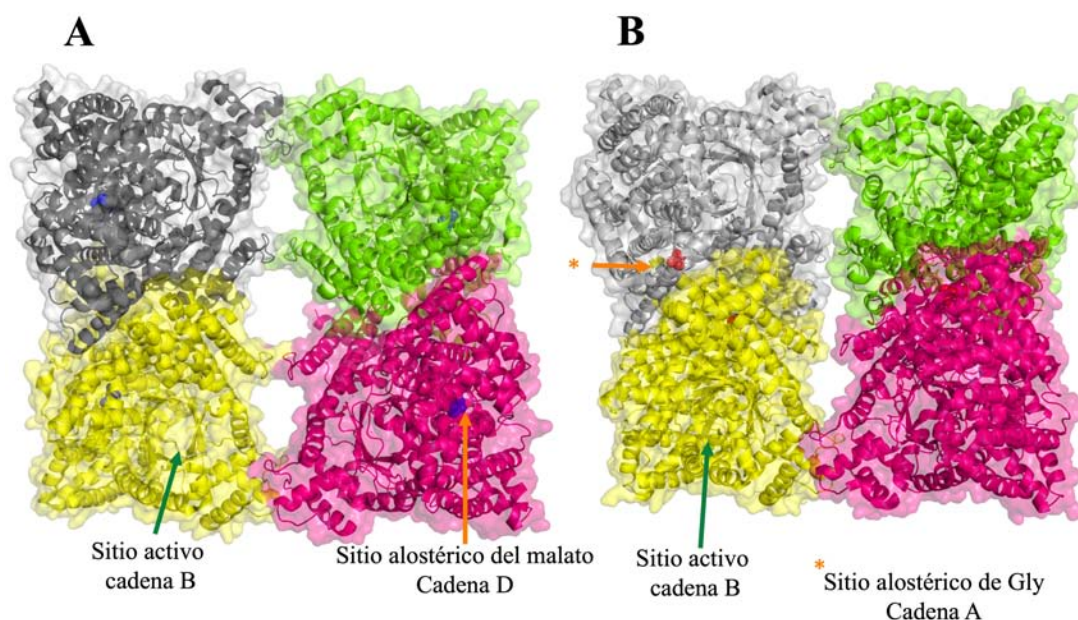


Figura 8. Estructuras tridimensionales de los estados T y R de *ZmPEPC-C4*. Representación en listones y en superficie del plegamiento y elementos de la estructura secundaria de *ZmPEPC-C4* en complejo con malato, estado T, (A) y con Gly, estado R, (B). Las cadenas A, B, C y D de ambos complejos se muestran en color gris, amarillo, verde y magenta, respectivamente. Malato se muestra como esferas azules y Gly como esferas rojas. El sitio activo se señala con una flecha verde y los sitios alostéricos para malato y Gly con flechas naranjas. Las figuras se realizaron con el programa de cómputo Pymol utilizando las estructuras cristalográficas con códigos PDB 6U2T (*ZmPEPC-C4*-malato) y 5VYJ (*ZmPEPC-C4*-Gly).

I. 4. Estructura del sitio activo de las enzimas PEPC-C₄

El sitio activo se identificó inicialmente en la estructura cristalográfica de *EcPEPC*, en la que se encontró un análogo del sustrato unido (PDB 1JQN; Matsumura *et al.*, 2002). A pesar de que el sitio no estaba organizado para ser funcional, junto con el hecho de que también tenía una molécula de inhibidor unida y el sitio alostérico para el inhibidor perfectamente conformado, claramente indicaba que se trataba de la estructura del estado T de la enzima. El sitio activo con la conformación funcional característica del estado R se observó en las tres estructuras reportadas del estado R de *ZmPEPC-C4* (PDBs 1JQO, Matsumura *et al.*, 2002; 5VYJ, González-Segura *et al.*, 2018; y 6MGI, Muñoz-Clares *et al.*, 2020), en una de las cuales, 6MGI, hay unido un análogo de PEP, fosfoglicolato, haciendo las interacciones con los residuos que estudios previos de mutagénesis sitio-dirigida habían predicho que formaban parte del sitio activo (Figura 9).

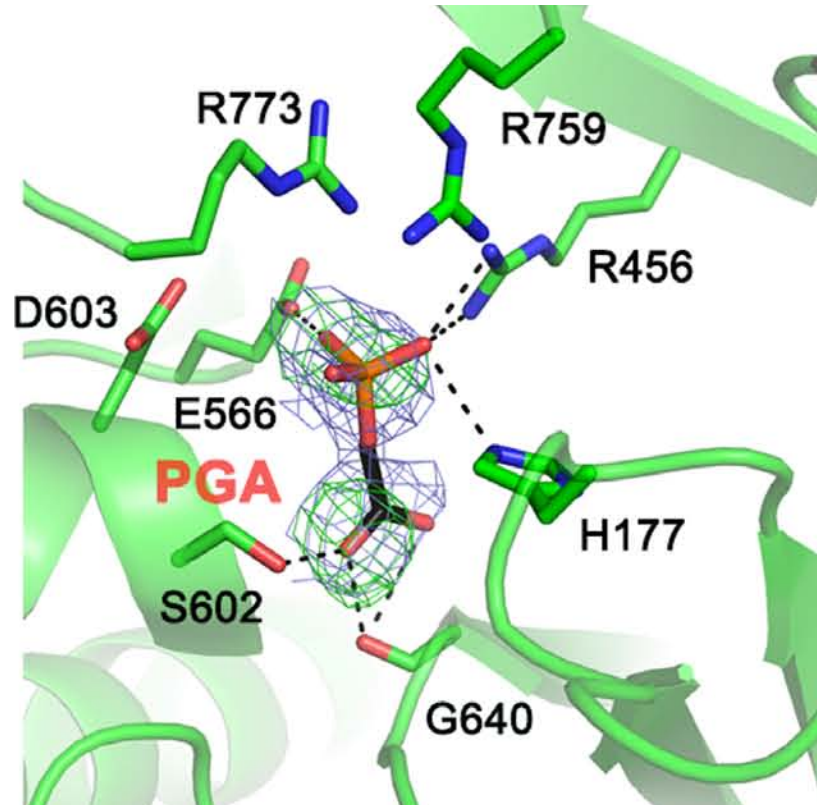


Figura 9. Residuos del sitio activo de *ZmPEPC-C4*. Se muestran los residuos directamente involucrados con la unión del fosfoglicolato (PGA) observados en la estructura 6MGI de *ZmPEPC-C4*. Los átomos de carbono de cadenas laterales de aminoácidos y del PGA se representan en verde o negro, respectivamente, los átomos de oxígeno en rojo y los átomos de nitrógeno en azul. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas discontinuas negras. Imagen tomada de Muñoz-Clares *et al.*, 2020.

I. 5. Estructura de los sitios alostéricos de las enzimas PEPC-C4

El sitio alostérico de los ácidos carboxílicos también se encontró por vez primera en una de las estructuras cristalográficas de *EcPEPC* con aspartato unido (PDB 1FIY; Yasushi *et al.*, 1999) y posteriormente se confirmó en las estructuras de la *FtPEPC-C4* (PDB 3ZGE, 4BXC, 4BXH; Paulus *et al.*, 2013; Schlieper *et al.*, 2014), de la *PEPC-C3* de *Flaveria pringlei* (*FpPEPC-C3*; PDB 3ZGB; Paulus *et al.*, 2013) y de la *PEPC-C3* de *Arabidopsis thaliana* (*AtPEPC-C3*; PDB 5FDN; Connell, *et al.* 2018), todas ellas también con aspartato unido a este sitio. Recientemente en nuestro grupo se ha encontrado también en la estructura cristalográfica de la *ZmPEPC-C4* con malato (PDB 6U2T) o citrato (PDB 6V3O) unidos (Carrizosa EI, González-Segura L y Muñoz-Clares RA, manuscrito en preparación). Este sitio alostérico está muy conservado en todas estas

enzimas, tanto en su composición de aminoácidos y en las interacciones que estos hacen con la molécula del inhibidor, como en su organización tridimensional (Figura 10).

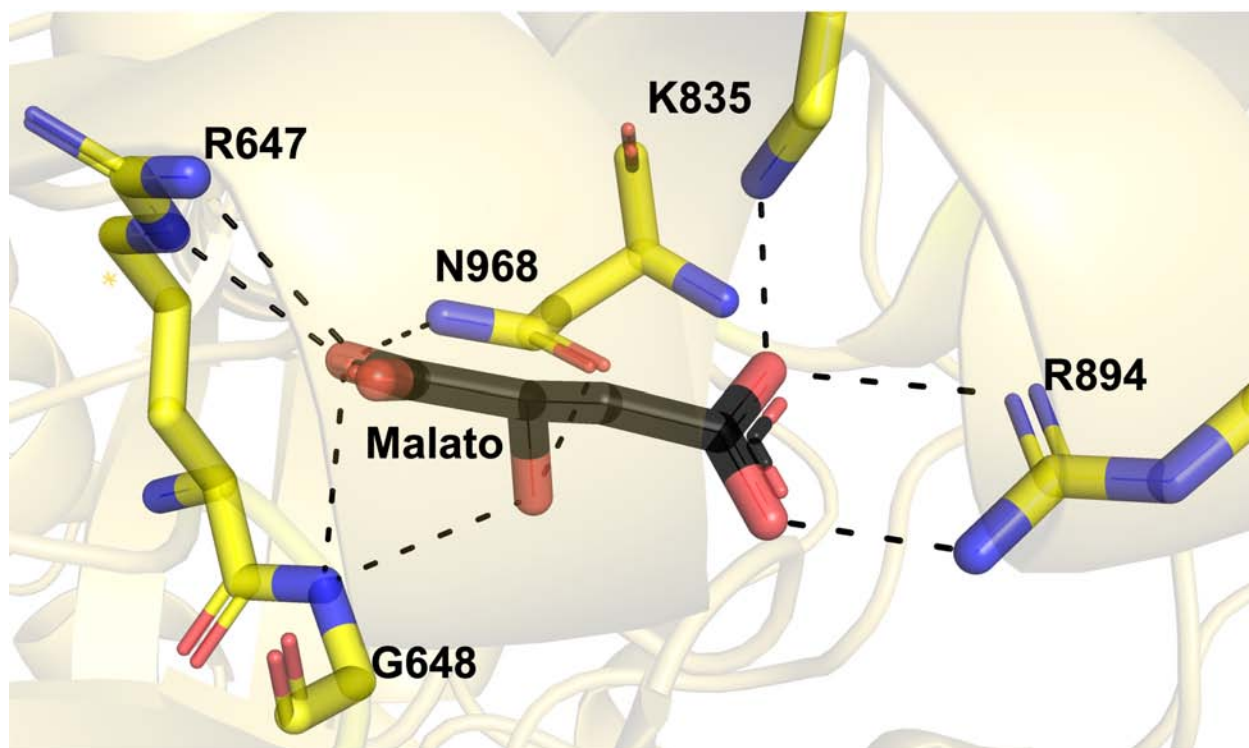


Figura 10. Sitio alostérico de los ácidos carboxílicos de *ZmPEPC-C4*. Los átomos de carbono de cadenas laterales de aminoácidos y del malato se representan en amarillo o negro, respectivamente, los átomos de oxígeno en rojo y los átomos de nitrógeno en azul. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas discontinuas negras. La figura se realizó con el programa de cómputo Pymol utilizando la estructura cristalográfica con código PDB 6U2T (*ZmPEPC-C4*-malato).

La localización del sitio alostérico de los fosfoazúcares se propuso al observar un anión sulfato unido en la estructura 1JQO de la *ZmPEPC-C4* (Matsumura et al., 2002), y se confirmó en la estructura 6MGI de la *ZmPEPC-C4* que mostró a G6P unida a este sitio (Muñoz-Clares *et al*, 2020) (Figura 11).

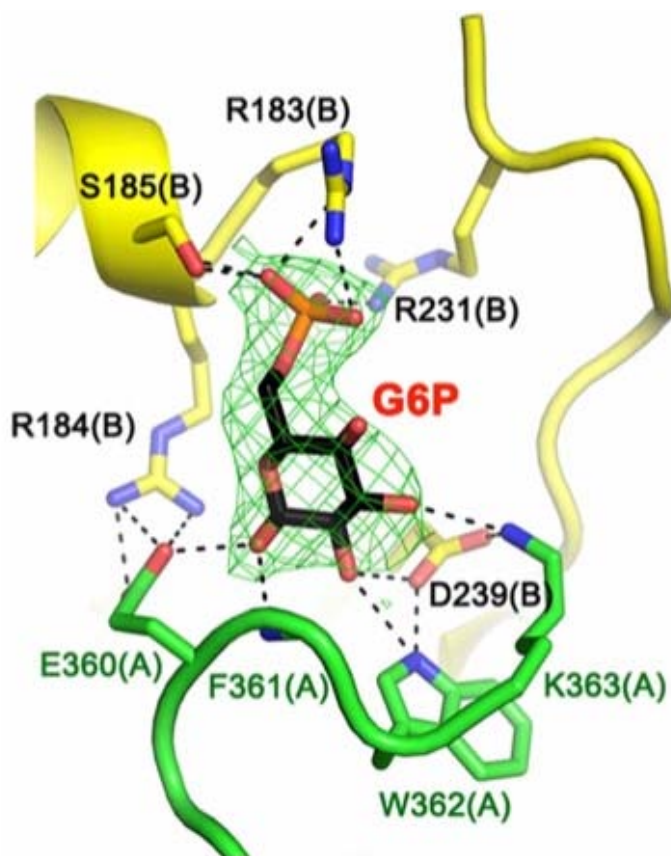


Figura 11. Sitio alostérico de los azúcares fosforilados de *ZmPEPC-C₄*. Se muestra el sitio de *ZmPEPC-C₄* con G6P unida observado en el cristal PDB 6MGI. Los carbonos de la proteína están en color verde (subunidad A) o amarillo (subunidad B) y los de G6P en negro. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas discontinuas negras. Imagen tomada de Muñoz-Clares *et al.*, 2020.

La existencia de este sitio alostérico se había puesto en duda por haberse encontrado en una estructura de *FtPEPC-C₄* (PDB 4BXC) una molécula de G6P unida al sitio activo y no al sitio alostérico (Schlieper *et al.*, 2014). Como se discutió en Muñoz-Clares *et al.*, 2020, y aunque los autores del trabajo sobre la enzima de *Flaveria* (*FtPEPC-C₄*) no lo entendieron así, este hallazgo se explica porque en esta estructura la enzima de *F. trinervia* está en el estado T y su sitio alostérico para los fosfoazúcares está totalmente desorganizado y por tanto no puede unir a su ligando. En cambio el sitio activo, aunque claramente no funcional, sí posee algunos residuos en una conformación que permite la unión de G6P. De nuevo, los residuos del sitio que participan en la unión del activador tal y como se observa en la estructura 6MGI fueron en su mayoría predichos por mutagénesis sitio-dirigida (Takahashi-Terada *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006) o fueron confirmados por mutagénesis sitio-dirigida (Muñoz-Clares *et al.*, 2020).

Estudios cinéticos han demostrado que en el sitio alostérico de fosfoazúcares se unen además ésteres de fosfato y análogos de fosfoenolpiruvato (Tabla 1)

Tabla 1. Compuestos activadores de las enzimas PEPC que se unen al sitio alostérico de fosfoazúcares.

<i>Compuesto activador</i>	<i>Referencia</i>
Fosfoazúcares	
Fructosa-6-fosfato	Doncaster y Leegood, 1987
Fructosa-2,6-bifosfato	
Fructosa-1,6-bifosfato	Mújica-Jiménez <i>et al.</i> , 1998
Dihidroxiacetona fosfato	Doncaster y Leegood, 1987
Ésteres de fosfato	
Fosfoenolpiruvato	Rustin <i>et al.</i> , 1988; Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez <i>et al.</i> , 1998
3-fosfoglicerato	Selinioti <i>et al.</i> , 1985
Adenosín monofosfato	Lavergne y Champigny, 1983
Acetil fosfato	González <i>et al.</i> , 1987
Fenilfosfato	Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990
<i>Myo</i> -inositol fosfato	Mújica-Jiménez <i>et al.</i> , 1998
Análogos de fosfoenolpiruvato	
Metil 2-dihidroxifosfinoilmetil-2-propenoato	Jenkins <i>et al.</i> , 1986
Sulfoenolpiruvato	Peliska y O'Leary, 1989
Fosfomicina	Mújica-Jiménez <i>et al.</i> , 1998

En cuanto al sitio de los aminoácidos neutros, su existencia se había propuesto por estudios bioquímicos (Doncaster y Leegood, 1987; Nishikido y Takanashi, 1973; Garson y Gray, 1991; Bandarian *et al.* 1992; Gillinta y Grover, 1995; Tovar-Méndez *et al.*, 1998; Mújica-Jiménez *et al.*, 1999; Tovar-Méndez *et al.*, 2000, Güemez-Toro *et al.*, 2012) y de mutagénesis sitio-dirigida (Yuan *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2007) que indicaban que se trataba de un sitio alostérico activador diferente, aunque próximo, al de los fosfoazúcares, pero su localización exacta no se conoció hasta la determinación de una estructura cristalográfica de *ZmPEPC-C₄* con Gly unida a este sitio (PDB

5VYJ, González-Segura *et al.*, 2018). Al igual que el sitio alostérico de los fosfoazúcares, el sitio alostérico para los aminoácidos neutros se encuentra en la intercara entre los dos monómeros de la unidad dimérica del tetrámero nativo (Figura 12).

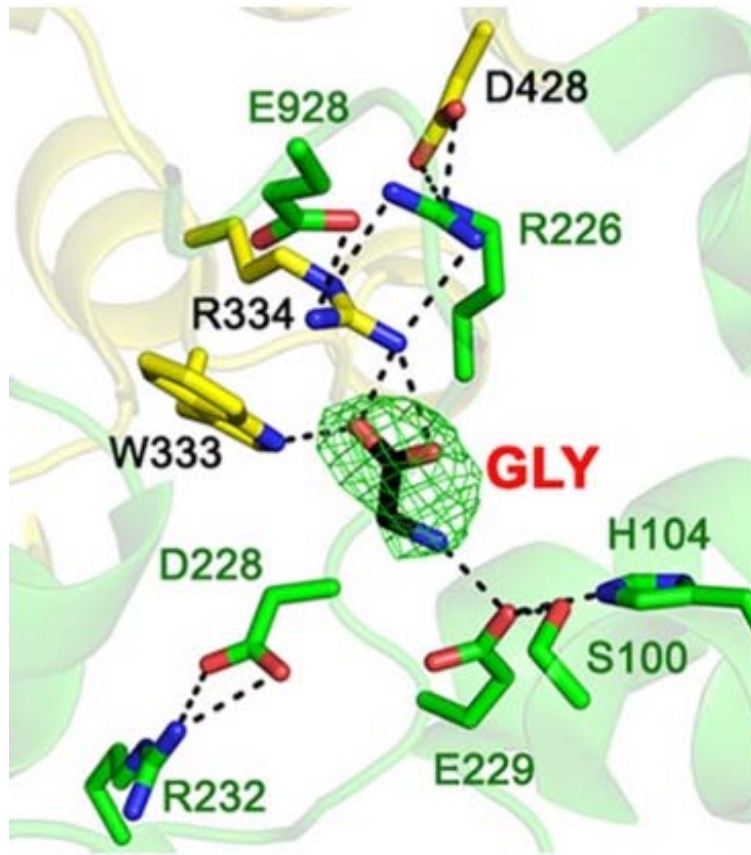


Figura 12. Sitio alostérico de los aminoácidos neutros de *ZmPEPC-C4*. Se muestra el sitio alostérico observado en el complejo *ZmPEPC-C4*-Gly (PDB 5VYJ). Los carbonos de la proteína están en color verde (subunidad A) o amarillo (subunidad B) y los de Gly en negro. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas discontinuas negras. Imagen tomada de González-Segura *et al.*, 2018.

II. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El modelo de alosterismo de MWC, que se propone que sigue la *ZmPEPC-C4*, asume que los efectores alostéricos sólo cambian el equilibrio preexistente entre estos dos estados, R y T, sin alterar sus propiedades. Por ello, los efectos de los inhibidores y activadores alostéricos siempre son opuestos y la saturación con un activador elimina la inhibición alostérica y viceversa. Sin

embargo, estudios cinéticos llevados a cabo con la *ZmPEPC-C₄* en nuestro grupo de trabajo sugirieron que el mecanismo de regulación alostérica es más complejo. Los dos tipos de activadores, G6P y Gly, no sólo disminuyen la $S_{0.5}$ por el sustrato PEP, o por el complejo PEP-Mg, sino que también aumentan la V_{\max} de la enzima determinada en su ausencia, es decir, poseen un efecto V (Figura 13A) (Mújica-Jiménez *et al.*, 1998; Tovar-Méndez *et al.*, 2000), lo que indica que la conformación de la enzima saturada por su sustrato PEP es diferente a la de la enzima saturada por los activadores. Además, la enzima saturada con Gly puede aún ser activada por G6P y viceversa, la enzima saturada con G6P también es capaz de activarse por Gly (Mújica-Jiménez *et al.*, 1998; Tovar-Méndez *et al.*, 2000, Figura 13B y C). Es decir, en ambos casos el estado conformacional de cada complejo es diferente al que se alcanza cuando la enzima está saturada con un activador distinto, lo que explica que la activación por G6P y Gly sea sinérgica en lugar de aditiva (Figura 13C). Y se encontró que mientras que la saturación de *ZmPEPC-C₄* por G6P es incapaz de revertir la inhibición causada por una concentración fisiológica de malato, la saturación por Gly o Ser produce una enzima casi tan activa como en ausencia del inhibidor (Figura 13D, Tovar-Méndez *et al.* 2000). Esto último nuevamente indica que los dos tipos de activadores, es decir, fosfoazúcares y aminoácidos neutros, al unirse a la enzima inducen o estabilizan diferentes estados conformacionales y que esto tiene importantes implicaciones funcionales.

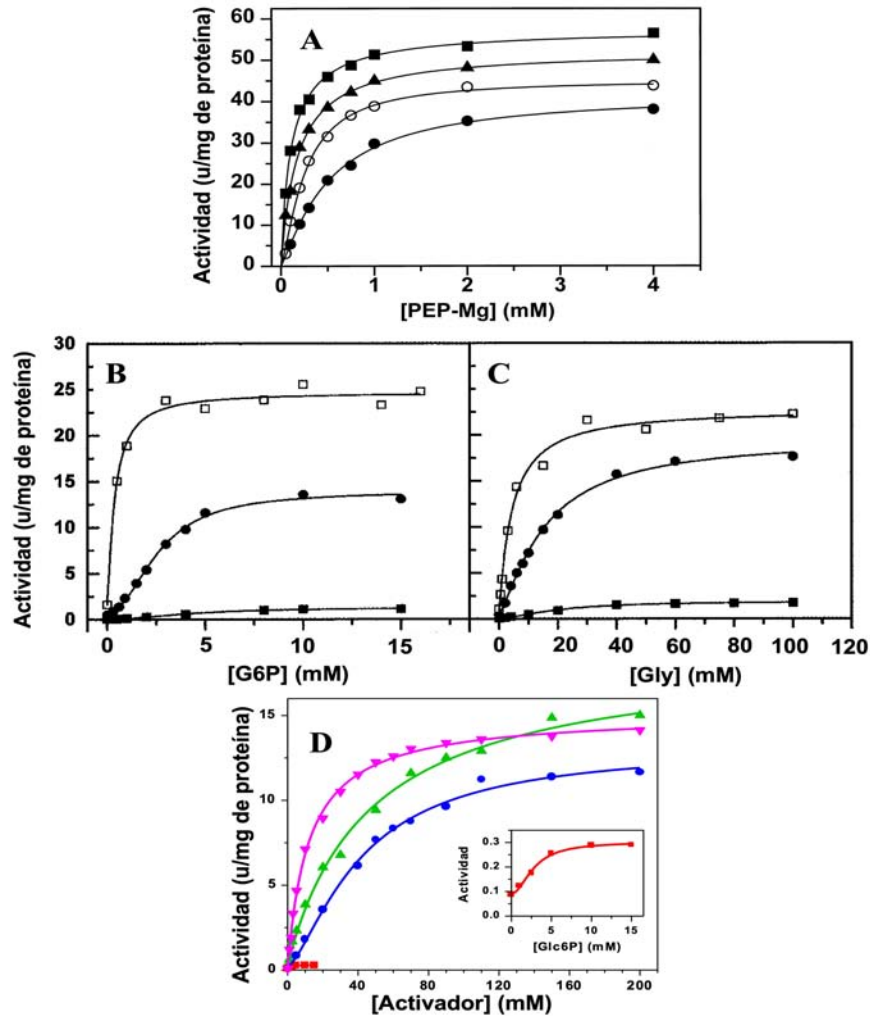


Figura 13. Efectos de los activadores sobre la actividad de *ZmPEPC-C4* (A) Cinética de saturación por el complejo PEP-Mg de *ZmPEPC-C4* en ausencia (●) y presencia de 0.25 (○), 0.5 (▲) y 1 mM (■) de fosfomicina (activador que se une al sitio de los azúcares fosforilados) mostrando el efecto V del activador. Los ensayos de actividad se realizaron a pH 7.3, manteniendo constante la concentración de PEP_{libre} de 5 mM y variando las concentraciones de PEP-Mg (la concentración de Mg²⁺ libre fue de 0.11 a 4.44 mM). Figura tomada de Mújica-Jiménez *et al.*, 1998. (B) Cinética de saturación de *ZmPEPC-C4* por G6P en ausencia (●, ■) y presencia (□) de 50 mM de Gly. (C) Cinética de saturación de *ZmPEPC-C4* por Gly en ausencia (●, ■) y presencia (□) de 10 mM de G6P. Los paneles B y C muestran los efectos sinérgicos de ambos tipos de activadores. (D) Efectos de G6P y aminoácidos neutros sobre la actividad de *ZmPEPC-C4* inhibida por malato 20 mM. Por si sola, la G6P contrarresta débilmente la inhibición, mientras que los aminoácidos neutros prácticamente la eliminan. Los paneles B, C y D se adaptaron de Tovar-Méndez *et al.*, 2000.

En la Figura 14 se muestra un esquema mínimo de los posibles estados conformacionales en equilibrio que proponemos pueden adoptar las enzimas *ZmPEPC-C4*. La enzima libre en el estado

T inactivo (T_0) cambia a un estado T unido a malato, conformacionalmente diferente al T vacío. Igualmente, la enzima libre en el estado R, es decir sin tener un ligando unido, (R_0), cambia a diferentes estados R cuando une al sustrato o activadores alostéricos. Por lo tanto, proponemos que el estado R adopta al menos tres conformaciones diferentes según tenga unidos a PEP, G6P o Gly. Es probable que también existan diferentes conformaciones cuando dos o los tres de estos últimos ligandos están unidos a sus respectivos sitios, por ejemplo, el sustrato y uno o dos activadores alostéricos. No es de esperarse que se una el sustrato o algún activador cuando el inhibidor alostérico esté unido, porque la enzima estaría en el estado T con el sitio activo y los sitios alostéricos para los activadores no organizados. La incapacidad de G6P de revertir totalmente la inhibición por malato de la *ZmPEPC-C4* podría deberse a que G6P pueda unirse al sitio activo, como se vio en la estructura cristalográfica de la *FlPEPC-C4* (PDB 4BXC; Schlieper *et al.*, 2014), estabilizando así el estado T y su capacidad para desplazar el equilibrio del estado R al estado T. Si esto ocurre, podría existir un complejo enzima-malato-G6P.

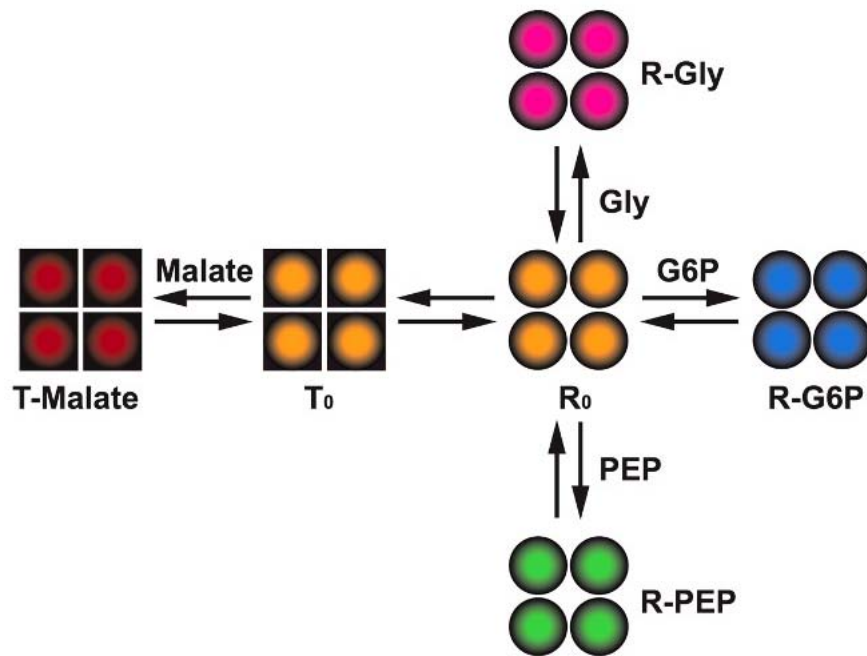


Figura 14. Representación esquemática de los estados conformacionales mínimos propuestos para *ZmPEPC-C4*.

Las estructuras cristalinas obtenidas hasta ahora de *ZmPEPC-C4* en un estado R son de una enzima libre (código PDB 1JQO; Matsumura *et al.*, 2002), del complejo enzima-Gly (código PDB

5VYJ; González-Segura *et al.*, 2018) y del complejo enzima-fosfoglicolato-G6P-Gly (código PDB 6MGI; Muñoz-Clares *et al.*, 2020). Estas estructuras en estado R muestran la conformación funcional del sitio activo y de los sitios alostéricos G6P y Gly, pero un sitio alostérico de malato desorganizado incapaz de unir al inhibidor. Por el contrario, las estructuras *ZmPEPC-C₄* en estado T muestran sitios activos y de los activadores alostéricos desorganizados y no funcionales y el sitio alostérico del inhibidor correctamente formado, con malato (código PDB 6U2T) o citrato (código PDB 6V3O) unidos (Carrizosa EI, González-Segura L. y Muñoz-Clares RA, manuscrito en preparación). Como era de esperarse, las diferencias entre las estructuras cristalinas del estado R y el estado T son importantes y múltiples, pero las diferencias entre las tres estructuras cristalinas del estado R (1JQO, 5VYJ y 6MGI) son sutiles. A pesar de que la estructura 1JQO no tiene ni el sustrato PEP ni algún activador alostérico unido, tiene una conformación general similar a la estructura 6MGI, que tiene unido al sitio activo un análogo de PEP y G6P y Gly unidos a sus respectivos sitios alostéricos. La estructura 5VYJ, que sólo tiene unida a Gly en su sitio alostérico, también tiene una conformación general similar, aunque muestra algunas diferencias con las otras dos estructuras en estado R. Específicamente, difiere en el grado de desorden del asa que forma la tapa del sitio activo y en la conformación del asa que forma la tapa del sitio alostérico de G6P. Por lo tanto, parece que las diferencias funcionalmente significativas en la conformación o dinámica de la enzima provocada por el sustrato o los dos tipos de activadores, como indican los resultados cinéticos, se pierden en las estructuras cristalinas. Las condiciones de cristalización parecen favorecer una única conformación de estado R entre las varias energéticamente similares, y, por lo tanto, fácilmente interconvertibles, que probablemente existen en solución. Debido a esto, las posibles diferentes conformaciones R deben investigarse mediante experimentos realizados en solución.

El tamaño de esta proteína, un homotetrámero de alrededor de 440 kDa, y la probable asimetría de sus subunidades derivada de una alta flexibilidad, como se observa en las estructuras cristalinas en las que hay varias regiones desordenadas y otras muy móviles (las primeras se refieren regiones no estructuradas y las segundas son asas), impiden el uso de la espectroscopía de RMN para determinar diferentes conformaciones en los complejos. Todas las estructuras cristalinas de *ZmPEPC-C₄* reportadas tienen varias regiones altamente flexibles tanto en el estado R como en el estado T y, en consecuencia, se espera que las subunidades no sean completamente simétricas. De hecho, la unidad asimétrica de estas estructuras cristalinas es dos, cuatro o incluso

ocho subunidades. Por ello, la RMN usando marcado selectivo de grupos metilo, en un fondo deuterado—que ha permitido el uso de esta técnica para proteínas grandes—no puede usarse en el caso de la *ZmPEPC-C₄*, ya que cada pequeña diferencia entre las subunidades dará señales diferentes, y esto complica muchísimo el análisis de los resultados. Otra técnica de gran utilidad para monitorear el microambiente de una proteína y que puede proporcionar información sobre cambios conformacionales es la fluorescencia de los residuos aromáticos (fluorescencia intrínseca). La fluorescencia de la fenilalanina en presencia de tirosina y triptófano no se utiliza debido a su bajo rendimiento cuántico en solución (0.04 en comparación con 0.20 y 0.21 para Trp y Tyr respectivamente). La fluorescencia de la tirosina por su parte se apaga parcial o completamente si este residuo se encuentra ionizado o cerca de un grupo amino, un grupo carboxilo o un residuo de triptófano (Teale, 1960; Freifelder, 1982), por lo que casi no se utiliza excepto si la proteína no contiene Trp. El requisito para usar la fluorescencia intrínseca de una proteína es que los sitios de interés tengan al menos un residuo de aminoácido fluorescente, preferiblemente Trp, o que el cambio conformacional afecte el ambiente de al menos un residuo de este tipo, y que de existir varios de estos residuos no estén muy próximos para que no haya transferencia de energía entre ellos con el consiguiente apagamiento de la fluorescencia. A pesar de que *ZmPEPC-C₄* contiene varios residuos de Trp, en estudios previos no observamos cambios inducidos por sus ligandos en la fluorescencia intrínseca del Trp, por razones que no exploramos, lo que motivó el que no usáramos esta herramienta en este trabajo de tesis.

