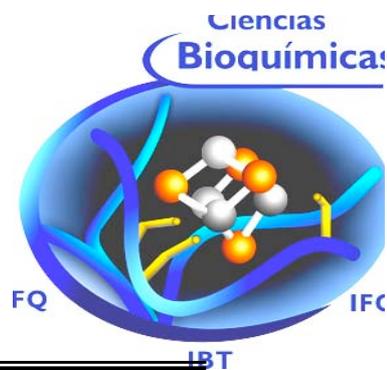




**Universidad Nacional Autónoma
de México**



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

*Estudio de los cambios
conformacionales de la enzima
fosfoenolpiruvato carboxilasa de hojas de maíz
inducidos por sus ligandos*

**TESIS QUE PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
PRESENTA
Q.F.B. FÁTIMA BARREDA
HUERTA**



MÉXICO D.F. Mayo 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

La presente tesis se realizó en el laboratorio 102 del departamento de bioquímica, de la facultad de química. Estuvo bajo la dirección de la Doctora Rosario A. Muñoz Clares. El comité tutorial estuvo formado por:

Dra. Rosario A. Muñoz Clares

Dra. Adela Rodríguez Romero

Dr. Guillermo Mendoza Hernández

El jurado de examen para la obtención de grado estuvo constituido por:

PRESIDENTE

Dra. Marietta Tuena Sangri

VOCAL

Dr. Mario Luis Calcagno Montans

SECRETARIO

Dr. Guillermo Mendoza Hernández

SUPLENTE

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

SUPLENTE

Dr. Alejandro Sosa Peinado

Durante los estudios de Maestría gocé de la beca otorgada por CONACYT, número de registro 183655 y de la beca del Sistema Nacional de Investigadores.

*Yo quiero viajar lo más lejos posible
quiero alcanzar la alegría que hay en mi alma,
cambiar las limitaciones que conozco
y sentir como crecen mi espíritu y mi mente.*

*Yo quiero vivir, existir, "ser",
y oír las verdades que hay dentro de mí.*

Nuevos Rumbos

*Al ángel que guía mi vida,
mi sonrisa bella...*

A Paloma, con todo mi ser...

Mi más profundo agradecimiento:

A **Dios** por darme la oportunidad de existir, sentirme elegida, amar, escuchar, aprender, llorar, reír...

A mis señores padres **Rufina y Delfino** por su ayuda incondicional, sin ésta no hubiera podido continuar. Le agradezco a Dios que sean mis padres...

A mi hermano *Miguel Ángel*, Neli y el pequeño *Christopher*, por estar en mi camino. Dios los bendiga siempre...

A la *Doctora **Rosario A. Muñoz Clares*** por permitirme pertenecer a su equipo de trabajo, aceptar ser mi guía en este desafiante viaje, por corregirme y hacerme crecer como profesionalista; *es un honor pertenecer a su grupo de investigación...*

Al Biólogo **Carlos Mújica** (El maestro, amigo y confidente), por sus invaluable enseñanzas, su paciencia y ayuda en todos los sentidos, por escucharnos: **GRACIAS**.

A Rodrigo, Lilian, Víctor Javier, Ángel Gabriel, Liliana, Alicia y Carmina; Lilia Angélica, Daniel y Javier Andrés por hacer aun más grato el trabajo en el laboratorio, ustedes también son mi familia, con todo mi afecto.

A la Señora **Leticia García Gutiérrez**, por considerar nuestros asuntos académicos como propios.

A los Doctores Adela Rodríguez Romero y Guillermo Mendoza Hernández (Miembros de mi comité tutorial). Así mismo a los Doctores Marietta Tuena Sangri, Mario Luis Calcagno Montans, Rogelio Rodríguez Sotres y Alejandro Sosa Peinado (Sinodales). *Por su paciencia y sus valiosos comentarios acerca de mi trabajo.*

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y al **Posgrado de Bioquímica**, por que estar aquí, me ha cambiado la vida.

Al CONACyT y Sistema Nacional de Investigadores, por la beca que me otorgaron e hicieron posible la realización de este trabajo.

Abreviaturas

ANS	Ácido 1-Anilino-8-naftaleno sulfónato
C4PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa isoforma C4
C4ZmPEPC	Isoforma C ₄ de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de hojas de maíz
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
DCDP	3,3-dicloro-2-dihidroxifosfinoilmetil-2-propenoato
EcPEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido Etilen diamino tetraacético
Glc6P	Glucosa-6-fosfato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanesulfónico
KNF	Kohsland-Nemety-Filmer
MWC	Monod-Wyman-Changeux
MDH	Enzima malico deshidrogenasa
OAA	Oxalacetato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PEPMg	Complejo formado por el fosfoenolpiruvato y el catión
Rubisco	Ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante

INDICE

RESUMEN	3
1.INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	
2.1 <i>Una nueva era en el estudio de las enzimas alostéricas</i>	6
2.2 Fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz (C4ZmPEPC).....	8
2.2.1 <i>Reacción catalizada</i>	8
2.2.2 <i>Distribución y función biológica</i>	9
2.2.3 <i>Participación de PEPC en el ciclo C4</i>	9
2.2.4 <i>Genes que codifican a diferentes isoformas de PEPCs</i>	11
2.2.5 <i>Evolución de la isoforma C4 de la PEPC</i>	12
2.2.6 <i>Mecanismo cinético de C4ZmPEPC</i>	14
2.2.7 <i>Mecanismo de reacción de PEPC</i>	15
2.2.8 <i>Regulación de C4ZmPEPC por metabolitos</i>	18
2.2.9 <i>Regulación de C4ZmPEPC por modificación covalente reversible</i>	21
2.2.10 <i>Mecanismo de regulación alostérica de C4ZmPEPC</i>	22
2.2.10.1 <i>Modelo de asociación-disociación</i>	22
2.2.10.2 <i>Modelo concertado de transición alostérica</i>	23
2.2.11 <i>Estructura tridimensional de C4ZmPEPC</i>	24
2.2.11.1 <i>Sitio activo de C4ZmPEPC</i>	27
2.2.11.2 <i>Sitios alostéricos de C4ZmPEPC</i>	32
2.2.11.2 a) <i>Sitio alostérico de ácidos dicarboxílicos</i>	32
2.2.11.2 b) <i>Sitio alostérico de azúcares fosforilados</i>	34
2.2.11.2 c) <i>Sitio alostérico de aminoácidos neutros</i>	37
2.3 <i>Técnicas usadas en el estudio de los cambios conformacionales de las proteínas</i>	38
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	41
5.1 <i>Objetivo general</i>	41
5.2 <i>Objetivos particulares</i>	41
6. MATERIALES Y MÉTODOS	42
6.1 <i>Reactivos</i>	42

6.2 Métodos.....	42
6.2.1 Purificación y ensayo de actividad de C4ZmPEPC.....	42
6.2.2 Determinación de la concentración de proteína.....	43
6.2.3 Experimentos de unión al equilibrio mediante fluorescencia extrínseca.....	43
6.2.4 Análisis de los datos.....	44
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
7.1 Titulación de la enzima por sus ligandos en presencia y ausencia de glicerol.....	45
7.2 Unión de PEP a la enzima saturada con activadores o inhibidor.....	52
7.3 Unión de Glc6P a la enzima saturada con el sustrato, Gly o malato.....	55
7.4 Unión de Gly a la enzima saturada con PEP, Glc6P o malato.....	58
7.5 Unión del inhibidor malato a la enzima saturada con PEP y activadores.....	62
8. CONCLUSIONES.....	66
9. PERSPECTIVAS.....	66
10. REFERENCIAS.....	68

RESUMEN

La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC, EC 4.1.1.31) cataliza la carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) a expensas de bicarbonato, para formar el oxalacetato y fósforo inorgánico. La reacción requiere de iones magnesio pues el sustrato preferido por la enzima es PEP_{Mg} y el metal estabiliza el enolato intermediario de la reacción. Esta reacción es el primer paso de la vía de asimilación de CO₂ atmosférico en plantas C₄ como el maíz. La PEPC de hoja de maíz (C₄ZmPEPC) está sujeta a una compleja regulación alostérica que involucra efectos homotrópicos (cooperatividad positiva en la unión de su sustrato y activadores alostéricos) así como efectos heterotrópicos tanto positivos (activación por azúcares fosfato y aminoácidos neutros) como negativos (inhibición por ácidos dicarboxílicos). Igual que en las otras isoenzimas PEPC fotosintéticas de las plantas C₄, la C₄ZmPEPC está fosforilada durante el día y no fosforilada durante la noche. Esta modificación covalente aumenta su afinidad por el sustrato y modula su respuesta a los efectores alostéricos. Se ha propuesto que la regulación alostérica de la enzima ocurre de acuerdo con el modelo de dos estados de Monod-Wyman-Changeux (MWC). Sin embargo, resultados de nuestro grupo de investigación muestran que la regulación es aun más compleja, involucrando a más de dos estados conformacionales. Para estudiar estos estados conformacionales, caracterizamos la unión al equilibrio bajo condiciones no catalíticas del sustrato PEP y de los efectores alostéricos en presencia y ausencia de glicerol en el medio, utilizando para ello la fluorescencia extrínseca del ANS. Encontramos diferencias muy importantes en el cambio máximo-mínimo de fluorescencia en los complejos enzima-PEP, enzima-Glc6P y enzima-Gly, que indican que los estados conformacionales producidos por el sustrato, y los activadores Glc6P y Gly son diferentes, lo que nos lleva a concluir que la C₄ZmPEPC posee al menos tres conformaciones de alta afinidad diferentes entre ellas.

1. INTRODUCCIÓN

En relación con los estudios realizados en otras áreas de la bioquímica, los de las proteínas alostéricas son comparativamente pocos (Figura 1). Esto se debe a que los sistemas alostéricos no son fáciles de estudiar por su gran complejidad (Lindsley and Rutter, 2006). La enzima PEPC de hojas de maíz (C4ZmPEPC) tiene particularidades que la hacen única entre las enzimas alostéricas, por lo que el estudio de la C4ZmPEPC ofrece un reto muy interesante. Aunque la C4ZmPEPC ya ha sido objeto de intensa investigación, no siempre muy rigurosa, aún no se conocen aspectos muy importantes de su mecanismo de regulación. Creemos que la detección y caracterización funcional y estructural de los estados conformacionales de la C4ZmPEPC, que iniciamos con este trabajo será un paso muy importante para establecer el mecanismo de regulación alostérica de esta importante y sumamente compleja enzima. Las proteínas alostéricas han sido objeto de numerosos estudios durante los últimos años como blanco biotecnológico para fines farmacológicos, terapéuticos o agrícolas. El conocimiento de los aspectos más importantes de los mecanismos de regulación alostérica, junto con la aplicación de técnicas de biología molecular permitirá a los investigadores usar los genes que codifican a proteínas alostéricas para dotar a otros sistemas de características o propiedades novedosas y deseables. Indudablemente uno de los factores que está limitando el éxito de muchos de estos experimentos es que no se conocen a fondo las propiedades de estas enzimas. El aportar nuevo conocimiento al campo de las proteínas alostéricas podría facilitar en un futuro la manipulación de procesos bioquímicos, lo que es necesario para enfrentar muchas de las necesidades que demanda la sociedad actual. Por ejemplo, la relevancia de la isoforma fotosintética de la PEPC de plantas C4 en la productividad de estas plantas ha llevado a varios investigadores a usar el gen que la codifica en experimentos de ingeniería genética, tratando de crear características C4 en plantas C3, sin éxito hasta el momento (Furbank and Taylor, 1995). Éste es un reto muy difícil porque son muchos los genes involucrados en la ruta C4, pero indudablemente uno de

los factores que está limitando el éxito de estos experimentos es que no se conocen a fondo las propiedades de las enzimas involucradas en esta ruta, en particular las de la isoforma C4 de PEPC.

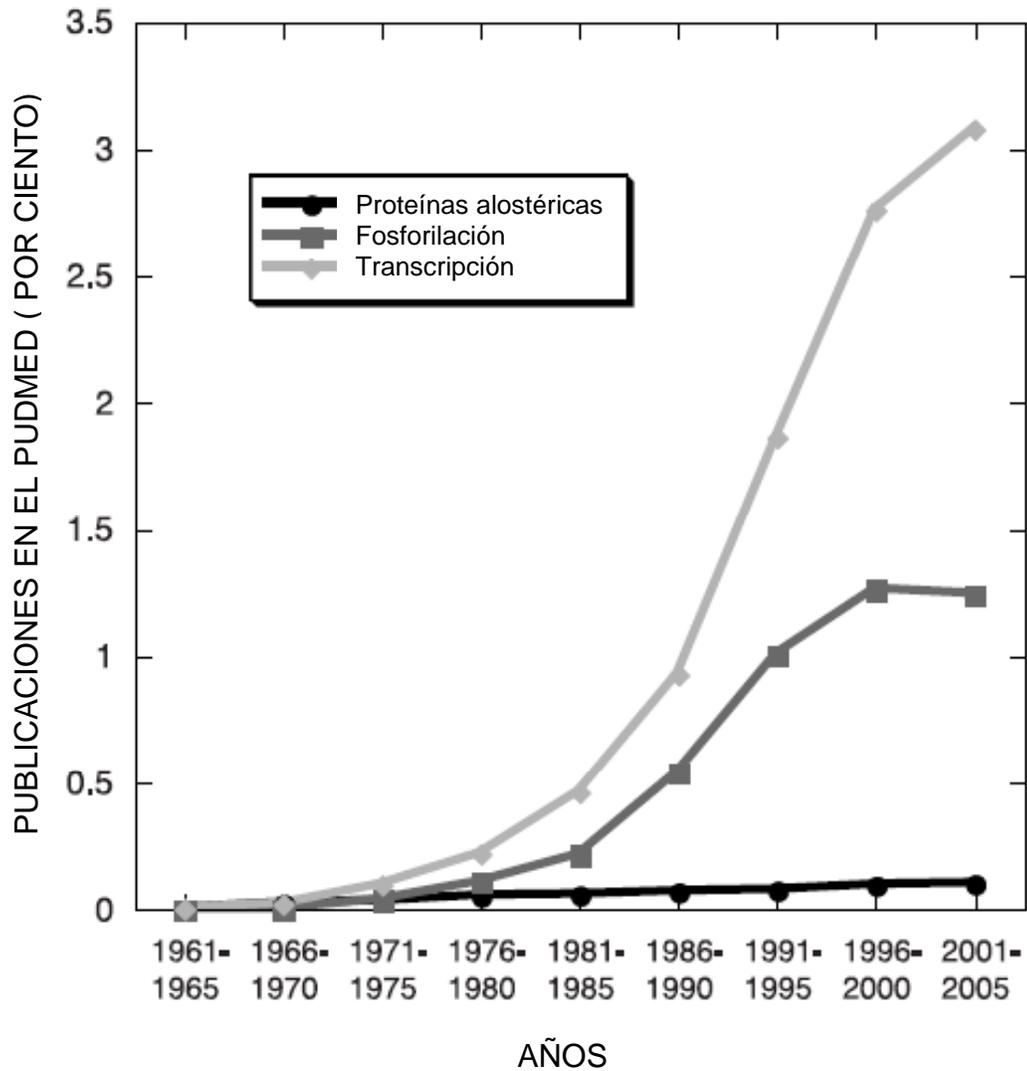


Figura 1. Artículos registrados en el PUDMED (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi) en tres diferentes áreas de la bioquímica durante las últimas cuatro décadas. Tomado de Lindsley and Rutter. (2006).

2. ANTECEDENTES

2.1 Una nueva era en el estudio de las enzimas alostéricas

El avance en los programas de cómputo y de técnicas altamente sofisticadas que permiten estudiar las transiciones alostéricas ha hecho posible estudiar a las proteínas como sistemas dinámicos. Gracias a estas técnicas podemos obtener información acerca del mecanismo de regulación, ya sea de tipo alostérico o mnemónico, de múltiples enzimas, ya que nos permiten estudiarlas como sistemas dinámicos. Se acepta hoy en día que todas las proteínas existen como un conjunto dinámico de subconformaciones, que pueden originarse por fluctuaciones de átomos individuales o rearrreglos conformacionales que involucran movimientos de dominios o asas. Estos movimientos ocurren en escalas que van desde picosegundos hasta milisegundos. Pero ¿cómo se relaciona la dinámica molecular con el cambio conformacional alostérico? Existe evidencia de que los cambios conformacionales de las proteínas suceden no sólo cuando son inducidos por la unión de un ligando sino también en la ausencia de esta unión. De tal forma, que es posible generalizar los modelos alostéricos tradicionales en un modelo único en el que un determinado ligando se unirá preferencialmente a una de las conformaciones posibles, provocando un cambio en la energía libre y desplazando el equilibrio hacia el conformero más estable (Figura 2).

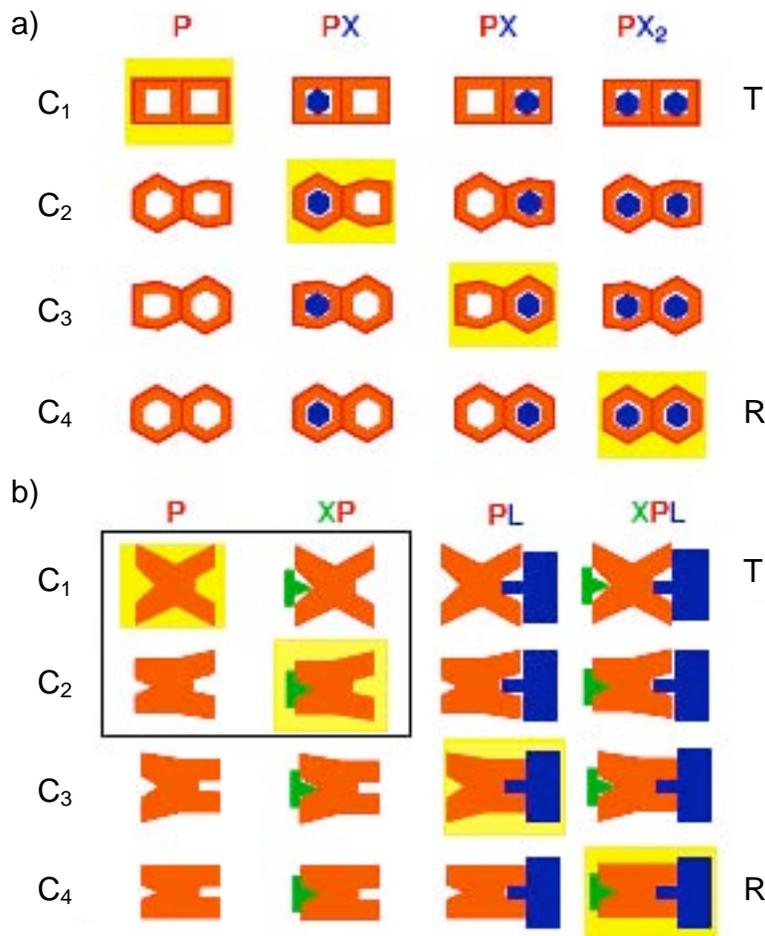


Figura 2. Modelo general de interacciones alostéricas (a) homotrópicas y (b) heterotrópicas entre dos ligandos (X) involucrados en el cambio conformacional. Se plantea aquí que la proteína libre puede adoptar todos los estados conformacionales posibles, por lo que la unión de un ligando simplemente desplazará la población de conformaciones. La figura considera el modelo MWC (estados T y R en las filas C1 y C4, de ambos paneles), según el cual en cualquier momento todas las subunidades de una molécula pueden estar en la misma conformación R o T (equilibrio preexistente), en este modelo no son permitidos ambas conformaciones en la misma molécula debido a que las subunidades tendrían interacciones poco favorables. El modelo KNF se muestra con fondo amarillo de forma diagonal en la figura, en éste modelo el ligando induce un cambio conformacional después de unirse a la enzima y además permite que coexistan ambas conformaciones en la misma molécula, es decir, permite la existencia de subunidades mixtas o híbridas. El panel (b) muestra que las proteínas alostéricas pueden ser monoméricas y los ligandos pueden ser otras proteínas (L). Los estados intermedios (filas C2 y C3) muestran que el sitio de unión desocupado cambia hacia la conformación que resulta de la unión del ligando (C4). La línea negra indica un equilibrio preexistente. Tomado de Kern and Zuiderweg, (2003).

2.2 Fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz (C4ZmPEPC)

Existen en la literatura excelentes revisiones sobre C4ZmPEPC (Chollet et al., 1996; Kai et al., 2003; Miyao and Fukayama, 2003; Nimmo, 2003; Svensson et al., 2003; Izui et al., 2004; Takahashi-Terada et al., 2005). A continuación, describiré aquellas características de esta interesante enzima que considero importantes para la comprensión de este trabajo.

2.2.1 Reacción catalizada

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (ortofosfato: oxaloacetato carboxilasa fosforilante, PEPC; EC 4.1.1.31) cataliza la carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato a expensas de bicarbonato, para formar el oxaloacetato, y fosfato inorgánico (Figura 3). La reacción requiere un catión divalente que *in vivo* es Mg^{2+} (Bandurski, 1955; Tchen and Vennesland, 1955). *In vitro*, la enzima puede también usar Mn^{2+} ó Co^{2+} (Miziorko et al., 1974; Nguyen et al., 1988). Esta carboxilación ocurre en el citosol de las células de mesófilo y es independiente de biotina como cofactor (Cooper and Wood, 1971; Mukerji, 1977), siendo ésta la única carboxilasa dependiente de bicarbonato que no necesita este cofactor.