Por lo anterior, para detectar los posibles cambios conformacionales de *ZmPEPC-C₄* inducidos por sus ligandos, en este trabajo de tesis utilizamos otros tres enfoques experimentales: Mediciones de fluorescencia extrínseca usando sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) como sonda conformacional. El ANS que en solventes polares es un fluoróforo muy débil, disuelto en solventes no polares o unido las regiones hidrofóbicas de las proteínas emite una señal de fluorescencia clara (Brand *et al.*, 1967, 1972), lo que permite detectar cambios conformacionales que lleven a la exposición de residuos o regiones hidrofóbicas. Espectroscopía de dicroísmo circular (CD) en el UV cercano, que brinda información sobre los cambios en la estructura terciaria de las proteínas que afectan el entorno de las cadenas laterales aromáticas. Proteólisis limitada, ya que un cambio conformacional en la estructura de la solución de la proteína puede conducir a una susceptibilidad alterada a la proteólisis. Se sabe que el corte por la proteasa no ocurre dentro de elementos de estructura secundaria (por ejemplo, dentro de hélices α), sino sólo en las asas, por lo

que esta técnica permite identificar los sitios de mayor flexibilidad de una cadena polipeptídica (Fontana *et al.*, 2004). Los cambios de fluorescencia de ANS y la proteólisis limitada se han utilizado con éxito para detectar diferentes cambios conformacionales inducidos por efectores alostéricos de la *EcPEPC* (Yoshinaga, 1976; Kameshita *et al.*, 1979).

III. HIPÓTESIS

En solución, la especie de la *ZmPEPC-C₄* no unida a ligandos posee dos estados conformacionales T_0 y R_0 en un equilibrio que se desplaza hacia diferentes estados conformacionales cuando se une el sustrato PEP, cualquiera de los dos tipos de activadores alostéricos, G6P y Gly, o un inhibidor alostérico. El complejo enzima-inhibidor alostérico es un estado T conformacionalmente diferente al T_0 y la conformación de los estados R de los complejos enzima-PEP, enzima-G6P o enzima-Gly son distintos al estado R_0 y entre sí. Por lo tanto, el estado R adopta al menos tres conformaciones diferentes dependiendo de que tenga unidos PEP, G6P o Gly.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Detectar los posibles distintos estados conformacionales en solución de la *ZmPEPC-C₄* inducidos por su sustrato PEP y efectores alostéricos mediante técnicas espectroscópicas, como fluorescencia extrínseca del ANS y dicroísmo circular en el UV cercano, así como por proteólisis limitada usando tripsina. Además, obtener nueva información sobre la dinámica de la enzima subyacente a su función catalítica y regulación alostérica a partir de los datos experimentales que obtengamos y su análisis usando herramientas bioinformáticas y las estructuras tridimensionales ya reportadas.

IV.2. Objetivos particulares

1. Obtener una enzima *ZmPEPC-C₄* recombinante soluble, activa y no truncada en el extremo amino terminal. Para ello, subclonar el gen que codifica a esta enzima en un vector de expresión adecuado para su sobreexpresión en *E. coli* con una etiqueta de His en su amino terminal, que permita purificarla con la región N-terminal íntegra. Esta será la enzima que usemos para los

estudios posteriores

2. Investigar si se producen cambios en la fluorescencia de la enzima *ZmPEPC-C₄* en respuesta a la unión del sustrato PEP o de sus efectores alostéricos, y si estos cambios indican distintos estados conformacionales de la enzima.

3. Investigar si el tratamiento con tripsina de la *ZmPEPC-C₄* libre y en complejo con PEP o sus efectores alostéricos produce diferentes patrones de digestión indicativos de diferentes estados conformacionales.

4. Investigar si la incubación con tripsina de la enzima libre y en complejo con PEP o sus efectores alostéricos afecta en forma diferencial a su actividad y a su sensibilidad a los efectores alostéricos.

5. Proponer los posibles sitios de corte de la *ZmPEPC-C₄* por tripsina, usando métodos informáticos y las estructuras cristalográficas de la enzima reportadas, y analizar la posible información que estos análisis informáticos proporcionen sobre la dinámica de la proteína, importante para su función y regulación alostérica.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Subclonación del gen *ppc-C₄*

Para este procedimiento se contó con la colaboración del Dr. Ismael Bustos Jaimes de la Facultad de Medicina, UNAM. El gen que codifica para *ZmPEPC-C₄* (*ppc1* al que llamaremos de ahora en adelante *ppc-C₄*), con número de acceso en el GenBank AJ536629, inserto en el vector pTM94 entre los sitios de restricción *NcoI* y *HindIII* (Yanagisawa *et al.*, 1988) se subclonó en el vector pET32a(+) (Novagen) (Figura 15). Debido a que el gen *ppc-C₄* tiene un sitio de restricción interno para *NcoI*, para obtenerlo completo se realizó una digestión parcial a 20 °C por 10 min con *NcoI* del plásmido pTM94, que había sido previamente cortado con *HindIII* a 37° C por 2 horas. Se aisló la banda de 3 kbp obtenida, que es un tamaño consistente con el del gen completo, se purificó en gel de agarosa al 1% (p/v) y se insertó en el vector pET32a(+) previamente linearizado por digestión simultánea con *HindIII* y *NcoI* (Invitrogen) a 37° C por 2 horas. La reacción de ligación del vector pET32a(+) con el gen *ppc-C₄* se realizó a una temperatura de 22 °C, por 16 h, usando T4 DNA Ligase Kit (Thermo Scientific, EUA). Con el plásmido resultante, llamado pET102, se transformaron células ultracompetentes de la cepa XL10-Gold de *E. coli* (Agilent) por

medio de choque térmico. Las células transformadas se crecieron en placa con medio Luria-Bertani (LB) de manera selectiva en presencia de ampicilina (0.1 mg/mL) y las colonias que crecieron se sembraron en medio líquido LB que contenía ampicilina (0.1 mg/mL) y se incubaron por 16 h a 37 °C. De estas colonias se extrajo el plásmido pET-102 utilizando GeneElute Kit (Sigma Aldrich) y se secuenció mediante el método de Sanger (Sanger y Coulson, 1975) en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT, UNAM. Debido al tamaño de *ppc-C₄* (2,913 pb), con los oligonucleótidos T7 promotor y T7 terminador sólo pudieron secuenciarse los extremos del gen, por lo que para secuenciar las regiones internas internas se usaron oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia del gen y que permitieron la secuenciación de fragmentos de tamaño adecuado para obtener su secuencia de forma confiable.

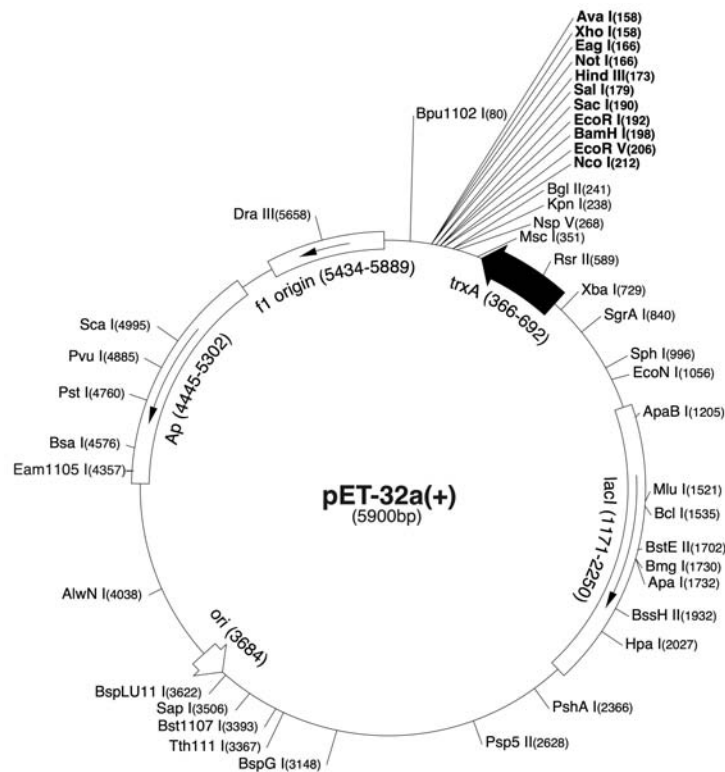


Figura 15. Mapa del vector pET32a(+) en el que se subclonó el gen *ppc-C₄*.

V.2. Expresión, purificación y caracterización cinética de la enzima recombinante

Una vez comprobado que el plásmido pET102 sí contenía el gen *ppc-C₄* completo, se transformaron con él células competentes de la cepa BL21 (DE3) P_{Lys}S de *E. coli* (Stratagene) Novagen o Promega) por medio de choque térmico. Debido a que con estas células no se logró una buena expresión de la proteína *ZmPEPC-C₄*, se investigó la presencia en el gen *ppc-C₄* de codones que no pueden traducirse bien en *E. coli* con la ayuda del *Graphical Codon Usage Analyzer* (<http://gcu.schoedl.de/sequentialex.html>), encontrándose que estos codones son muy abundantes. Por ello, se transformaron células de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Novagen) con el plásmido pET-102, siguiendo el mismo procedimiento llevado a cabo con la otra cepa. Para inducir la síntesis de *ZmPEPC-C₄* se cultivaron las células transformadas a 25 °C y 200 rpm. El crecimiento bacteriano se siguió midiendo el cambio en la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) hasta que alcanzó un valor entre 0.6 y 0.8 unidades de absorbancia, cuando se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), 0.2 mM y se continuó la incubación por 4 horas más. El nivel de producción de la enzima se evaluó por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), siguiendo el método de Laemmli (1970). A las células transformadas se les adicionó glicerol hasta obtener una concentración final de 20 % (v/v) y se hicieron alícuotas de 50 μL que se almacenaron a -80 °C para su posterior uso.

La enzima recombinante *ZmPEPC-C₄* se purificó a homogeneidad en un solo paso mediante cromatografía de afinidad a iones níquel usando una columna Protino® Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel, Alemania) gracias a la etiqueta de histidinas en su extremo N-terminal. Para ello, las bacterias, crecidas como se describió anteriormente, se centrifugaron a 6,000 rpm durante 5 min, a 10 °C, desechando el sobrenadante. El sedimento de células obtenido se resuspendió en amortiguador HEPES/KOH 50 mM, pH 6.5, conteniendo KCl 300 mM, glicerol 10 % (v/v), fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM, β-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 0.1 mM (amortiguador de extracción) y se obtuvo el extracto crudo por ruptura de las células por ultrasonido en hielo con pulsos de 20 segundos de encendido y 20 segundos de apagado por un tiempo total de 15 minutos a una amplitud de 27%. Posteriormente, el lisado se centrifugó a 16,000 rpm por 30 min a 4 °C y el sobrenadante se aplicó a la columna de afinidad previamente equilibrada con el amortiguador de extracción pero sin PMSF y sin EDTA. Después de lavar con 5 mM imidazol en este amortiguador, la elución se realizó con un gradiente de 5 a 50 mM de imidazol

en el mismo amortiguador. Durante la elución se recogieron fracciones a las que se les determinó la concentración de proteína por absorción a $\lambda = 280$ nm, su grado de pureza por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) según Laemmli (Laemmli, 1970) y la actividad enzimática, como se describe a continuación. Se reunieron las fracciones con actividad y se les eliminó el imidazol por lavados sucesivos con el amortiguador sin imidazol y sin sal en filtros Amicon (Millipore) de 50 kDa de corte. La concentración de la *ZmPEPC-C4* recombinante se determinó espectrofotométricamente por A_{280} utilizando un coeficiente de extinción de $111,730 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ predicho a partir de su secuencia de aminoácidos utilizando ExpASY ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2003).

La actividad de la *ZmPEPC-C4* se determinó espectrofotométricamente a 30°C en un ensayo enzimático acoplado a la enzima malato deshidrogenasa y siguiendo la oxidación de NADH a 340 nm en tampón HEPES-KOH 100 mM pH 7.3, PEP 5 mM , CO_3H^- 10 mM , MgCl_2 10 mM , NADH 0.25 mM y 4 unidades de deshidrogenasa málica. Las cinéticas de saturación por el sustrato PEP (o el complejo PEP-Mg) y por los efectores alostéricos se realizaron a una concentración fija de Mg^{2+} libre de 0.4 mM y sin añadir CO_3H^- al medio de ensayo, ya que se pretendía hacer estos ensayos bajo condiciones cercanas a las fisiológicas y la concentración de CO_3H^- en soluciones acuosas a pH 7.3 en equilibrio con el aire es $107 \mu\text{M}$, asumiendo una concentración parcial en el aire de CO_2 de $300 \mu\text{bares}$. Las concentraciones de las especies libres de PEP y Mg^{2+} y la del complejo PEP-Mg se calcularon a partir de las concentraciones totales como se describe en Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990. En las situaciones por G6P o Gly se usó una concentración fija de PEP total de 3 mM y de 2.5 mM en el caso de la saturación por malato. La unidad (U) de actividad enzimática la definimos como la cantidad de enzima que produce $1 \mu\text{mol}$ de sustrato por minuto a 30°C . Los datos se analizaron por regresión no lineal, usando el programa de cómputo Prism y las ecuaciones 1 (ecuación de Hill) para la saturación por el sustrato, 2 y 3 para las saturaciones por los activadores y 4 y 5 para la saturación por malato.

$$v = V_{max} [S]^h / (S_{0.5}^h + [S]^h) \quad (1)$$

$$v = ((v_{max} - v_0)[A] / (A_{0.5} + [A])) + v_0 \quad (2)$$

$$v = ((v_{max} - v_0)[A]^h / (A_{0.5}^h + [A]^h)) + v_0 \quad (3)$$

$$v = v_0 I_{50} / (I_{50} + [I]) \quad (4)$$

$$v = v_0 I_{50}^h / (I_{50}^h + [I]^h) \quad (5)$$

donde v es la velocidad inicial determinada experimentalmente, V_{max} la velocidad máxima, $[S]$ es la concentración del sustrato variable, h es el número de Hill, v_0 es la velocidad inicial en ausencia del activador o inhibidor, v_{max} es la velocidad más alta obtenida a concentraciones saturantes del activador, $[A]$ es la concentración del activador, $A_{0.5}$ es la concentración del activador que se requiere para lograr la mitad de la activación máxima a concentración de sustratos constante, I_{50} es la concentración de inhibidor que se requiere para disminuir a la mitad la actividad en ausencia del inhibidor e $[I]$ es la concentración de inhibidor.

La doble etiqueta de tiorredoxina y hexahistidinas que posee la *ZmPEPC-C₄* recombinante se eliminó por digestión de la enzima con enterocinasa (New England Biolabs) en una proporción de 0.000125% (p/p) con respecto a la *ZmPEPC-C₄*. La reacción de digestión se realizó a una temperatura de 25 °C, en un amortiguador HEPES-KOH 50 mM, pH 7.4, NaCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM por 1 hr. A continuación, la mezcla de la digestión se aplicó a una columna Mono QHR5 (GE Healthcare) equilibrada con HEPES-KOH 50 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 10 mM y glicerol al 10% (v/v) y la enzima se eluyó con un gradiente de 0 a 350 mM de fosfatos de potasio en este amortiguador. Se mezclaron las fracciones que contenían a la enzima, se alicuotearon y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

V.3. Experimentos de unión al equilibrio del sustrato y efectores alostéricos a la *ZmPEPC-C₄*

Se llevaron a cabo midiendo los cambios en la fluorescencia del complejo *ZmPEPC-C₄*-ANS a 25 °C con un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5000 U en un amortiguador HEPES-KOH 50 mM, pH 7.3, EDTA 0.1 mM, β-mercaptoetanol 10 mM. La concentración usada de *ZmPEPC-C₄* fue de 150 µg/mL (1.37 µM como monómero), la de ANS 30 µM y las concentraciones de PEP y efectores alostéricos se variaron como se indica en el texto o en las leyendas de las figuras. El ANS se excitó a 370 nm y los espectros de emisión se registraron entre 400 y 600 nm a intervalos de 2 min después de la adición de 5 µL de ligando. Para eliminar el efecto de la dilución, los espectros resultantes se corrigieron con los obtenidos al agregar 5 µL de amortiguador. Las intensidades de fluorescencia corregidas se usaron para calcular la constante de disociación de los ligandos ajustando los datos a la Ecuación 6:

$$F = \{F_0 \times L_{0.5}^h / (L_{0.5}^h + [L]^h)\} + F_{\min} \quad (6)$$

donde F y F_0 son las intensidades de fluorescencia a la longitud máxima de onda de emisión observada en presencia y ausencia del ligando; respectivamente; $[L]$ es la concentración de ligando; $L_{0.5}$ es la concentración de ligando que da la mitad del cambio máximo de fluorescencia y es igual a la constante de disociación cuando la unión del ligando es hiperbólica; F_{\min} es la fluorescencia residual estimada a la saturación del ligando; y h es el número de Hill que indica el grado de cooperatividad ($h = 1$ en unión hiperbólica; $h > 1$ en unión con cooperatividad positiva). En estos cálculos, se utilizaron concentraciones de ligandos totales, en lugar de libres, ya que los ligandos estaban en gran exceso a la concentración de enzima, dada su baja afinidad por la enzima, y por lo tanto sus concentraciones totales son prácticamente las mismas que sus concentraciones libres.

V.4. Experimentos de dicroísmo circular en el UV cercano con la ZmPEPC-C₄

Las señales de CD y el voltaje del dínodo se registraron con un espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Inc., Easton, MD) equipado con un sistema de control de temperatura tipo Peltier (Modelo PTC-423S) y calibrado con d-10-(+)-canforsulfónico ácido. Los espectros de UV cercano (250–320 nm) de ZmPEPC-C₄, a una concentración de 0.35 mg/ml, se obtuvieron en un amortiguador HEPES-KOH 10 mM, pH 7.4, 2-mercaptoetanol 0.5 mM, KCl 50 mM en cubetas de cuarzo de 0.5 cm de longitud de paso óptico a intervalos de 1 nm, un ancho de banda de 1 nm y una velocidad de barrido de 20 nm/min. Al promedio de tres espectros de cada muestra se le restó el espectro promedio de las muestras de referencia sin proteína. Las elipticidades observadas se convirtieron en elipticidades molares [Θ] usando el valor de la masa molecular de la proteína recombinante (109,416.07 Da) obtenida a partir de su secuencia de aminoácidos con el programa ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

V.5. Experimentos de proteólisis limitada de la ZmPEPC-C₄ con tripsina

La digestión de ZmPEPC-C₄ con tripsina se realizó a 25 °C por los tiempos indicados en cada experimento en amortiguador HEPES-KOH 50 mM, pH 7.4, que contenía 2-mercaptoetanol 10 mM y CaCl₂ 1 mM, en una proporción de proteasa de 0.001 % (p/p). Para seguir el curso temporal de desaparición y formación de cada fragmento proteolítico, se tomaron alícuotas de la mezcla de

reacción a los intervalos de tiempo indicados, se detuvo la reacción con PMSF 1 mM; Roche, EE. UU.) y se sometieron inmediatamente a (SDS-PAGE) según Laemmli (Laemmli, 1970). Los fragmentos de la proteína se detectaron mediante tinción con azul de Coomassie R-250 y su masa molecular aparente se estimó comparando su migración relativa con la de proteínas de masa molecular conocida (Bio-Rad, EE. UU.). En experimentos de digestión similares, después de detener la reacción con PMSF, se analizó la actividad de *ZmPEPC-C₄* en las alícuotas usando condiciones de ensayo estándar en ausencia y presencia de concentraciones saturantes de los efectores alostéricos.

V.6. Análisis bioinformáticos estructurales de la ZmPEPC-C₄

Las simulaciones de acoplamiento molecular de ANS en las estructuras cristalográficas de *ZmPEPC-C₄* (PDB 5VYJ) (que es la de una proteína en estado R con una molécula de glicina unida al sitio alostérico de los aminoácidos neutros) y PDB 6U2T (que es la de una proteína en estado T con una molécula de malato unida al sitio alostérico de los ácidos carboxílicos) se hicieron con el programa DockingServer (<https://www.dockingserver.com/web>, Bikadi y Hazai, 2009) y el servidor DockThor (<https://dockthor.lncc.br/v2/>, De Magalhães *et al.*, 2014). Antes de las simulaciones se eliminaron las moléculas de glicina y malato de los archivos pdb correspondientes.

Los sitios potenciales de corte con tripsina se predijeron con la herramienta PeptideCutter en el servidor web Expasy (Expert Protein Analysis System, <http://expasy.org>, Gasteiger *et al.*, 2003). El área de superficie accesible (ASA) se evaluó utilizando la herramienta “Accessible Surface Area and Accessibility Calculation for Protein” (<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/ASA/>). Los residuos de aminoácidos expuestos se identificaron utilizando el programa Concave Finder (<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/CONCAVE/>), que se basa en el algoritmo CX (Pintar *et al.*, 2002). Los valores de Cx son la relación entre el volumen externo expuesto de los átomos en una proteína y el volumen interno enterrado (v_{ext}/v_{int}). Para conocer la localización de los posibles sitios de corte con tripsina se analizaron los elementos de estructura secundaria de *ZmPEPC-C₄* con el programa Stride (<http://webclu.bio.wzw.tum.de/stride/>, Frishman y Argos, 1995). Los sitios de corte con tripsina propuestos se mapearon en la estructura cristalográfica usando PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1. Subclonación del gen que codifica para la ZmPEPC-C₄

El gen *ppc-C₄* (NCBI GenBank número de acceso AJ536629) que codifica la enzima ZmPEPC-C₄ (NCBI GenBank número de acceso CAD60555) (Yanagisawa *et al.*, 1988) nos fue donado por el Dr. Katsura Izui de la Universidad de Kioto, Japón, inserto en el vector pTM94 entre los sitios de restricción *NcoI* y *HindIII*. Para optimizar la sobreexpresión de este gen, y por tanto la obtención de la proteína ZmPEPC-C₄, decidimos subclonarlo en el vector de expresión pET32a(+), el cual posee un promotor y un terminador transcripcional para la RNA polimerasa T7 que produce altos niveles de transcripción en diferentes cepas de *E. coli*, así como un gen que confiere resistencia a ampicilina que se usa como marcador de selección de las bacterias transformadas. Dado que en el gen *ppc-C₄* existe un sitio interno de restricción para *NcoI* (Figura 15A), para poderlo obtener completo a partir del plásmido pTM94, primero se linearizó por digestión con la enzima *HindIII* a 37 °C por 2 horas y posteriormente se probaron diferentes condiciones de digestión parcial con *NcoI*, variando la temperatura y el tiempo de incubación. Encontramos que a 20 °C desde tiempos cortos y hasta 30 min de incubación se podía obtener la banda de aproximadamente 3 kbp que corresponde al tamaño esperado del gen *ppc-C₄* completo (2,913 pb) (Figura 15B). Elegimos el tiempo de digestión de 10 min para purificar esta banda e insertarla en el vector pET32a(+) obteniéndose así el plásmido pET102.

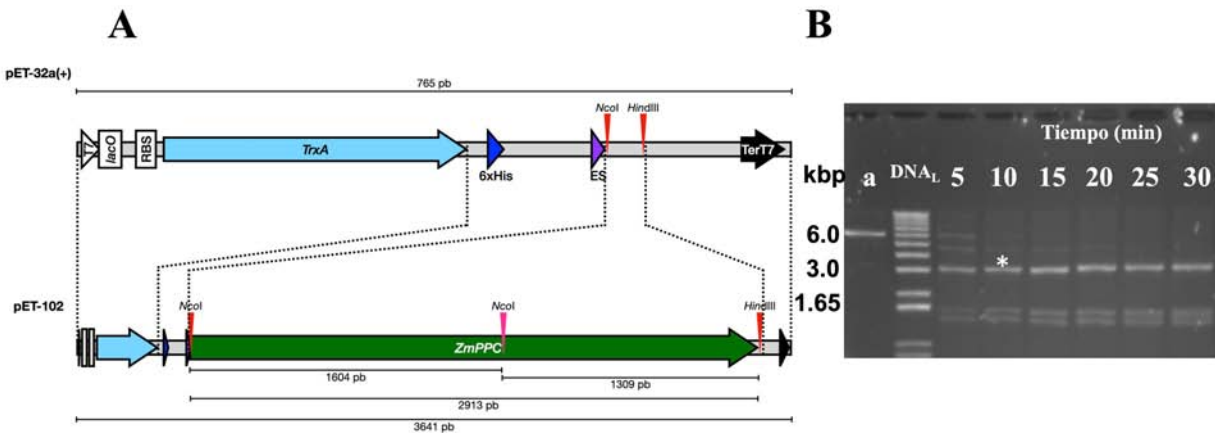


Figura 16. Subclonación del gen *ppc-C4*. (A) Representación esquemática del gen *ppc-C4* (2.9 kb) mostrando el sitio de restricción *NcoI* dentro de la secuencia codificante y los fragmentos del gen que se obtienen (de 1.6 y 1.3 kb) por digestión en este sitio. (B) Gel de agarosa (teñido con bromuro de etidio) mostrando las bandas resultantes de la digestión del plásmido pTM94-*ppc-C4* con *HindIII* (carril a) y posteriormente con *NcoI* a los tiempos indicados. La banda de aproximadamente 3 kbp (señalada con un asterisco), fue la que se usó para subclonar este gen en el vector pET32a(+) y obtener el plásmido pET102.

La confirmación de que el plásmido pET-102 tenía insertado el gen *ppc-C4* completo y en el marco de lectura correcto se realizó inicialmente por secuenciación usando oligonucleótidos específicos para el promotor y terminador T7 (Figura 17)

Secuencia promotor T7

CNNNNNGTGAGCGGATACATTCCCCTCTAGAAAATTTTGTNNCTTAAAGAAGGAGATATACATATGAGCGATAAA
ATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTCTGGG
CAGAGTGGTGGCGTCCGTGCAAAATGATCGCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGAC
CGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAACCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTG
CTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGTGCACCTGTCTAAAGGTTCAGTTGAAAGAGTTCTCGAC
GCTAACCTGGCCGGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCTTCTTGGTCTGGTGCCACGC
GGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTGCAACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGGTACCGA
CGACGACGACAAGGCCATGGCGTGCACCAAGGCACCCGGCCCTGGCGAGAAGCACCCTCCATCGACGGCAGCT
CCGTGAGCTGGTCCAGGCAAGGTCTCCGAGGACGACAAGCTCATCGAGTACGATGCGCTGCTCGTCGANCGTTCCTCNANAT
CCTCNAGGACNTCCNNNGGNCNNCNTTNTCGANNNNNTCNCNAGNGCTNCNANANGTGNCGCCNANTANGANGNNA
NAGGANANNNNANNANGCTGGGNNANCTCGGCNNCNAGCTNNGGGCNCNCCCGCNACNCNTCNCGTGNNNNNNNTCNC
NGNATGNTNACTCNCNACTNCCNNGNNGNATNNNNNNNCNANNNNNANNANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCN
NNNNNNNNNNNANNCNAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAAAANGNNNNNTTNNNNNANCCNNNNNNNT
NNNN

Secuencia terminador T7

CAAGAGANGCCCGGGCGGCATCNCGACCTGCGGCCATCCCTGGATNTTCTCGTGACCCAGNCCAGTTCCACCTCCCGTGT
GGCTGGGAGTNGCCCGCATTCAAGTTCGCCATCGACAAGGACGTCAGGAACCTCCAGNTCNTCAAAGAGATGTACAACGAGTG
GCCATTCTCAGGGTACCTGGACCTGGTGGAGATGGTTTTTCGCCAAGGGAGACCCCGGCATTGCCGGCTTGTATGACGAGCTG
CTTGTGGCAGAAGAAGCTAAGCCCTTGGGAAGCAGCTCAGGGACAAATACGTGGAGACACAGCAGCTTCTCTCCAGATCGCTG
GGCACAAGGATATTCTGAAGGCGATCCATTCTGAAGCAGGGGCTGGTGTGCGCAACCCCTACATCACCCCTGAACGTTGTT
CCAGGCCTACAGCTGAAGCGGATAAGGGACCCCAACTTCAAGGTGACGCCCCAGCCGCGCTGTCCAAGGAGTTCGCCGACGA
GAACAAGCCCGCGACTGGTCAAGCTGAACCCGGCGAGGAGTACCCGCCGGCTGGAAGACACGCTCATCTCACCATGA
AGGGCATCGCCCGGCATGCAGAACAATGGCTTAGGCGGCTTCTTCTACTCACCTGCAGAGTGCACCCGAATAATCAGCTT
CCGGATGGTGGCGTTTTGTGTCAGTTTTGGATGGAATGCCGAACCTGGCAGCGTCTGTTTTCCCTATGCATAGCCAAAGCTTG
CGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTNNCAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGT
GGNNGNCCN

Figura 17. Resultados de la secuenciación del plásmido pET-102 usando nucleótidos específicos para el promotor y terminador T7. En negritas se muestran nucleótidos que son parte del vector, en naranja los que codifican para tiorredoxina, en azul para la etiqueta de 6 His, tanto en la región 5' como 3' del gen, en verde los que codifican para el sitio de reconocimiento de trombina, en magenta para el sitio de reconocimiento de enterocinasas y en rojo el codón de término del gen. Las secuencias subrayadas son los sitios de corte de *NcoI* y *HindIII*. En itálicas están los fragmentos idénticos a los extremos 5' y 3' del gen *ppc-C4* de maíz. En fondo amarillo con letras más grandes se muestra el codón de alanina que adiciona el vector pET102 junto al codón de la metionina de inicio.

La secuenciación completa del gen usando oligonucleótidos internos mostró que la secuencia insertada en el plásmido pET102 corresponde sin cambios al gen *ppc-C4* obtenido a partir del plásmido pTM94 (identificador AJ536629; Yanagisawa *et al.*, 1988) y que, por tanto, a partir de pET102 podríamos obtener la proteína *ZmPEPC-C4* reportada en GenBank con el identificador CAD60555. Con respecto a otros dos genes *ppc-C4* reportados en el GenBank (con identificadores X15238 y X15239 que respectivamente codifican las proteínas con identificadores CAA33316 y CAA33317; Hudspeth y Grula, 1989) encontramos varias mutaciones silenciosas y tres mutaciones que resultan en cambios en residuos de aminoácidos de la proteína (Apéndice I y Figura 18). De estos últimos, los cambios D509E y P482S probablemente corresponden a polimorfismos, ya que existe otra secuencia de *ZmPEPC-C4* (gen X152642 que codifica la proteína

CAA33663; Matsouka and Minami, 1989) que posee los mismos residuos que la proteína codificada por el gen *ppc-C₄* en el plásmido pET102, es decir la CAD60555. El cambio A239D en realidad no existe, es decir, en esta posición la *ZmPEPC-C₄* posee un aspartato y el que lo reportaran como una alanina en la secuencia de la proteína CAA33316 deducida a partir del gen X15238 fue por un error de secuenciación, dado que ninguna de las otras secuencias reportadas posee una alanina. Resulta extraño que para determinar la primera estructura cristalográfica depositada en el PDB de la enzima *ZmPEPC-C₄* por el grupo del Dr. Izui (PDB 1JQO) usaran la secuencia CAA33316, por lo que erróneamente modelaron como una alanina el residuo en la posición 239. Un análisis de la densidad electrónica del cristal 1JQO reveló que en realidad esta densidad electrónica corresponde a un aspartato (Muñoz-Clares *et al.*, 2020). De hecho, este error impidió que por un tiempo se conociera la importancia del residuo Asp239, el que está en el sitio alostérico de los azúcares fosforilados y que participa en forma importante en la activación de la *ZmPEPC-C₄* por G6P como demostraron estudios por mutagénesis sitio-dirigida realizados por nuestro grupo (Muñoz-Clares *et al.*, 2020).