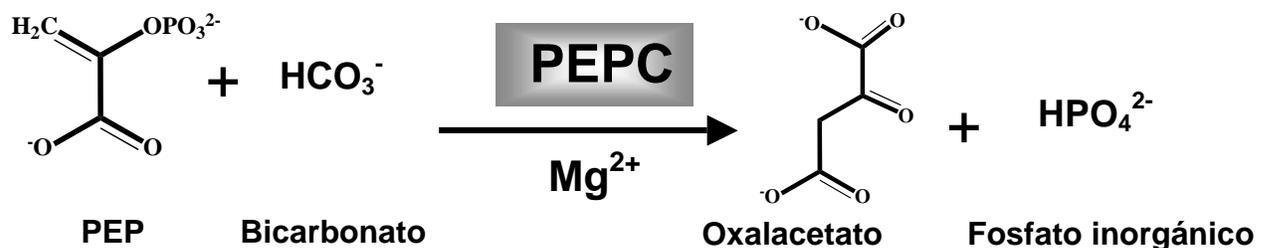


Figura 3. Reacción catalizada por PEPC (Bandurski, 1955).

2.2.2 Distribución y función biológica

La enzima PEPC está presente en organismos fotosintéticos como plantas, cianobacterias y algas, y en organismos no fotosintéticos, como algunas bacterias y protozoarios, pero ausente en hongos y animales (Chollet et al., 1996; Izui et al., 2004). En estos organismos llevan a cabo diversas funciones (Toh et al., 1994) que permiten agrupar a las diferentes isoenzimas de PEPC en dos grandes categorías: a) PEPC de organismos no fotosintéticos, de hojas de plantas C3 y de tejidos no fotosintéticos de todo tipo de plantas, que está involucrada en funciones anapleróticas (reabastecimiento de oxaloacetato al ciclo del ácido cítrico para la síntesis de aminoácidos y porfirinas) o aportando esqueletos carbonados para el metabolismo de fijación de nitrógeno en raíz (Lepiniec et al., 1993) entre otras funciones, y b) PEPC de tejido fotosintético de plantas C4 y CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas), que está asociada a la fijación inicial del CO₂ atmosférico en el proceso fotosintético de estas plantas (Hatch and Slack, 1970; Hatch, 1987).

2.2.3 Participación de PEPC en el ciclo C4

La reacción catalizada por la isoenzima fotosintética de la PEPC de hojas de plantas C4 es el primer paso en la ruta de asimilación de CO₂ en estas plantas, como el maíz, consideradas de alta productividad. La asimilación de CO₂ por la mayor parte de los organismos fotosintéticos se lleva a cabo a través de la ruta C3, mejor conocida como Ciclo de Calvin. Las plantas C3 tienen un solo tipo de cloroplasto en donde se realizan todas las reacciones que convierten la energía de la luz a energía química, que es usada para fijar el CO₂ y sintetizar compuestos carbonados reducidos de los cuales depende la vida. La ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) es la enzima que cataliza la primera reacción de fijación del carbono. En esta ruta un azúcar fosforilado de 5 carbonos la ribulosa-1,5-bisfosfato y el CO₂ atmosférico, son convertidos a dos moléculas de un compuesto de 3 carbonos: el 3-fosfoglicerato (de ahí el nombre C3 que se le da a estas plantas). Rubisco también cataliza la oxidación de la molécula de ribulosa-1,5-bisfosfato con el O₂ atmosférico, produciéndose una molécula de 3-fosfoglicerato y otra de 2-fosfoglicolato. Este último compuesto no puede ser utilizado en el Ciclo de Calvin y es convertido a 3-fosfoglicerato en un proceso conocido

como fotorrespiración, que requiere ATP y NADPH y libera CO_2 , por lo que compite directamente con la fijación de CO_2 . Aproximadamente, por cada tres moléculas de CO_2 fijadas por Rubisco para formar tres moléculas de 3-fosfoglicerato, una molécula de oxígeno también es fijada, produciendo 3-fosfoglicerato y 2,3-fosfoglicolato (Hatch, 1988). 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 C3.

La ruta C4 es una adaptación de la ruta C3 que permite superar las limitaciones de la fotorrespiración. Esta ruta está presente en diversas especies, entre las que se incluyen el maíz, la caña de azúcar, el sorgo, el amaranto y diversas especies de pastizales y malezas. Muchas de las plantas que poseen esta ruta crecen en climas calientes con precipitaciones esporádicas. Como se describe más adelante, la ruta C4 disminuye la fotorrespiración elevando la concentración de CO_2 disponible para Rubisco, utilizando una bomba bioquímica de CO_2 . Las plantas C4 tienen dos tipos de cloroplastos, ambos encontrados en diferentes tipos de células especializadas. Las hojas de plantas C4 muestran una extensa vascularización. Rodeando al haz vascular hay un anillo de células, llamadas células de la vaina vascular y, finalmente, las llamadas células de mesófilo, situadas entre las células de la vaina vascular y la epidermis de la hoja. Este tipo de anatomía es conocido como tipo Kranz (del alemán “corona”, Figura 4).

El CO_2 atmosférico es inicialmente fijado en el citosol de las células de mesófilo por la isoenzima PEPC fotosintética, para formar oxalacetato, un ácido dicarboxílico de 4 carbonos (de ahí el nombre C4 que se le da a estas plantas) el cual es después convertido a malato ó aspartato según la planta, en el interior de los cloroplastos de estas células. Cualquiera de los dos últimos ácidos difunde al interior de las células de la vaina vascular, donde son descarboxilados en los cloroplastos. El CO_2 producido es entonces refijado por la Rubisco y utilizado en el Ciclo de Calvin. Existen varias enzimas que descarboxilan al ácido dicarboxílico en los cloroplastos de las células de la vaina vascular, dependiendo de la planta. En el caso del maíz, se produce malato a partir de oxalacetato y la enzima descarboxilante es la enzima málica dependiente de NADP^+ .

Debido a que el Ciclo de Calvin es más eficiente en las plantas C4, éstas muestran alta eficiencia en la fotosíntesis a elevadas intensidades de luz y temperatura, lo que se traduce en una mayor productividad en las cosechas de estas plantas.

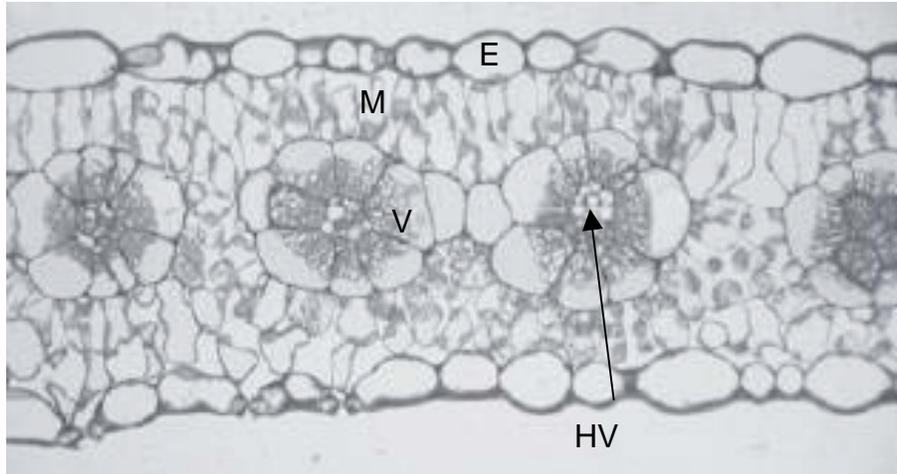


Figura 4. Corte transversal de hojas de *Amaranthus cruentus* (Una planta C4). La imagen muestra el arreglo de las células de mesófilo (M), bajo la epidermis de la hoja (E), adyacente a las células de mesófilo se encuentra el estrato de las células de la vaina vascular (V) alrededor del anillo del haz vascular (HV), tomado de Tazoe et al. (2006).

2.2.4 Genes que codifican a diferentes isoformas de PEPCs

Estudios sobre cómo surgieron las características C4 a partir de las plantas C3 en el género *Flaveria* (que tiene plantas C3 y C4) permitieron determinar cuáles son los genes que codifican para las isoformas fotosintética y no fotosintética de la PEPC. Estos genes pertenecen a una familia que está formada por tres clases diferentes: *ppcA*, *ppcB* y *ppcC* (Hermans and Westhoff, 1990 1992; Ernst and Westhoff, 1997). El gen *ppcA* codifica para la forma fotosintética, mientras que *ppcB* y *ppcC* codifican para isoformas no fotosintéticas, aunque en muchos casos no se sabe cuál es el papel fisiológico específico de estas últimas.

2.2.5 Evolución de la isoforma C4 de la PEPC

La evolución de la ruta C4 a partir de la ruta C3 ha sido de gran interés porque esta vía ha logrado introducir una estrategia para la fijación efectiva de CO₂ en estas plantas en las condiciones de bajo CO₂ y altas concentraciones de O₂ prevalecientes actualmente (Bazzaz and Fajer, 1992). Estas condiciones se originaron hace 15 o 20 millones de años aproximadamente (Sheen, 1999), lo que sugiere que es cuando surgió la ruta C4 (Sage, 2001).

El metabolismo C4 está ampliamente distribuido en familias de monocotiledóneas y dicotiledóneas, lo que ha llevado a la conclusión de que la fotosíntesis C4 tiene un origen polifilético (Brown and Smith, 1972; Moore, 1982; Monson and Moore, 1989). Además, se cree que no fue difícil que apareciera el metabolismo C4 porque las enzimas del ciclo C4 también se encuentran en las plantas C3, de tal forma que la fotosíntesis C4 evolucionó a partir de los genes ya existentes en las especies ancestrales C3. El análisis de alineamiento de secuencias sugiere que el gen que codifica para la isoforma C4, *ppcA*, surgió a partir del gen *ppcB* por duplicación génica (Figura 5).

Mientras las isoformas de PEPC no fotosintéticas se expresan en tejidos no fotosintéticos, la expresión de C4PEPC está restringida a las células de mesófilo (Sheen, 1999), aunque hace algunos años se reportó que no es indispensable que exista separación de las enzimas C3 y C4 en 2 células distintas, las cuales son características de la anatomía Kranz en las plantas con metabolismo C4 (Voznesenskaya et al., 2001). Aunado a lo anterior, las diferencias en las concentraciones de sustratos y productos de las enzimas probablemente condujo a isoformas con una cinética y regulación diferente a las de las PEPCs ancestrales (Svensson et al., 2003).

Las PEPCs de plantas C3 muestran una $S_{0.5}$ para el sustrato PEP de 5 a 10 veces menor comparada con las isoformas C4, sin embargo existe una gran variabilidad dentro de cada grupo de las isoformas de especies C3 y C4 (Ting and Osmond, 1973). Por el contrario, las PEPCs C4 tienen una $S_{0.5}$ más baja para el bicarbonato que las PEPCs de plantas C3. Con respecto a los efectores alostéricos, las PEPCs C4 son

menos sensibles a la inhibición por malato que las isoformas C3 (Dong et al., 1998; Bläsing et al., 2002), mientras que las isoformas C4 se activan en mayor grado por Glc6P y Gly que las isoformas no fotosintéticas (Nishikido and Takanashi, 1973; Ting and Osmond, 1973; Uedan and Sugiyama, 1976). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, existen contradicciones en estos reportes debido a que no existe un consenso entre los procedimientos de purificación y ensayo de actividad enzimática (Miziorko et al., 1974).

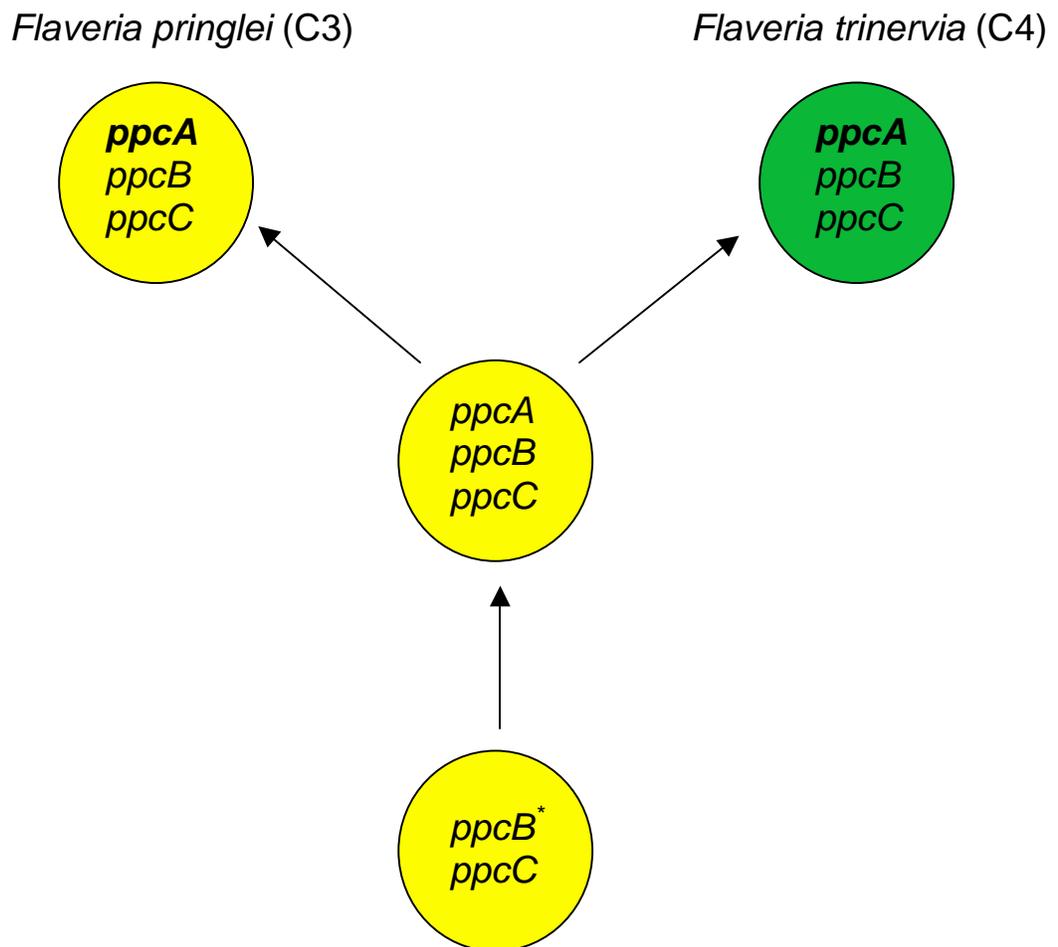


Figura 5. Evolución de los genes de PEPC (*ppc*) en el género *Flaveria*. Los análisis de secuencias sugieren que el gen *ppcA* se formó por duplicación del gen *ppcB*, presente en un ancestro C3 (*ppcB**). El gen *ppcA* de *Flaveria trinervia* (C4) codifica para la isoforma C4PEPC, tomado de Svensson et al. (2003).

2.2.6 Mecanismo cinético de la C4ZmPEPC

La reacción catalizada por PEPC requiere dos sustratos, PEP y HCO_3^- , y del ion Mg^{2+} (Figura 6), existen dos diferentes propuestas para el mecanismo de unión de magnesio, PEP y bicarbonato al sitio activo de la C4ZmPEPC:

- 1) A partir de estudios de velocidad inicial realizados con la enzima no fosforilada y usando concentraciones totales de PEP y magnesio, se concluyó que la unión de magnesio a la enzima se realiza en primer lugar, seguida por PEP y, por último, el bicarbonato (Janc et al., 1992; Chollet et al., 1996).
- 2) Estudios de velocidad inicial realizados con la forma no fosforilada y fosforilada de la enzima, en los que se consideraron las especies libres y el complejo de PEP y magnesio (PEPMg), indican que el complejo PEPMg es el verdadero sustrato (Wedding et al., 1989; Rodríguez-Sotres and Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez et al., 1998) y que PEP libre (Rodríguez-Sotres and Muñoz-Clares, 1990; Tovar-Méndez et al., 1998) o magnesio libre (Mukerji, 1977) se comportan como activadores. La enzima C4ZmPEPC, sigue un mecanismo ordenado en equilibrio rápido mostrado en la Figura 6.

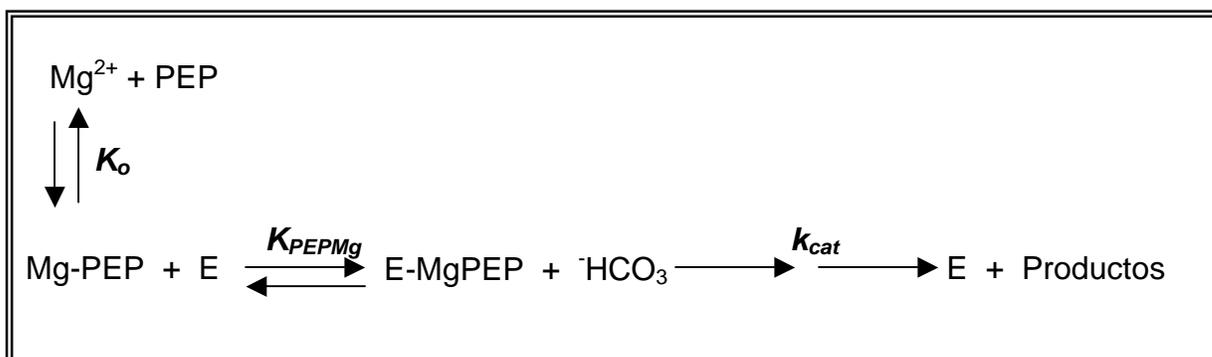


Figura 6. Mecanismo cinético de C4ZmPEPC. K_o , K_{PEPMg} son las constantes de disociación del complejo PEPMg y del complejo E-PEPMg respectivamente; k_{cat} es la constante catalítica de la reacción. Tomado de Tovar-Méndez et al. (1998).

2.2.7 Mecanismo de reacción de PEPC

El primer paso en la reacción es el ataque nucleofílico del bicarbonato al átomo de fósforo del grupo fosfato del complejo PEP-Metal, para formar carboxifosfato y el enolato de piruvato (Figura 7a Panel B). El segundo paso es la formación del CO_2 a partir del carboxifosfato (Figura 7b Panel C). En el tercer paso (Figura 7b Panel D y E), el CO_2 realiza un ataque electrofílico sobre el tercer átomo de carbono del enolato para formar el oxaloacetato y fosfato inorgánico (O'Leary et al., 1981; Hansen and Knowles, 1982; Fujita et al., 1984).

Se ha propuesto que el metal actúa como un ácido de Lewis, estabilizando al grupo enolato del fosfoenolpiruvato y favoreciendo la transferencia del grupo fosforilo al bicarbonato (Janc et al., 1992). Las argininas 456, 759 y 773 (Figura 7a Panel A y B) formarían un centro de cargas positivas que disiparía las cargas negativas del grupo fosforilo del PEP durante el estado de transición, haciendo al átomo de fósforo más electrofílico y susceptible al ataque nucleofílico por el bicarbonato (Westheimer, 1987).

En la descomposición del carboxifosfato a CO_2 y fósforo inorgánico es necesaria la intervención de un residuo de aminoácido que abstraiga un protón y luego lo ceda al grupo fosforilo (Figura 7b Panel C y D) (Janc et al., 1992). Por mutagénesis sitio dirigida (Terada and Izui, 1991) se sabe que este residuo es una histidina que se encuentra altamente conservada en todas las PEPCs, en el caso de C4ZmPEPC es la His177 (Terada and Izui, 1991).

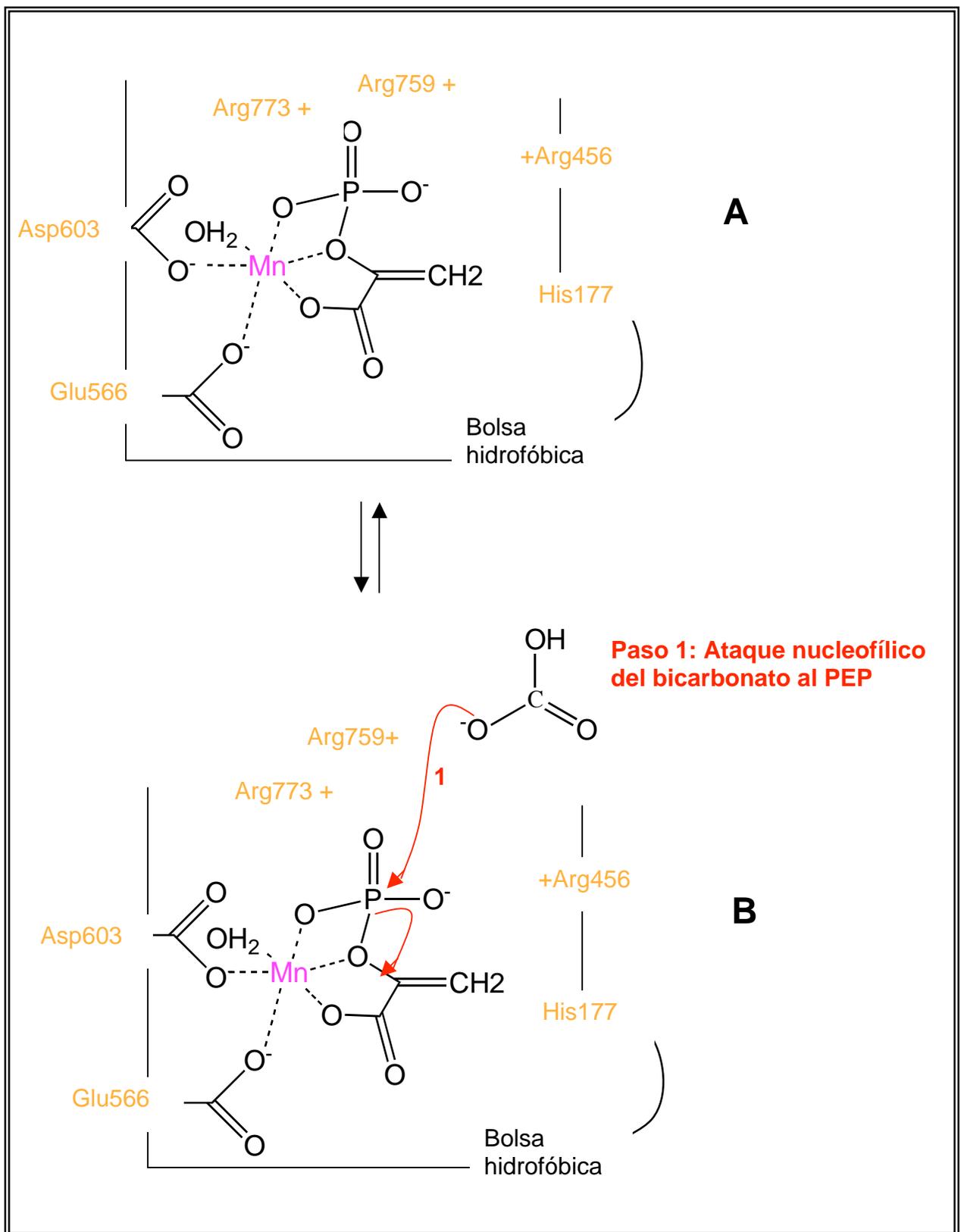


Figura 7a. Mecanismo de reacción propuesto para C4ZmPEPC. Panel A sitio activo ocupado con el sustrato PEP_{Mg}. Panel B, paso 1 del mecanismo de reacción.