CAD60555.1	MASTKAPGPGKEKHSIDAQLRQLVPGKVS	EDDKLIEYDALLVDRFLNQLDLHGPSLREFVQECYEVSADYEGKGD	80
CAA33663.1	MASTKAPGPGKEKHSIDAQLRQLVPGKVS	EDDKLIEYDALLVDRFLNQLDLHGPSLREFVQECYEVSADYEGKGD	80
CAA33317.1	MASTKAPGPGKEKHSIDAQLRQLVPGKVS	EDDKLIEYDALLVDRFLNQLDLHGPSLREFVQECYEVSADYEGKGD	80
CAA33316.1	MASTKAPGPGKEKHSIDAQLRQLVPGKVS	EDDKLIEYDALLVDRFLNQLDLHGPSLREFVQECYEVSADYEGKGD	80

CAD60555.1	GELGAKLTGLAPADAILVASSILHMLNLANLAE	EVQIAHRRRNKSLKGGFADEGSATTESDIETLKR	160
CAA33663.1	GELGAKLTGLAPADAILVASSILHMLNLANLAE	EVQIAHRRRNKSLKGGFADEGSATTESDIETLKR	160
CAA33317.1	GELGAKLTGLAPADAILVASSILHMLNLANLAE	EVQIAHRRRNKSLKGGFADEGSATTESDIETLKR	160
CAA33316.1	GELGAKLTGLAPADAILVASSILHMLNLANLAE	EVQIAHRRRNKSLKGGFADEGSATTESDIETLKR	160

CAD60555.1	VFEALKNQTVDLVFTAHTQSARRSLLQKNAR	IRNCLTQLNAKIDTDDDKQELDEALQREIQA	240
CAA33663.1	VFEALKNQTVDLVFTAHTQSARRSLLQKNAR	IRNCLTQLNAKIDTDDDKQELDEALQREIQA	240
CAA33317.1	VFEALKNQTVDLVFTAHTQSARRSLLQKNAR	IRNCLTQLNAKIDTDDDKQELDEALQREIQA	240
CAA33316.1	VFEALKNQTVDLVFTAHTQSARRSLLQKNAR	IRNCLTQLNAKIDTDDDKQELDEALQREIQA	240

CAD60555.1	MRYGMSYIHETVWKGVPKFLRRVDTALKNIG	INERLRYNVSIRFSSWGGDRDGNPRVTP	320
CAA33663.1	MRYGMSYIHETVWKGVPKFLRRVDTALKNIG	INERLRYNVSIRFSSWGGDRDGNPRVTP	320
CAA33317.1	MRYGMSYIHETVWKGVPKFLRRVDTALKNIG	INERLRYNVSIRFSSWGGDRDGNPRVTP	320
CAA33316.1	MRYGMSYIHETVWKGVPKFLRRVDTALKNIG	INERLRYNVSIRFSSWGGDRDGNPRVTP	320

CAD60555.1	DQIEELMFELSMWRCNDELVRAEELHSSSGS	KVTYYIEFWKQIPPNPEYRVILGHVRDKLYN	400
CAA33663.1	DQIEELMFELSMWRCNDELVRAEELHSSSGS	KVTYYIEFWKQIPPNPEYRVILGHVRDKLYN	400
CAA33317.1	DQIEELMFELSMWRCNDELVRAEELHSSSGS	KVTYYIEFWKQIPPNPEYRVILGHVRDKLYN	400
CAA33316.1	DQIEELMFELSMWRCNDELVRAEELHSSSGS	KVTYYIEFWKQIPPNPEYRVILGHVRDKLYN	400

CAD60555.1	SAESSFTSIEEFLEPLELCEYKSLCDCGDKA	IADGSLDLLRQVTFGLSLVKLDIRQESERHT	480
CAA33663.1	SAESSFTSIEEFLEPLELCEYKSLCDCGDKA	IADGSLDLLRQVTFGLSLVKLDIRQESERHT	480
CAA33317.1	SAESSFTSIEEFLEPLELCEYKSLCDCGDKA	IADGSLDLLRQVTFGLSLVKLDIRQESERHT	480
CAA33316.1	SAESSFTSIEEFLEPLELCEYKSLCDCGDKA	IADGSLDLLRQVTFGLSLVKLDIRQESERHT	480

CAD60555.1	WSEDKRQEWLLSELRGKRPLLPDLPQTEI	ADVIGAFHVLAELPDSFGPYIISMATAPSDV	560
CAA33663.1	WSEDKRQEWLLSELRGKRPLLPDLPQTEI	ADVIGAFHVLAELPDSFGPYIISMATAPSDV	560
CAA33317.1	WSEDKRQEWLLSELRGKRPLLPDLPQTEI	ADVIGAFHVLAELPDSFGPYIISMATAPSDV	560
CAA33316.1	WSEDKRQEWLLSELRGKRPLLPDLPQTEI	ADVIGAFHVLAELPDSFGPYIISMATAPSDV	560

CAD60555.1	VVPLFERLADLQSAPASVERLFSVDWYMDR	IKGKQVMVGYSDSGKDAGRLSAAWQLYRAE	640
CAA33663.1	VVPLFERLADLQSAPASVERLFSVDWYMDR	IKGKQVMVGYSDSGKDAGRLSAAWQLYRAE	640
CAA33317.1	VVPLFERLADLQSAPASVERLFSVDWYMDR	IKGKQVMVGYSDSGKDAGRLSAAWQLYRAE	640
CAA33316.1	VVPLFERLADLQSAPASVERLFSVDWYMDR	IKGKQVMVGYSDSGKDAGRLSAAWQLYRAE	640

CAD60555.1	RGGTVGRGGGPTHLLAILSQPPDTINGS	IRVTVQGEVIEFCFGEELHCFQTLQRF	720
CAA33663.1	RGGTVGRGGGPTHLLAILSQPPDTINGS	IRVTVQGEVIEFCFGEELHCFQTLQRF	720
CAA33317.1	RGGTVGRGGGPTHLLAILSQPPDTINGS	IRVTVQGEVIEFCFGEELHCFQTLQRF	720
CAA33316.1	RGGTVGRGGGPTHLLAILSQPPDTINGS	IRVTVQGEVIEFCFGEELHCFQTLQRF	720

CAD60555.1	AVVATEEYRSVVVKEARFVEYFRSATPETE	YGRMNIISRPAKRRPGGGITTLLRAIPWIF	800
CAA33663.1	AVVATEEYRSVVVKEARFVEYFRSATPETE	YGRMNIISRPAKRRPGGGITTLLRAIPWIF	800
CAA33317.1	AVVATEEYRSVVVKEARFVEYFRSATPETE	YGRMNIISRPAKRRPGGGITTLLRAIPWIF	800
CAA33316.1	AVVATEEYRSVVVKEARFVEYFRSATPETE	YGRMNIISRPAKRRPGGGITTLLRAIPWIF	800

CAD60555.1	AIDKDVNRNFQVLKEMYNWPFVRTLDLLEM	VFAKGDPIAGLYDELLVAEELKPFQKLRDK	880
CAA33663.1	AIDKDVNRNFQVLKEMYNWPFVRTLDLLEM	VFAKGDPIAGLYDELLVAEELKPFQKLRDK	880
CAA33317.1	AIDKDVNRNFQVLKEMYNWPFVRTLDLLEM	VFAKGDPIAGLYDELLVAEELKPFQKLRDK	880
CAA33316.1	AIDKDVNRNFQVLKEMYNWPFVRTLDLLEM	VFAKGDPIAGLYDELLVAEELKPFQKLRDK	880

CAD60555.1	LEGDPFLKQGLVLRNPYITTLNVFQAYTL	KRIRDPNFKVTPQPPLSKEFADENK	960
CAA33663.1	LEGDPFLKQGLVLRNPYITTLNVFQAYTL	KRIRDPNFKVTPQPPLSKEFADENK	960
CAA33317.1	LEGDPFLKQGLVLRNPYITTLNVFQAYTL	KRIRDPNFKVTPQPPLSKEFADENK	960
CAA33316.1	LEGDPFLKQGLVLRNPYITTLNVFQAYTL	KRIRDPNFKVTPQPPLSKEFADENK	960

CAD60555.1	GIAAGMQNTG	970	
CAA33663.1	GIAAGMQNTG	970	
CAA33317.1	GIAAGMQNTG	970	
CAA33316.1	GIAAGMQNTG	970	

Figura 18. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de nucleótidos del gen *pepc-C4* reportadas en el GenBank. Marcados en rojo se muestran los cambios en la secuencia de las proteínas *ZmPEPC-C4* CAA33316.1, deducida a partir del gen X15238.1, y CAA33317.1, deducida a partir del gen X15239.1 (Hudspeth y Grula, 1989) con respecto a la proteína usada en este trabajo, secuencia CAD6055.1 deducida a partir del gen AJ536629.1 (Yanagisawa *et al.*, 1988) y a la CAA33663.1, deducida a partir del gen X15642.1 (Matsouka y Minami, 1989).

VI.2. Obtención de la ZmPEPC-C₄ recombinante

Se realizaron varios intentos de obtener a ZmPEPC-C₄ recombinante en forma soluble y activa transformando con el gen *ppc-C₄* células de las cepas de *E. coli* BL21(DE3) PLysS, BL21 Star (DE3) y ROSETTA (D3) y probando diferentes condiciones de crecimiento, concentración de IPTG y tiempo de inducción. En todas las condiciones probadas la expresión en estas cepas fue muy pobre por lo que, pensando que probablemente ello se debiera a la ausencia de genes que codifican para los ARN de transferencia requeridos en *E. coli* para traducir los codones CTC, AGG, CGA y CTA que codifican para los residuos Lys y Arg y que son muy abundantes en el gen *ppc-C₄* (Apéndice I), utilizamos la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, con la que sí se logró una buena expresión.

VI.3. Purificación de la ZmPEPC-C₄ recombinante

La ZmPEPC-C₄ recombinante con la doble etiqueta de tiorredoxina y hexahistidinas en el amino terminal se purificó en un solo paso mediante cromatografía de afinidad, como se describió en la sección de Materiales y métodos.

La actividad específica de la enzima ZmPEPC-C₄ recombinante pura con etiquetas fue 26.6 U/mg, un valor ligeramente menor a las 33 U/mg previamente encontrado en nuestro grupo para la enzima purificada a partir de extractos de hojas de maíz mantenidas en la oscuridad (Mújica-Jiménez *et al.*, 1998; Tovar-Méndez *et al.*, 1998; Tovar-Méndez *et al.*, 2000; Tovar-Méndez y Muñoz-Clares, 2001) y mayor al reportado por otro grupo de investigación para la ZmPEPC-C₄ recombinante obtenida a partir del vector pET94, 15 U/mg (Dong *et al.*, 1997). Además, como se muestra en la Tabla 2, los parámetros cinéticos del sustrato PEP-Mg y de los dos tipos de activadores, G6P y Gly fueron prácticamente iguales en la enzima recombinante con la doble etiqueta de tiorredoxina e histidinas que en la enzima purificada de hoja, pero el valor de la *I*₅₀ de malato de la enzima recombinante fue el doble del valor de la enzima purificada de hoja. Además, mientras su unión es no cooperativa en la enzima purificada de hoja, en la recombinante con la doble etiqueta su unión mostró una clara cooperatividad positiva. Se ha reportado que la pérdida de residuos de la región amino terminal de las enzimas PEPC-C₄, que ocurre durante su purificación a partir de hojas si no se incluyen inhibidores de proteasas tipo quimotripsina en el amortiguador de extracción, provoca una disminución en la afinidad por el ácido carboxílico inhibidor de la enzima (Wang *et al.*, 1992; Chollet *et al.*, 1996), aunque la razón de ello aún no

está clara. Pareciera ser que la integridad y/o conformación del amino terminal sea importante para la correcta conformación del sitio alostérico inhibidor, por lo que pensamos que la doble etiqueta unida al amino terminal pudiera impedir la correcta conformación de esta región y por consiguiente la del sitio alostérico. De hecho, el inhibidor malato se unió a la enzima con una afinidad parecida a la que se obtiene para la enzima purificada de hoja truncada.

Debido a estos resultados se decidió eliminar las etiquetas por digestión con enterocinasa para obtener una enzima recombinante cinéticamente idéntica a la no-truncada purificada de hoja. La digestión se llevó a cabo como se describe en la sección de Materiales y métodos y no se observaron cortes inespecíficos en la proteína incluso en tiempos más largos de incubación con la proteasa. Los parámetros cinéticos obtenidos de la proteína digerida y eluida de la columna de intercambio iónico, incluido el valor de I_{50} para el inhibidor malato, fueron los esperados para *ZmPEPC-C₄* con un amino terminal completo, como los determinados usando la enzima no truncada purificada de hoja (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros cinéticos aparentes de la *ZmPEPC-C₄* recombinante con y sin etiqueta de histidinas.

Parámetro	<i>ZmPEPC-C₄</i> purificada de hoja	<i>ZmPEPC-C₄</i> recombinante con histidinas	<i>ZmPEPC-C₄</i> recombinante sin histidinas
Saturación por PEP total			
V_{max} (U mg ⁻¹ proteína)	20.04 ± 1.36	21.24 ± 1.07	21.95 ± 1.75
$S_{0.5}$ (mM)	8.88 ± 0.84	8.45 ± 0.53	12.34 ± 1.21
h	1.95 ± 0.27	2.65 ± 0.38	1.97 ± 0.21
Saturación por G6P			
v_{max} (U mg ⁻¹ proteína)	7.79 ± 0.62	8.97 ± 0.16	8.89 ± 1.18
$A_{0.5}$ (mM)	2.31 ± 0.31	2.5 ± 0.09	2.80 ± 0.59
h	1.50 ± 0.42	2.15 ± 0.18	1.57 ± 0.55
Saturación por Gly			
v_{max} (U mg ⁻¹ proteína)	20.91 ± 0.48	25.63 ± 0.26	24.28 ± 0.60
$A_{0.5}$ (mM)	1.85 ± 0.40	3.22 ± 0.25	3.59 ± 0.63
h	1.00 ± 0.00	1.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00
Saturación por malato			
I_{50} (mM)	0.43 ± 0.13	0.71 ± 0.05	0.44 ± 0.06
h	0.55 ± 0.11	2.43 ± 0.38	0.92 ± 0.10

VI.4. Determinación de los parámetros de unión al equilibrio del sustrato y efectores de la *ZmPEPC-C₄* mediante cambios en la fluorescencia extrínseca del complejo ANS-*ZmPEPC-C₄*

La unión del sustrato PEP o los efectores alostéricos G6P, Gly o malato no indujo ningún cambio medible en la fluorescencia del triptófano de *ZmPEPC-C₄*, por lo que la fluorescencia intrínseca de la proteína no se pudo aprovechar para investigar sus posibles cambios conformacionales en solución inducidos por sus ligandos. Debido a esto, para caracterizar las propiedades dinámicas de *ZmPEPC-C₄* tras la unión del ligando, decidimos utilizar la sonda de ANS, que tiene un bajo rendimiento de fluorescencia en solución acuosa, pero exhibe una mayor fluorescencia cuando se une a sitios hidrofóbicos en proteínas (Dodd y Radda, 1969).

En ausencia de ligandos, ANS se une a *ZmPEPC-C₄* y produce un espectro de emisión con un máximo de 476 nm (Figuras 19A y B). Los cambios en la fluorescencia mostraron una dependencia hiperbólica de la concentración del ANS, y por tanto reflejan el grado de saturación de la *ZmPEPC-C₄* por el ANS. Con estos datos se pudo determinar un valor de K_d (ANS) de 14.5

$\pm 1.5 \mu\text{M}$. Aunque con este experimento no podemos conocer la estequiometría de unión del ANS a la enzima, sí nos proporcionó la información que requeríamos para poder usar este fluoróforo como herramienta en nuestros estudios de unión al equilibrio a la *ZmPEPC-C₄* del sustrato y los efectores alostéricos.

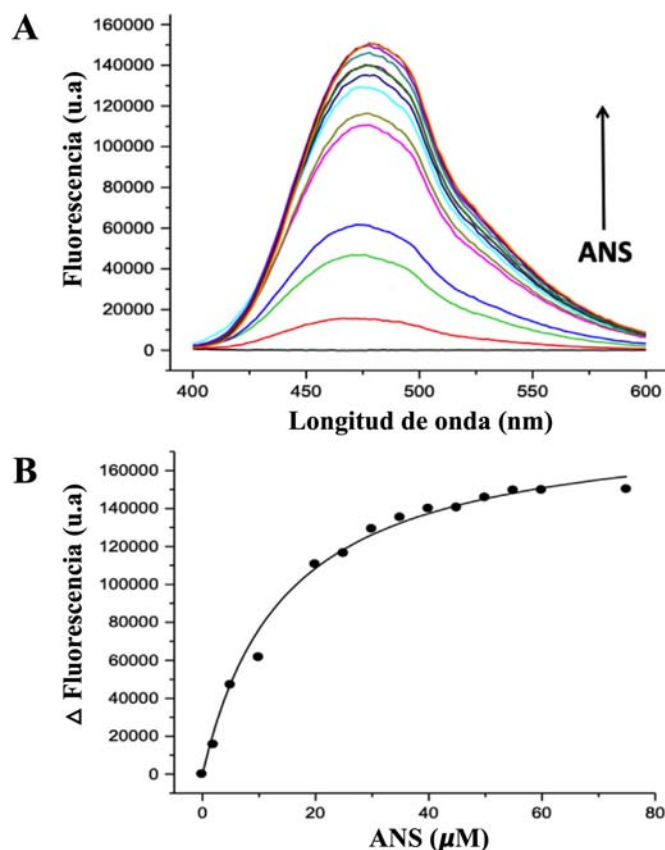
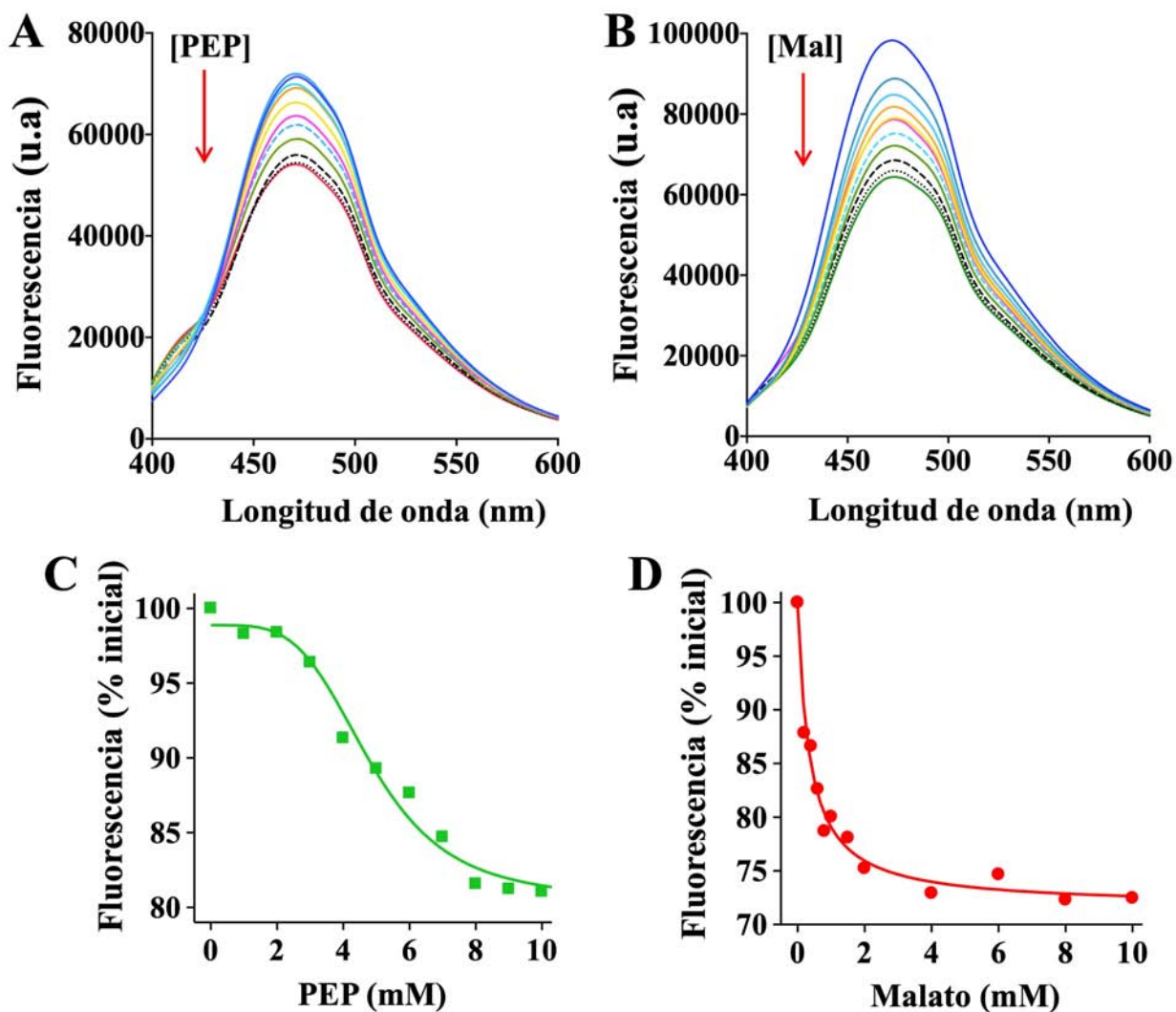


Figura 19. Cambios en la fluorescencia del ANS en presencia *ZmPEPC-C₄*. (A) Espectros de emisión de soluciones de *ZmPEPC-C₄*/ANS a concentraciones crecientes de ANS. (B) Saturación de *ZmPEPC-C₄* por ANS medida por el cambio de fluorescencia a 476 nm en función de la concentración de ANS. La concentración de la enzima fue de 150 $\mu\text{g/mL}$ (1.37 μM como monómero).

La incubación del complejo *ZmPEPC-C₄*/ANS con los activadores alostéricos G6P y Gly, usando un amplio intervalo de concentración (hasta 15 y 100 mM para G6P y Gly, respectivamente) alcanzándose concentraciones altas en relación a los valores de sus constantes de activación conocidas por experimentos cinéticos (Tovar-Méndez *et al.*, 2000), no cambiaron significativamente ni la longitud de onda de máxima fluorescencia del complejo *ZmPEPC-C₄*/ANS ni la intensidad de la fluorescencia a esta longitud de onda (datos no mostrados). Por lo tanto,

tampoco el ANS resultó adecuado para detectar los cambios conformacionales provocados por estos dos tipos de activadores alostéricos. Por el contrario, el sustrato PEP y el inhibidor alostérico malato redujeron la intensidad de la fluorescencia del complejo *Zm*PEPC-*C*₄/ANS en la longitud de onda de máxima emisión (Figuras 20A y B), en forma dependiente de su concentración (Figuras 20C y D). Los ajustes correspondientes de los datos de fluorescencia a la Ecuación 6 dieron los parámetros de unión incluidos en la tabla mostrada en la Figura 20E.



E

Ligando	F_{\min} ($\%F_0$)	$L_{0.5}$ (mM)	h
PEP	78.0 ± 3.1	5.42 ± 0.62	3.1 ± 0.9
Malato	70.7 ± 1.7	0.36 ± 0.07	0.9 ± 0.2

Figura 20. Efectos de PEP y malato sobre la fluorescencia del complejo *ZmPEPC-C₄*/ANS. (A y B) Espectros de emisión de soluciones de *ZmPEPC-C₄*/ANS en presencia de concentraciones crecientes de PEP o malato. u.a., unidades arbitrarias. (C y D) Cambios de fluorescencia dependientes de la concentración de PEP o malato. Las líneas son el resultado del mejor ajuste de los cambios en la intensidad de la fluorescencia en la longitud de onda de emisión máxima (476 nm) a la Ecuación 1. Los cambios de fluorescencia se expresan como porcentaje de la fluorescencia medida en ausencia de ligando (F_0). (E) Parámetros de unión estimados.

Se puede observar que el apagamiento de la fluorescencia a saturación por PEP es menor que el que se produce a saturación por malato, y lo más relevante es que se observaron diferencias en las curvas de saturación: sigmoideal en el caso de PEP e hiperbólica en el caso de malato. El valor de $L_{0.5}$ estimado y el grado de cooperatividad de unión para PEP concuerdan razonablemente bien con los encontrados previamente en experimentos en los que se midió la protección de la actividad enzimática de *ZmPEPC-C₄* proporcionada por el PEP contra la modificación química por fosfato de piridoxal (Tovar-Méndez *et al.*, 1995). Así, los valores estimados de $L_{0.5}$ y h para PEP en el estudio referido fueron 5.33 ± 0.32 mM y 2.43 ± 0.33 , respectivamente, mientras que los valores estimados en el presente estudio midiendo los cambios en la fluorescencia del ANS fueron de 5.42 ± 0.62 mM y 3.1 ± 0.9 , respectivamente. De manera similar, los parámetros de unión al equilibrio estimados para el malato son similares a los parámetros de inhibición para el malato determinados en experimentos de velocidad inicial: I_{50} 0.43 ± 0.04 mM y $h = 1$ (Güemez-Toro *et al.*, 2012) y $L_{0.5}$ 0.36 ± 0.07 mM y $h = 0.9 \pm 0.2$ determinados en el presente estudio por los cambios en fluorescencia.

Las diferencias en la respuesta de la enzima tras la unión de los dos ligandos (altamente cooperativa en el caso de PEP y no cooperativa en el caso de malato) sugieren que el estado conformacional inducido por PEP es diferente del estado conformacional inducido por malato, si bien el apagamiento de la fluorescencia del ANS sugiere que ambos estados conformacionales son más compactos o con menos regiones hidrofóbicas expuestas que la proteína libre. Por lo tanto, los datos de fluorescencia de ANS sugieren que la unión de PEP o malato induce dos transiciones alostéricas diferentes a estados conformacionales diferentes a los de la enzima libre: la inducida por el sustrato PEP, que cooperativamente cambia el equilibrio entre el estado T_0 presente en la ausencia de ligandos hacia el estado R unido a PEP, y la inducida por malato, que de manera no cooperativa induce un estado T diferente, el estado T unido a malato, como se mostró en la Figura 14 de la sección de Planteamiento del problema. Este hallazgo es consistente con los datos

cinéticos de *ZmPEPC-C₄* ya reportados, que mostraron cooperatividad en la unión de PEP y no cooperatividad en la unión de malato (Tovar-Méndez *et al.*, 2000; Güemez-Toro *et al.*, 2012). Además, el hallazgo de que la transición alostérica inducida por G6P o Gly no afectó la unión del ANS sugiere diferencias entre el estado R de la enzima cuando tiene a PEP unido y los estados R cuando tiene unidos a G6P o Gly, pero las posibles diferencias entre los dos últimos estados R no se pudieron estudiar con esta técnica.

No podemos descartar la posibilidad de que el ANS se una al sitio activo o al sitio alostérico de malato y, por lo tanto, que el PEP y el malato desplacen al fluoróforo de sus respectivos sitios de unión, en lugar de inhibir su unión a través de un cambio conformacional. No obstante, pensamos que la probabilidad de hacerlo es baja dada (i) la naturaleza altamente polar de los sitios de unión de PEP y malato, aunque el grupo sulfónico del ANS podría establecer interacciones polares con residuos de estos sitios; (ii) la buena concordancia de los valores de los parámetros de unión determinados por diferentes métodos experimentales; e (iii) el que no pudimos obtener poses en simulaciones de acoplamiento molecular, realizadas usando las estructuras cristalinas de *ZmPEPC-C₄* con códigos PDB 5VYJ (estado R unido a glicina) o 6U2T (estado T unido a malato), con la molécula de ANS unida dentro del sitio activo o del sitio alostérico de los ácidos carboxílicos donde se une el malato (resultados no mostrados). De hecho, las mejores poses obtenidas mostraron que el ANS se une a la superficie de la proteína, lejos del sitio activos o del sitio alostérico, pero nuevamente somos conscientes de que los resultados de los acoplamientos moleculares no son pruebas concluyentes. Sin embargo, incluso si la disminución de la fluorescencia del complejo *ZmPEPC-C₄*-ANS fue causada por la unión competitiva isostérica del ANS en cualquiera de los dos sitios, nuestros datos representan una valiosa contribución al conocimiento del modo de unión de PEP y malato y las transiciones alostéricas provocadas por estos ligandos.

VI.5. Efecto de los ligandos de la *ZmPEPC-C₄* sobre su espectro de dicroísmo circular en el UV cercano

Debido a que los resultados de la fluorescencia del complejo no informaron sobre las posibles diferencias entre los estados conformacionales desencadenados o estabilizados por los dos tipos de efectores alostéricos de esta enzima, probamos otras estrategias experimentales para detectar la existencia de los distintos estados conformacionales sugeridos por los estudios cinéticos.

Y una de estas estrategias fue el investigar posibles cambios en los espectros de CD en la región UV cercana de la *ZmPEPC-C₄* libre o unida a sus ligandos. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 21A. Hasta donde sabemos, este es el primer informe de espectroscopía de CD realizado en una enzima PEPC. El número considerable de residuos aromáticos en *ZmPEPC-C₄* (38 Phe, 27 Tyr y 13 Trp por subunidad) impide un análisis detallado de los espectros. Sin embargo, las diferencias entre estos espectros (representadas en la Figura 21B como la diferencia de espectros obtenida restando el espectro de CD de la enzima libre del espectro de CD de cada complejo enzimático) sugieren cambios en el ambiente local de algunos de estos residuos y, por lo tanto, diferentes conformaciones enzimáticas. Dado que la *ZmPEPC-C₄* posee más residuos de Phe por subunidad que de Tyr y Trp, es posible que estos residuos sean los generen la mayor diferencia en la absorción de luz polarizada, específicamente en el intervalo de longitud de onda de 255 a 270 nm, seguidos por los residuos de Tyr, también abundantes en la enzima en el intervalo de 275 a 282 nm. Por otra parte, existen varios factores que pueden afectar la diferencia en la absorción de la luz polarizada de los residuos aromáticos, tales como la flexibilidad de la proteína, es decir, si las cadenas laterales son muy móviles la absorción de la luz polarizada es menor, distancias entre residuos de aminoácidos aromáticos menores de 1 nm, y el número de residuos aromáticos de la proteína, que de ser alto puede generar bandas pequeñas de DC por cancelación entre las contribuciones positivas y negativas de la luz polarizada (Kelly y Price, 2000).

Cuando se comparó con la enzima libre, el espectro del complejo E-malato mostró los cambios más importantes, pero también se observaron diferencias en los espectros de CD de los complejos E-PEP, E-G6P y E-Gly, no solo en relación con el espectro de la enzima libre sino también entre ellos. Estos resultados confirman el cambio de un estado T vacío, T_0 , que es el que pensamos que existe cuando la enzima no tiene unido a ningún ligando, a un estado T unido, provocado por la unión del inhibidor malato, y respaldan que la unión del sustrato PEP o los dos tipos de activadores alostéricos al unirse inducen conformaciones distintas del estado R.

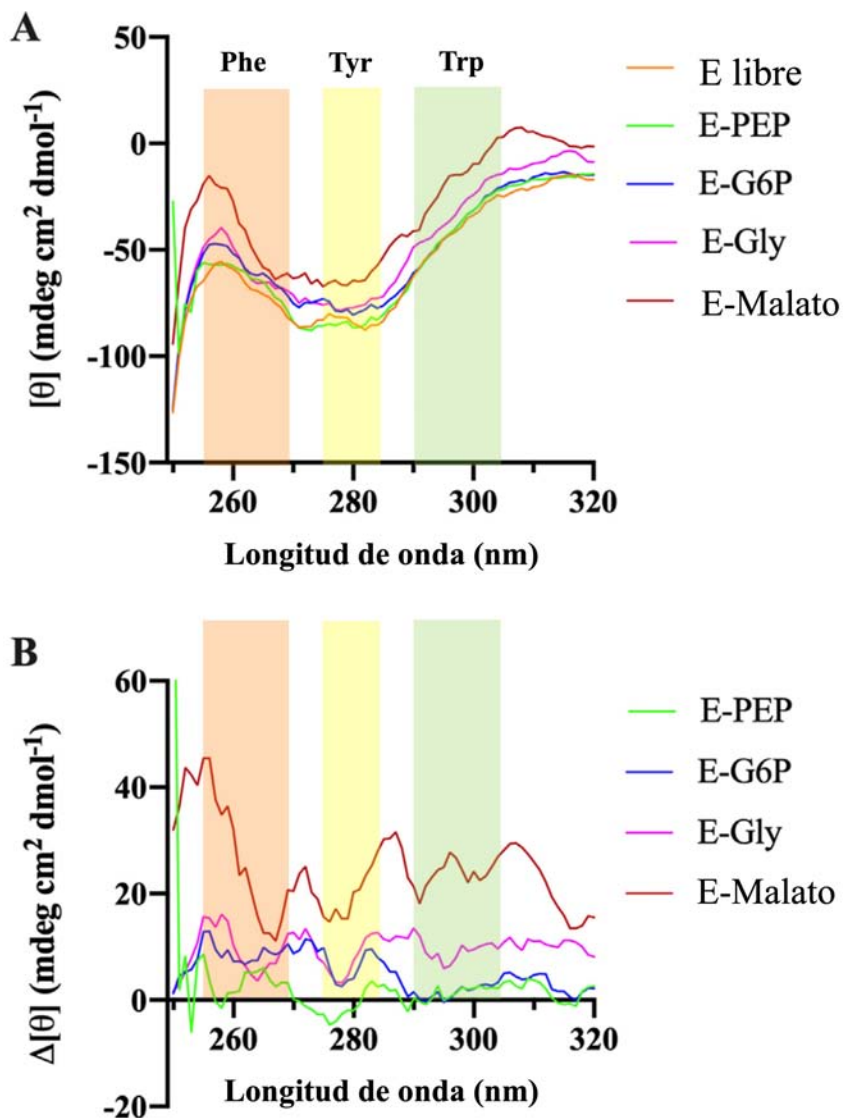


Figura 21. Efecto de los ligandos sobre el espectro CD en el UV-cercano de la *ZmPEPC-C₄*. (A) Espectros en ausencia o presencia del sustrato PEP o efectores alostéricos. (B) Espectros de diferencia obtenidos restando el espectro de la enzima libre del espectro de cada complejo enzimático. Las concentraciones de ligandos usadas fueron: PEP 10 mM, G6P 15 mM, Gly 100 mM y malato 10 mM. Los resultados mostrados son el promedio de tres espectros obtenidos en cada condición.

VI.6. Proteólisis parcial de la *ZmPEPC-C₄* libre y en complejo con sus ligandos

Para seguir investigando la posible existencia de diferentes conformaciones de estado R características de los diferentes complejos de *ZmPEPC-C₄* con su sustrato PEP o con cualquiera

de sus dos tipos de activadores alostéricos, llevamos a cabo experimentos de proteólisis limitada sometiendo la proteína con PEP, G6P, o Gly unidos a digestión con tripsina y comparando los patrones de fragmentación obtenidos y las velocidades de formación y degradación de estos fragmentos con los de la enzima libre no unida a algún ligando (Figura 22). Se realizaron experimentos similares con el complejo enzima-malato para probar si el estado T unido al malato también se puede detectar utilizando este enfoque experimental.

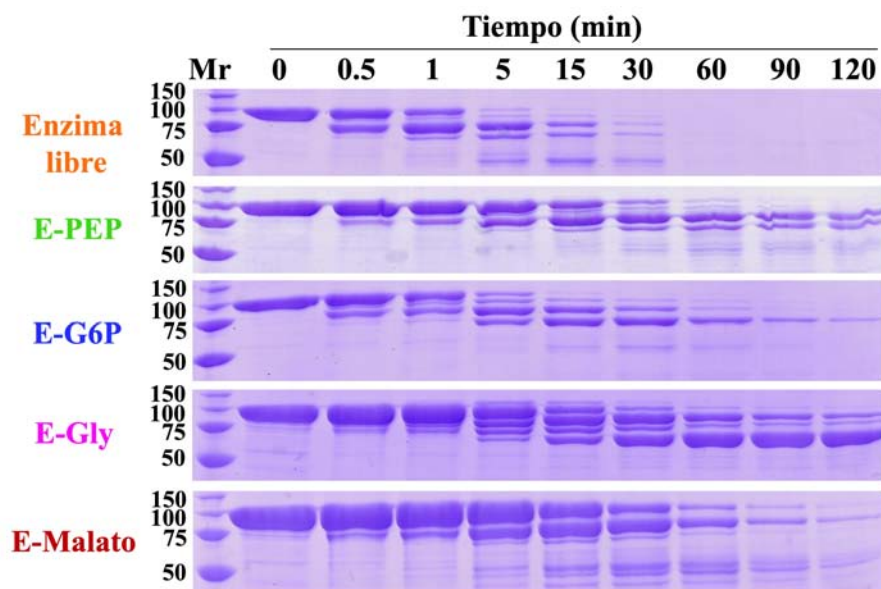


Figura 22. Patrones de digestión por tripsina de la *ZmPEPC-C₄* libre y unida a ligandos. La enzima se incubó con tripsina en ausencia o presencia del sustrato PEP o sus efectores alostéricos y se tomaron muestras en los tiempos indicados. Los patrones de fragmentación se visualizaron mediante SDS-PAGE. Las concentraciones de ligandos fueron: PEP 10 mM, G6P 15 mM, Gly 100 mM y malato 10 mM. Las imágenes de los geles SDS-PAGE sin recortar se muestran en el Apéndice III.