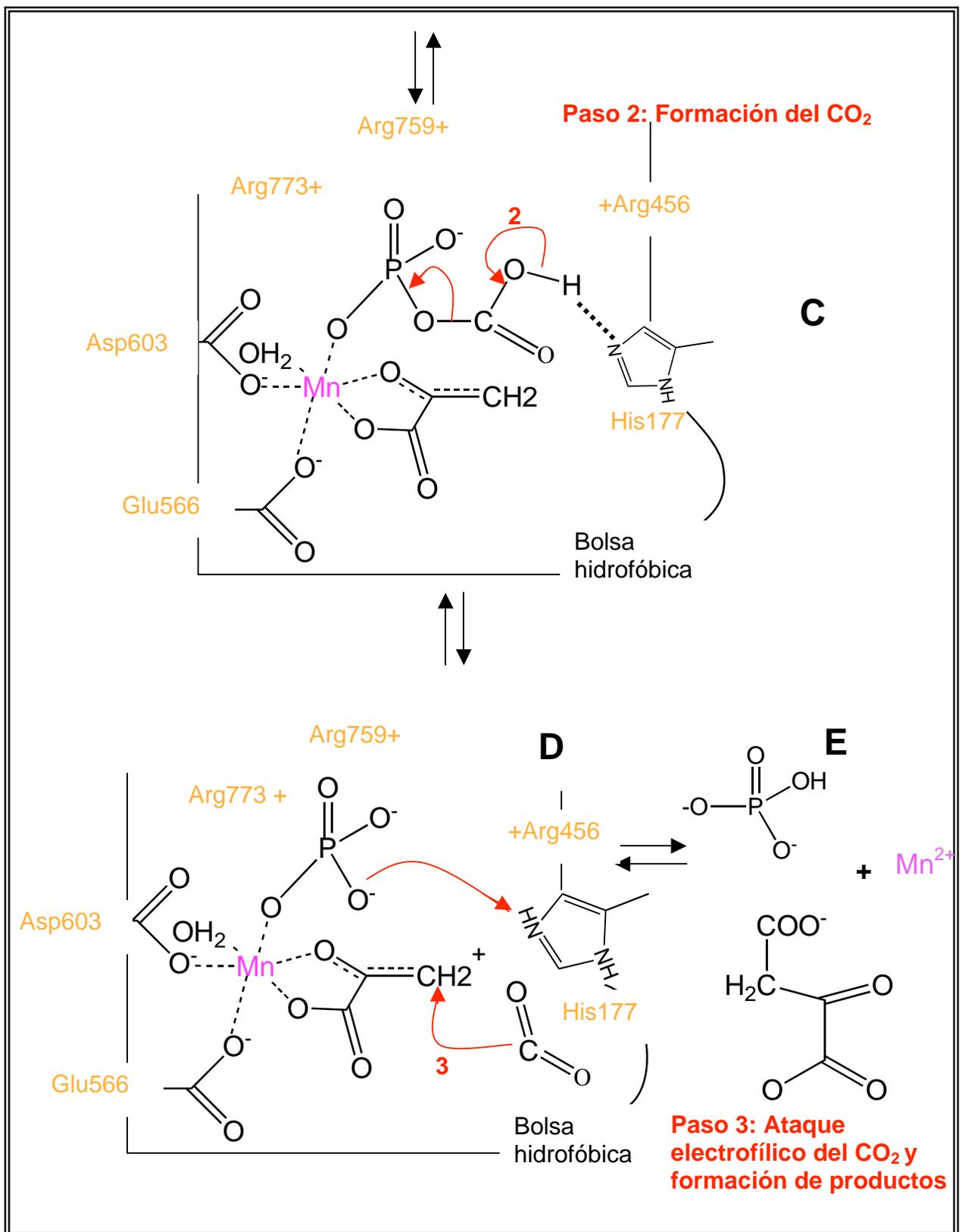


Figura 7b. Mecanismo de reacción propuesto para C4ZmPEPC. Panel C paso 2 del mecanismo de reacción. Panel D y E Paso 3 y formación de productos respectivamente.

2.2.8 Regulación de C4ZmPEPC por metabolitos

Se han descrito tres tipos de metabolitos efectores de la actividad de PEPC, uno inhibidor y dos activadores. Estos metabolitos tienen un efecto más pronunciado a valores de pH neutros.

Los ácidos dicarboxílicos como el malato y el aspartato son inhibidores de todas las PEPCs estudiadas hasta la fecha. En el caso de la enzima de maíz, el inhibidor de mayor relevancia fisiológica es el malato (Huber and Edwards, 1975; Leegood and Osmond, 1990). El malato se comporta como un inhibidor competitivo en la saturación de la enzima por el PEP a pH neutro (González et al., 1984) y aumenta el grado de cooperatividad en la saturación de la enzima por el PEP (Wu and Wedding, 1985). Se ha reportado que los activadores Glc6P y Gly contrarrestan la inhibición por el malato en forma sinérgica (Gillinta and Grover, 1995; Tovar-Méndez et al., 2000), aunque la Gly es más efectiva que la Glc6P para contrarrestar dicha inhibición (Gao and Woo, 1996; Tovar-Méndez et al., 2000).

Los azúcares fosforilados como la Glc6P activan a C4ZmPEPC (Coombs et al., 1973; Huber and Edwards, 1975; Uedan and Sugiyama, 1976; Marés and Leblová, 1980; Stiborová and Leblová, 1985) y CAM (Rustin et al., 1988; Wedding et al., 1989). Su principal efecto es disminuir la K_m para el sustrato PEP (Coombs et al., 1973; Uedan and Sugiyama, 1976; Tovar-Méndez et al., 2000). Se ha reportado que a valores de pH de 7 o menores la saturación por la Glc6P es cooperativa, pero a valores de pH 8 o mayores no lo es (Stiborová and Leblová, 1985). Otro factor que afecta la afinidad de la C4ZmPEPC por la Glc6P es el estado de saturación del sitio activo. Así, la enzima con el sitio activo saturado presenta una constante de activación aparente para la Glc6P menor que en presencia de concentraciones de sustrato subsaturantes (Duff and Chollet, 1995).

La activación de C4ZmPEPC por el análogo de PEP, 3,3-dicloro-2-dihidroxifosfinoilmetil-2-propenoato (DCDP) sugirió que la enzima posee dos sitios a los que el PEP se une: el sitio activo y un sitio regulatorio, uniéndose el análogo de PEP al sitio regulatorio (Jenkins et al., 1986). La misma conclusión se alcanzó en estudios de velocidad inicial usando otros análogos del PEP también activadores de la enzima: el

fenilfosfato (Rodríguez-Sotres and Muñoz-Clares, 1990) y la fosfomicina (Mújica-Jiménez et al., 1998). Se demostró que el PEP libre se une al sitio alostérico, que es el de los azúcares fosforilados (Rustin et al., 1988; Rustin et al., 1991; Tovar-Méndez et al., 1998). A este respecto, se ha sugerido que aunque el sitio activo y este sitio alostérico unen a los mismos ligandos, difieren en la especie del ligando al que unen. Así, mientras que el sitio activo une al complejo ligando-Mg, el sitio alostérico une a su forma libre (Mújica-Jiménez et al., 1998). Esta diferencia es fundamental para que los activadores, que *in vivo* se encuentran mayoritariamente en forma no acomplexada con el magnesio, no inhiban a la enzima por competencia con el sustrato por el sitio activo (Mújica-Jiménez et al., 1998).

Los aminoácidos neutros como la Gly y la Ala activan exclusivamente a las PEPC de plantas monocotiledóneas, como la C4ZmPEPC (Nishikido and Takanashi, 1973). La Gly aumenta ligeramente la V_{max} y disminuye en mucha mayor proporción la K_m para el PEP (Nishikido and Takanashi, 1973; Uedan and Sugiyama, 1976; Stiborová and Leblová, 1985; Gillinta and Grover, 1995; Tovar-Méndez et al., 2000). La Gly también reduce la K_m para magnesio, pero no tiene un efecto significativo sobre la K_m para el bicarbonato (Gillinta and Grover, 1995; Tovar-Méndez et al., 2000). La enzima puede ser activada también por la Ala y por la Ser, sin embargo, se ha encontrado que posee mayor afinidad por la Gly que por los otros aminoácidos neutros (Bandarian et al., 1992). Empleando concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} y bicarbonato, se encontró que el efecto inhibitor del malato sobre la enzima fosforilada puede ser revertido por Gly o Ala, pero no por la Glc6P, tanto en presencia como en ausencia de altas concentraciones de glicerol (Tovar-Méndez et al., 2000) (Figura 8). Esto demuestra que el sitio alostérico para los aminoácidos neutros es fundamental para lograr niveles apreciables de actividad de C4ZmPEPC bajo condiciones cercanas a las fisiológicas (Tovar-Méndez et al., 2000). A diferencia de los azúcares fosforilados, altas concentraciones de aminoácidos no inhiben a la enzima (Tovar-Méndez et al., 2000). Se ha propuesto (Tovar-Méndez et al., 2000) que la Ala podría ser el aminoácido clave para regular la actividad de PEPC en condiciones de iluminación y concentraciones normales de CO_2 , en tanto que la Gly lo sería a bajas concentraciones de CO_2 , cuando las concentraciones de Ala disminuyen de forma drástica. Por lo tanto, la Gly ayudaría a

incrementar el flujo a través de la ruta C4 bajo condiciones en las que la fotorrespiración estaría activa, contrarrestándola (Tovar-Méndez et al., 2000).

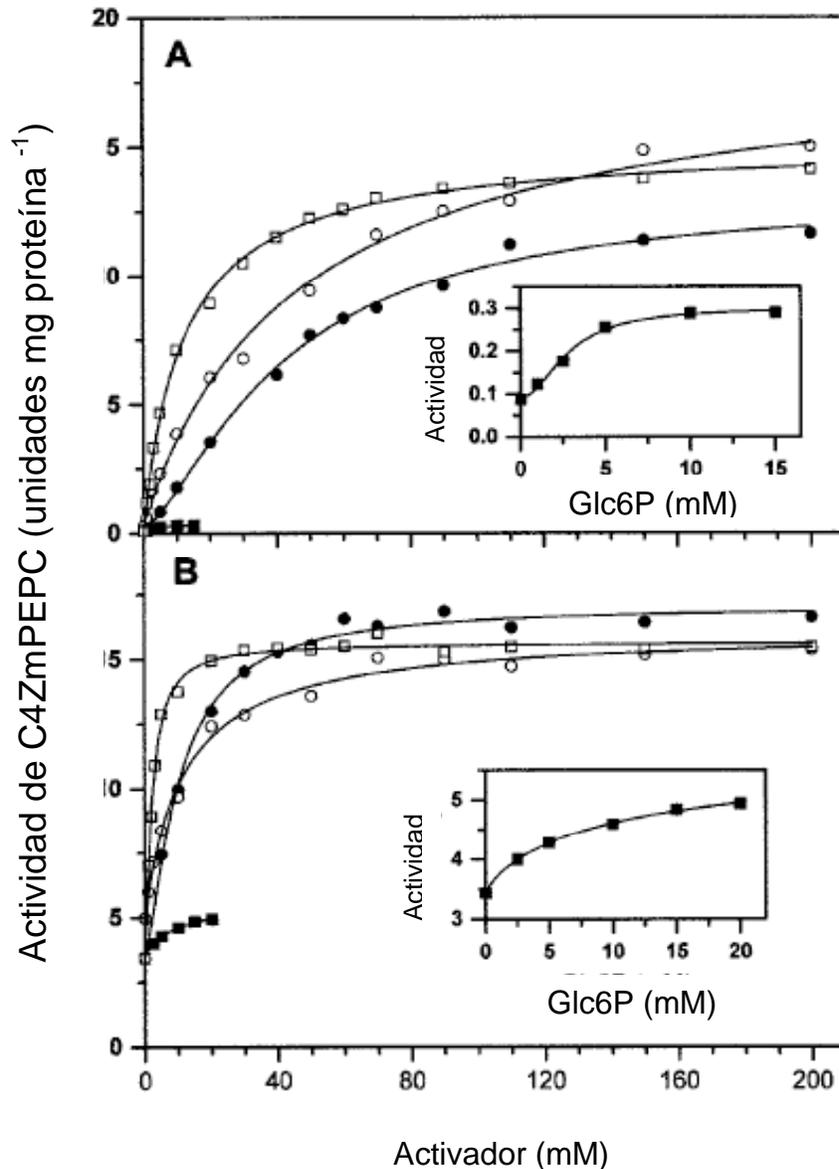


Figura 8. Cinética de saturación de C4ZmPEPC fosforilada (forma diurna) por Glc6P (cuadros negros), Ala (cuadros blancos) o Gly (círculos negros) y por Gly en presencia de Glc6P 10 mM (círculos blancos). Panel A y B ausencia y presencia de glicerol 20% (v/v) respectivamente. Los ensayos se realizaron en presencia de 20 mM de malato, 3 mM de PEP total, 0.1 mM de bicarbonato y 0.4 mM de Mg²⁺ libre. El inserto representa el eje de las ordenadas en escala pequeña. Tomado de Tovar-Méndez et al. (2000).

2.2.9 Regulación de C4ZmPEPC por modificación covalente reversible

En todas las PEPCs, esta forma de regulación se lleva a cabo por fosforilación y desfosforilación del grupo hidroxilo de una Ser en el extremo amino terminal de la proteína, que en el caso de la C4ZmPEPC es la Ser15 (Jiao and Chollet, 1989). La fosforilación también se ha documentado en la enzima tipo CAM (Nimmo et al., 1986; Nimmo et al., 1987) y tipo C3 (Zhang et al., 1995). En hojas de plantas C4 la fosforilación de PEPC se induce por luz, de manera que la forma fosforilada está presente durante el día (Jiao et al., 1991; Jiao and Chollet, 1991; Duff and Chollet, 1995). PEPC es fosforilada por una PEPC cinasa específica Ser/Thr y es desfosforilada por una fosfatasa tipo 2A (Nimmo, 2003).

Se ha planteado un modelo para la regulación de la enzima por fosforilación-desfosforilación (Jiao and Chollet, 1991; Chollet et al., 1996) el cual propone que la forma no fosforilada es menos activa, más sensible a inhibición por malato y menos sensible a activación por Glc6P, que la forma fosforilada. Sin embargo, se ha sugerido que la fosforilación *per se* no es suficiente para permitir la actividad de la enzima durante los períodos de luz (Gao and Woo, 1996; Tovar-Méndez et al., 2000). La fosforilación de la enzima disminuye la $S_{0.5}$ para PEP, aunque la diferencia entre la forma no fosforilada y la fosforilada es pequeña (Duff and Chollet, 1995; Tovar-Méndez et al., 2000). Por ello, se propone que la fosforilación presenta ventajas sólo si el inhibidor está presente, es decir, que la función de la fosforilación es insensibilizar a la PEPC frente a la presencia de altas concentraciones de malato, durante períodos de iluminación, sin que tenga un efecto importante sobre la afinidad de la enzima por sustratos y activadores.

La fosforilación de la PEPC también actúa de manera sinérgica con ambos tipos de activadores de la enzima contrarrestando la inhibición por malato (Bakrim et al., 1993; Gao and Woo, 1996; Tovar-Méndez et al., 2000) por lo que se ha sugerido que la actividad de la PEPC, y así la fijación atmosférica del CO₂, es el resultado del balance entre la regulación positiva (activación por triosas fosfato, Glc6P y aminoácidos neutros como Gly), la regulación negativa (inhibición por malato) y la fosforilación (Bakrim et al., 1993; Tovar-Méndez et al., 2000).

2.2.10 Mecanismo de regulación alostérica de C4ZmPEPC

2.2.10.1 Modelo de asociación-disociación oligomérica

Este modelo plantea que la C4ZmPEPC puede ser regulada *in vivo* vía un equilibrio dímero-tetrámero (Podestá and Andreo, 1989; Willeford et al., 1990), donde la forma tetramérica sería la forma totalmente activa y con la mayor afinidad por el sustrato, siendo el dímero mucho menos activo o inactivo y el monómero totalmente inactivo. El modelo es apoyado por las siguientes observaciones:

1. La enzima diluida a pH 7 y a concentraciones menores de 0.1 mg/mL es una mezcla de dímeros y tetrámeros (Podestá and Andreo, 1989).
2. El PEP desplaza el equilibrio hacia la forma tetramérica (Willeford et al., 1990), lo cual explicaría la cooperatividad positiva observada en las cinéticas de saturación por el PEP.
3. El activador Glc6P también favorece la forma tetramérica (Willeford and Wedding, 1992), lo que explicaría la ausencia de cooperatividad positiva y el aumento de la afinidad por el PEP en la presencia de la Glc6P.
4. El inhibidor malato, que favorece la disociación del tetrámero en dímero (Willeford et al., 1990), tiene efectos contrarios a la Glc6P, disminuye la afinidad por el sustrato y aumenta la cooperatividad positiva por el sustrato.
5. El glicerol al 20% (v/v) elimina la cooperatividad positiva de la enzima en la cinética de saturación por el PEP, lo que concuerda con la observación de que la enzima diluida en la presencia de altas concentraciones de glicerol se encuentra principalmente en forma tetramérica (Podestá and Andreo, 1989).

Sin embargo, dada la elevada concentración de enzima que existe *in vivo* (esta enzima llega a ser el 10-15% de la proteína total soluble de las células de mesófilo (Uedan and Sugiyama, 1976), muy superior a la que comúnmente es utilizada *in vitro* para los ensayos de actividad es poco probable que la enzima exista como dímeros bajo condiciones intracelulares. Por otra parte, se ha demostrado que la enzima diluida en el medio de ensayo pierde actividad muy lentamente (vida media de 190 min) mientras que en presencia de malato 20 mM (vida media de 32 min), lo que demuestra

que en los ensayos de actividad que no duran más de 1 minuto la enzima se encuentra como tetrámero. Además, estudios de velocidad inicial en la enzima fosforilada y en concentraciones de Mg^{2+} , bicarbonato y malato muy cercanas a las fisiológicas han mostrado que la inhibición de la enzima por el malato puede revertirse por la Gly, pero no por la Glc6P en ausencia y presencia de glicerol (Figura 8). Por tanto, el modelo de oligomerización no explica el mecanismo de regulación alostérica de la isoenzima C4 de PEPC. (Monod et al., 1965)

2.2.10.2 Modelo concertado de transición alostérica

Se ha sugerido que la enzima existe en dos estados, T y R, con diferente afinidad por el sustrato y por los efectores alostéricos, de acuerdo al modelo de Monod-Wyman-Changeux, MWC, (Monod et al., 1965). Este modelo propone que las dos conformaciones de las enzimas alostéricas, T y R, preexisten en ausencia de ligando y que están en equilibrio, y asume que los efectores alostéricos sólo cambian el equilibrio preexistente entre estos dos estados, 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.

Recientemente, se ha propuesto que la C4ZmPEPC existe en dos formas I y II, con diferentes afinidades por el PEP, que serían las equivalentes a las formas T y R del modelo MWC. La forma I es la conformación con baja afinidad por el PEP y la forma II la conformación con mayor afinidad por el PEP. Ambas formas están en equilibrio y la unión del PEP a la forma II puede modificar el equilibrio favoreciendo la forma II (Frank et al., 1999). Estos autores se basan en que el cambio en la fluorescencia extrínseca de la enzima, medido por cinética rápida, inducido por la unión del PEP en la presencia de iones magnesio presenta dos tiempos de relajación. Un tiempo de relajación rápido asociado al proceso de unión de PEP y un tiempo de relajación más lento atribuido al proceso de isomerización entre las formas I y II. 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.

Un comportamiento similar se encontró cuando se estudió la unión de la Glc6P y la del inhibidor malato (Frank et al., 2001).

Sin embargo, otros estudios cinéticos han mostrado que el efecto de los activadores sobre la actividad de la enzima y sobre la inhibición por malato no pueden explicarse por ningún mecanismo de regulación alostérica que involucre sólo dos estados (Tovar-Méndez et al., 2000) ya que, por ejemplo, la unión de un activador a su sitio alostérico produce una conformación de la enzima diferente a la existente cuando el otro activador está unido al suyo. Por lo que, se ha postulado un modelo que contempla la existencia de múltiples estados conformacionales, estabilizados por los diferentes efectores alostéricos.