La tripsina digirió rápidamente la *ZmPEPC-C₄* libre, mientras que los complejos de la enzima con sus ligandos fueron más resistentes a la digestión, en particular el complejo enzima-PEP. En el caso de la enzima libre, después de solo 0.5 min de incubación, se digirió una proporción significativa de la proteína intacta, produciendo un fragmento de alrededor de 90 kDa, lo que indica que existe al menos un enlace peptídico muy susceptible a la tripsina en la enzima libre. También se formó rápidamente un segundo fragmento más pequeño y, después de una incubación de 60 minutos, la proteína se digirió por completo. La enzima en complejo con PEP fue considerablemente más resistente a la digestión, y los dos fragmentos mayoritarios formados, uno de ellos en los primeros minutos de incubación, representan casi toda la cantidad inicial de proteína,

incluso después de 120 min de incubación. En el complejo enzima-G6P, la proteína intacta se digirió más rápidamente que en el complejo enzima-PEP, pero no tan rápido como en la enzima libre. Después de 15 min de incubación, se formaron dos fragmentos principales, pero diferentes de los formados en el complejo enzima-PEP, y estos fragmentos mostraron ser bastante susceptibles a la digestión a tiempos más largos de incubación con tripsina. El patrón de digestión del complejo enzima-Gly fue diferente al de los complejos enzima-PEP y enzima-G6P, aunque se esperaría el mismo estado R activo en estos tres complejos si para la *ZmPEPC-C₄* aplicara el modelo alostérico MWC de solo dos estados. Después de 15 min de incubación del complejo enzima-Gly con tripsina, se formaron tres fragmentos principales. La cantidad del fragmento con la masa molecular más baja aumentó con el tiempo de digestión y fue muy resistente a proteólisis a tiempos más largos, de manera que representó la mayor parte de la proteína no digerida después de una incubación de 120 minutos. Ello sugiere que este fragmento no tiene sitios accesibles de escisión por tripsina o que su escisión es muy lenta. Finalmente, la proteína intacta en el complejo enzima-malato fue inicialmente casi tan resistente a la tripsina como en el complejo enzima-PEP, pero el fragmento principal formado no fue tan resistente a la tripsina como el que se forma cuando se une el PEP a la enzima, por lo que se formaron varios fragmentos más pequeños en los siguientes minutos de incubación con la proteasa. Este hallazgo sugiere que este fragmento principal formado inicialmente está parcialmente desestructurado y expone varios nuevos sitios de escisión por tripsina. Después de 120 min de digestión, la proteína se había digerido casi por completo.

Curiosamente, las diferencias en los patrones de fragmentación entre *ZmPEPC-C₄* libre y sus complejos con el sustrato o los efectores alostéricos, así como las diferencias observadas entre los cuatro complejos enzimáticos, se encontraron no solo en los primeros minutos de incubación con tripsina sino también en tiempos más largos. Aunque no identificamos los diferentes sitios de digestión trípica en los complejos enzimáticos estudiados, la evolución de los patrones de fragmentación durante un tiempo prolongado de incubación (hasta 120 min) también proporcionó información sobre los estados conformacionales de *ZmPEPC-C₄* inducidos por sus ligandos. Nuestros hallazgos indican que los diferentes péptidos de alta masa formados en tiempos cortos tienen diferente susceptibilidad a la digestión por tripsina y, por lo tanto, parecen no tener la misma conformación a pesar de tener aparentemente masas similares.

En resumen, las diferencias en los patrones de digestión de la enzima *ZmPEPC-C₄* libre y sus diferentes complejos indican que algunos sitios de escisión están más o menos disponibles para

la digestión trípica dependiendo del ligando unido, revelando así diferentes estados conformacionales en solución de esta enzima, como habían sugerido los estudios cinéticos previos. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que el método de digestión con tripsina es muy sensible para detectar diferentes conformaciones de ZmPEPC-C₄ en solución. Este método permitió la detección no sólo de aquellas conformaciones que se esperaba que fueran muy diferentes, como el estado T inducido por el inhibidor malato y el estado R inducido por el sustrato PEP, sino también aquellas conformaciones que probablemente son ligeramente diferentes, como los estados R inducidos por el sustrato PEP o cualquiera de los dos tipos de activadores alostéricos, G6P o Gly. Por lo tanto, la digestión trípica parece ser un método poderoso y sencillo para explorar el espacio conformacional disponible en las enzimas PEPC en particular y en las enzimas sujetas a regulación alostérica en general.

VI.7. Efecto de la incubación con tripsina de la ZmPEPC-C₄ sobre su actividad y sensibilidad a los efectores alostéricos

Para corroborar los resultados descritos anteriormente, medimos la actividad residual y la sensibilidad a los efectores alostéricos de la enzima libre y los diferentes complejos enzimáticos incubados con tripsina durante 60 min. La pérdida de actividad, expresada como el porcentaje de las actividades de la enzima libre y de los diferentes complejos con sus ligandos medidas al tiempo cero de incubación con tripsina, se muestra en la Figura 23A. Los cambios en la sensibilidad al malato, expresados como el porcentaje de la inhibición de la enzima por malato 10 mM, se muestran en la Figura 23B.

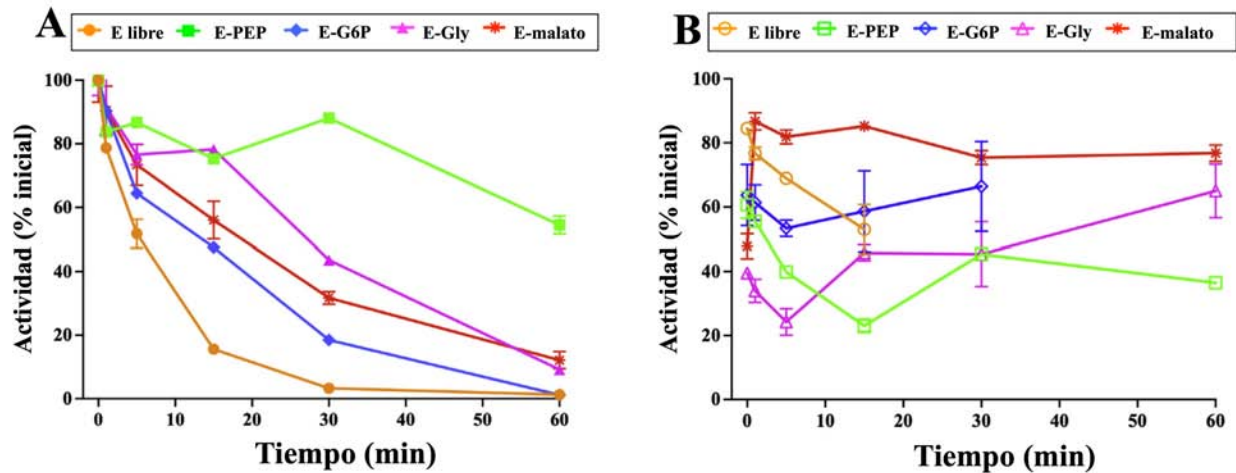


Figura 23. Efecto de la incubación con tripsina sobre la actividad y sensibilidad a los efectores alostéricos de la *ZmPEPC-C4*. Actividad enzimática residual en ausencia de cualquier efector (A) o en presencia de malato 10 mM (B). Las concentraciones de los ligandos fueron: PEP 10 mM, G6P 15 mM, Gly 100 mM y malato 10 mM. En el panel A, el valor de actividad promedio medido en el tiempo cero como U/mg prot fue: E libre = 0.633 ± 0.007 ; E-PEP = 0.975 ± 0.020 ; E-G6P = 1.251 ± 0.028 ; E-Gly = 1.036 ± 0.071 ; E-malato = 0.205 ± 0.014 . En el panel B, los valores del porcentaje de inhibición por malato 10 mM medidos al tiempo cero fueron: E libre = 84.5 ± 0.2 ; E-PEP = 60.7 ± 4.2 ; E-G6P = 63.7 ± 9.5 ; E-Gly = 39.5 ± 1.4 ; E malato = 47.8 ± 3.9 .

De manera consistente con los patrones de digestión observados, se encontraron diferencias importantes entre las enzimas libres y la enzima unida a sus ligandos. La enzima libre perdió actividad rápidamente, lo que concuerda con la rápida digestión de la proteína observada en la electroforesis de los productos de la digestión, mientras que la enzima en complejo con PEP retuvo un porcentaje importante de su actividad inicial, incluso después de 60 minutos de incubación (Figura 23A). Este último hallazgo sugiere que al menos uno de los dos fragmentos formados en la digestión con tripsina del complejo enzima-PEP, presumiblemente el de mayor masa molecular, tiene un sitio activo intacto o poco afectado. Para averiguar si estos fragmentos de digestión del complejo enzima-PEP conservaban la asociación tetramérica de la enzima nativa intacta, sometimos una muestra de este complejo a digestión con tripsina durante 60 min y luego a cromatografía de exclusión molecular. Pero no pudimos obtener un perfil de elución porque la proteína tratada con tripsina se retuvo en el filtro pre-columna, lo que sugiere que los fragmentos peptídicos que se generan en la digestión son altamente hidrofóbicos y se agregan en concentraciones superiores a las concentraciones bajas utilizadas en los ensayos de actividad. Los complejos enzima-G6P y enzima-Gly también fueron más estables frente a la pérdida de actividad provocada por la tripsina que la enzima libre (Figura 23A). La unión de Gly proporcionó mayor

protección que la de G6P, probablemente porque la cantidad de proteína intacta que queda durante la incubación es mayor en el complejo enzima-Gly que en el complejo enzima-G6P. Finalmente, los efectos estabilizadores de la unión del malato fueron intermedios entre los de la unión de G6P y Gly, un resultado también consistente con la mayor estabilización proporcionada por este inhibidor frente a la digestión con tripsina de la proteína intacta.

En todos los complejos enzimáticos, la enzima que permaneció activa durante la incubación parece ser igualmente sensible a la activación por G6P y Gly que la enzima no incubada con tripsina (datos no mostrados), pero en la enzima libre y en los complejos con PEP y con G6P, observamos una rápida y parcial pérdida de sensibilidad al malato durante los primeros cinco minutos de incubación (Figura 23B). Esta reducción en la inhibición reducida por malato podría deberse a la eliminación de un fragmento en la región N-terminal de la proteína, como se había reportado anteriormente (Wang *et al.*, 1992). Por el contrario, la sensibilidad para el malato del complejo enzima-malato disminuyó rápidamente tras la incubación con tripsina (Figura 23B) por una razón que no podemos explicar por el momento. Esta interesante observación merece ser investigada ya que podría arrojar luz sobre las bases estructurales del mecanismo de inhibición de las enzimas PEPC por parte de los ácidos carboxílicos.

VI.8. Posibles sitios de corte de la ZmPEPC-C₄ por la tripsina

La determinación de los sitios de corte por tripsina en la proteína ZmPEPC-C₄ a los diferentes tiempos de incubación la abordamos inicialmente tratando de obtener por espectroscopía de masas por ionización por electroespray (ESI-MS, por sus siglas en inglés) acoplada a HPLC las secuencias de los péptidos generados en una colaboración con el Dr. Guillermo Mendoza de la Facultad de Medicina, UNAM. El inesperado y lamentable fallecimiento del Dr. Mendoza interrumpió esta colaboración y los resultados que hasta esa fecha se habían obtenido no eran consistentes. Nuestros intentos posteriores para completarlos fueron infructuosos, por lo que, para ampliar nuestra comprensión de los resultados de los experimentos de proteólisis limitada con tripsina, investigamos los posibles sitios de corte de la tripsina en la proteína ZmPEPC-C₄ utilizando los métodos bioinformáticos descritos en la sección Materiales y métodos.

Se sabe que la tripsina escinde los enlaces peptídicos en los que un residuo de lisina o de arginina aportan el grupo carbonilo (Olsen *et al.*, 2004), y usando este conocimiento la herramienta PeptideCutter predijo un total de 119 potenciales sitios de corte en la ZmPEPC-C₄. Para reducir la

selección de los sitios de corte probables, y teniendo en cuenta que las regiones de proteínas más accesibles y expuestas en la superficie tienen más probabilidades de interactuar con el sitio activo de la tripsina, llevamos a cabo un análisis de los valores ASA y cx de cada residuo de proteína utilizando las estructuras cristalinas de *ZmPEPC-C₄* disponibles. Los resultados de estos análisis se muestran en la Figura 24 para el caso de la estructura de la enzima con código PDB 5VYJ y en los Apéndices III, IV y V de la tesis para las estructuras con código 1JQO y 6MGI, respectivamente.

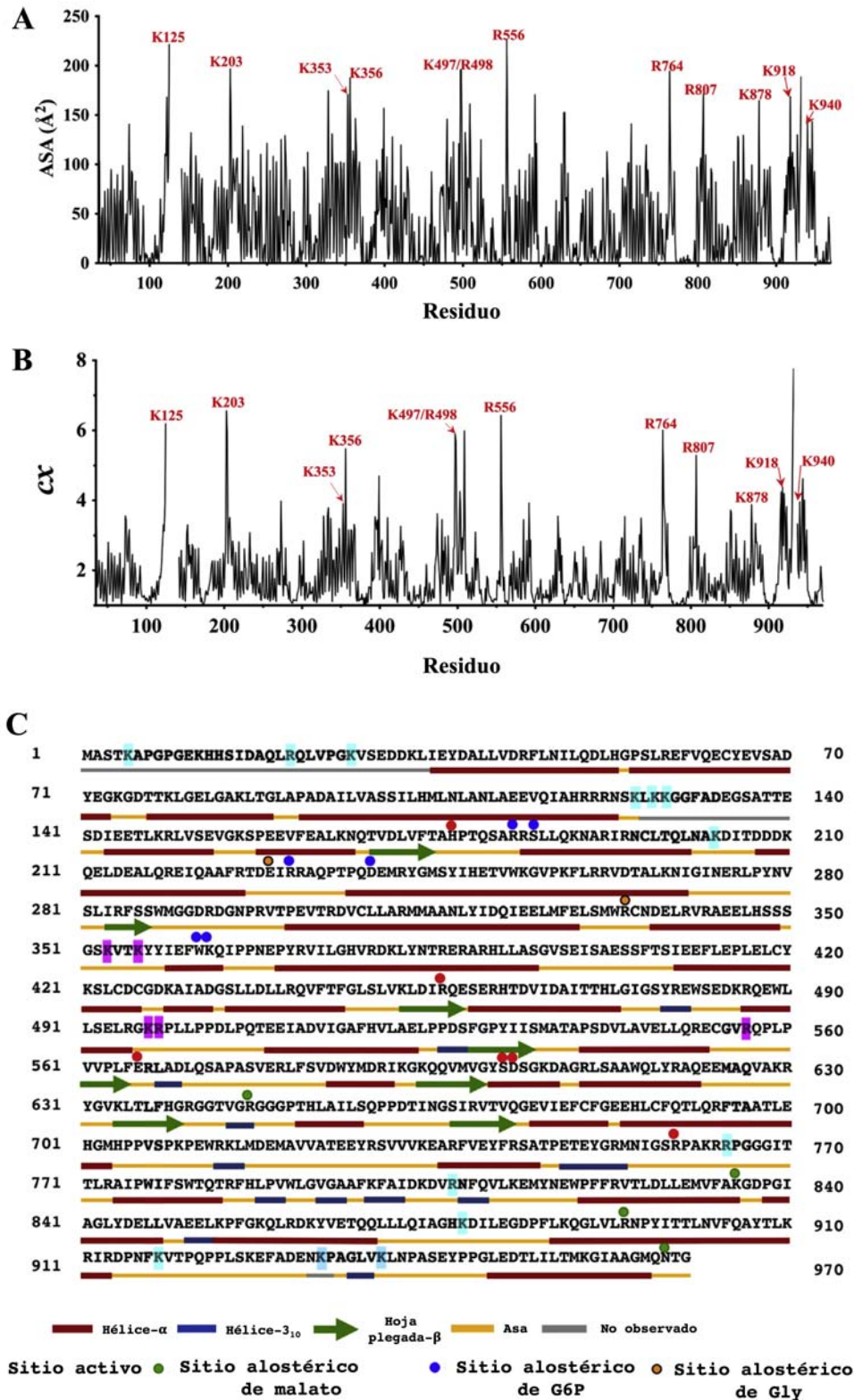


Figura 24. Predicción de sitios de corte por tripsina en la estructura cristalina de la *ZmPEPC-C₄*. Se muestran los sitios probables de corte en el monómero A de la estructura con código PDB 5VYJ predichos siguiendo los criterios dados en el texto principal. De las tres

estructuras en estado R de *ZmPEPC-C4* reportadas, la 5VYJ es la que exhibe más residuos con densidad electrónica asociada. (A y B) Valores ASA y *cx*, respectivamente, de los posibles sitios de corte. (C) Mapeo en la secuencia de la proteína de los sitios de corte predichos. En cian se marcan los residuos donde proponemos que es más probable que ocurra un corte y en magenta aquellos en los pensamos que los cortes que no son muy probables. Los residuos del sitio activo y los sitios alostéricos están marcados con círculos de colores para comparar sus posiciones en la secuencia de la proteína con las de los sitios predichos de corte de tripsina.

Como posibles sitios de escisión, seleccionamos residuos de lisina y arginina que: (1) muestran valores altos de ASA y *cx*, (2) están en asas flexibles que podrían permitir su unión al sitio activo de la proteasa (Abramowitz *et al.*, 1967; Hubbard y Argos, 1994; Hubbard *et al.*, 1998), y (3) no tienen aspartato o glutamato en una o dos posiciones antes del residuo de lisina o la arginina, porque se sabe que los dos residuos ácidos reducen considerablemente la velocidad de hidrólisis por tripsina del enlace peptídico (Šlechtová *et al.*, 2015). No consideramos la "regla de Keil", que propone que la escisión no ocurre si la prolina está después de la arginina o la lisina (Keil, 1992), porque esta regla ha sido cuestionada dada la abundancia de cortes antes de la prolina encontrados en experimentos de MS/MS (Rodríguez *et al.*, 2008).

Aplicando estos criterios, después de un examen visual de la secuencia de aminoácidos de *ZmPEPC-C4* y de la topología de sus estructuras cristalinas, combinado con los resultados del análisis ASA y *cx* (Figuras 24A y B, Apéndices IV, V y VI), proponemos que la mayoría los sitios probables de corte son Lys125, Lys203, Lys353/Lys356, Lys497/Arg498, Arg556, Lys762/Arg763, Lys807, Lys878, Lys918 y Lys940. Además, proponemos que Lys5, Arg21, Lys27 y Lys127/Lys128 también son sitios probables de corte por tripsina, ya que están ubicados en regiones flexibles, tanto que no mostraron densidad electrónica en ninguna de las tres estructuras cristalinas de la *ZmPEPC-C4* en estado R reportadas, y no están precedidos por un residuo ácido (Figura 24C y Apéndices IV, V y VI). Parece razonable asumir que, después de los varios cortes que probablemente ocurran en el segmento N-terminal mencionada, el péptido que se observe será resultado del corte en Lys27. De hecho, lo que hemos llamado la enzima intacta en los experimentos de incubación con tripsina de la enzima libre y de los complejos enzima-PEP y enzima-G6P pudiera ser la resultante de un corte en Lys27, lo que sería consistente con su rápida pérdida de sensibilidad al malato, como se mencionó más arriba. Sin embargo, en el complejo enzima-Gly, la proteína completa podría ser la primera banda observada en los geles SDS-PAGE ya que se mantiene su sensibilidad al malato. Por otra parte, también es muy probable un corte en

Lys934, ya que este es un residuo muy flexible, que se observa solo en la subunidad A de la estructura 6MGI donde está altamente expuesto.

Está claro que, en la secuencia de la proteína, los sitios predichos de corte por tripsina no están cerca de los residuos del sitio activo o de los sitios alostéricos, como se muestra en la Figura 24C. Por lo tanto, para explorar más a fondo las regiones de proteínas donde pueden ocurrir estos cortes, los mapeamos en la estructura tridimensional de la *ZmPEPC-C₄* (Figura 25A) y encontramos que efectivamente no están cercanos al sitio activo o a los sitios alostéricos (Figuras 25B y C). Por lo tanto, parece que las diferencias en su susceptibilidad a la escisión por tripsina no surgen de la protección por un ligando particular unido a la enzima.

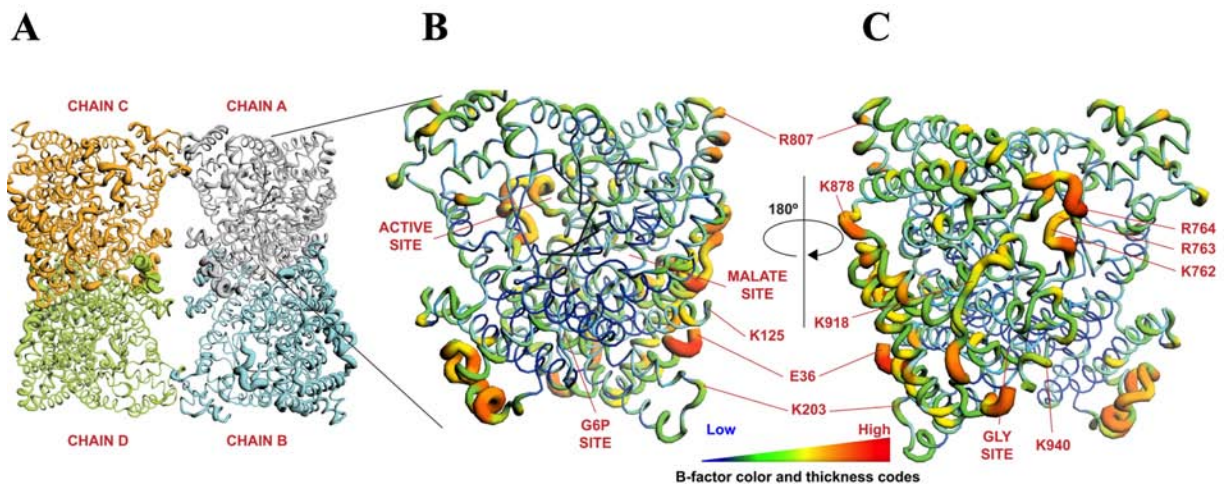


Figura 25. Mapeo de los sitios de corte por tripsina predichos en la estructura cristalina de *ZmPEPC-C₄* y desorden estático de esta estructura. (A) Tetrámero observado en el cristal 5VYJ mostrando una representación de los valores de los factores B. El tetrámero está coloreado de acuerdo al monómero. (B y C) Se muestran los residuos predichos como los sitios de corte por tripsina más probables en el monómero A, coloreado de acuerdo al valor de los factores B. La posición del primer residuo observado en la región N-terminal (Glu36) así como las posiciones del sitio activo y de los sitios alostéricos se indican en los paneles B y C

Al inspeccionar visualmente la estructura, se puede ver que los cortes en Lys497/Arg498 y Arg556, que habíamos anteriormente predicho como posibles, no pueden ocurrir porque estos residuos están ubicados en la interfaz dímico-dímico del tetrámero (hay que tener en cuenta que nuestras predicciones se basaron en que estos residuos están altamente expuestos en el monómero utilizado para las estimaciones de accesibilidad) y por lo tanto no están accesibles a la proteasa en la enzima nativa. De manera similar, los cortes en Lys353/Lys356, también predichos inicialmente

por nosotros como posibles, no son probables ya que estos residuos se encuentran en la interfaz monómero/monómero de las unidades diméricas de la estructura cuaternaria tetramérica de la proteína (que es un dímero de dímeros). Esta conclusión es consistente con la ausencia de fragmentos de digestión del tamaño correspondiente en los tiempos de incubación con tripsina más cortos. Los otros sitios de corte predichos están expuestos en el tetrámero y están ubicados en regiones o asas muy flexibles, como lo indica su falta de densidad electrónica o los valores altos de los factores B de sus carbonos α en comparación con el valor promedio de estos factores (Figuras 25B y C).

Puede observarse que los sitios potenciales de corte están en: 1) la región N-terminal, la cual no se observa en ninguna de las tres estructuras cristalográficas de estado R de *ZmPEPC-C4* reportadas; 2) en el asa Ser125-Ile144, parte de la cual no se observa en ninguna de estas estructuras en estado R; 3) en el asa Asn755-Arg773 que forma la tapa del sitio activo, la que se observa completa en la estructura 5VYJ pero está desordenada en los residuos Lys762/Arg763/Arg764 en las estructuras 1JQO y 6MGI; y 4) en el asa Pro915-Glu932, la cual se observó completa sólo en la subunidad A de la estructura 6MGI. En la subunidad B de la unidad asimétrica de 6MGI y en cada subunidad de las unidades asimétricas de 1JQO y 5VYJ, el segmento corto no observado del asa Pro915-Glu932 incluye Lys934 (Figura 25C, Apéndices IV y V). Una combinación de cortes en los sitios sensibles a la tripsina predichos en estas asas, más los ubicados en las regiones flexibles sin densidad electrónica en las estructuras cristalográficas, podría explicar los fragmentos de digestión observados en los diferentes complejos enzimáticos, como se muestra en la Tabla 2. Curiosamente, se ha reportado que la incubación de la enzima *EcPEPC* libre con tripsina produjo un corte en Arg703 (Kai *et al.*, 1999), que es el residuo de arginina equivalente a Arg763 de *ZmPEPC-C4* predicho por nosotros como un sitio de corte muy posible en la enzima del maíz.

Tabla 3. Masas moleculares de los posibles péptidos obtenidos tras la digestión triptica de *ZmPEPC-C4*. Los sitios de corte por tripsina se predijeron de acuerdo con los criterios establecidos en el texto. Las masas moleculares se estimaron utilizando la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Sólo los péptidos de alta masa molecular (M_r) se incluyen en este análisis. La enzima recombinante intacta tiene 971 residuos más un residuo de alanina como resultado de la subclonación, por lo que su M_r es de 109,296 Da.

Péptido posible	Número de residuos	M_r (Da)
K27-K940	912	103,267
K27-K934	907	102,857
K27-K918	891	101,075
K27-R878	851	96,385
K27-R807	780	88,116
K27-R764	737	83,306
K125-K940	814	92,447
K125-K934	808	91,882
K125-K918	792	90,100
K125-K878	753	85,565
K125-K807	682	77,297
K125-R764	639	72,487
K203-K940	736	83,850
K203-K918	714	81,502
K203-K878	675	76,968
K203-K807	604	68,699
K203-R764	561	63,889

Nuestros hallazgos de distintos patrones de fragmentación por tripsina de la enzima libre y de los diferentes complejos de la enzima con sus ligandos sugieren que la conformación de las asas flexibles situadas en la superficie de la proteína y mencionadas anteriormente, las que, como se dijo antes, no están directamente involucradas en la unión del sustrato PEP o de los efectores alostéricos, es muy sensible a la unión de los diferentes ligandos. Además, estas asas superficiales flexibles podrían jugar papeles esenciales en la catálisis o regulación alostérica de la isoenzima *ZmPEPC-C4* y, presumiblemente, de las enzimas PEPC de plantas en general. La región N-terminal antes de la hélice $\alpha 1$ y las asas mencionadas anteriormente también podrían jugar un papel importante en las enzimas PEPC bacterianas. Sin embargo, en las enzimas bacterianas algunas de estas asas son más cortas que en las enzimas de plantas, como se puede ver en las estructuras cristalográficas reportadas de la *EcPEPC* (códigos PDB 1FIY, 1QB4 y 1JQN; Kai *et al.*, 1999;

Matsumura *et al.*, 1999; Matsumura *et al.*, 2002), una enzima en la que también se han observado múltiples estados conformacionales en solución (Yoshinaga *et al.*, 1976; Kameshita *et al.*, 1979; Izui, 1970; Izui, 1973; Teraoka *et al.*, 1974). El asa completa de la tapa del sitio activo, a la que pertenecen Lys762/Arg763/Arg764 (numeración de *ZmPEPC-C₄*), también está presente en las enzimas bacterianas, y su secuencia de aminoácidos está muy conservada en las PEPC bacterianas y de plantas, lo que respalda el que estos residuos juegan un papel crítico en la función de estas PEPC en general.

Se han documentado diferentes conformaciones en varias proteínas alostéricas, particularmente en la hemoglobina, donde se han propuesto estados conformacionales energéticamente próximos con diferentes estructuras terciarias para explicar las propiedades de unión de esta proteína (Viappiani *et al.*, 2004; Eaton *et al.*, 2007; Shibayam *et al.*, 2011; Shibayama, 2020). Otras enzimas alostéricas también pueden presentar diferentes estados R, como la glucosamina-6-fosfato desaminasa de *E. coli*, cuyos diferentes estados R se demostraron mediante espectroscopia de fluorescencia (Bustos-Jaimes, *et al.*, 2005). Con respecto a las enzimas PEPC, la gran flexibilidad conformacional que da lugar a la multiplicidad de estados conformacionales inducidos por ligando o estabilizados por ligando parece ser una característica general de estas enzimas y no solo de la *EcPEPC* reportada previamente.

VII. CONCLUSIONES

- 1- La enzima *ZmPEPC-C₄* sobreexpresada con la doble etiqueta de tiorredoxina y 6His en su extremo amino terminal permite obtener una proteína no truncada en la región N-terminal. La eliminación por proteólisis específica de la doble etiqueta produce una enzima que cinéticamente es igual a la no-truncada purificada a partir de hojas de la planta en presencia de inhibidores de proteasas.
- 2- Los experimentos de unión al equilibrio seguida por fluorescencia extrínseca fueron útiles para detectar las transiciones alostéricas entre los estados T_0 , o R_0 si es que este es el estado más abundante al pH al que se hicieron los experimentos, y $T_{\text{inhibidor}}$ y entre T_0 , o R_0 , y R_{PEP} , pero no permitieron detectar las transiciones entre T_0 , o R_0 , y $R_{\text{activador}}$.
- 3- Los cambios observados en los espectros de CD obtenidos en el UV cercano apoyaron que la *ZmPEPC-C₄* posee diferentes conformaciones cuando está libre o unida a sus ligandos, no solo cuando tiene unido al inhibidor malato, sino también cuando está unida a su sustrato o a alguno de sus dos tipos de activadores, pudiéndose distinguir con esta técnica diferencias entre complejos con el sustrato y con cada uno de los activadores.
- 4- Las diferencias en los patrones de fragmentación obtenidos en los experimentos de proteólisis limitada de la enzima libre y los complejos de la enzima con sus ligandos, tanto los obtenidos en los primeros minutos de incubación como en tiempos más largos, aportaron evidencia adicional de la existencia de diferentes estados conformacionales de la *ZmPEPC-C₄* en solución.
- 5- Todos los complejos enzimáticos que permanecieron activos durante la incubación con tripsina fueron igualmente sensibles a la activación por G6P y Gly, al igual que la enzima no incubada con tripsina. Pero los complejos con PEP y Gl6P mostraron una pérdida de sensibilidad a malato desde los primeros minutos, lo que sugiere que el fragmento de la región N-terminal de la proteína en estos complejos está muy expuesto y se elimina durante la digestión.
- 6- Los análisis de los valores de ASA y c_x de los residuos Lys o Arg en las estructuras cristalinas de *ZmPEPC-C₄* en estado R reportadas a la fecha, con códigos PDB 1JQO, 5VYJ y 6MGI, sugieren que los posibles sitios de corte por tripsina están en la región amino terminal y en regiones o asas muy flexibles y expuestas al solvente.

- 7- El mapeo de estos posibles sitios de corte por tripsina en la estructura tridimensional de la *ZmPEPC-C₄*, obtenida por cristalografía y difracción con Rayos X, mostró que éstos se encuentran alejados del sitio activo o de los sitios alostéricos, por lo que las diferencias entre los complejos de la enzima en cuanto a su susceptibilidad a la digestión no se deben a la protección directa del sitio de corte por el ligando unido a la enzima.
- 8- Los hallazgos de los distintos patrones de fragmentación por tripsina de la enzima libre y sus complejos, sugieren que la conformación de las asas flexibles que se encuentran en la superficie de la proteína, no están directamente involucradas en la unión del sustrato PEP y efectores alostéricos, pero si son sensibles a su unión y desempeñan papeles esenciales en la catálisis o la regulación alostérica
- 9- Estos resultados muestran el potencial de la técnica de digestión limitada con tripsina, que es una técnica sencilla y al alcance de la mayor parte de los laboratorios de bioquímica, para detectar diferentes conformaciones de enzimas PEPC en solución. También ejemplifican como conjuntamente con métodos bioinformáticos de fácil uso permiten obtener información valiosa sobre el funcionamiento de las enzimas. En este trabajo de tesis en particular, señalando la posible participación en la transmisión de la transición alostérica o en la catálisis de asas superficiales que no están directamente involucradas en la unión del sustrato PEP o de los efectores alostéricos, pero que si son sensibles a la unión de estos ligandos.

Como conclusión general, los resultados experimentales e informáticos obtenidos respaldan que *ZmPEPC-C₄* tiene varios estados conformacionales en solución inducidos por la unión de sus ligandos, de acuerdo con los resultados cinéticos previamente reportados, por medio de los cuales la enzima puede ajustar de manera muy fina su actividad a los requerimientos fisiológicos de la hoja y de la planta. Además, estos resultados, aportan nuevas evidencias para un mejor entendimiento de la compleja regulación alostérica de las isoenzimas PEPC-C₄ de plantas, que son objetivos biotecnológicos importantes en los esfuerzos por aumentar los rendimientos de los cultivos de las plantas C₃.

VIII. PERSPECTIVAS

1. Investigar, por medio de los métodos experimentales y bioinformáticas usados en este trabajo de tesis, si:
 - a. la presencia del ión Mg^{2+} conjuntamente con el sustrato PEP induce un estado conformacional de la *ZmPEPC-C₄* diferente al observado en el complejo enzima-PEP, debido a que se sabe que el sustrato preferido de esta enzima es el complejo PEP-Mg (Rodríguez-Sotres y Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez *et al.*, 1998).
 - b. *ZmPEPC-C₄* adquiere estados conformacionales diferentes cuando tiene unido más de un ligando. Concretamente, el sustrato PEP más cada uno de los dos tipos de activadores, o PEP con los dos tipos de activadores. O incluso, de G6P con malato, un complejo que de existir podría explicar la ineficiencia de G6P para revertir la inhibición por malato. No esperaríamos que se pudieran formar los complejos enzima-PEP-malato o enzima PEP-Gly, pero debería comprobarse esto experimentalmente.
 - c. el pH de la solución en la que esté la enzima libre afecta su estado conformacional, favoreciendo el estado T_0 o R_0 .

IX. REFERENCIAS

- Abramowitz, N., Schechter, I., and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. II. Carboxypeptidase-A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 862-867. DOI: [10.1016/0006-291X\(67\)90299-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(67)90299-9)
- Andreo, C.S., González, D.H., and Iglesias, A.A. (1987) Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase: Structure and regulation. *FEBS Lett.* 213, 1-8. DOI: [10.1016/0014-5793\(87\)81454-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81454-0)
- Bakrim, N., Prioul, J.L., Deleens, E., Rocher, J.P., Arrio-Dupont, M., Vidal, J., Gadal, P., and 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. DOI: [10.1104/pp.101.3.891](https://doi.org/10.1104/pp.101.3.891)
- Bandarian, V., Poehner, W. J. and Grover S.D. (1992) Metabolite activation of crassulacean acid metabolism and C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 100, 1411-1416. DOI: [10.1104/pp.100.3.1411](https://doi.org/10.1104/pp.100.3.1411)
- Bikadi, Z. and Hazai, E. (2009) Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. *J. Cheminform.* 15, 1-16. DOI: [10.1186/1758-2946-1-15](https://doi.org/10.1186/1758-2946-1-15)
- Brand, L., Gohlke, J., and Rao, D. (1967) Evidence for binding of rose bengal and anilino-naphthalenesulfonates at the active site regions of liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 6, 3510-3518. DOI: [10.1021/bi00863a024](https://doi.org/10.1021/bi00863a024)
- Bustos-Jaimes, I., Ramírez-Costa, M., De Anda-Aguilar, L., Hinojosa-Ocaña, P., and Calcagno, M.L. (2005) Evidence for two different mechanisms triggering the change in quaternary structure of the allosteric enzyme, Glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochemistry* 44, 1127-1135. DOI: [10.1021/bi048514o](https://doi.org/10.1021/bi048514o)
- Chollet, R., Vidal, J., and O'Leary, M.H. (1996) Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 273-298. DOI: [10.1146/annurev.arplant.47.1.273](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.273)
- Crétin, C., Santi, S., Keryer, E., Lepiniec, L., Tagu, D., Vidal, J., and Gadal, P. (1991) The phosphoenolpyruvate carboxylase gene family of *Sorghum*: promoter structures, amino acid sequences and expression of genes. *Gene.* 99, 87-94. DOI: [10.1016/0378-1119\(91\)90037-C](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90037-C)

- Connell, M.B., Lee, M.J.Y., Li, J., Plaxton W.C., and Jiao, Z. (2018) Structural and biochemical characterization of citrate binding to AtPPC3, a plant-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Struct. Biol.* 204, 507-512. DOI: [10.1016/j.jsb.2018.11.003](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.11.003)
- De Magalhães, C.S., Almeida, D.M., Barbosa, H.J.C., and Dardenne, L.E. (2014) A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking of highly flexible ligands. *Inf. Sci.* 289, 206-224. DOI: [10.1016/j.ins.2014.08.002](https://doi.org/10.1016/j.ins.2014.08.002)
- Dodd, G.H. and Radda, G.K. (1969) 1-Anilidonaphthalene-8-sulphonate, a fluorescent conformational probe for glutamate dehydrogenase. *Biochem. J.* 114, 407-417. DOI: [10.1042/bj1140407](https://doi.org/10.1042/bj1140407)
- Doncaster, H.D. and Leegood, R.C. (1987) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity in maize leaves. *Plant Physiol.* 84, 82-87. DOI: [10.1104/pp.84.1.82](https://doi.org/10.1104/pp.84.1.82)
- Eaton, W.A., Henry, E.R., Hofrichter, J., Bettati, S., Viappiani, C., and Mozzarelli, A. (2007) Evolution of allosteric models for hemoglobin. *IUBMB Life* 59, 586-599. DOI: [10.1080/15216540701272380](https://doi.org/10.1080/15216540701272380)
- Frank, J., Vater, J., and Holzwarth, J.F. (1999) Kinetics and equilibrium binding of phosphoenolpyruvate to phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1, 455-461. DOI: [10.1039/A808087I](https://doi.org/10.1039/A808087I)
- Frank, J., Clarke, R.J., Vater, J., and Holzwarth, J.F. (2001) Influence of allosteric effectors on the kinetics and equilibrium binding of phosphoenolpyruvate (PEP) to phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) from *Zea mays*. *Biophys. Chem.* 30, 53-64. DOI: [10.1016/S0301-4622\(01\)00185-5](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(01)00185-5)
- Freifelder, D. (1982) *Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed. W.H. Freeman, New York. ISBN 978-0716714446
- Fontana, A., De-Laureto, P.P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P., and Zambonin, M. (2004) Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim. Pol.* 51, 299-321.
- Frishman, D. and Argos, P. (1995) Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* 23, 566-579. DOI: [10.1002/prot.340230412](https://doi.org/10.1002/prot.340230412)
- Fujita, N., Miwa, T., Ishijima, S., Izui, K., and Katzuki, H. (1984) 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. DOI: [10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134718](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134718)
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, 3784-3788. DOI: [10.1093/nar/gkg563](https://doi.org/10.1093/nar/gkg563)
- Gillinta, J. and Grover, S.D. (1995) Kinetic interactions of glycine with substrates and effectors of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Photosynth. Res.* 45, 121-126. DOI: [10.1007/BF00032583](https://doi.org/10.1007/BF00032583)
- González, D.H., Iglesias, A.A., and Andreo, C.S. (1984) On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity from maize leaves by L-malate. Effect of pH, *J. Plant Physiol.* 116, 425-434. DOI: [10.1016/S0176-1617\(84\)80134-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(84)80134-0)
- Gonzalez, DH., Iglesias, AA. And Andreo, C. S. (1987) Interaction of acetyl phosphate and carbamyl phosphate with plant phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem J.* 241, 543-548. DOI: [10.1042/bj2410543](https://doi.org/10.1042/bj2410543)
- Gonzalez, L., Sánchez, S., Home, J., Kanzaki, G., and Grover, S. (2007) Mutational analysis of a proposed glycine binding site in PEP carboxylase. *FASEB J.* 21, 806-3.
- González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., Juárez-Díaz, J.A., Güémez-Toro, R., Martínez-Castilla, L.P., and Muñoz-Clares, R.A. (2018) Identification of the allosteric site for neutral amino acids in the maize C₄ isozyme of phosphoenolpyruvate carboxylase: The critical role of Ser-100. *J. Biol. Chem.* 293, 9445-9957. DOI: [10.1074/jbc.ra118.002884](https://doi.org/10.1074/jbc.ra118.002884)
- Güemez-Toro, R., Mújica-Jiménez, C., and Muñoz-Clares, R. A. (2012) Allosteric regulation of the photosynthetic C₄ isoenzyme of phosphoenolpyruvate carboxylase: A comparative study between enzymes from monocot and eudicots. *J. Mex. Chem. Soc.* 56, 58–66. DOI: [10.29356/jmcs.v56i1.275](https://doi.org/10.29356/jmcs.v56i1.275)
- Hatch, M.D., Osmond, C.B., and Slatyer, R.O. (1971). *Photosynthesis and Photorespiration*. Wiley Interscience, New York. ISBN 978-0471359005
- Hatch, M.D. (1987) C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* 895, 81-106. DOI: [10.1016/S0304-4173\(87\)80009-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4173(87)80009-5)
- Hatch, M.D. (1992) C₄ photosynthesis: An unlikely process full of surprises. *Plant Cell Physiol.* 33, 333-342. DOI: [10.1093/oxfordjournals.pcp.a078260](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078260)

- Huber, S.C. and Edwards, G.E. (1975) Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄ plants by malate and aspartate. *Can. J. Bot.* 53, 1925-1933. DOI: <https://doi.org/10.1139/b75-216>
- Hubbard, S.J. and Argos P. (1994) Cavities and packing at protein interfaces. *Protein Sci.* 3, 2194-2206. DOI: [10.1002/pro.5560031205](https://doi.org/10.1002/pro.5560031205)
- Hubbard, S.J., Beynon, R.J., and Thornton, J.M. (1998) Assessment of conformational parameters as predictors of limited proteolytic sites in native protein structures. *Protein Eng. Des. Sel.* 11, 349–359. DOI: [10.1093/protein/11.5.349](https://doi.org/10.1093/protein/11.5.349)
- Hudspeth, R.L. and Grula, J.W. (1989) Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C₄ photosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 12, 579–589. DOI: [10.1007/BF00036971](https://doi.org/10.1007/BF00036971)
- Izui, K. (1970) Kinetic studies on the allosteric nature of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 68, 227–238. DOI: [10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129350](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129350)
- Izui, K. (1973) Effects of high pressure on the stability and activity of allosteric phosphoenolpyruvate carboxylase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 73, 505-513. DOI: [10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130109](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130109)
- Jenkins, C.L.D., Harris, R.L.N. and McFadden, H.G. (1986) Activation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by the non-physiological substrate analogue methyl-1,2-dihydroxyphosphinoylmethyl-2-propenoate. *Biochem. Int.* 12, 619-625.
- Jiao, J. and Chollet, R. (1991) Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄ and crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* 95, 981-985. DOI: [10.1104/pp.95.4.981](https://doi.org/10.1104/pp.95.4.981)
- Kai, Y., Matsumura, H., Inoue, T., Terada, K., Nagara, Y., Yoshinaga, T., Kihara, A., Tsumura, K., and Izui, K. (1999) Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: A proposed mechanism for allosteric inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 823-828. DOI: [10.1073/pnas.96.3.823](https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.823)
- Kameshita, I., Izui, K., and Katsuki, H. (1979) Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*: Effect of proteolytic modification on the catalytic and regulatory properties. *J. Biochem.* 86, 1-10. DOI: [10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0)
- Keil, B. (1992) Essential substrate residues for action of endopeptidases. In: Specificity of Proteolysis, Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: [10.1007/978-3-642-48380-6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-48380-6)

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. DOI: [10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0)
- Lavergne, D. and Champigny, M.L. (1983) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Penisetum americanum* by adenine nucleotides and energy charge. *Physiol. Veg.* 21, 1021-1029.
- Matsumura, H., Terada, M., Shirakata, S., Inoue, T., Yoshinaga, T., Izui, K., and 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. DOI: [10.1016/S0969-2126\(02\)00913-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00913-9)
- Matsumura, H., Xie, Y., Shirakata, S., Inoue, T., Yoshinaga, T., Ueno, Y., Izui, K., and Kai, Y. (2002) Crystal structures of C₄ form maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylases. *Structure* 10, 1721-1730. DOI: [10.1016 / s0969-2126 \(02\) 00913-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(02)00913-9)
- Matsuoka, M. and Minami, E. (1989) Complete structure of the gene for phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Eur. J. Biochem.* 181, 593-598. DOI: [10.1111/j.1432-1033.1989.tb14765.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14765.x)
- Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J. (1965) On the nature of allosteric transitions. A plausible model, *J. Mol. Biol.* 12, 88-118. DOI: [10.1016/S0022-2836\(65\)80285-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80285-6)
- Mújica-Jiménez, C., Castellanos-Martínez, A., and Muñoz-Clares, R.A. (1998) Studies of the allosteric properties of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase with the phosphoenolpyruvate analog phosphomycin as activator. *Biochim. Biophys. Acta* 1386, 132-144. DOI: [10.1016/S0167-4838\(98\)00093-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00093-4)
- Mukerji, S.K. (1977) Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. The effect of divalent cations on activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 182, 352-359. DOI: [10.1016/0003-9861\(77\)90316-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90316-2)
- Muñoz-Clares, R. A., González-Segura, L., Andrés Juárez-Díaz, J., and Mújica-Jiménez, C. (2020) Structural and biochemical evidence of the glucose 6-phosphate-allosteric site of maize C₄-phosphoenolpyruvate carboxylase: its importance in the overall enzyme kinetics. *Biochem. J.* 477, 2095-2114. DOI: [10.1042/BCJ20200304](https://doi.org/10.1042/BCJ20200304)
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2005) *Lehninger: Principles of Biochemistry*. WH Freeman and Company, New York
- Nishikido, T. and Takanashi, H. (1973) Glycine activation of PEP carboxylase from

- monocotyledonous C₄ plants, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 126-133. DOI: [10.1016/0006-291X\(73\)91410-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)91410-1)
- O'Leary, M.H. (1982) Phosphoenolpyruvate carboxylase: An enzymologist's view. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 297-315. DOI: [10.1146/annurev.pp.33.060182.001501](https://doi.org/10.1146/annurev.pp.33.060182.001501)
- Olsen, J.V., Ong, S.E., and Mann, M. (2004) Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell Proteomics* 3, 608-614. DOI: [10.1074/mcp.T400003-MCP200](https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200)
- Paulus, J., Schlieper, D., and Groth, G. (2013) Greater efficiency of photosynthetic carbon fixation due to single amino-acid substitution. *Nat. Commun.* 4, 1518. DOI: [10.1038/ncomms2504](https://doi.org/10.1038/ncomms2504)
- Peliska, J.M. and O'Leary, M.H. (1989) Sulfuryl transfer catalyzed by pyruvate kinase. *Biochemistry* 28, 1604-1611.
- Pintar, A., Carugo, O., and Pongor, S. (2002) CX, an algorithm that identifies protruding atoms in proteins. *Bioinformatics* 18, 980–984. DOI: [10.1093/bioinformatics/18.7.980](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.7.980)
- Rodríguez-Sotres, R. and Muñoz-Clares, R.A. (1990) Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch. Biochem Biophys.* 276, 180-190. DOI: [10.1016/0003-9861\(90\)90025-T](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90025-T)
- Rodríguez, J., Gupta, N., Smith, R.D., and Pevzner, P.A. (2008) Does trypsin cut before proline? *J. Proteome Res.* 7, 300-305. DOI: [10.1021/pr0705035](https://doi.org/10.1021/pr0705035)
- Rustin, P., Meyer, C.R. and Wedding, R.T. (1988) Identification of substrate and effector binding site of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*. A possible role of phosphoenolpyruvate as substrate and activator. *J. Biol. Chem.* 263, 17611–17614
- Schlieper, D., Förster, K., Paulus, J.K., and Groth, G. (2014) Resolving the activation site of positive regulators in plant phosphoenolpyruvate carboxylase. *Mol. Plant* 7, 437-440. DOI: [10.1093/mp/sst130](https://doi.org/10.1093/mp/sst130)
- Selinioti, E., Karabourniotis, G., Manetas, Y. and Gavalas, N.A. (1985) Modulation of phosphoenolpyruvate carboxylase by 3-phosphoglycerate: Probable physiological significance for C₄-photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 121, 353-360. DOI: [10.1016/S0176-1617\(85\)80028-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(85)80028-6)
- Shibayama, N., Sugiyama, K., and Park, S.Y. (2011) Structures and oxygen affinities of crystalline human hemoglobin C ($\beta 6$ Glu->Lys) in the R and R2 quaternary structures. *J. Biol. Chem.* 286, 33661–33668. DOI: [10.1074/jbc.M111.266056](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.266056)

- Shibayama, N. (2020) Allosteric transitions in hemoglobin revisited. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1864, 129335. DOI: [10.1016/j.bbagen.2019.03.021](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.03.021)
- Šlechtová, T., Gilar, M., Kalíková, K., and Tesařová, E. (2015) Insight into trypsin miscleavage: Comparison of kinetic constants of problematic peptide sequences. *Anal. Chem.* 87, 7636–764. DOI: [10.1021/acs.analchem.5b00866](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00866)
- Stiborová, M., Leblová, S. (1985) Activation of maize (*Zea mays L.*) phosphoenolpyruvate carboxylase by glucose-6-phosphate and glycine: Effect of pH and Mg²⁺. *Photosynthetica* 19, 177-182.
- Takahashi-Terada, A., Kotera, M., Ohshima, K., Furumoto, T., Matsumura, H., Kai, Y., and Izui, K. (2005) Maize phosphoenolpyruvate carboxylase. Mutations at the putative binding site for glucose 6-phosphate caused desensitization and abolished responsiveness to regulatory phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 280, 11798 –11806. DOI: [10.1074/jbc.M408768200](https://doi.org/10.1074/jbc.M408768200)
- Teraoka, H., Izui, K., and Katsuki, H. (1974) Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Multiple conformational states elicited by allosteric effectors. *Biochemistry* 13, 5121–5128. DOI: [10.1021/bi00722a011](https://doi.org/10.1021/bi00722a011)
- Toh, H., Kawamura, T., and Izui, K. (1994) Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Cell Environ.* 17, 31-43. DOI: [10.1111/j.1365-3040.1994.tb00263.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1994.tb00263.x)
- Tovar-Méndez, A., Yampara-Iquise, H., Mújica-Jiménez, C., and Muñoz-Clares, R.A. (1995) Binding of ligands to the glucose-6-phosphate allosteric site in maize-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. In P Mathis ed., *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, vol 5 pp. 155-158. Kluwer, Dordrecht. ISBN 978-0-7923-3862-8
- Tovar-Méndez, A., Rodríguez-Sotres, R., López-Valentín, D.M., and Muñoz-Clares, R.A. (1998) Re-examination of the roles of PEP and Mg²⁺ in the reaction catalyzed 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. DOI: [10.1042/bj3320633](https://doi.org/10.1042/bj3320633)
- Tovar-Méndez, A., Mújica-Jiménez C., and Muñoz-Clares, R.A. (2000) Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 123, 149-160. DOI: [10.1104/pp.123.1.149](https://doi.org/10.1104/pp.123.1.149)

- Tovar-Mendez, A. and Muñoz-Clares, R. (2001) Kinetics of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays* leaves at high concentration of substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1546, 242-252. DOI: [10.1016/S0167-4838\(01\)00148-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00148-0)
- Uedan, K, and Sugiyama, T. (1976) Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiol.* 57, 906-910.
- Viappiani, C., Bettati, S., Bruno, S., Ronda, L., Abbruzzetti, S., Mozzarelli, A., and Eaton, W.A. (2004) New insights into allosteric mechanisms from trapping unstable protein conformations in silica gels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 14414–14419. DOI: [10.1073/pnas.0405987101](https://doi.org/10.1073/pnas.0405987101)
- Wang, Y.H., Duff, M.G., Lepiniec, L., Crétin, C., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, J., Gadai, P., and Chollet, R. (1992) Site-directed mutagenesis of the phosphorylatable serine (Ser8) in C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum. The effect of negative charge at position 8. *J. Biol. Chem.* 267, 16759-16762. DOI: [10.1016/S0021-9258\(18\)41844-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41844-3)
- Wedding, R.T., Black M.K., and Meyer C.R (1989) Activation of higher plant phosphoenolpyruvate carboxylases by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 90: 648-652. 652. DOI: [10.1104/pp.90.2.648](https://doi.org/10.1104/pp.90.2.648)
- Wong, K.F. and Davies, D.D. (1973) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Zea mays* by metabolites. *Biochem. J.* 131, 451-458. DOI: [10.1042/bj1310451](https://doi.org/10.1042/bj1310451)
- Yanagisawa, S., Izui, K., Yamaguchi, Y., Shigesada, K., and Katsuki, H. (1988) Further analysis of cDNA clones for maize phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C₄ photosynthesis. Nucleotide sequence of entire open reading frame and evidence for polyadenylation of mRNA at multiple sites in vivo. *FEBS Lett.* 229, 107-110. DOI: [10.1016/0014-5793\(88\)80807-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80807-X)
- Yanagisawa, S. and Izui, K. (1990) Production of active phosphoenolpyruvate carboxylase of *Zea mays* in *Escherichia coli* encoded by a full-length cDNA. *Agric. Biol. Chem.* 54, 241-243. DOI: [10.1080/00021369.1990.10869899](https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10869899)
- Yano, M. and Izui, K. (1997) The replacement of Lys620 by serine desensitizes *Escherichia Coli* phosphoenolpyruvate carboxylase to the effects of the feedback inhibitors L-aspartate and L-malate. *Eur. J. Biochem.* 247, 74 – 81. DOI: [10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00074.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00074.x)
- Yoshinaga, T. (1976) Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*: Studies on multiple conformational states elicited by allosteric effectors with fluorescence probe, 1-

anilinonaphthalene-8-sulfonate. *Biochim. Biophys. Acta* 452 566-579. DOI: 10.1016/0005-2744(76)90208-4

Yasushi, Kai., Matsumura, H., Inoue, T., Terada, K., Nagara, Y., Yoshinaga, T, Kihara, A., Tsumura, K., and Izui, K. (1999) Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: A proposed mechanism for allosteric inhibition *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 823–828: DOI: [10.1073/pnas.96.3.823](https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.823)

Yuan, J., Sayegh, J., Mendez, J., Sward, L., Sanchez, N., Sanchez, S., Waldrop, G., and Grover, S. (2006) The regulatory role of residues 226-232 in phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Photosynth. Res.* 88, 73-81. DOI: [10.1007/s11120-005-9032-x](https://doi.org/10.1007/s11120-005-9032-x)

X. APÉNDICES

Apéndice I

Alineamiento de secuencias de nucleótidos del gen ppc-C₄ reportadas en el Genbank. En color gris se muestran las mutaciones silenciosas y en rojo las que originan un cambio en un residuo de aminoácido.

AJ536629.1	ATGGCGTCGACCAAGGCA ¹ CCCGGCC ¹ GGCGAGAAGCACCCTCCATCGACGCGCAGCTCCGTACAGTGGTCCCAGGCAAGGTCTCCGAG	90
X15642.1	ATGGCGTCGACCAAGGCA ¹ CCCGGCC ¹ GGCGAGAAGCACCCTCCATCGACGCGCAGCTCCGTACAGTGGTCCCAGGCAAGGTCTCCGAG	90
X15239.1	ATGGCGTCGACCAAGGCT ¹ CCCGGCC ¹ GGCGAGAAGCACCCTCCATCGACGCGCAGCTCCGTACAGTGGTCCCAGGCAAGGTCTCCGAG	90
X15238.1	ATGGCGTCGACCAAGGCT ¹ CCCGGCC ¹ GGCGAGAAGCACCCTCCATCGACGCGCAGCTCCGTACAGTGGTCCCAGGCAAGGTCTCCGAG	90

AJ536629.1	GACGACAAGCTCATCGAGTACGATGCGCTGCTCGTACGACCGCTTCTCAACATCCTCCAGGACCTCCACGGGCCAGCCTTCGCGAATTT	180
X15642.1	GACGACAAGCTCATCGAGTACGATGCGCTGCTCGTACGACCGCTTCTCAACATCCTCCAGGACCTCCACGGGCCAGCCTTCGCGAATTT	180
X15239.1	GACGACAAGCTCATCGAGTACGATGCGCTGCTCGTACGACCGCTTCTCAACATCCTCCAGGACCTCCACGGGCCAGCCTTCGCGAATTT	180
X15238.1	GACGACAAGCTCATCGAGTACGATGCGCTGCTCGTACGACCGCTTCTCAACATCCTCCAGGACCTCCACGGGCCAGCCTTCGCGAATTT	180

AJ536629.1	GTCAGGAGTGTACGAGGTG ¹ TCGGCCGACTAT ¹ GAGGGCAAAGGAGACACGACGAAGCTGGGCGAGCTCGGCGCCAAGCTCACGGGGCTG	270
X15642.1	GTCAGGAGTGTACGAGGTG ¹ TCGGCCGACTAT ¹ GAGGGCAAAGGAGACACGACGAAGCTGGGCGAGCTCGGCGCCAAGCTCACGGGGCTG	270
X15239.1	GTCAGGAGTGTACGAGGTG ¹ TCGGCCGACTAT ¹ GAGGGCAAAGGAGACACGACGAAGCTGGGCGAGCTCGGCGCCAAGCTCACGGGGCTG	270
X15238.1	GTCAGGAGTGTACGAGGTG ¹ TCGGCCGACTAT ¹ GAGGGCAAAGGAGACACGACGAAGCTGGGCGAGCTCGGCGCCAAGCTCACGGGGCTG	270

AJ536629.1	GCCCCCGCGACGCCATCCTCGTGGCGAGCTCCATCCTGCACATGCTCAACCTCGCCAACCTGGCCGAGGAGGTGCAGATCGCGCACCGC	360
X15642.1	GCCCCCGCGACGCCATCCTCGTGGCGAGCTCCATCCTGCACATGCTCAACCTCGCCAACCTGGCCGAGGAGGTGCAGATCGCGCACCGC	360
X15239.1	GCCCCCGCGACGCCATCCTCGTGGCGAGCTCCATCCTGCACATGCTCAACCTCGCCAACCTGGCCGAGGAGGTGCAGATCGCGCACCGC	360
X15238.1	GCCCCCGCGACGCCATCCTCGTGGCGAGCTCCATCCTGCACATGCTCAACCTCGCCAACCTGGCCGAGGAGGTGCAGATCGCGCACCGC	360

AJ536629.1	CGCCGCAACAGCAAGCTCAAGAAAGGTGGGTTCGCCGACGAGGGCTCCGCCACCACCGAGTCCGACATCGAGGAGACGCTCAAGCGCCTC	450
X15642.1	CGCCGCAACAGCAAGCTCAAGAAAGGTGGGTTCGCCGACGAGGGCTCCGCCACCACCGAGTCCGACATCGAGGAGACGCTCAAGCGCCTC	450
X15239.1	CGCCGCAACAGCAAGCTCAAGAAAGGTGGGTTCGCCGACGAGGGCTCCGCCACCACCGAGTCCGACATCGAGGAGACGCTCAAGCGCCTC	450
X15238.1	CGCCGCAACAGCAAGCTCAAGAAAGGTGGGTTCGCCGACGAGGGCTCCGCCACCACCGAGTCCGACATCGAGGAGACGCTCAAGCGCCTC	450

AJ536629.1	GTGTCCGAGGTTCGGCAAGTCCCCGAGGAGGTGTTTCGAGGCGCTCAAGAACCAGACCGTTCGACCTCGTCTTCCACCGCGCATCC ¹ ACGCAG	540
X15642.1	GTGTCCGAGGTTCGGCAAGTCCCCGAGGAGGTGTTTCGAGGCGCTCAAGAACCAGACCGTTCGACCTCGTCTTCCACCGCGCATCC ¹ ACGCAG	540
X15239.1	GTGTCCGAGGTTCGGCAAGTCCCCGAGGAGGTGTTTCGAGGCGCTCAAGAACCAGACCGTTCGACCTCGTCTTCCACCGCGCATCC ¹ ACGCAG	540
X15238.1	GTGTCCGAGGTTCGGCAAGTCCCCGAGGAGGTGTTTCGAGGCGCTCAAGAACCAGACCGTTCGACCTCGTCTTCCACCGCGCATCC ¹ ACGCAG	540

AJ536629.1	TCCGCCCGCGCTCGCTCCTGCAGAAAAAGCCAGGATCCGAAATTGTCTGACCCAGCTGAATGCCAAGGACATCACTGACGACGACAAG	630
X15642.1	TCCGCCCGCGCTCGCTCCTGCAGAAAAAGCCAGGATCCGAAATTGTCTGACCCAGCTGAATGCCAAGGACATCACTGACGACGACAAG	630
X15239.1	TCCGCCCGCGCTCGCTCCTGCAGAAAAAGCCAGGATCCGAAATTGTCTGACCCAGCTGAATGCCAAGGACATCACTGACGACGACAAG	630
X15238.1	TCCGCCCGCGCTCGCTCCTGCAGAAAAAGCCAGGATCCGAAATTGTCTGACCCAGCTGAATGCCAAGGACATCACTGACGACGACAAG	630

AJ536629.1	CAGGAGCTCGATGAGGCTCTGCAGAGAGAGATCCAAGCAGCCTTCAGAACCAGTGAATCAGGAGGGCACAACCACCCC ¹ CAGGACGAA	720
X15642.1	CAGGAGCTCGATGAGGCTCTGCAGAGAGAGATCCAAGCAGCCTTCAGAACCAGTGAATCAGGAGGGCACAACCACCCC ¹ CAGGACGAA	720
X15239.1	CAGGAGCTCGATGAGGCTCTGCAGAGAGAGATCCAAGCAGCCTTCAGAACCAGTGAATCAGGAGGGCACAACCACCCC ¹ CAGGACGAA	720
X15238.1	CAGGAGCTCGATGAGGCTCTGCAGAGAGAGATCCAAGCAGCCTTCAGAACCAGTGAATCAGGAGGGCACAACCACCCC ¹ CAGGACGAA	720

AJ536629.1	ATGCGCTATGGGATGAGCTACATCCATGAGACTGTATGGAAGGG ¹ GTGCC ¹ TAAGTTCTTTCGCGCGTGTGGATACAGCCCTGAAGAATATC	810
X15642.1	ATGCGCTATGGGATGAGCTACATCCATGAGACTGTATGGAAGGG ¹ GTGCC ¹ TAAGTTCTTTCGCGCGTGTGGATACAGCCCTGAAGAATATC	810
X15239.1	ATGCGCTATGGGATGAGCTACATCCATGAGACTGTATGGAAGGG ¹ GTGCC ¹ TAAGTTCTTTCGCGCGTGTGGATACAGCCCTGAAGAATATC	810
X15238.1	ATGCGCTATGGGATGAGCTACATCCATGAGACTGTATGGAAGGG ¹ GTGCC ¹ TAAGTTCTTTCGCGCGTGTGGATACAGCCCTGAAGAATATC	810

AJ536629.1	GGCATCAATGAGCGCCTCCCTACAATGTTTCTCTCATTTCGTTCTTCTTTCGATGGGTGGTGACCGCGATGGAAATCCAAGAGTTACC	900
X15642.1	GGCATCAATGAGCGCCTCCCTACAATGTTTCTCTCATTTCGTTCTTCTTTCGATGGGTGGTGACCGCGATGGAAATCCAAGAGTTACC	900
X15239.1	GGCATCAATGAGCGCCTCCCTACAATGTTTCTCTCATTTCGTTCTTCTTTCGATGGGTGGTGACCGCGATGGAAATCCAAGAGTTACC	900
X15238.1	GGCATCAATGAGCGCCTCCCTACAATGTTTCTCTCATTTCGTTCTTCTTTCGATGGGTGGTGACCGCGATGGAAATCCAAGAGTTACC	900

AJ536629.1	CCGGAGGTGACAAGAGATGTATGCTTGTGCGCCAGAATGATGGTGC ¹ AACTTGTACATCGATCAGATTGAAGAGCTGATGTTTGTAGCTC	990
X15642.1	CCGGAGGTGACAAGAGATGTATGCTTGTGCGCCAGAATGATGGTGC ¹ AACTTGTACATCGATCAGATTGAAGAGCTGATGTTTGTAGCTC	990
X15239.1	CCGGAGGTGACAAGAGATGTATGCTTGTGCGCCAGAATGATGGTGC ¹ AACTTGTACATCGATCAGATTGAAGAGCTGATGTTTGTAGCTC	990
X15238.1	CCGGAGGTGACAAGAGATGTATGCTTGTGCGCCAGAATGATGGTGC ¹ AACTTGTACATCGATCAGATTGAAGAGCTGATGTTTGTAGCTC	990

Continúa en la siguiente página...

Continuación...

AJ536629.1	TCTATGTGGCGCTGCAACGATGAGCTTCGTGTTTCGTGCCGAAGAGCTCCACAGTTCGTCTGGTTCCAAAGTTACCAAGTATTACATAGAA	1080
X15642.1	TCTATGTGGCGCTGCAACGATGAGCTTCGTGTTTCGTGCCGAAGAGCTCCACAGTTCGTCTGGTTCCAAAGTTACCAAGTATTACATAGAA	1080
X15239.1	TCTATGTGGCGCTGCAACGATGAGCTTCGTGTTTCGTGCCGAAGAGCTCCACAGTTCGTCTGGTTCCAAAGTTACCAAGTATTACATAGAA	1080
X15238.1	TCTATGTGGCGCTGCAACGATGAGCTTCGTGTTTCGTGCCGAAGAGCTCCACAGTTCGTCTGGTTCCAAAGTTACCAAGTATTACATAGAA	1080

AJ536629.1	TTCTGGAAGCAAATTCCTCCAAACGAGCCCTACCGGGTGATACTAGGCCATGTAAGGGACAAGCTGTACAACACACGCGAGCGTGTCTCGC	1170
X15642.1	TTCTGGAAGCAAATTCCTCCAAACGAGCCCTACCGGGTGATACTAGGCCATGTAAGGGACAAGCTGTACAACACACGCGAGCGTGTCTCGC	1170
X15239.1	TTCTGGAAGCAAATTCCTCCAAACGAGCCCTACCGGGTGATACTAGGCCATGTAAGGGACAAGCTGTACAACACACGCGAGCGTGTCTCGC	1170
X15238.1	TTCTGGAAGCAAATTCCTCCAAACGAGCCCTACCGGGTGATACTAGGCCATGTAAGGGACAAGCTGTACAACACACGCGAGCGTGTCTCGC	1170

AJ536629.1	CATCTGCTGGCTTCTGGAGTTTCTGAAATTTTCAGCGGAATCGTCATTTACCAGTATCGAAGAGTTCCTTGAGCCACTTGAGCTGTGCTAC	1260
X15642.1	CATCTGCTGGCTTCTGGAGTTTCTGAAATTTTCAGCGGAATCGTCATTTACCAGTATCGAAGAGTTCCTTGAGCCACTTGAGCTGTGCTAC	1260
X15239.1	CATCTGCTGGCTTCTGGAGTTTCTGAAATTTTCAGCGGAATCGTCATTTACCAGTATCGAAGAGTTCCTTGAGCCACTTGAGCTGTGCTAC	1260
X15238.1	CATCTGCTGGCTTCTGGAGTTTCTGAAATTTTCAGCGGAATCGTCATTTACCAGTATCGAAGAGTTCCTTGAGCCACTTGAGCTGTGCTAC	1260

AJ536629.1	AAATCACTGTGTGACTGCGGCGACAAGGCCATCGCGGACGGGAGCCTCCTGGACCTCCTGCGCCAGGTTCACAGTTCGGGCTCTCCCTG	1350
X15642.1	AAATCACTGTGTGACTGCGGCGACAAGGCCATCGCGGACGGGAGCCTCCTGGACCTCCTGCGCCAGGTTCACAGTTCGGGCTCTCCCTG	1350
X15239.1	AAATCACTGTGTGACTGCGGCGACAAGGCCATCGCGGACGGGAGCCTCCTGGACCTCCTGCGCCAGGTTCACAGTTCGGGCTCTCCCTG	1350
X15238.1	AAATCACTGTGTGACTGCGGCGACAAGGCCATCGCGGACGGGAGCCTCCTGGACCTCCTGCGCCAGGTTCACAGTTCGGGCTCTCCCTG	1350

AJ536629.1	GTGAAGCTGGACATCCGGCAGGAGTCGGAGCGGCACACCGACGTGATCGACGCCATCACCACGCACCTCGGCATCGGGTCGTACCGCGAG	1440
X15642.1	GTGAAGCTGGACATCCGGCAGGAGTCGGAGCGGCACACCGACGTGATCGACGCCATCACCACGCACCTCGGCATCGGGTCGTACCGCGAG	1440
X15239.1	GTGAAGCTGGACATCCGGCAGGAGTCGGAGCGGCACACCGACGTGATCGACGCCATCACCACGCACCTCGGCATCGGGTCGTACCGCGAG	1440
X15238.1	GTGAAGCTGGACATCCGGCAGGAGTCGGAGCGGCACACCGACGTGATCGACGCCATCACCACGCACCTCGGCATCGGGTCGTACCGCGAG	1440

AJ536629.1	TGGCCGAGGACAAGCGGCAGGAGTGGCTGCTGTCGGAGCTGCGAGGCAAGCGCCGCTGCTGCCCCCGACCTTCCCAGACCGAGGAG	1530
X15642.1	TGGCCGAGGACAAGCGGCAGGAGTGGCTGCTGTCGGAGCTGCGAGGCAAGCGCCGCTGCTGCCCCCGACCTTCCCAGACCGAGGAG	1530
X15239.1	TGGCCGAGGACAAGCGGCAGGAGTGGCTGCTGTCGGAGCTGCGAGGCAAGCGCCGCTGCTGCCCCCGACCTTCCCAGACCGAGGAG	1530
X15238.1	TGGCCGAGGACAAGCGGCAGGAGTGGCTGCTGTCGGAGCTGCGAGGCAAGCGCCGCTGCTGCCCCCGACCTTCCCAGACCGAGGAG	1530
*** ***** **		
AJ536629.1	ATCGCCGACGTCATCGGCGCTTCCACGTCTCCTCGCGGAGCTCCCGCCGACAGCTTCGGCCCTACATCATCTCCATGGCGACGGCCCC	1620
X15642.1	ATCGCCGACGTCATCGGCGCTTCCACGTCTCCTCGCGGAGCTCCCGCCGACAGCTTCGGCCCTACATCATCTCCATGGCGACGGCCCC	1620
X15239.1	ATCGCCGACGTCATCGGCGCTTCCACGTCTCCTCGCGGAGCTCCCGCCGACAGCTTCGGCCCTACATCATCTCCATGGCGACGGCCCC	1620
X15238.1	ATCGCCGACGTCATCGGCGCTTCCACGTCTCCTCGCGGAGCTCCCGCCGACAGCTTCGGCCCTACATCATCTCCATGGCGACGGCCCC	1620

AJ536629.1	TCCGACGTGCTCGCCGTGGAGCTCCTGACAGCGGAGTGCGGCGTGCGCCAGCCGCTGCCCGTGGTGCCGCTGTTGCAAAGGCTGGCCGAC	1710
X15642.1	TCCGACGTGCTCGCCGTGGAGCTCCTGACAGCGGAGTGCGGCGTGCGCCAGCCGCTGCCCGTGGTGCCGCTGTTGCAAAGGCTGGCCGAC	1710
X15239.1	TCCGACGTGCTCGCCGTGGAGCTCCTGACAGCGGAGTGCGGCGTGCGCCAGCCGCTGCCCGTGGTGCCGCTGTTGCAAAGGCTGGCCGAC	1710
X15238.1	TCCGACGTGCTCGCCGTGGAGCTCCTGACAGCGGAGTGCGGCGTGCGCCAGCCGCTGCCCGTGGTGCCGCTGTTGCAAAGGCTGGCCGAC	1710
***** * * ***** *		
AJ536629.1	CTGCAGTCGGCGCCCGCTCCGTGGAGCGCTCTTCTCGGTGGACTGGTACATGGACCGGATCAAGGGCAAGCAGCAGGTCATGGTCCGGC	1800
X15642.1	CTGCAGTCGGCGCCCGCTCCGTGGAGCGCTCTTCTCGGTGGACTGGTACATGGACCGGATCAAGGGCAAGCAGCAGGTCATGGTCCGGC	1800
X15239.1	CTGCAGTCGGCGCCCGCTCCGTGGAGCGCTCTTCTCGGTGGACTGGTACATGGACCGGATCAAGGGCAAGCAGCAGGTCATGGTCCGGC	1800
X15238.1	CTGCAGTCGGCGCCCGCTCCGTGGAGCGCTCTTCTCGGTGGACTGGTACATGGACCGGATCAAGGGCAAGCAGCAGGTCATGGTCCGGC	1800

AJ536629.1	TACTCCGACTCCGGCAAGGACGCGCGCCCTGTCCGCGGCTGGCAGCTGTACAGGGCGCAGGAGGAGATGGCGCAGGTGGCCAAAGCGC	1890
X15642.1	TACTCCGACTCCGGCAAGGACGCGCGCCCTGTCCGCGGCTGGCAGCTGTACAGGGCGCAGGAGGAGATGGCGCAGGTGGCCAAAGCGC	1890
X15239.1	TACTCCGACTCCGGCAAGGACGCGCGCCCTGTCCGCGGCTGGCAGCTGTACAGGGCGCAGGAGGAGATGGCGCAGGTGGCCAAAGCGC	1890
X15238.1	TACTCCGACTCCGGCAAGGACGCGCGCCCTGTCCGCGGCTGGCAGCTGTACAGGGCGCAGGAGGAGATGGCGCAGGTGGCCAAAGCGC	1890

AJ536629.1	TACGGCGTCAAGCTCACCTTGTTCCACGGCCGCGAGGCACCGTGGGCAGGGGTGGCGGGCCACGCACCTTGCCATCCTGTCCAGCCG	1980
X15642.1	TACGGCGTCAAGCTCACCTTGTTCCACGGCCGCGAGGCACCGTGGGCAGGGGTGGCGGGCCACGCACCTTGCCATCCTGTCCAGCCG	1980
X15239.1	TACGGCGTCAAGCTCACCTTGTTCCACGGCCGCGAGGCACCGTGGGCAGGGGTGGCGGGCCACGCACCTTGCCATCCTGTCCAGCCG	1980
X15238.1	TACGGCGTCAAGCTCACCTTGTTCCACGGCCGCGAGGCACCGTGGGCAGGGGTGGCGGGCCACGCACCTTGCCATCCTGTCCAGCCG	1980

Continúa en la siguiente página...