2.2.11 Estructura tridimensional de C4ZmPEPC

De acuerdo con la secuencia de aminoácidos reportada, la C4ZmPEPC tiene una masa relativa 109,297 Da por monómero (Fujita et al., 1984). En años recientes se han obtenido las estructuras tridimensionales la enzima de EcPEPC (Kai et al., 1999) y de C4ZmPEPC (Matsumura et al., 2002). De los estudios de difracción de rayos X de los cristales de C4ZmPEPC y *E.coli* EcPEPC (el número de acceso en el PDB de cada estructura se presenta en la Tabla 1, la estructura global de PEPC es un tetrámero de cuatro subunidades idénticas con un arreglo de “dímero de dímeros” (Figura 9). Un enlace salino entre la Arg498 y Glu493 (numeración de C4ZmPEPC) en la intercara entre los dímeros contribuye a la estabilidad del tetrámero (Kai et al., 1999; Matsumura et al., 1999) (Matsumura et al., 2002; Kai et al., 2003; Izui et al., 2004). Cada monómero consiste de un barril α/β tipo TIM (Triosa fosfato isomerasa) con 8 hebras β y 40 hélices α que las conectan.

Tabla 1. Estructuras tridimensionales de PEPCs y su número de acceso al Protein Data Bank (PDB)

Organismo	Ligandos	clave PDB
	Aspartato	1FIY
<i>E. coli</i>	Mn ²⁺ y Aspartato	1QB4
	Mn ²⁺ , DCDP y Aspartato	1JQN
<i>Z. maíz</i>	Sulfato	1JQO
DCDP (3,3-dicloro-2-dihidroxifosfinoilmetil-2-propenoato) es un análogo del sustrato PEP		

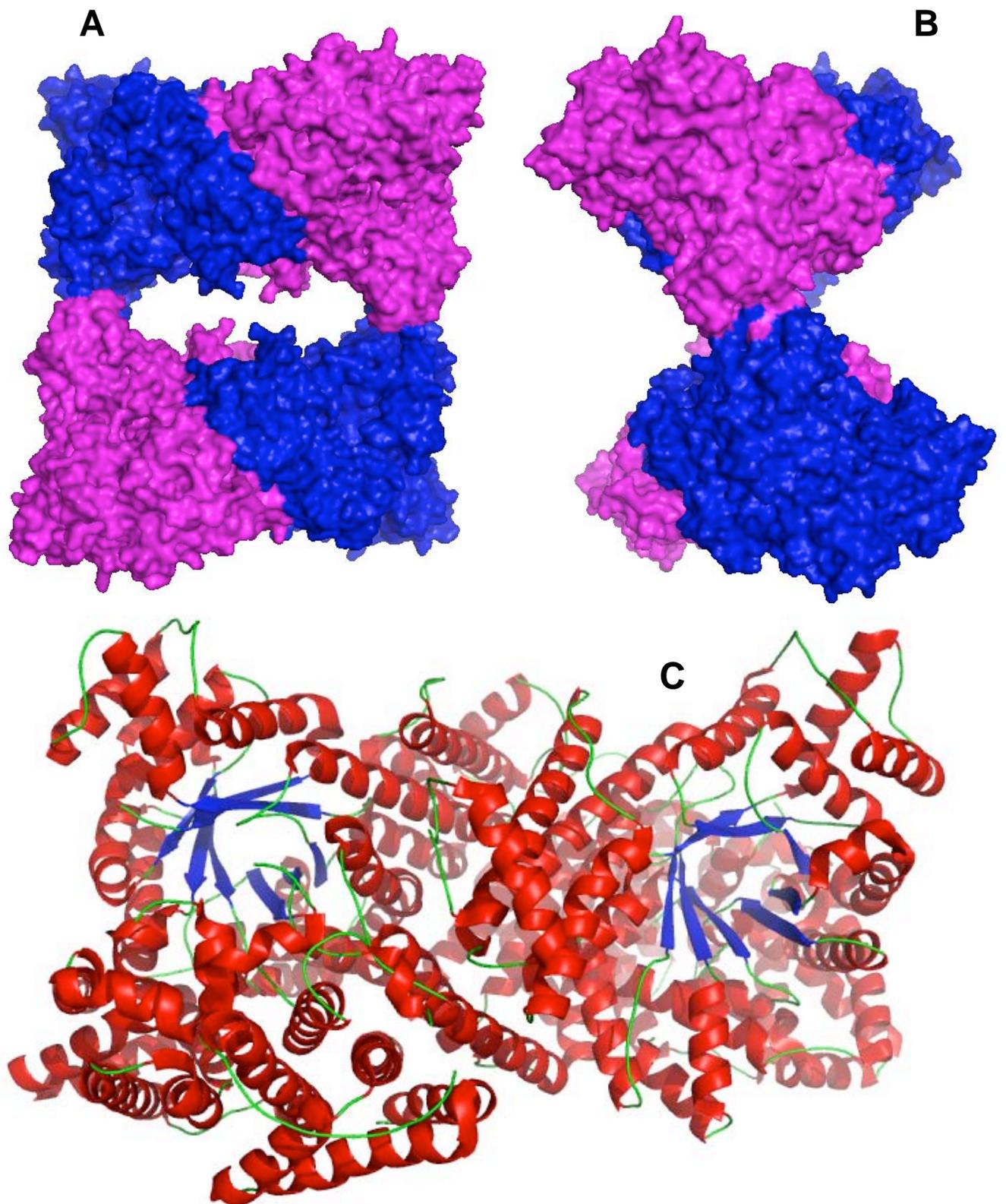


Figura 9. Estructura tridimensional de C4ZmPEPC. Paneles A y B: vista frontal y lateral del tetrámero, respectivamente, en estructura de superficie. Panel C: dímero mostrando la estructura secundaria en listones. La figura se realizó a partir de las coordenadas cristalográficas de la enzima de C4ZmPEPC (PDB 1JQO) con el programa PyMol (DeLano).

2.2.11.1 El sitio activo de C4ZmPEPC

En base a las coordenadas obtenidas de los cristales, el sitio activo se encuentra en el extremo carboxilo terminal del barril α/β (Figura 10a Panel A), como ocurre con la mayor parte de las enzimas que poseen una estructura de barril α/β (Sternier and Höcker, 2005). El sitio activo (en el texto se hará referencia únicamente a la numeración de C4ZmPEPC; Tabla 2) está formado por las argininas 456, 759 y 773 y los residuos Glu566 y Asp603 (Figura 10a Panel B; Matsumura et al., 2002), los cuales están estrictamente conservados en todas las PEPCs estudiadas hasta la fecha (Toh et al., 1994). El ion Mn^{2+} está unido al átomo de oxígeno de dos grupos carboxilo de los residuos Glu566 y Asp603 (Figura 10b Panel C; Tabla 2). Las argininas 456, 759 y 773 interactúan directamente con el grupo fosfato del análogo del PEP (Figura 10b Panel C, Tabla 2). Se ha propuesto que los residuos de Trp288, Leu564, Met598 forman una cavidad hidrofóbica donde se aloja el grupo metileno del PEP (Figura 10b Panel D; Matsumura et al., 1999). Estudios de mutagénesis sitio dirigida en EcPEPC (Gao and Woo, 1995; Dong et al., 1997) sugieren que la Lys606 (Tabla 2) participa en la unión del bicarbonato, así como otros residuos de carácter básico que forman parte de una α hélice en la región carboxilo terminal (residuos 824 al 831; Kai et al., 1999).

Además, existen movimientos de dos asas ricas en Gly que comprenden los residuos 174-184 y 639-651. En la primera se encuentra la His177, propuesto como el ácido donador del protón en el paso de descomposición del carboxifosfato. La cadena lateral de este residuo está en la conformación adecuada para que se lleve a cabo la catálisis en el cristal de la C4ZmPEPC que contiene una molécula de sulfato en el sitio alostérico de azúcares fosforilados, mientras que en la enzima de *E. coli* este residuo se encuentra en una conformación que no permitiría que ocurra la reacción de catálisis (Figura 10a Panel B), lo que sugiere que el estado T con el inhibidor unido es inactivo (Matsumura et al., 2002). En la segunda asa, se encuentra la Arg647 que participa en la unión con el inhibidor, según muestra la estructura cristalográfica de la EcPEPC como veremos más adelante. Este residuo es catalíticamente importante de acuerdo con estudios de mutagénesis sitio dirigida (Yano et al., 1995). En la estructura de

C4ZmPEPC se observa que este residuo se ha movido hacia el sitio activo (Figura 11), por lo que se ha sugerido que en ausencia del inhibidor participaría en la unión del sustrato (Matsumura et al., 2002). Existe otra asa situada en la región carboxilo terminal de C4ZmPEPC que comprende los residuos 965-970. Se cree que su función es estabilizar la conformación del asa rica en Gly del carboxilo terminal mencionada arriba (asa 639-651) cuando el inhibidor no está presente, mediante la formación en un enlace salino entre el carboxilo terminal de la Gly970 y la cadena lateral de la Arg647 (Matsumura et al., 2002).

Tabla 2. Residuos funcionales importantes en *C4ZmPEPC* y *EcPEPC*

Residuo(s) de aminoácido(s)	Numeración en C4ZmPEPC	Numeración en <i>E. coli</i>	Función propuesta
Arg	773	713	Unión del grupo fosforilo del PEP
Arg	456	396	
Arg	759	699	
Lys α hélice	606 824-831	- 762 al 769	Unión del bicarbonato
His	177	138	Donador del protón en la descomposición del carboxifosfato
Asa	174-184	135-145	Mueve a la His177 durante la catálisis
Asp Glu	603 566	543 506	Unión del metal a la enzima
Arg	647	587	- Unión del PEP y del inhibidor alostérico
Gly	970	883	Residuo carboxilo terminal que en ausencia del inhibidor alostérico forma un puente salino con la Arg647
Asa	639-651	579-591	Se mueve cuando la Arg647 pasa del sitio sitio activo al sitio del inhibidor alostérico
Asa	965-970	878-883	Se mueve junto con el asa de la Arg647
Trp Leu Met	288 564 598	248 504 538	Bolsa hidrofóbica donde se aloja el grupo metileno del PEP
Lys Arg Asn	835 894 968	773 832 881	Unión del inhibidor alostérico
Arg Arg Arg Ser	183 184 231 185	144 145 192 Thr146	Unión de la Glc6P
Arg Glu	372 360	313 -	Unión de la Glc6P y transmisión de la señal alostérica entre monómeros
Arg Glu	226 229	His187 190	Unión de la Gly en la C4ZmPEPC