Continuación...

AJ536629.1	CCGGACACCATCAACGGGTCCATCCGTGTGACGGTGCAGGGCAGGTCATCGAGTTCTGCTTCGGGGAGGAGCACCTGTGCTTCCAGACT	2070
X15642.1	CCGGACACCATCAACGGGTCCATCCGTGTGACGGTGCAGGGCAGGTCATCGAGTTCTGCTTCGGGGAGGAGCACCTGTGCTTCCAGACT	2070
X15239.1	CCGGACACCATCAACGGGTCCATCCGTGTGACGGTGCAGGGCAGGTCATCGAGTTCTGCTTCGGGGAGGAGCACCTGTGCTTCCAGACT	2070
X15238.1	CCGGACACCATCAACGGGTCCATCCGTGTGACGGTGCAGGGCAGGTCATCGAGTTCTGCTTCGGGGAGGAGCACCTGTGCTTCCAGACT	2070

AJ536629.1	CTGCAGCGCTTACAGGCCGCCACGCTGGAGCACGGCATGCACCCGCGGCTCTCCCAAGCCCAGTGGCGCAAGCTCATGGACGAGATG	2160
X15642.1	CTGCAGCGCTTACAGGCCGCCACGCTGGAGCACGGCATGCACCCGCGGCTCTCCCAAGCCCAGTGGCGCAAGCTCATGGACGAGATG	2160
X15239.1	CTGCAGCGCTTACAGGCCGCCACGCTGGAGCACGGCATGCACCCGCGGCTCTCCCAAGCCCAGTGGCGCAAGCTCATGGACGAGATG	2160
X15238.1	CTGCAGCGCTTACAGGCCGCCACGCTGGAGCACGGCATGCACCCGCGGCTCTCCCAAGCCCAGTGGCGCAAGCTCATGGACGAGATG	2160

AJ536629.1	GCGGTCGTGGCCACGGAGGAGTACCCTCCGTCTGCTCAAGGAGGCGCGCTTCTGTCGAGTACTTCAGATCGGCTACACCGGAGACCGGAG	2250
X15642.1	GCGGTCGTGGCCACGGAGGAGTACCCTCCGTCTGCTCAAGGAGGCGCGCTTCTGTCGAGTACTTCAGATCGGCTACACCGGAGACCGGAG	2250
X15239.1	GCGGTCGTGGCCACGGAGGAGTACCCTCCGTCTGCTCAAGGAGGCGCGCTTCTGTCGAGTACTTCAGATCGGCTACACCGGAGACCGGAG	2250
X15238.1	GCGGTCGTGGCCACGGAGGAGTACCCTCCGTCTGCTCAAGGAGGCGCGCTTCTGTCGAGTACTTCAGATCGGCTACACCGGAGACCGGAG	2250

AJ536629.1	TACGGGAGGATGAACATCGGCAGCCGCCAGCCAAGAGGAGGCCCGCGCGGCATCACGACCTGCGCGCCATCCCTGGATCTTCTCG	2340
X15642.1	TACGGGAGGATGAACATCGGCAGCCGCCAGCCAAGAGGAGGCCCGCGCGGCATCACGACCTGCGCGCCATCCCTGGATCTTCTCG	2340
X15239.1	TACGGGAGGATGAACATCGGCAGCCGCCAGCCAAGAGGAGGCCCGCGCGGCATCACGACCTGCGCGCCATCCCTGGATCTTCTCG	2340
X15238.1	TACGGGAGGATGAACATCGGCAGCCGCCAGCCAAGAGGAGGCCCGCGCGGCATCACGACCTGCGCGCCATCCCTGGATCTTCTCG	2340

AJ536629.1	TGGACCCAGACAGGTTCCACCTCCCGTGTGGTGGGAGTCGGCGCGCATCAAGTTCGCCATCGACAAGGACGTCAGGAACCTCCAG	2430
X15642.1	TGGACCCAGACAGGTTCCACCTCCCGTGTGGTGGGAGTCGGCGCGCATCAAGTTCGCCATCGACAAGGACGTCAGGAACCTCCAG	2430
X15239.1	TGGACCCAGACAGGTTCCACCTCCCGTGTGGTGGGAGTCGGCGCGCATCAAGTTCGCCATCGACAAGGACGTCAGGAACCTCCAG	2430
X15238.1	TGGACCCAGACAGGTTCCACCTCCCGTGTGGTGGGAGTCGGCGCGCATCAAGTTCGCCATCGACAAGGACGTCAGGAACCTCCAG	2430

AJ536629.1	GTCCCTCAAAGAGATGTACAACGAGTGGCCATTCTTCAAGGTCACCCCTGGACCTGCTGGAGATGGTTTTTCGCCAAGGAGACCCCGGCATT	2520
X15642.1	GTCCCTCAAAGAGATGTACAACGAGTGGCCATTCTTCAAGGTCACCCCTGGACCTGCTGGAGATGGTTTTTCGCCAAGGAGACCCCGGCATT	2520
X15239.1	GTCCCTCAAAGAGATGTACAACGAGTGGCCATTCTTCAAGGTCACCCCTGGACCTGCTGGAGATGGTTTTTCGCCAAGGAGACCCCGGCATT	2520
X15238.1	GTCCCTCAAAGAGATGTACAACGAGTGGCCATTCTTCAAGGTCACCCCTGGACCTGCTGGAGATGGTTTTTCGCCAAGGAGACCCCGGCATT	2520

AJ536629.1	GCCGCTTGTATGACGAGTGTCTGTGGCAGAAGAAGTCAAGCCCTTTGGGAAGCAGCTCAGGGACAAATACGTGGAGACACAGCAGCTT	2610
X15642.1	GCCGCTTGTATGACGAGTGTCTGTGGCAGAAGAAGTCAAGCCCTTTGGGAAGCAGCTCAGGGACAAATACGTGGAGACACAGCAGCTT	2610
X15239.1	GCCGCTTGTATGACGAGTGTCTGTGGCAGAAGAAGTCAAGCCCTTTGGGAAGCAGCTCAGGGACAAATACGTGGAGACACAGCAGCTT	2610
X15238.1	GCCGCTTGTATGACGAGTGTCTGTGGCAGAAGAAGTCAAGCCCTTTGGGAAGCAGCTCAGGGACAAATACGTGGAGACACAGCAGCTT	2610

AJ536629.1	CTCCTCCAGATCGCTGGGCACAAGGATATTCTTGAAGGCGATCCATTCTTGAAGCAGGGGCTGGTGTGCGCAACCCCTACATCACCACC	2700
X15642.1	CTCCTCCAGATCGCTGGGCACAAGGATATTCTTGAAGGCGATCCATTCTTGAAGCAGGGGCTGGTGTGCGCAACCCCTACATCACCACC	2700
X15239.1	CTCCTCCAGATCGCTGGGCACAAGGATATTCTTGAAGGCGATCCATTCTTGAAGCAGGGGCTGGTGTGCGCAACCCCTACATCACCACC	2700
X15238.1	CTCCTCCAGATCGCTGGGCACAAGGATATTCTTGAAGGCGATCCATTCTTGAAGCAGGGGCTGGTGTGCGCAACCCCTACATCACCACC	2700

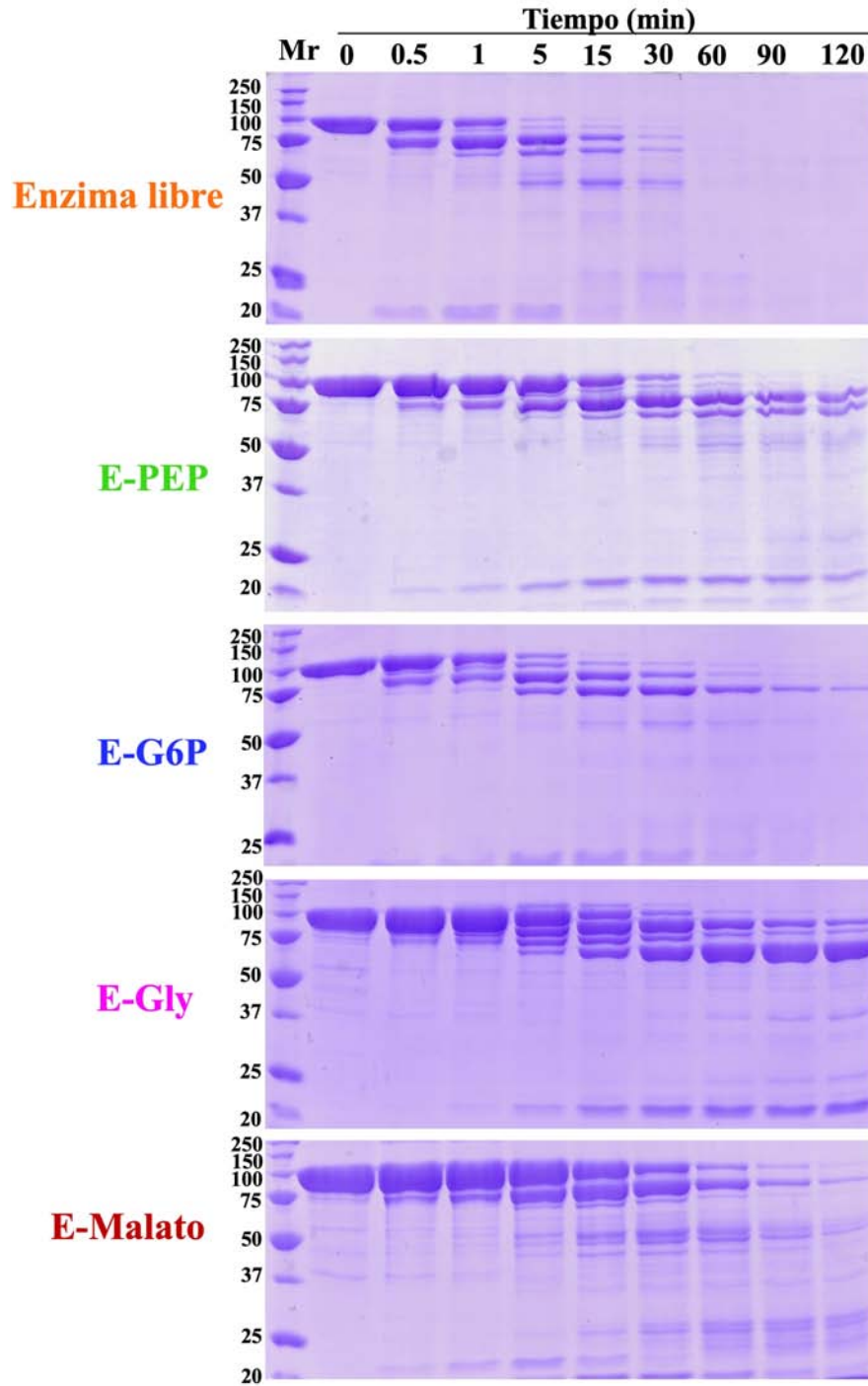
AJ536629.1	CTGAACGTGTTCCAGGCCTACACGCTGAAGCGGATAAGGGACCCCAACTTCAAGGTGACGCCCCAGCCGCGCTGTCCAAGGAGTTCCGCC	2790
X15642.1	CTGAACGTGTTCCAGGCCTACACGCTGAAGCGGATAAGGGACCCCAACTTCAAGGTGACGCCCCAGCCGCGCTGTCCAAGGAGTTCCGCC	2790
X15239.1	CTGAACGTGTTCCAGGCCTACACGCTGAAGCGGATAAGGGACCCCAACTTCAAGGTGACGCCCCAGCCGCGCTGTCCAAGGAGTTCCGCC	2790
X15238.1	CTGAACGTGTTCCAGGCCTACACGCTGAAGCGGATAAGGGACCCCAACTTCAAGGTGACGCCCCAGCCGCGCTGTCCAAGGAGTTCCGCC	2790

AJ536629.1	GACGAGAACAAGCCCGCGGACTGGTCAAGCTGAACCCGGCGAGCGAGTACCCGCCCGGCTGGAAGACACGCTCATCCTCACCATGAAG	2880
X15642.1	GACGAGAACAAGCCCGCGGACTGGTCAAGCTGAACCCGGCGAGCGAGTACCCGCCCGGCTGGAAGACACGCTCATCCTCACCATGAAG	2880
X15239.1	GACGAGAACAAGCCCGCGGACTGGTCAAGCTGAACCCGGCGAGCGAGTACCCGCCCGGCTGGAAGACACGCTCATCCTCACCATGAAG	2880
X15238.1	GACGAGAACAAGCCCGCGGACTGGTCAAGCTGAACCCGGCGAGCGAGTACCCGCCCGGCTGGAAGACACGCTCATCCTCACCATGAAG	2880

AJ536629.1	GGCATCGCCGCGGCATGCAGAACAACACTGGCTAG	2913
X15642.1	GGCATCGCCGCGGCATGCAGAACAACACTGGCTAG	2913
X15239.1	GGCATCGCCGCGGCATGCAGAACAACACTGGCTAG	2913
X15238.1	GGCATCGCCGCGGCATGCAGAACAACACTGGCTAG	2913

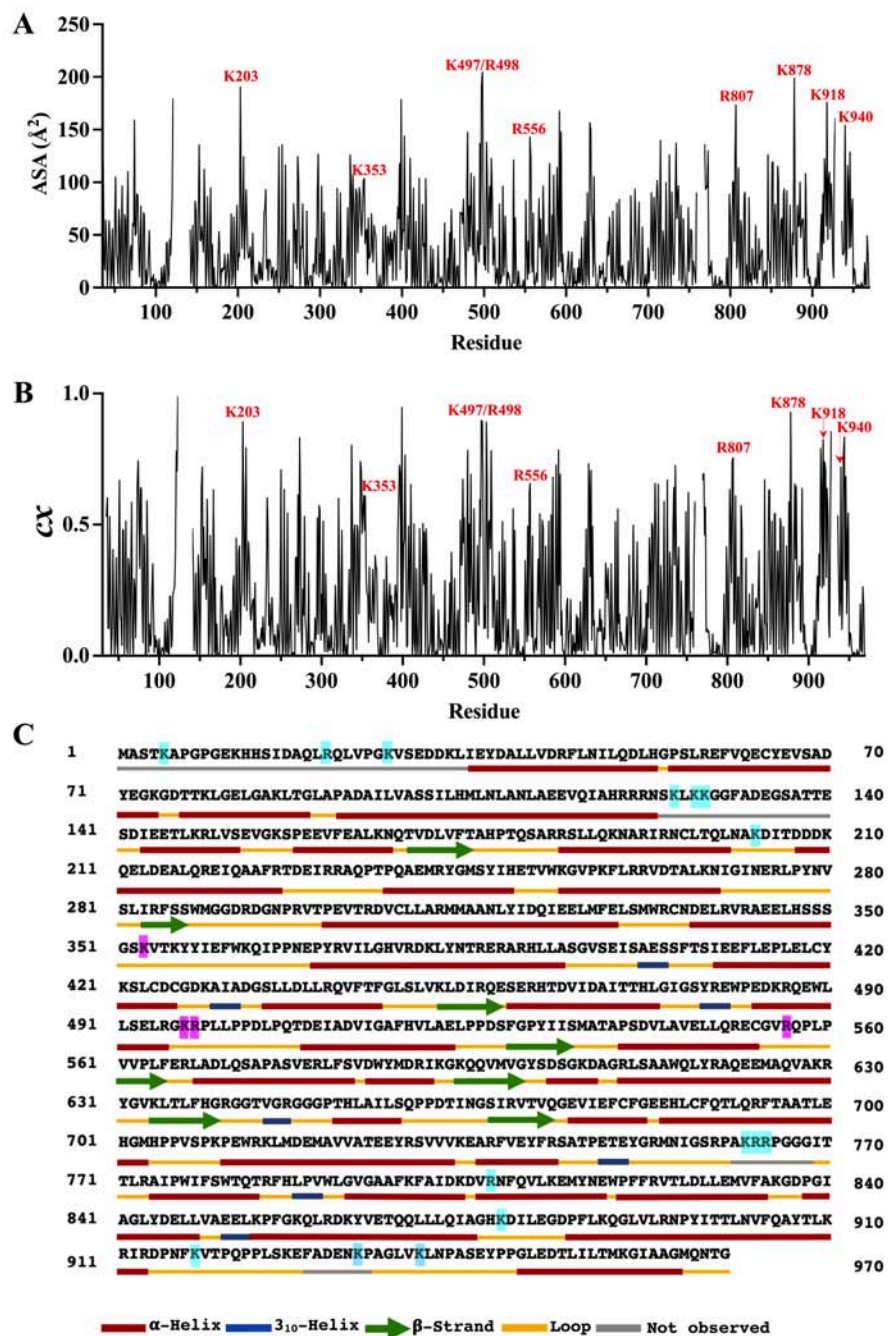
Apéndice II

Análisis mediante SDS-PAGE de los fragmentos de digestión de tripsina de la ZmPEPC-C₄ libre y unida a los ligandos



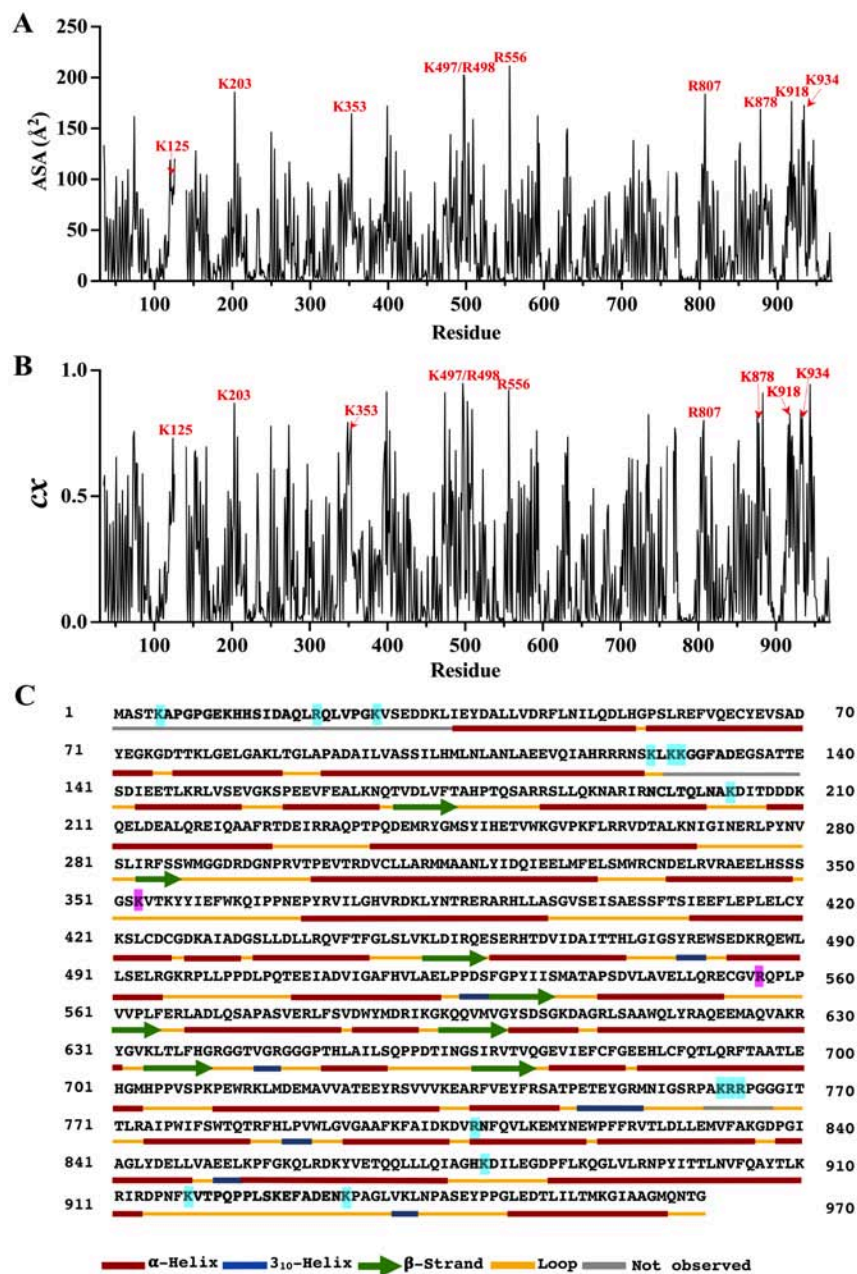
Apéndice III

Predicción de sitios de corte de tripsina en la estructura cristalina de la ZmPEPC-C₄ con código PDB 1JQO



Apéndice IV

Predicción de sitios de corte de tripsina en la estructura cristalina de la ZmPEPC-C₄ con código PDB 6MGI



Apéndice V

Área de superficie accesible (ASA) y concavidad (cx) de residuos en sitios potenciales de escisión de tripsina en las estructuras cristalinas ZmPEPC-C₄1JQO, 5VYJ y 6MGI

Sitio de corte ^a	Topología ^b	ASA ^c	Cx ^d
CRYSTAL STRUCTURE PDB CODE 1JQO			
K5	not observed	ND	ND
K12	not observed	ND	ND
R21	not observed	ND	ND
K27	not observed	ND	ND
K33	not observed	ND	ND
R44	α -helix	48.5	1.7
R58	α -helix	45	1.6
K74	end α -helix	159.4	3.7
K79	α -helix	43.8	1.6
K86	α -helix	68.6	2.1
R120	α -helix	89.4	2.4
R122	α -helix	161.4	3.4
K125	not observed	ND	ND
K127	not observed	ND	ND
K128	not observed	ND	ND
K148	α -helix	82.5	2
R149	α -helix	72.4	2.2
K156	loop	58.6	2.1
K166	α -helix	60.8	1.9
R183	loop	17.2	1.7
R184	start α -helix	32.1	1.7
K189	α -helix	0.1	1.1
R192	α -helix	70.4	1.9
R194	α -helix	11.9	1.3
K203	loop	190.9	4.4
K210	α -helix	93.4	1.8
R219	α -helix	26.7	1.4
R226	end α -helix	24.8	1.5
R231	loop	30.6	1.6
R232	loop	72.3	2.2
R242	α -helix	15.4	1.2
K254	start α -helix	136.1	2.8
K258	α -helix	116.9	2.8

Continúa en la siguiente página...

Continuación...

Sitio de corte ^a	Topología ^b	ASA ^c	Cx ^d
R261	α -helix	27.9	1.4
R262	α -helix	45.3	1.5
K268	α -helix	80	1.8
R275	loop	29.2	1.6
R284	β -strand	73	1.8
R293	loop	14.3	1.2
R298	loop	126.9	2.6
R305	α -helix	72	1.9
R312	α -helix	27	1.4
R334	loop	76.3	1.9
R340	α -helix	107.4	2
R342	α -helix	60.6	2
K353	loop	101.7	2.9
K356	loop	51.2	1.8
K363	loop	70.7	2
R372	α -helix	1.9	1.2
R379	α -helix	7.1	1.2
K381	α -helix	38.7	1.5
R386	α -helix	53	1.6
R388	α -helix	45.9	1.5
R390	α -helix	50.2	1.6
K421	α -helix	103.9	2.5
K429	loop	103.8	2.2
R441	α -helix	2.8	1
K452	β -strand	61.7	1.6
R456	β -strand	28.1	1.3
R461	α -helix	49.6	1.6
R479	3_{10} -helix	92.8	2.1
K485	α -helix	75.4	2
R486	α -helix	36.7	1.2
R495	end α -helix	137.3	3
K497*	loop	192.2	6.4
R498*	loop	205	6.7
R551	α -helix	83.7	1.8
R556*	loop	143.3	3
R567	loop	84.9	2
R580	α -helix	118.2	2.3
R590	α -helix	67.8	1.8

Continúa en la siguiente página...

Continuación...

Sitio de corte ^a	Topología ^b	ASA ^c	Cx ^d
K592	loop	167.9	5.0
K594	β -strand	148.3	3.7
K606	α -helix	21	1.5
R610	α -helix	18.6	1.3
R619	α -helix	47.9	1.6
K629	α -helix	156.8	3.7
R630	end α -helix	149.2	2.9
K634	β -strand	106	2.6
R641	loop	21.3	1.4
R647	3_{10} -helix	0.6	1.3
R669	β -strand	21.3	1.2
R693	α -helix	57.9	1.8
R714	α -helix	57.7	1.6
K715	α -helix	140.3	3.5
R729	α -helix	91.1	2.5
K734	loop	137.6	3.2
R737	α -helix	97.1	2.8
R743	α -helix	66	2
R753	loop	53	2.1
R759	loop	89.6	2.4
K762	not observed	ND	ND
R763	not observed	ND	ND
R764	not observed	ND	ND
R773	loop	130.3	3.1
R785	loop	3.1	1.1
K799	α -helix	89.2	2.6
R807	α-helix	173.8	4.1
K813	α -helix	64.1	1.7
R823	α -helix	85.9	1.9
K835	loop	46.9	1.8
K858	α -helix	115.6	2.9
R861	α -helix	43.2	1.5
K863	α -helix	66.4	1.6
K878	loop	199	6
K888	α -helix	65.7	1.9
R894	α -helix	11.3	1.3
K910	α -helix	43.3	1.5
R911	α -helix	70.1	1.5
R913	end α -helix	89.4	2

Continúa en la siguiente página...

Continuación...

Sitio de corte ^a	Topología ^b	ASA ^c	Cx ^d
K918	loop	176.6	4.6
K927	loop	127.9	3.2
K934	not observed	ND	ND
K940	loop	154.4	4
K960	α -helix	5.2	1.3
CRYSTAL STRUCTURE PDB CODE 5VYJ			
K5	not observed	ND	ND
K12	not observed	ND	ND
R21	not observed	ND	ND
K27	not observed	ND	ND
K33	not observed	ND	ND
R44	α -helix	31.3	1.7
R58	α -helix	40.3	1.6
K74	loop	141.2	3.4
K79	α -helix	38.2	1.8
K86	α -helix	49.4	2.0
R120	α -helix	111.1	2.4
R122	α -helix	168.6	3.30
K125	loop	222.0	6.2
K127	not observed	ND	ND
K128	not observed	ND	ND
K148	α -helix	88.4	2.1
R149	α -helix	59.0	1.9
K156	loop	60.5	2.2
K166	α -helix	76.8	1.9
R183	loop	69.2	2.0
R184	start α -helix	84.3	2.2
K189	α -helix	39.0	1.6
R192	α -helix	98.3	2.3
R194	α -helix	15.2	1.4
K203	loop	197.3	6.6
K210	α -helix	89.4	2.1
R219	α -helix	139.3	2.8
R226	end α -helix	115.0	2.6
R231	loop	36.0	1.6
R232	loop	87.9	2.3
R242	α -helix	110.6	2.5
K254	α -helix	94.2	2.3
K258	α -helix	108.7	2.4

Continúa en la siguiente página...

Continuación...

Sitio de corte ^a	Topología ^b	ASA ^c	Cx ^d
R261	α -helix	73.5	1.8
R262	α -helix	103.2	2.2
K268	α -helix	125.8	2.6
R275	loop	74.9	1.9
R284	β -strand	52.8	1.7
R293	loop	9.9	1.1
R298	loop	92.5	2.2
R305	α -helix	49.6	1.6
R312	α -helix	28.2	1.4
R334	loop	97.6	3.8
R340	α -helix	101.3	2.3
R342	α -helix	55.2	1.9
K353*	loop	171.8	3.9
K356*	loop	188.0	5.5
K363	α -helix	146.8	3.2
R372	α -helix	47.5	1.7
R379	α -helix	2.5	1.2
K381	α -helix	22.2	1.2
R386	α -helix	39.7	1.5
R388	α -helix	52.8	1.5
R390	α -helix	104.9	2.5
K421	α -helix	120.3	2.5
K429	α -helix	98.2	2.3
R441	α -helix	2.3	1.0
K452	β -strand	47.1	1.6
R456	β -strand	0.0	1.1
R461	α -helix	39.4	1.5
R479	3_{10} -helix	102.7	2.1
K485	loop	107.9	2.3
R486	α -helix	32.7	1.3
R495	end α -helix	121.5	2.6
K497*	loop	195.8	5.9
R498*	loop	196.4	5.7
R551	α -helix	79.8	1.7
R556*	loop	227.4	6.4
R567	loop	78.8	1.9
R580	loop	94.4	2.4
R590	α -helix	48.7	1.9
K592	loop	171.1	3.9

Continúa en la siguiente página...

Continuación...

Sitio de corte ^a	Topología ^b	ASA ^c	Cx ^d
K594	β -strand	121.9	2.9
K606	α -helix	35.9	1.4
R610	α -helix	19.5	1.3
R619	α -helix	63.9	1.7
K629	loop	152.3	3.6
R630	loop	153.2	2.9
K634	β -strand	91.5	2.4
R641	loop	20.0	1.3
R647	3_{10} -helix	0.6	1.2
R669	β -strand	17.4	1.2
R693	α -helix	50.9	1.8
R714	3_{10} -helix	68.3	1.7
K715	3_{10} -helix	141.5	3.6
R729	loop	70.3	1.9
K734	loop	120.3	3.0
R737	α -helix	82.4	2.7
R743	α -helix	63.1	1.7
R753	3_{10} -helix	50.9	2.0
R759	loop	23.7	1.5
K762	loop	37.9	1.7
R763	loop	57.0	1.9
R764	loop	195.3	6.0
R773	loop	2.6	1.4
R785	loop	4.0	1.1
K799	3_{10} -helix	97.6	3.0
R807	loop	172.1	5.3
K813	α -helix	62.5	1.7
R823	α -helix	82.5	1.9
K835	end α -helix	23.6	1.7
K858	α -helix	129.8	3.1
R861	α -helix	37.7	1.4
K863	α -helix	42.0	1.6
K878	loop	165.0	4.0
K888	α -helix	78.2	2.2
R894	α -helix	10.3	1.3
K910	α -helix	45.1	1.6
R911	α -helix	75.5	1.6
R913	end α -helix	89.3	2.1
K918	loop	169.3	4.4

Continúa en la siguiente página...

Continuación...

Sitio de corte ^a	Topología ^b	ASA ^c	Cx ^d
K927	loop	130.4	2.6
K934	not observed	ND	ND
K940	loop	141.9	3.9
K960	α -helix	12.7	1.4
CRYSTAL STRUCTURE PDB CODE 6MGI			
K5	not observed	ND	ND
K12	not observed	ND	ND
R21	not observed	ND	ND
K27	not observed	ND	ND
K33	not observed	ND	ND
R44	α -helix	39.4	1.7
R58	α -helix	40.9	1.6
K74	end α -helix	162.3	4.0
K79	α -helix	44.4	1.7
K86	α -helix	35.8	1.8
R120	α -helix	119.3	2.5
R122	α -helix	91.8	2.1
K125	loop	84.9	2.5
K127	not observed	ND	ND
K128	not observed	ND	ND
K148	α -helix	90.1	2.1
R149	α -helix	69.6	2.0
K156	loop	62.2	2.2
K166	α -helix	63.1	1.9
R183	loop	9.9	1.5
R184	start α -helix	14.6	1.6
K189	α -helix	0.0	1.1
R192	α -helix	41.6	1.7
R194	α -helix	18.7	1.5
K203	loop	186.1	4.8
K210	α -helix	102.7	2.2
R219	α -helix	8.6	1.4
R226	end α -helix	4.2	1.3
R231	loop	14.3	1.6
R232	loop	70.6	2.2
R242	α -helix	4.5	1.21
K254	α -helix	130.3	2.7
K258	α -helix	80.8	1.9
R261	α -helix	31.9	1.3

Continúa en la siguiente página...

Continuación...

Sitio de corte ^a	Topología ^b	ASA ^c	Cx ^d
R262	α -helix	13.4	1.3
K268	α -helix	106.0	2.2
R275	loop	47.5	1.6
R284	β -strand	64.9	1.7
R293	loop	6.1	1.1
R298	loop	87.4	2.1
R305	α -helix	73.8	1.9
R312	α -helix	29.0	1.4
R334	loop	12.5	1.5
R340	α -helix	99.9	2.2
R342	α -helix	60.9	1.9
K353*	loop	164.8	4.6
K356	loop	46.9	1.7
K363	loop	62.1	2.1
R372	α -helix	0.0	1.3
R379	α -helix	15.7	1.3
K381	α -helix	27.7	1.4
R386	α -helix	51.3	1.6
R388	α -helix	61.6	1.7
R390	α -helix	66.4	2.0
K421	α -helix	109.1	2.4
K429	α -helix	87.5	2.1
R441	α -helix	2.2	1.0
K452	β -strand	56.2	1.7
R456	β -strand	0.1	1.2
R461	α -helix	34.8	1.5
R479	3_{10} -helix	101.6	2.1
K485	α -helix	102.2	2.2
R486	α -helix	30.6	1.2
R495	end α -helix	117.9	2.6
K497*	loop	203.1	6.6
R498*	loop	200.1	5.9
R551	α -helix	89.9	1.8
R556*	loop	211.8	6.3
R567	loop	80.7	1.9
R580	α -helix	113.4	2.7
R590	α -helix	48.2	1.8
K592	loop	162.8	3.8
K594	β -strand	135.6	3.3

Continúa en la siguiente página...

Continuación...

Sitio de corte ^a	Topología ^b	ASA ^c	Cx ^d
K606	α -helix	21.8	1.3
R610	α -helix	1.7	1.3
R619	α -helix	69.7	1.8
K629	α -helix	143.9	3.2
R630	α -helix	150.0	2.8
K634	β -strand	102.7	2.5
R641	loop	13.4	1.3
R647	3_{10} -helix	1.0	1.2
R669	β -strand	17.4	1.2
R693	α -helix	51.5	1.8
R714	α -helix	66.5	1.6
K715	α -helix	138.7	3.2
R729	α -helix	67.2	1.9
K734	loop	134.1	3.2
R737	start α -helix	91.7	2.8
R743	α -helix	81.2	2.0
R753	3_{10} -helix	51.5	2.1
R759	loop	63.4	2.1
K762	not observed	ND	ND
R763	not observed	ND	ND
R764	not observed	ND	ND
R773	loop	63.8	2.3
R785	loop	4.4	1.1
K799	α -helix	78.7	2.3
R807	start α -helix	184.2	6.2
K813	α -helix	74.2	1.8
R823	α -helix	89.1	2.0
K835	end α -helix	18.5	1.7
K858	α -helix	113.1	2.8
R861	α -helix	40.9	1.4
K863	α -helix	52.3	1.6
K878	loop	169.2	4.5
K888	α -helix	64.1	2.0
R894	α -helix	9.3	1.3
K910	α -helix	44.2	1.6
R911	α -helix	64.3	1.6
R913	end α -helix	93.3	2.1
K918	loop	176.9	4.6

Continúa en la siguiente página...

Continuación...

Sitio de corte ^a	Topología ^b	ASA ^c	Cx ^d
K927	loop	129.8	2.7
K934	loop	173.2	5.2
K940	3 ₁₀ -helix	117.7	3.1
K960	α -helix	6.5	1.3

^aLos sitios potenciales de escisión de tripsina se predijeron con la herramienta "PeptideCutter" en el servidor web Expasy (<http://expasy.org>).

^bLos elementos de la estructura secundaria de *ZmPEPC-C₄* se asignaron con el programa Stride (<http://webclu.bio.wzw.tum.de/stride/>).

^cEl área de superficie accesible (ASA) se evaluó mediante la herramienta "Área de superficie accesible y cálculo de accesibilidad para proteínas" (<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/ASA/>).

^dLos átomos muy expuestos se identificaron utilizando el programa Concave Finder (<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/CONCAVE/>).

En negrita están aquellos residuos que se prevé que sean posibles sitios de escisión de acuerdo con los criterios dados en el texto principal. Con * se marcan aquellos residuos altamente expuestos en el monómero pero ubicados en las intercaras dímero/dímero o monómero/monómero. ND, valor no determinado porque el residuo no presenta densidad electrónica en la estructura cristalina.



Contents lists available at ScienceDirect

Heliyon

journal homepage: www.cell.com/heliyon



Research article

Multiple conformations in solution of the maize C₄-phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme



Fátima Barrera-Huerta^a, Ismael Bustos-Jaimes^b, Carlos Mújica-Jiménez^a,
Rosario A. Muñoz-Clares^{a,*}

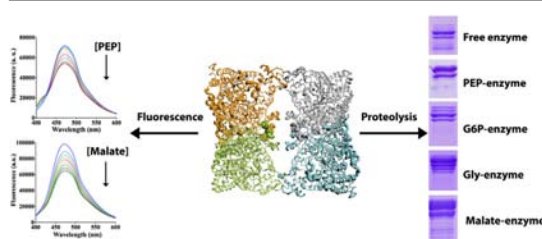
^a Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, 04510, Mexico

^b Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, 04510, Mexico

HIGHLIGHTS

- PEP or malate binding produce distinct changes in ZmPEPC-C₄/ANS fluorescence.
- Different near-UV CD spectra of the free enzyme or of the enzyme complexes were observed.
- PEP or effectors binding produce distinctive ZmPEPC-C₄ trypsin-fragmentation patterns.
- Our results support several ligand-induced ZmPEPC-C₄ conformational states in solution.
- Predicted trypsin-cleavage sites are at flexible loops, which probably participate in ZmPEPC-C₄ function and regulation.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
Zea mays L.
C₄ metabolism
Allosteric regulation
Ligand-induced conformational changes
ANS fluorescence
CD spectroscopy
Trypsin proteolysis

ABSTRACT

The photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme from C₄ plants (PEPC-C₄) has a complex allosteric regulation, involving positive cooperativity in binding the substrate phosphoenolpyruvate as well as positive and negative allosteric effectors. Besides the proposed R- and T-states, previous kinetic results suggested functionally relevant different R-states of the maize enzyme (ZmPEPC-C₄) elicited by PEP or its two kinds of activators, glucose 6-phosphate or glycine. To detect these different R-state conformations, we used as conformational probes the fluorescence of 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS), near-UV circular dichroism (CD) spectroscopy, and limited proteolysis by trypsin. Phosphoenolpyruvate and malate binding caused distinct concentration-dependent fluorescence changes of ZmPEPC-C₄/ANS, suggesting that they elicited conformational states different from that of the free enzyme, while glucose 6-phosphate or glycine binding did not produce fluorescence changes. Differences were also observed in the near UV CD spectra of the enzyme, free or complexed with its substrate or allosteric effectors. Additionally, differences in the trypsin-digestion fragmentation patterns, as well as in the susceptibility of the free and complexed enzyme to digestion and digestion-provoked loss of activity, provided evidence of several ZmPEPC-C₄ conformations in solution elicited by the substrate and the allosteric effectors. Using the already reported ZmPEPC-C₄ crystal structures and bioinformatics methods, we predicted that the most probable trypsin-cleavage sites are located in superficial flexible regions, which seems relevant for the protein

* Corresponding author.
E-mail address: clares@unam.mx (R.A. Muñoz-Clares).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08464>

Received 24 July 2021; Received in revised form 16 September 2021; Accepted 19 November 2021

2405-8440/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

dynamics underlying the function and allosteric regulation of this enzyme. Together, our findings agree with previous kinetic results, shed light on this enzyme's complex allosteric regulation, and place *ZmPEPC-C₄* in the growing list of allosteric enzymes possessing an ensemble of closely related R-state conformations.

1. Introduction

In leaves of *C₄* plants, two metabolic pathways are involved in the assimilation of the atmospheric *CO₂*: the *C₄* and the Calvin cycles. In the *C₄* cycle, the initial *CO₂* assimilation reaction is the carboxylation of phosphoenolpyruvate (PEP) by the phosphoenolpyruvate carboxylase *C₄*-isozyme (PEPC-*C₄*), which yields oxaloacetate and inorganic phosphate in mesophyll cells of *C₄* plants [1]. Oxaloacetate is then converted to malate or aspartate, depending on the plant, which are transported to the vascular sheath cells where they produce the *CO₂* that is finally assimilated into sugars by the Calvin cycle in the chloroplast of these cells.

The importance of the PEPC-*C₄* isozyme in the photosynthetic *CO₂* assimilation metabolism of *C₄* plants is underscored by its complex allosteric regulation—particularly in the case of PEPC-*C₄* from gramineous *C₄* plants such as the maize isozyme (*ZmPEPC-C₄*)—, which involves positive cooperativity in the binding of PEP and the positive and negative allosteric effectors [for reviews, see Refs. [2, 3, 4]. At physiological pH, *ZmPEPC-C₄* is allosterically activated by phospho-sugars, as glucose 6-phosphate (G6P) [5, 6, 7, 8], and the neutral amino acids glycine (Gly) and serine (Ser) [6, 7, 8, 9, 10, 11], whereas is subjected to feedback inhibition by the dicarboxylic acid malate [12, 13]. The two kinds of *ZmPEPC-C₄* allosteric activators are by no means redundant; they act as separate metabolic signals, both indicating the necessity of a more active *C₄* cycle under different physiological conditions. Activation of *ZmPEPC-C₄* by phospho-sugars would increase *C₄* cycle flux to keep pace with an active Calvin cycle—which leads to the build-up of these phospho-sugars—so that the fluxes of both cycles are coordinated and the *C₄* cycle does not limit the rate of *CO₂* assimilation by the Calvin cycle. *ZmPEPC-C₄* activation by the neutral amino acids glycine and serine—produced during photorespiration—also would increase the *CO₂* supply to the bundle sheath cells, which in turn would diminish or abolish photorespiration, leading to an increased net *CO₂* assimilation [14].

The allosteric regulation of *ZmPEPC-C₄* has been proposed [15, 16] to conform to the symmetry two-state model of Monod, Changeux, and Wyman (MWC model) [17], which postulated that the substrate and allosteric activators shift the preexisting equilibrium between an inactive, or less active, T-state and an active, or more active, R-state, favoring the latter. However, previous kinetic studies [9, 18] suggested that the binding of PEP, G6P, or Gly elicits different R-state conformations of *ZmPEPC-C₄*, which are in equilibrium with the free enzyme, as schematized in Figure 1. The two kinds of activators were found to have a V effect and to be synergic rather than additive, which suggests that (i) the conformation of the enzyme saturated by its substrate PEP is different from that of the enzyme saturated by G6P or Gly, and (ii) this conformation is also different from that existing when the two activators are simultaneously bound to their respective allosteric sites. Moreover, while saturation of *ZmPEPC-C₄* by G6P is unable to revert the inhibition caused by a physiological concentration of malate, saturation by Gly or Ser produces an enzyme almost as active as that in the absence of the inhibitor [9], again supporting the notion that the two kinds of activators, i.e., phospho-sugars and neutral amino acids, elicit different conformational states.

The so far reported crystal structures of *ZmPEPC-C₄* in an active R-state are of a free enzyme (PDB code 1JQO) [19], of the enzyme-Gly complex (PDB code 5VYJ) [20], and of the enzyme-phosphoglycolate-G6P-Gly complex (PDB code 6MGI) [21]. These R-state structures show the correct conformation of the active site and G6P- and Gly-allosteric sites and a disorganized malate-allosteric site, contrary to the reported T-state *ZmPEPC-C₄* structures, which show disorganized active and activator-allosteric sites and a properly formed malate-allosteric site with bound malate (PDB code 6U2T) or citrate (PDB code 6V3O) [Carrizosa E. I., González-Segura L., and Muñoz-Clares R. A., manuscript in preparation]. As expected, the differences between the R-state and T-state crystal structures are important and multiple, but the differences between the three R-state crystal structures (1JQO, 5VYJ, and 6MGI) are subtle. Thus,

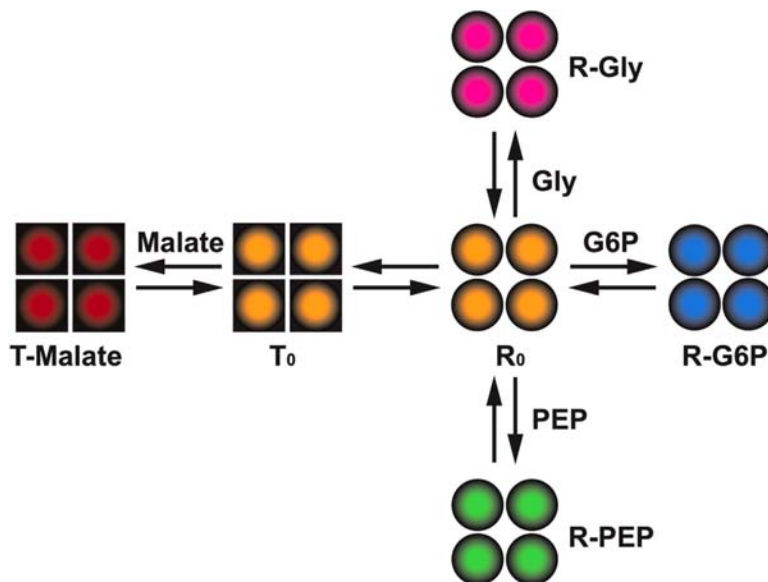


Figure 1. Schematic representation of the proposed different conformational states of *ZmPEPC-C₄* and the equilibria between them. The free enzyme is assumed to predominantly be in the inactive T-state, which changes to a conformationally different malate-bound T-state in the presence of malate, or to different active R-sates in the presence of substrate or allosteric activators. Thus, we propose that the R-state adopts at least three different conformations depending on the binding of PEP, G6P, or Gly. It is likely that different conformations also exist when two or the three of the latter ligands are bound to their respective sites.

although the 1JQO structure has no substrate or allosteric activator bound, it has a similar overall conformation to the 6MGI structure, which has the PEP analog phosphoglycolate bound into the active site and G6P and Gly bound into their respective allosteric sites. The 5VYJ structure, which only has Gly bound in its allosteric site, also has a similar overall conformation, although it shows some differences with the other two R-state structures. Specifically, it differs in the degree of disorder of the loop forming the active site lid and in the conformation of the loop forming the G6P-allosteric site lid. Therefore, it appears that the functionally significant differences in the conformation or dynamics of the enzyme elicited by the substrate or the two kinds of activators, as indicated by the kinetic results, are lost in the crystal structures. The crystallization conditions might favor a single R-state conformation among the several energetically very similar—and therefore easily interconvertible—that probably exist in solution. Because of this, the possible different conformational R-states should be investigated through experiments carried out with the enzyme in solution. The size of this protein—a homotetramer of around 440 kDa—and the probable asymmetry of its subunits derived from high flexibility, as observed in the crystal structures, preclude the use of NMR spectroscopy. NMR using methyl labeling has been used for large proteins, but *ZmPEPC-C₄* PEP enzymes have several highly flexible regions in both the R- and T-states according to all reported crystal structures and, consequently, it is expected that they are not fully symmetrical. Indeed, the asymmetric unit in the reported crystal structures was two, four, or even eight. Each small difference between subunits will give different signals in the NMR experiments, and this will greatly complicate the analysis. For these reasons, to detect the conformational changes of *ZmPEPC-C₄* induced by ligands, in this work we used three other experimental approaches: 1) Extrinsic fluorescence measurements using 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) as a conformational probe; 2) near-UV circular dichroism (CD) spectroscopy, which gives information about changes in the tertiary structure of proteins affecting the surrounding environment of aromatic side chains; and 3) limited proteolysis, since a conformational change in the solution structure of the protein can lead to altered susceptibility to proteolysis. ANS fluorescence changes and limited proteolysis have been successfully used to detect different conformational changes induced by allosteric effectors of the *Escherichia coli* PEP enzyme (*EcPEPC*) [22, 23].

We here report that the substrate PEP changes the fluorescence of the *ZmPEPC-C₄*-ANS complex, while G6P and Gly did not, which suggests that the conformation of the PEP-bound R-state differs from those of the G6P-bound or Gly-bound R-states. We also observed differences in the near-UV CD spectra of the enzyme, free or complexed with its substrate or allosteric effectors. Furthermore, the fragmentation patterns of the enzyme in the absence and presence of PEP, G6P, or Gly were different from each other. Together, our results give strong support to the notion that *ZmPEPC-C₄* has at least three different R-states, in accordance with previous kinetic results. Besides, based on the prediction of possible trypsin-cleavage sites, we propose the importance of certain flexible regions for the function and allosteric regulation of the enzyme.

2. Materials and methods

2.1. Expression, purification, and assay of recombinant *ZmPEPC-C₄*

The expression and purification of recombinant *ZmPEPC-C₄* have been previously described [20]. Briefly, the cDNA for *ZmPEPC-C₄* (*ppc-C₄*, GenBank entry CAD60555, a kind gift from Dr. Katsura Izui) was subcloned into pET32a (+) vector (Novagen) between NcoI/HindIII restriction sites, as described [20]. The resulting plasmid was used for the expression of the full-length, N-terminal double-tagged thioredoxin and His6 *ZmPEPC-C₄* protein in transformed BL21-CodonPlus (DE3)-RIL *E. coli* cells (Novagen). Protein purification was achieved by metal-affinity chromatography on a Protino nickel-tris(carboxymethyl) ethylene diamine column (Macherey-Nagel, Düren, Germany). After removal of the double tag by digestion at the thrombin cleavage site with enterokinase (New England Biolabs), the enzyme was further purified

using a Mono QHR5 column (GE Healthcare) column. An ÄKTA™ PURE FPLC system (Cytiva) was used in the chromatographic steps. Protein concentration was determined spectrophotometrically by A280 using an extinction coefficient of 111,730 M⁻¹ cm⁻¹ predicted from the amino acid sequence using ExPASy ProtParam [24]. The purity of the recombinant *ZmPEPC-C₄* was verified by SDS-PAGE after Laemmli [25]. The enzyme was stored at -80 °C in 50 mM HEPES-KOH buffer, pH 7.5, containing 10 mM 2-mercaptoethanol and 10% (v/v) glycerol until use. *ZmPEPC-C₄* was assayed spectrophotometrically at 30 °C in a coupled enzymatic assay by monitoring NADH oxidation at 340 nm in 100 mM HEPES-KOH pH 7.3 buffer, 5 mM PEP, 10 mM CO₃H⁻, 10 mM Mg²⁺, 0.25 mM NADH and 4 units of malic dehydrogenase, in the absence or presence of allosteric effectors at the concentrations stated in each experiment.

2.2. Fluorescence measurements

ANS fluorescence was measured at 30 °C with a Shimadzu RF-5000 U spectrofluorimeter in 50 mM HEPES-KOH buffer, pH 7.3, 0.1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, and 30 μM ANS. *ZmPEPC-C₄* concentration was 150 μg/mL (1.37 μM as monomer) and PEP and allosteric effectors concentrations were varied as indicated in the text or the legends of the figures. ANS was excited at 370 nm and emission spectra were recorded between 400–600 nm at 2-min intervals after the addition of 5 μL ligand. The resulting spectra were corrected with those obtained upon the addition of 5 μL buffer. The corrected fluorescence intensities were used to calculate the dissociation constant of ligands by fitting the data to Eq. (1):

$$F = \{F_0 \times L_{0.5}^h / (L_{0.5}^h + [L]^h)\} + F_{\min} \quad (1)$$

where F and F_0 are the fluorescence intensities at the maximum wavelength of emission observed in the presence and absence of the ligand; respectively; $[L]$ is the concentration of ligand; $L_{0.5}$ is the ligand concentration giving half of the maximum change in fluorescence, and equals the dissociation constant when the binding of the ligand is hyperbolic; F_{\min} is the estimated residual fluorescence at saturation of the ligand; and h is the Hill number indicating the degree of cooperativity ($h = 1$ in hyperbolic binding; $h > 1$ in positive cooperativity binding). In these calculations, we used total instead of free ligand concentrations since the ligands were in great excess of the enzyme concentration, given their low affinity for the enzyme, and therefore their total concentrations are practically the same as their free concentrations.

2.3. CD spectroscopy

CD signals and dynode voltage were recorded with a Jasco J-715 spectropolarimeter (Jasco Inc., Easton, MD) equipped with a Peltier-type temperature control system (Model PTC-423S) and calibrated with d-10-(+)-camphorsulfonic acid. Near-UV (250–320 nm) spectra were recorded for solutions of 0.35 mg/ml protein concentration placed in quartz cuvettes of 0.5 cm path length. *ZmPEPC-C₄* was in 10 mM HEPES buffer, pH 7.3, containing 0.5 mM 2-mercaptoethanol. Data were collected at 1 nm intervals, bandwidth of 1.0 nm, and a scan rate of 20 nm/min. Spectra were averaged over 3 scans, and the average spectrum of reference samples without protein was subtracted. The observed ellipticities were converted to molar ellipticities $[\Theta]$ on the basis of the molecular mass of the protein (109296.99 Da).

2.4. Limited proteolysis

Digestion of *ZmPEPC-C₄* with trypsin was conducted at 25 °C in 100 mM HEPES-KOH, pH 7.3, containing 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA, and 1 mM CaCl₂ at a protease to protein ratio of 1:100 (w/w). To follow the time-course of disappearance and formation of each proteolytic fragment, aliquots of the reaction mixture were withdrawn at

the indicated intervals, the reaction stopped with 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF; Roche, USA) and immediately subjected to SDS-PAGE on 12 % polyacrylamide minislab gels after Laemmli [25]. Proteins were detected by staining with Coomassie blue R-250. The apparent molecular mass was estimated from SDS-PAGE gels comparing the relative migration with those of standard reference samples of known molecular mass (Bio-Rad, USA). In similar digestion experiments, after stopping the reaction with PMSF, aliquots were assayed for *ZmPEPC-C₄* activity under standard assay conditions in the absence and presence of saturating concentrations of allosteric effectors.

2.5. Structural analysis

Docking simulations of ANS in the *ZmPEPC-C₄* crystal structures 5VYJ (R-state with a glycine molecule bound into the neutral amino acids-allosteric site) and 6U2T (T-state with a malate molecule bound into the carboxylic acids-allosteric site) were attempted with DockingServer [26] (<https://www.dockingserver.com/web>) and DockThor server [27] (<https://dockthor.lncc.br/v2/>). The glycine and malate molecules were removed from the corresponding pdb files before the docking simulations. Potential trypsin-cleavage sites were predicted with the Peptide-Cutter tool in the ExPASy (Expert Protein Analysis System) web server [24] (<http://expasy.org>). The accessible surface area (ASA) was evaluated using the “Accessible Surface Area and Accessibility Calculation for Protein” tool (<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/ASA/>). Protruding atoms were identified using the Concave Finder program (<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/CONCAVE/>), which is based on the CX algorithm [28]. Cx values are the ratio between the external, exposed volume of atoms in a protein and the internal, buried volume (v_{ext}/v_{int}). Secondary structure elements of *ZmPEPC-C₄* were assigned with the program Stride [29] (<http://webclu.bio.wzw.tum.de/stride/>). The proposed trypsin-cleavage sites were mapped on the crystal structure using PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

3. Results and discussion

3.1. ANS fluorescence measurements

The binding of the substrate PEP or the allosteric effectors G6P, Gly, or malate did not induce any measurable change in the tryptophan fluorescence of *ZmPEPC-C₄*; thus intrinsic fluorescence could not be exploited to investigate ligand-induced conformational changes in solution. Therefore, to characterize the dynamic properties of *ZmPEPC-C₄* upon ligand binding, we used the fluorescence probe ANS, which has a low fluorescence yield in aqueous solution but exhibits enhanced fluorescence when bound to hydrophobic sites on proteins [30].

In the absence of ligands, ANS binds to *ZmPEPC-C₄* and produces an emission spectrum with a maximum at 476 nm (Figure 2 A, B). The allosteric activators G6P and Gly did not significantly affect the maximum *ZmPEPC-C₄*/ANS-fluorescence even at high concentrations (data not shown). Therefore, ANS is not adequate to detect the conformational changes elicited by these two kinds of allosteric activators. On the contrary, the substrate PEP and the allosteric inhibitor malate decreased the maximum *ZmPEPC-C₄*/ANS-fluorescence to a different extent (Figure 3 A, B). The fluorescence signal changes in response to the binding of PEP or malate are a function of ligand concentration (Figure 3 C, D). The corresponding fits of the fluorescence data to Eq. (1) yield the binding parameters given in the table included in Figure 3. The estimated $L_{0.5}$ value and the degree of binding cooperativity for PEP agree reasonably well with those previously found in experiments where the protection of the enzyme activity afforded by PEP against chemical modification by pyridoxal phosphate was measured [31]. Thus, the estimated $L_{0.5}$ and h values for PEP in the referred study were 5.33 ± 0.32 mM and 2.43 ± 0.33 , respectively,

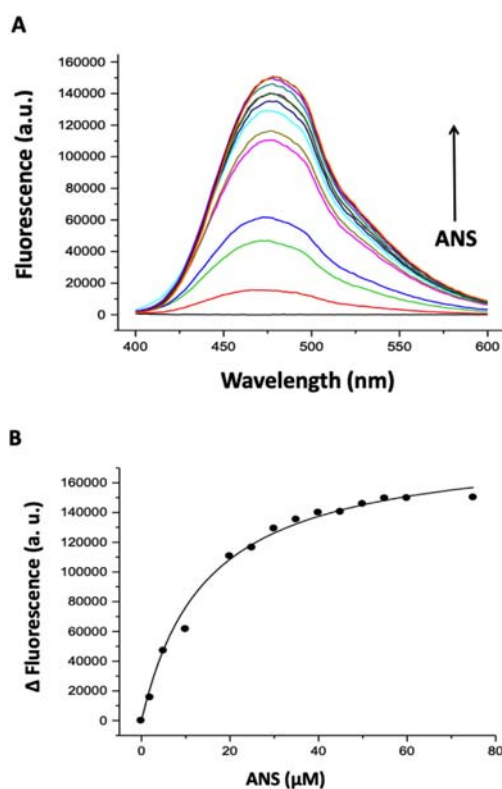


Figure 2. ANS-dependent fluorescence response in *ZmPEPC-C₄*. (A) Emission spectra of *ZmPEPC-C₄*/ANS solutions in the presence of increasing concentrations of ANS. The protein concentration was 1.37 μ M as monomer. ANS was excited at 370 nm. Spectra were corrected with those of the buffer. (B) ANS-concentration dependence of the fluorescence signal at 476 nm. The dissociation constant (K_d) of the ANS-*ZmPEPC-C₄* complex was calculated by fitting the data to $y = y_{max} * [ANS] / (K_d + [ANS])$, where y are the fluorescence data. The estimated K_d value was 14.5 ± 1.5 μ M.

while the values estimated by ANS fluorescence in the present study are 5.42 ± 0.62 mM and 3.2 ± 0.9 , respectively. Similarly, the estimated binding parameters for malate are close to the reported inhibition parameters found for malate in initial velocity experiments: I_{50} 0.43 ± 0.04 mM and h 1 [32] versus $L_{0.5}$ 0.36 ± 0.07 mM and h 0.9 ± 0.2 in the present study.

The differences in the response of the enzyme upon binding of the two ligands—highly cooperative in the case of PEP and non-cooperative in the case of malate—suggest that the PEP-induced conformational state is different from the malate-induced conformational state, although both appear to be either more compact or with less hydrophobic patches exposed. Thus, the ANS-fluorescence data suggest that binding of PEP or malate induces two different allosteric transitions to conformational states different from that of the free enzyme: the one induced by the substrate PEP, which cooperatively shifts the equilibrium between the T_0 state present in the absence of ligands towards the PEP-bound R state, and the one induced by malate, which non-cooperatively induces or stabilizes a different T state, the malate-bound T state, as depicted in Figure 1. This finding is consistent with previously reported *ZmPEPC-C₄* kinetic data, which showed cooperativity in PEP binding and non-cooperativity in malate binding [9, 32]. Also, the finding that the allosteric transition induced by either G6P or Gly did not affect ANS binding

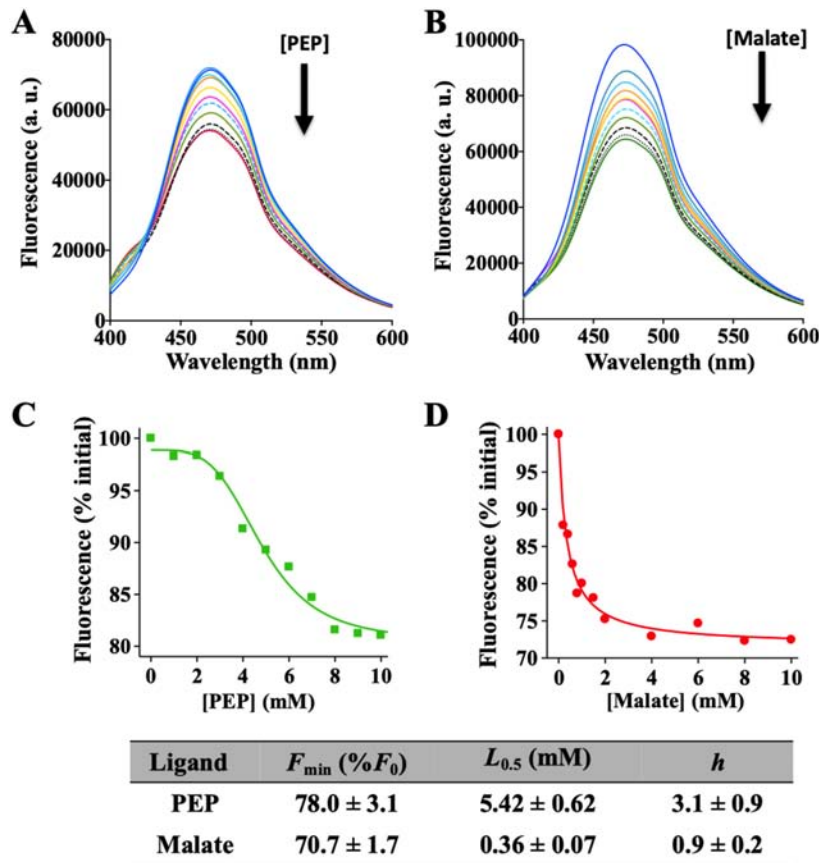


Figure 3. Extrinsic fluorescence studies. Emission spectra of *ZmPEPC-C₄*/ANS solutions in the presence of increasing concentrations of PEP (A), or malate (B). a.u., arbitrary units. (C and D) Ligand-concentration-dependent fluorescence changes. The lines are drawn from the best fit of the changes in fluorescence intensity at the maximum emission wavelength (476 nm) to Eq. (1), which gives the binding parameters shown in the table inserted in this figure. Fluorescence changes are expressed as a percentage of the fluorescence measured in the absence of ligand (F_0).

suggests differences between the PEP-bound R state and the G6P-bound or Gly-bound R states, but the possible differences between the two latter R states could not be studied using this technique.

We can not rule out the possibility that ANS binds to the active site or the malate-allosteric site and therefore that PEP and malate displace the fluorophore instead of inhibiting its binding through a conformational change. Nonetheless, we think that the probability of doing so is low given (i) the highly polar nature of the PEP- and malate-binding sites, although they could bind the sulfonic group of ANS; (ii) the good agreement of the values of the binding parameters with those determined by different experimental methods; and (iii) our failure to obtain by docking simulations the ANS molecule inside the active or malate-binding sites of the *ZmPEPC-C₄* 5VYJ (glycine-bound R state) or 6U2T (malate-bound T state) crystal structures (results not shown). Indeed, the best poses obtained showed that ANS binds at the protein surface, off of the active or allosteric sites; but again we are aware that dockings results are not conclusive proofs. But even if isosteric competitive binding caused the decreases in fluorescence of the *ZmPEPC-C₄*-ANS complex, our data represent a valuable contribution to the knowledge of the mode of binding of PEP and malate and the allosteric transitions elicited by them. But because the fluorescence results did not inform about possible differences between the conformational states triggered or stabilized by the two kinds of allosteric effectors of this enzyme, we tried different experimental approaches to detect the existence of the distinct conformational states suggested by the kinetic studies.

3.2. CD spectra

The CD spectra in the near-UV region of free or ligand-bound *ZmPEPC-C₄* are shown in Figure 4A. To the best of our knowledge, this is the first report of CD spectroscopy performed in a PEPC enzyme. The considerable number of aromatic residues in *ZmPEPC-C₄* (38 Phe, 27 Tyr, and 13 Trp per subunit) precludes a detailed analysis of the spectra. Nevertheless, the differences between these spectra (depicted in Figure 4B as the difference spectra obtained subtracting the CD spectrum of the free enzyme from the CD spectrum of each enzyme complex) suggest changes in the local environment of some of these residues and, therefore, different enzyme conformations. When compared with the free enzyme, the E-malate complex spectrum showed the most remarkable changes, but differences were also observed in the CD spectra of the E-PEP, E-G6P, and E-Gly complexes, not only relative to the spectrum of the free enzyme but also between them. These results confirm the change to a T-state bound conformation elicited by the inhibitor malate and support that several distinct R-state conformations are elicited by the binding of the substrate PEP or the two kinds of allosteric activators.

3.3. Fragmentation patterns obtained by limited proteolysis

To further assess the possible existence of different active R-state conformations characteristic of the different complexes of *ZmPEPC-C₄* with its substrate or with any of its two kinds of allosteric activators, we

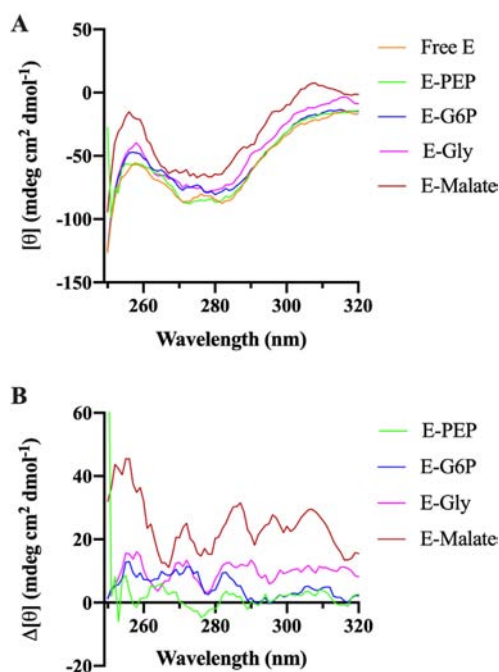


Figure 4. Circular dichroism studies. (A) Near-UV CD Spectra of *ZmPEPC-C₄* in the absence or presence of the substrate PEP or allosteric effectors. (B) Near-UV CD difference spectra were obtained subtracting the CD spectrum of the free enzyme from the CD spectrum of each enzyme complex. Ligands concentrations were: 10 mM PEP, 15 mM G6P, 100 mM Gly, and 10 mM malate.

conducted limited proteolysis experiments by subjecting the protein loaded with PEP, G6P, or Gly to trypsin digestion and comparing the fragmentation patterns and the rates of fragment formation and degradation with those of the free, non-ligand-bound enzyme (Figure 5A). Similar experiments were performed with the enzyme-malate complex to test whether the inactive T-state can also be detected using this experimental approach.

Trypsin quickly cleaved free *ZmPEPC-C₄*, while the ligand-bound enzyme forms were more resistant to digestion, particularly the complex enzyme-PEP. In the case of the free enzyme, after only 0.5 min incubation, a significant proportion of the intact protein was digested, producing a fragment of around 90 kDa, indicating a cleavage site very susceptible to trypsin proteolysis in the free enzyme. A second smaller fragment was also quickly formed, and after 60-min incubation, the protein was totally digested. The enzyme complexed with PEP was considerably more resistant to digestion, and the two major fragments formed, one of them in the first minutes of the incubation, accounted for almost all the initial amount of protein even after 120 min of incubation. In the enzyme-G6P complex, the intact protein was more quickly digested than in the enzyme-PEP complex, but not as quickly as in the free enzyme. After 15 min incubation, two major fragments were formed, but different from those formed in the complex enzyme-PEP, they were quite susceptible to further digestion. The digestion pattern of the enzyme-Gly complex is different from those of the enzyme-PEP and enzyme-G6P complexes, even though it would be expected the same active R-state in these three complexes if the MWC two-state allosteric model applied for *ZmPEPC-C₄*. After 15 min of incubation of the enzyme-Gly complex, three major fragments were formed. The amount of the fragment with the lower molecular mass increased with the digestion time and was very

resistant to further proteolysis. It accounted for most of the undigested protein after 120-min incubation, suggesting that it has not accessible trypsin-cleavage sites or that its cleavage was considerably slow. Finally, the intact protein in the complex enzyme-malate was initially almost as resistant to trypsin as in the enzyme-PEP complex, but the major fragment formed is not as trypsin-resistant as the one formed when PEP is bound, so that a considerable number of smaller fragments were formed in the following minutes of incubation. This finding suggests that this major fragment is partially unstructured and exposes several new trypsin cleavage sites. After 120 min of digestion, the protein was almost completely digested.

Interestingly, the differences in the fragmentation patterns between free *ZmPEPC-C₄* and its complexes with the substrate or allosteric effectors, as well as those between the four enzyme-complexes, were observed not only at the first minutes of incubation with trypsin but also at much longer times. Although we did not identify the different tryptic-cleavage sites in the studied enzyme complexes, the evolution of the fragmentation patterns during an extended time of incubation (up to 120 min) was also informative about the conformational states of *ZmPEPC-C₄* elicited by its ligands. Our findings indicate that the different high-mass peptides formed at short times have different susceptibility to trypsin digestion and therefore seem not to have the same conformation despite apparently having similar masses.

In summary, the differences in the digestion patterns of the free *ZmPEPC-C₄* enzyme and its different complexes indicate that some cleavage sites are more or less available for tryptic cleavage depending on the ligand-bound, thus revealing different conformational states in solution of this enzyme, as suggested by previous kinetic results. Thus, our results show that the trypsin digestion method is very sensitive to detecting different *ZmPEPC-C₄* conformations in solution. It allowed the detection of not only those conformations expected to be very different, as the T-state elicited by the inhibitor malate and the R-state elicited by the substrate, but also those conformations that probably are slightly different, as the R-states elicited by the substrate or any of the two kinds of allosteric activators. Therefore, tryptic digestion might be a powerful and straightforward method for exploring the conformational space available in PEPC enzymes in particular and in enzymes subjected to allosteric regulation in general.

3.4. Effects of incubation with trypsin in the activity and sensitivity to allosteric effectors

To further substantiate the above-described results, we measured the residual activity and sensitivity to allosteric effectors of the free enzyme and the different enzyme complexes during their incubation with trypsin for 60 min. The loss of activity, expressed as the percentage of the activities of the free enzyme and different enzyme complexes measured at time zero of incubation with trypsin, are shown in Figure 5B. The changes in sensitivity to malate, expressed as the percentage of the enzyme inhibition by 10 mM malate measured at time zero of incubation, are shown in Figure 5C.

Consistent with the digestion patterns, important differences were found between the free and ligand-bound enzymes. The free enzyme rapidly lost activity—which agrees with the observed rapid digestion of the protein—while the enzyme in complex with PEP retained an important percentage of its initial activity, even after 60 min-incubation (Figure 5B). The latter finding suggests that at least one of the two fragments formed in the trypsin digestion of the enzyme-PEP complex, presumably the one with the higher molecular mass, has an intact active site. To find out whether these fragments conserved the quaternary tetrameric arrangement of the intact enzyme we subjected a sample of the enzyme-PEP complex to trypsin digestion for 60 min and then to size exclusion chromatography. But we could not obtain an elution profile because the protein was retained in the pre-column filter, suggesting that these fragments are highly hydrophobic and aggregated at concentrations above the low ones used in the activity assays. The enzyme-G6P and

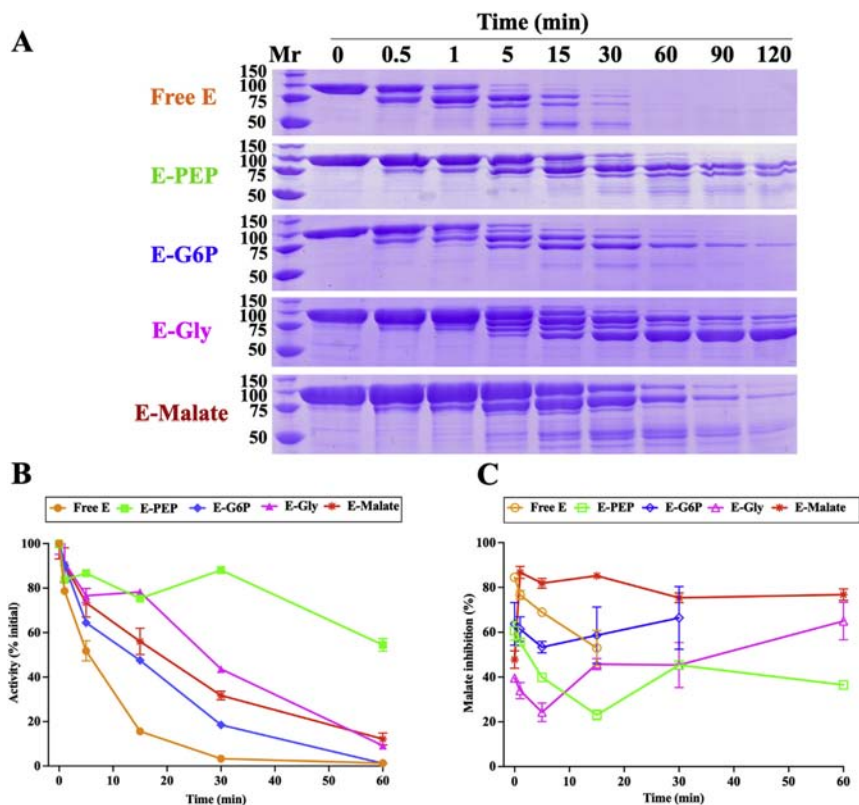


Figure 5. Limited proteolysis studies. *ZmPEPC-C₄* was incubated with trypsin in the absence or presence of the substrate PEP or allosteric effectors and samples were withdrawn at the indicated times. The fragmentation patterns were visualized by SDS-PAGE (A), or the residual enzymatic activity was measured either in the absence of any effector (B) or in the presence of 10 mM malate (C). Ligands concentrations were: 10 mM PEP, 15 mM G6P, 100 mM Gly, and 10 mM malate. In panel B are given the average activities values measured using the standard assay at each time of incubation, expressed as the percentage of the average activity value measured at time zero, which as U/mg prot was: free-E = 0.633 ± 0.007; E-PEP = 0.975 ± 0.020; E-G6P = 1.251 ± 0.028; E-Gly = 1.036 ± 0.071; E-malate = 0.205 ± 0.014. In panel C are given the values of the percentage of inhibition by 10 mM malate measured at each time of incubation. The percentage of inhibition values at time zero were: free-E = 84.5 ± 0.2; E-PEP = 60.7 ± 4.2; E-G6P = 63.7 ± 9.5; E-Gly = 39.5 ± 1.4; E-malate = 47.8 ± 3.9. Some malate inhibition values at the longer times are not included in panel C because the activity in the absence of malate was so low that the determination of the degree of inhibition by malate was not reliable. The differences in the values at time zero between the free enzyme and the enzyme complexes are due to the presence of the ligands in the samples of the complexes. The full, uncropped versions of the SDS-PAGE gels shown in panel A are provided in the Supplementary Material (Fig. S1).

enzyme-Gly complexes were also more stable against trypsin-provoked activity losses than the free enzyme (Figure 5B). Gly afforded higher protection than G6P, probably because the amount of the intact protein remaining during the incubation is higher in the enzyme-Gly complex than in the enzyme-G6P complex. Finally, the stabilizing effects of malate were intermediate between those of G6P and Gly, a result also consistent with the higher stabilization afforded by this inhibitor against trypsin digestion of the intact protein.

In all enzyme complexes, the enzyme that remained active through the incubation appears to be equally sensitive to activation by G6P and Gly as at zero time (data not shown), but in the free enzyme and the PEP- and G6P- complexes a rapid partial loss of sensitivity to malate was observed within the first 5 min of incubation (Figure 5C). This reduced malate inhibition might result from the removal of an N-terminal fragment, as previously reported [33]. On the contrary, the sensitivity for malate of the enzyme-malate complex rapidly increased upon incubation with trypsin (Figure 5C) for a so far unknown reason. This interesting observation deserves further investigation since it could shed light on the

structural bases of the mechanism of inhibition of PEPC enzymes by carboxylic acids.

3.5. Possible sites of trypsin cleavage

To further our understanding of the fragmentation patterns obtained, we next investigated the possible trypsin-cleavage sites in the *ZmPEPC-C₄* protein using the bioinformatics methods described in the Materials and Methods section.

It is known that trypsin cleaves proteins on the C-terminal side of lysine or arginine [34], and a total of 119 potential cleavage sites were predicted in *ZmPEPC-C₄* by the PeptideCutter tool. To narrow the selection of the probable cleavage-sites, and considering that the more accessible and protruding protein regions are the more likely to interact with trypsin, we carried out an analysis of the ASA and cx values of every protein residue using the available *ZmPEPC-C₄* crystal structures (Figure 6 A, B; Fig. S2 A, B; Fig. S3 A, B; Table S1). As possible cleavage sites, we selected lysine and arginine residues that: (i) show the high ASA

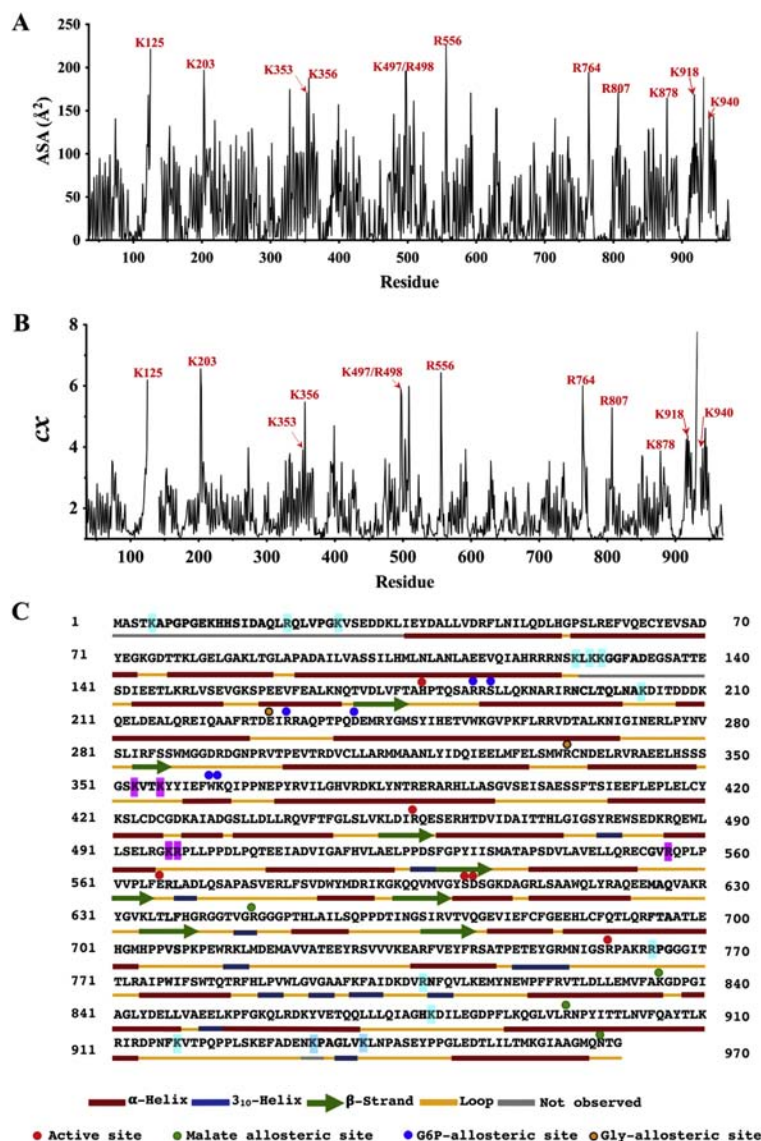


Figure 6. Prediction of trypsin-cleavage sites in *ZmPEPC-C₄* 5VYJ crystal structure. Of the three reported *ZmPEPC-C₄* R-state structures, this is the one exhibiting more residues with associated electronic density. Shown are the results obtained using chain A. The residues of the trypsin-cleavage sites, predicted according to the criteria given in the text, are shown, and their ASA (A) and cx (B) values are indicated by red arrows. (C) Protein sequence and topology showing the position of the predicted cleavage sites. In cyan and magenta are marked the residues where the most and less likely cuts, respectively, could occur. Active site and allosteric sites residues are marked with colored circles to compare their positions in the protein sequence to those of the predicted trypsin-cleavage sites.

and cx values, (ii) are at flexible loops that could allow the binding at the active site of the protease [35, 36, 37], and (iii) do not have aspartate or glutamate at one or two positions before lysine or arginine, because it is known that they greatly slow the rate of hydrolysis [38]. We did not consider the “Keil rule”, which proposes that cleavage does not occur if proline is after arginine or lysine [39], because this rule has been questioned given the abundance of cuts before proline in MS/MS data sets [40]. Applying these criteria, after a visual examination of the *ZmPEPC-C₄* amino acid sequence and the topology of its crystal structures (Figs. 6C, S1C, and S2C), combined with the results of the ASA and cx analysis, we propose that the most likely cleavage sites are Lys125, Lys203, Lys353/Lys356, Lys497/Arg498, Arg556, Lys762/Arg763, Lys807, Lys878, Lys918, and Lys940. In addition, we propose that Lys5, Arg21, Lys27, and Lys127/Lys128 also are probable trypsin-cleavage

sites since they are located in flexible regions—they did not show electronic density in any of the three reported R-state *ZmPEPC-C₄* crystal structures—and are not preceded by an acidic residue (Figs. 6C, S1C, and S2C, and Table S1). It seems reasonable to assume that, after cuts in the N-terminal segment, the peptide observed results from the cut at Lys27. Indeed, what we have called the intact enzyme in the experiments with the free enzyme and with the enzyme-PEP and enzyme-G6P complexes may be the one resulting from a cut at Lys27, which would be consistent with their rapid loss of sensitivity to malate, as mentioned. Nevertheless, in the enzyme-Gly complex, the complete protein could be the first band observed in the SDS-PAGE gels since malate sensitivity is retained. Cuts at Lys934 also are very likely. This is a very flexible residue, which is observed only in subunit A of the 6MGI structure where it is highly exposed.

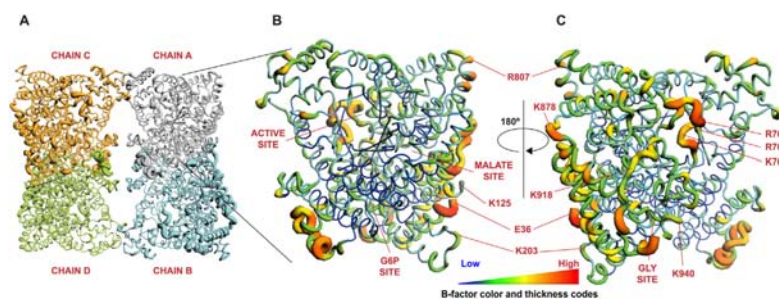


Figure 7. Mapping of the predicted trypsin-cleavage sites on the *ZmPEPC-C4* 5VYJ crystal structure. Sausage B-factors representation of the tetramer showing static disorder in some loops. The structure is colored according to monomer in (A) and according to B-factors values in (B) and (C). Residues predicted as the most likely trypsin-cleavage sites are shown in panels (B) and (C) mapped in chain A. The position of the first residue observed in the N-terminal region (Glu36) and well as the positions of the active and allosteric sites are indicated in panel (B).

It is clear that in the protein sequence, the predicted trypsin-cleavage sites are not close to either active or allosteric sites residues, as shown in Figure 6C. Thus, to further explore the protein regions where the predicted cuts may occur, we mapped these cleavage sites on the three-dimensional structure of *ZmPEPC-C4* (Figure 7A) and found that neither are they close to the active site or allosteric sites (Figure 7 B, C). Therefore, it seems that the differences in their susceptibility to trypsin cleavage do not arise from protection by a particular ligand bound to the enzyme.

By visual inspection of the structure, it can be seen that cuts at Lys497/Arg498 and Arg556 cannot occur because they are located at the dimer-dimer interface of the tetramer (note that our predictions were based on these residues being highly exposed in the monomer used for the accessibility estimations) and therefore not accessible to the protease in the native enzyme. Similarly, cuts at Lys353/Lys356 are not probable since these residues are at the monomer interface in dimeric units. This deduction is consistent with the absence of digestion fragments of the corresponding size at the shorter incubation times. The other predicted cleavage sites are exposed in the tetramer and are located in very flexible regions or loops, as indicated by either their lack of electronic density or high α -B factor values compared with the average value (Figure 7 B, C). In particular, these sites are at 1) the N-terminal region—not observed in the three reported *ZmPEPC-C4* R-state crystal structures—, 2) at the

Ser125- Ile144 loop—part of which is not observed in any of these R-state structures—, 3) at the Asn755-Arg773 loop that forms the active site lid—which is observed in the 5VYJ structure but is disordered at Lys762/Arg763/Arg764 in the 1JQO and 6MGI structures—, and 4) at the Pro915-Glu932 loop—which was completely observed only in subunit A of the 6MGI structure. In subunit B of the asymmetric unit of 6MGI and every subunit of 1JQO and 5VYJ, the short segment of Pro915-Glu932 loop not observed includes Lys934 (Figs. 6C, S1C, and S2C). A combination of cuts at the predicted trypsin-susceptible sites in these loops, plus the ones located in the flexible regions without electronic density in the crystal structures, could account for the observed digestion fragments in the different enzyme complexes, as shown in Table 1. Interestingly, it was reported that the incubation of the free *EcPEPC* enzyme with trypsin produced a cut at Arg703 [41], which is the arginine residue equivalent to Arg763 of *ZmPEPC-C4* predicted by us as a highly possible cleavage site in the maize enzyme.

Our findings of distinct trypsin-fragmentation patterns of the free enzyme and the different enzyme complexes suggest that the conformation of the above-mentioned flexible regions at the protein surface—which, as said before, are not directly involved in binding of the substrate PEP or of the allosteric effectors—are very sensitive to the binding of the different ligands. Also, they might play essential roles in the catalysis or allosteric regulation of the *ZmPEPC-C4* isozyme and, presumably, of plant PEPC enzymes in general. The N-terminal region before $\alpha 1$ and the loops mentioned above may also be necessary for bacterial PEPC enzymes. However, some of them are shorter than those present in the plant enzymes, as can be seen in the reported *EcPEPC* crystal structures (PDB codes 1FIY, 1QB4, and 1JQN) [41, 42, 43]—an enzyme in which multiple conformational states have also been detected in solution [22, 23, 44, 45, 46]. The whole loop of the active site lid—to which Lys762/Arg763/arg764 (*ZmPEPC-C4* numbering) belong—is also present in the bacterial enzymes, and its amino acid sequence is highly conserved in both bacterial and plant PEPCs, supporting a critical role in the function of these enzymes.

Different conformations have been well documented in several allosteric proteins, particularly in hemoglobin, where closely related conformational states with different tertiary structures have been proposed to explain the binding properties of this protein [47, 48, 49, 50] and references therein]. Other allosteric enzymes may also present different R-states, as is the glucosamine-6-phosphate deaminase from *E. coli*, whose different R-states were demonstrated by fluorescence spectroscopy [51]. Regarding PEPC enzymes, the great conformational flexibility that gives rise to the multiplicity of ligand-induced, or ligand-stabilized, conformational states appears to be a general feature of PEPC enzymes and not only of the *EcPEPC* previously reported.

4. Conclusions

The results from the combined experimental and bioinformatic methods used in this work support the existence of multiple

Table 1. Molecular masses of possible peptides obtained after tryptic digestion of *ZmPEPC-C4*. Possible trypsin-cleavage sites were predicted according to the criteria stated in the text. Molecular masses were estimated using the ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>). Only the peptides of high molecular mass (Mr) are included in this analysis. The intact recombinant enzyme used has 971 residues and a Mr value of 109,416 Da.

Peptide	Number of residues	Mr (Da)
K27-K940	912	103,267
K27-K934	907	102,857
K27-K918	891	101,075
K27-R878	851	96,385
K27-R807	780	88,116
K27-R764	737	83,306
K125-K940	814	92,447
K125-K934	808	91,882
K125-K918	792	90,100
K125-K878	753	85,565
K125-K807	682	77,297
K125-R764	639	72,487
K203-K940	736	83,850
K203-K918	714	81,502
K203-K878	675	76,968
K203-K807	604	68,699
K203-R764	561	63,889

conformations of *ZmPEPC-C₄* in solution and point out the importance of certain flexible regions at the protein surface for the PEPC enzymes dynamics underlying their function and allosteric regulation. Together, our results contribute to understanding the complex allosteric regulation of PEPC enzymes in general and of the plant *ZmPEPC-C₄* isozyme in particular, which is an important biotechnological target in the efforts to increase crops yields.

Declarations

Author contribution statement

Fátima Barreda-Huerta: Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data.

Ismael Bustos-Jaimes: Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data.

Carlos Mújica-Jiménez: Performed the experiments.

Rosario A. Muñoz-Clares: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Funding statement

Rosario A. Muñoz-Clares was supported by UNAM, grant PAPIIT IN216911. Fátima Barreda-Huerta was supported by a CONACYT scholarship.

Data availability statement

Data will be made available on request.

Declaration of interests statement

The authors declare no conflict of interest.

Additional information

Supplementary content related to this article has been published online at <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08464>.

Acknowledgements

We acknowledge the participation of the deceased Dr. G. Mendoza, Faculty of Medicine, UNAM, in preliminary mass spectrometry experiments.

References

- M.D. Hatch, C₄ photosynthesis: an unlikely process full of surprises, *Plant Cell Physiol.* 33 (1992) 333–342.
- C.S. Andreo, D.H. González, A.A. Iglesias, Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase: structure and regulation, *FEBS Lett.* 213 (1987) 1–8.
- R. Chollet, J. Vidal, M.H. O'Leary, Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1996) 273–298.
- K. Izui, H. Matsumura, T. Furumoto, Y. Kai, Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology, *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 (2004) 69–84.
- K.F. Wong, D.D. Davies, Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Zea mays* by metabolites, *Biochem. J.* 131 (1973) 451–458.
- H.D. Doncaster, R.C. Leegood, Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity in maize leaves, *Plant Physiol.* 84 (1987) 82–87.
- V. Bandarian, W.J. Poehner, S.D. Grover, Metabolite activation of crassulacean acid metabolism and C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase, *Plant Physiol.* 100 (1992) 1411–1416.
- A. Tovar-Méndez, R. Rodríguez-Sotres, D.M. López-Valentín, R.A. Muñoz-Clares, Re-examination of the roles of PEP and Mg²⁺ in the reaction catalysed by the phosphorylated and non-phosphorylated forms of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of *Zea mays*: effects of the activators glucose 6-phosphate and glycine, *Biochem. J.* 332 (1998) 633–642.
- A. Tovar-Méndez, C. Mújica-Jiménez, R.A. Muñoz-Clares, Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase, *Plant Physiol.* 123 (2000) 149–160.
- T. Nishikido, H. Takanashi, Glycine activation of PEP carboxylase from monocotyledonous C₄ plants, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53 (1973) 126–133.
- J. Gillinta, S.D. Grover, Kinetic interactions of glycine with substrates and effectors of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves, *Photosynth. Res.* 45 (1995) 121–126.
- S.C. Huber, G.E. Edwards, Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄ plants by malate and aspartate, *Can. J. Bot.* 53 (1975) 1925–1933.
- D.H. González, A.A. Iglesias, C.S. Andreo, On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity from maize leaves by L-malate. Effect of pH, *J. Plant Physiol.* 116 (1984) 425–434.
- R.C. Leegood, The intercellular compartmentation of metabolites in leaves of *Zea mays* L., *Planta* 164 (1985) 163–170.
- J. Frank, J. Vater, J.F. Holzwarth, Kinetics and equilibrium binding of phosphoenolpyruvate to phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1 (1999) 455–461.
- J. Frank, R.J. Clarke, J. Vater, J.F. Holzwarth, Influence of allosteric effectors on the kinetics and equilibrium binding of phosphoenolpyruvate (PEP) to phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) from *Zea mays*, *Biophys. Chem.* 30 (2001) 53–64.
- J. Monod, J. Wyman, J. Changeux, On the nature of allosteric transitions. A plausible model, *J. Mol. Biol.* 12 (1965) 88–118.
- C. Mújica-Jiménez, A. Castellanos-Martínez, R.A. Muñoz-Clares, Studies of the allosteric properties of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase with the phosphoenolpyruvate analog phosphomycin as activator, *Biochim. Biophys. Acta* 1386 (1998) 132–144.
- H. Matsumura, Y. Xie, S. Shirakata, T. Inoue, T. Yoshinaga, Y. Ueno, K. Izui, Y. Kai, Crystal structures of C₄ form maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylases, *Structure* 10 (2002) 1721–1730.
- L. González-Segura, C. Mújica-Jiménez, J.A. Juárez-Díaz, R. Güemez-Toro, L.P. Martínez-Castilla, R.A. Muñoz-Clares, Identification of the allosteric site for neutral amino acids in the maize C₄ isozyme of phosphoenolpyruvate carboxylase: the critical role of Ser-100, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 9445–9957.
- R.A. Muñoz-Clares, L. González-Segura, J. Andrés Juárez-Díaz, C. Mújica-Jiménez, Structural and biochemical evidence of the glucose 6-phosphate-allosteric site of maize C₄-phosphoenolpyruvate carboxylase: its importance in the overall enzyme kinetics, *Biochem. J.* 477 (2020) 2095–2114.
- T. Yoshinaga, Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*: studies on multiple conformational states elicited by allosteric effectors with fluorescence probe, 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate, *Biochim. Biophys. Acta* 452 (1976) 566–579.
- I. Kameshita, K. Izui, H. Katsuki, Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*: effect of proteolytic modification on the catalytic and regulatory properties, *J. Biochem.* 86 (1979) 1–10.
- E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, A. Bairoch, ExPASy, The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3784–3788.
- U.K. Laemli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- Z. Bikadi, E. Hazai, Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock, *J. Cheminf.* 15 (2009) 1–16.
- C.S. De Magalhães, D.M. Almeida, H.J.C. Barbosa, L.E. Dardenne, A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking of highly flexible ligands, *Inf. Sci.* 289 (2014) 206–224.
- A. Pintar, O. Carugo, S. Pongor, CX, an algorithm that identifies protruding atoms in proteins, *Bioinformatics* 18 (7) (2002) 980–984.
- D. Frishman, P. Argos, Knowledge-based protein secondary structure assignment, *Proteins* 23 (1995) 566–579.
- G.H. Dodd, G.K. Radda, 1-Anilinonaphthalene-8-sulphonate, a fluorescent conformational probe for glutamate dehydrogenase, *Biochem. J.* 114 (1969) 407–417.
- A. Tovar-Méndez, H. Yampara-Iquise, C. Mújica-Jiménez, R.A. Muñoz-Clares, Binding of ligands to the glucose-6-phosphate allosteric site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase, in: P. Mathis (Ed.), *Photosynthesis: from Light to Biosphere* 5, Kluwer, Dordrecht, 1995, pp. 155–158.
- R. Güemez-Toro, C. Mújica-Jiménez, R.A. Muñoz-Clares, Allosteric regulation of the photosynthetic C₄ isoenzyme of phosphoenolpyruvate carboxylase: a comparative study between enzymes from monocot and eudicots, *J. Mex. Chem. Soc.* 56 (2012) 58–66.
- Y.H. Wang, M.G. Duff, L. Lepiniec, C. Créton, G. Sarath, S.A. Condon, J. Vidal, P. Gadal, R. Chollet, Site-directed mutagenesis of the phosphorylatable serine (Ser8) in C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum. The effect of negative charge at position 8, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 16759–16762.
- J.V. Olsen, S.E. Ong, M. Mann, Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues, *Mol. Cell. Proteomics* 3 (2004) 608–614.
- N. Abramowitz, I. Schechter, A. Berger, On the size of the active site in proteases. II. Carboxypeptidase-A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29 (1967) 862–867.
- S.J. Hubbard, P. Argos, Cavities and packing at protein interfaces, *Protein Sci.* 3 (1994) 2194–2206.
- S.J. Hubbard, R.J. Beynon, J.M. Thornton, Assessment of conformational parameters as predictors of limited proteolytic sites in native protein structures, *Protein Eng. Des. Sel.* 11 (1998) 349–359.

- [38] T. Šlechtová, M. Gilar, K. Kalčíková, E. Tesařová, Insight into trypsin miscleavage: comparison of kinetic constants of problematic peptide sequences, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7636–7764.
- [39] B. Keil, Essential substrate residues for action of endopeptidases, in: *Specificity of Proteolysis*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1992.
- [40] J. Rodríguez, N. Gupta, R.D. Smith, P.A. Pevzner, Does trypsin cut before proline? *J. Proteome Res.* 7 (2008) 300–305.
- [41] Y. Kai, H. Matsumura, T. Inoue, K. Terada, Y. Nagara, T. Yoshinaga, A. Kihara, K. Tsumura, K. Izui, Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: a proposed mechanism for allosteric inhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 96 (1999) 823–828.
- [42] H. Matsumura, M. Terada, S. Shirakata, T. Inoue, T. Yoshinaga, K. Izui, Y. Kai, Plausible phosphoenolpyruvate binding site revealed by 2.6 Å structure of Mn^{2+} -bound phosphoenolpyruvate carboxylase from *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* 458 (1999) 93–96.
- [43] H. Matsumura, Y. Xie, S. Shirakata, T. Inoue, T. Yoshinaga, Y. Ueno, Y.K. Izui, Y. Kai, Crystal structures of C4 from maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylases, *Structure* 10 (2002) 1721–1730.
- [44] K. Izui, Kinetic studies on the allosteric nature of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Escherichia coli*, *J. Biochem.* 68 (1970) 227–238.
- [45] K. Izui, Effects of high pressure on the stability and activity of allosteric phosphoenolpyruvate carboxylase from *Escherichia coli*, *Biochemistry* 73 (1973) 505–513.
- [46] H. Teraoka, K. Izui, H. Katsuki, Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Multiple conformational states elicited by allosteric effectors, *Biochemistry* 13 (1974) 5121–5128.
- [47] C. Viappiani, S. Bettati, S. Bruno, L. Ronda, S. Abbruzzetti, A. Mozzarelli, W.A. Eaton, New insights into allosteric mechanisms from trapping unstable protein conformations in silica gels, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 101 (2004) 14414–14419.
- [48] W.A. Eaton, E.R. Henry, J. Hofrichter, S. Bettati, C. Viappiani, A. Mozzarelli, Evolution of allosteric models for hemoglobin, *IUBMB Life* 59 (2007) 586–599.
- [49] N. Shibayama, K. Sugiyama, S.Y. Park, Structures and oxygen affinities of crystalline human hemoglobin C ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$) in the R and R2 quaternary structures, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 33661–33668.
- [50] N. Shibayama, Allosteric transitions in hemoglobin revisited, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1864 (2020) 129335.
- [51] I. Bustos-Jaimes, M. Ramírez-Costa, L. De Anda-Aguilar, P. Hinojosa-Ocaña, M.L. Calcagno, Evidence for two different mechanisms triggering the change in quaternary structure of the allosteric enzyme, Glucosamine-6-phosphate deaminase, *Biochemistry* 44 (2005) 1127–1135.