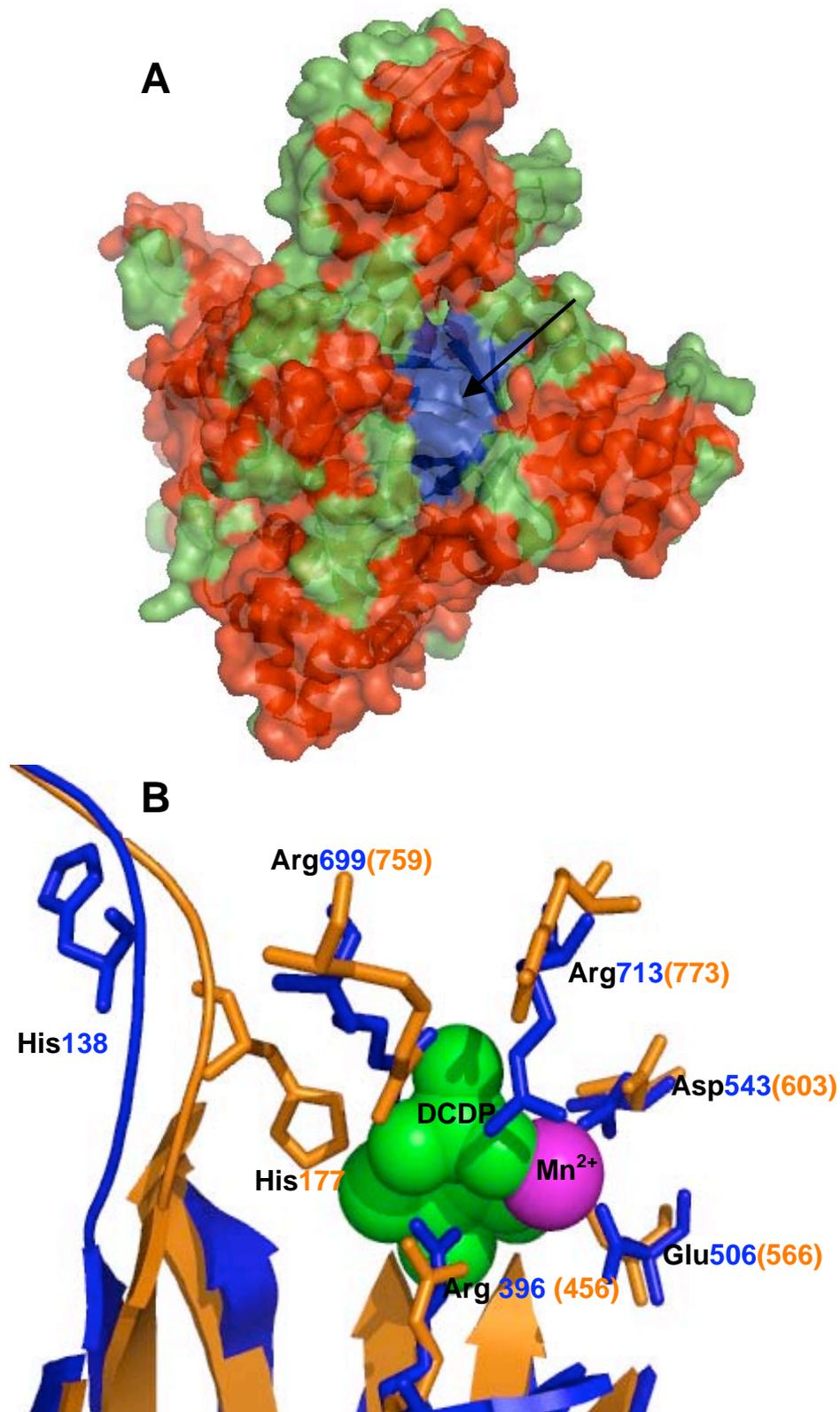


Figura 10a. Sitio activo de PEPC. Panel A Cavidad del sitio activo (en azul) de C4ZmPEPC en estructura de superficie. Panel B Sobreposición del sitio activo en listones de C4ZmPEPC-sulfato en naranja (código PDB 1JQO) y EcPEPC-DCDP-Mn-Asp en azul (código PDB 1JQN). Las figuras se realizaron con el programa PyMol (DeLano, 2002).

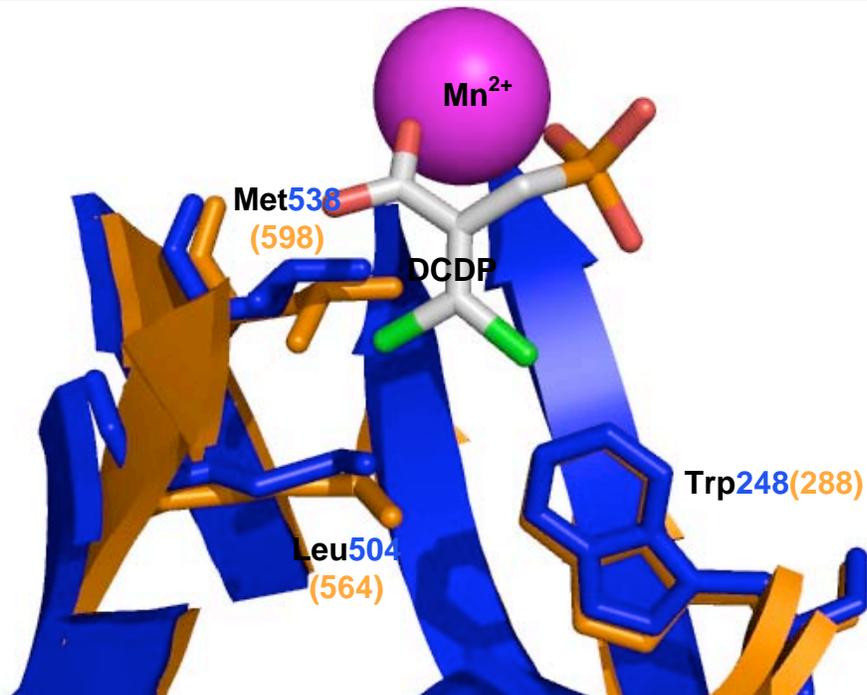
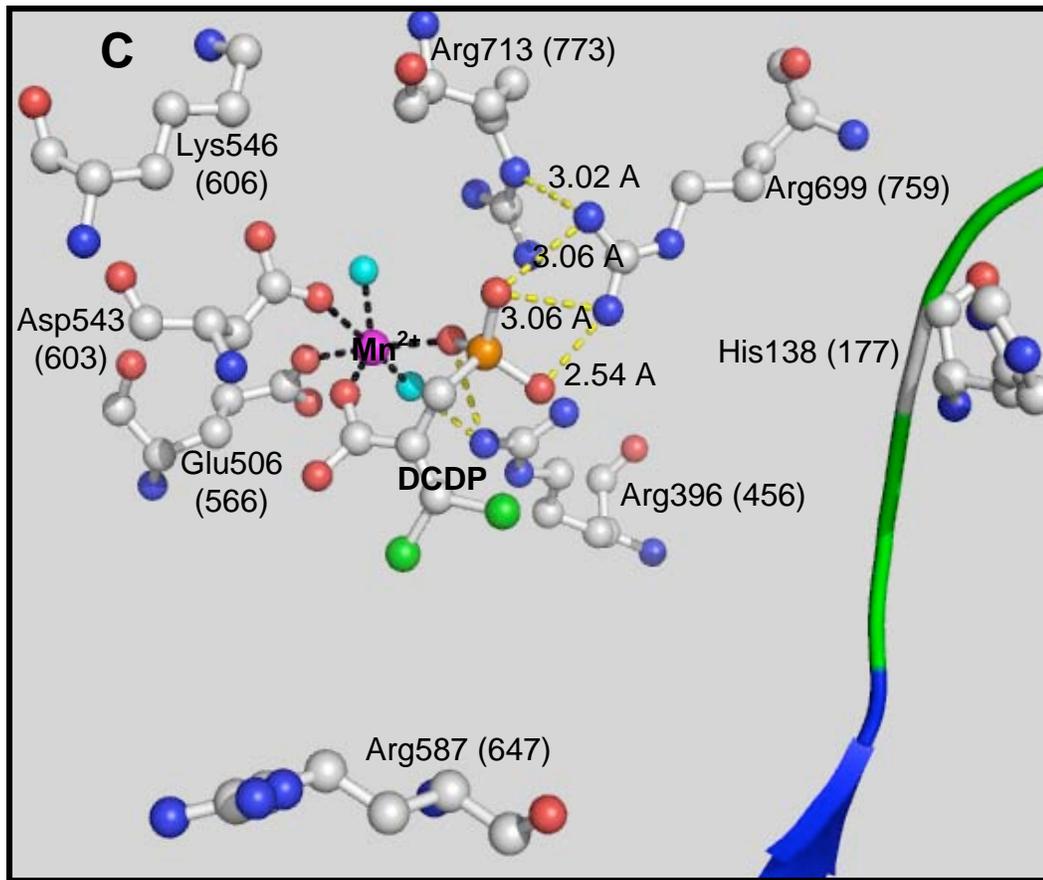


Figura 10b. Sitio activo de PEPC. C) Sitio activo en enlaces y esferas de EcPEPCDCDP-Mn-Asp (1JQN). D) Bolsa hidrofóbica en el sitio activo de C4ZmPEPC-sulfato en naranja (1JQO) y EcPEPC-DCDP-Mn²⁺-Asp en azul. Las estructuras se realizaron con el programa PyMol (DeLano, 2002).

2.2.11.2 Sitios alostéricos de C4ZmPEPC

2.2.11.2 a) Sitio alostérico de ácidos dicarboxílicos

En las estructuras cristalográficas de la EcPEPC obtenidas con el inhibidor aspartato unido (Kai et al., 1999), su sitio de unión se encuentra aproximadamente a 20 Å del sitio activo (Figura 11 Panel A; en el texto se hará referencia únicamente a la numeración de C4ZmPEPC; Tabla 2). Los residuos que participan en la unión del inhibidor son la Arg647, Lys835, Arg894 y Asn968 (Figura 11 Panel B). La cadena lateral de Arg647 forma un puente salino con el grupo carboxilo del inhibidor, de forma que el inhibidor alostérico mueve el asa rica en Gly donde se encuentra la arginina hacia el sitio alostérico, alejándola del sitio activo y dificultando así la unión de la molécula de sustrato. Sin embargo, este movimiento no impide la unión del análogo del sustrato, aunque probablemente disminuya la afinidad. Tampoco la unión del análogo impide la unión del inhibidor, como lo muestra la estructura con los dos ligandos unidos, lo que claramente muestra que ambos no son mutuamente excluyentes, aunque uno disminuya la afinidad de la enzima por el otro. La estructura, sin embargo, no muestra en forma clara cómo el análogo disminuiría la afinidad por el inhibidor. Se necesitaría contar con la estructura de la enzima sólo con el sustrato o análogo de sustrato unido al sitio activo para ver en qué forma se afecta el sitio de unión del inhibidor alostérico. La estructura cristalográfica por tanto indica que la inhibición alostérica es de tipo competitivo parcial. Además, la posición anormal de la His catalítica es claramente incompatible con su papel durante la catálisis, cuando el inhibidor está unido al sitio alostérico independientemente de si el sitio activo está vacío, u ocupado con el análogo, lo que parece indicar que el inhibidor impide totalmente la catálisis. En el contexto de la teoría alostérica de MWC, Kai y colaboradores, proponen que ambas estructuras de la EcPEPC, la que tiene unido sólo al inhibidor y la que además tiene unido al análogo del sustrato, están en la forma T, por que no se observa el sitio activo en condiciones óptimas ni para la unión ni para la catálisis. Esto implica que la unión del sustrato no es exclusiva para una forma de la enzima, es decir no sólo se une a la forma R sino también a la forma T. Falta por conocer si la unión del inhibidor es o no exclusiva.

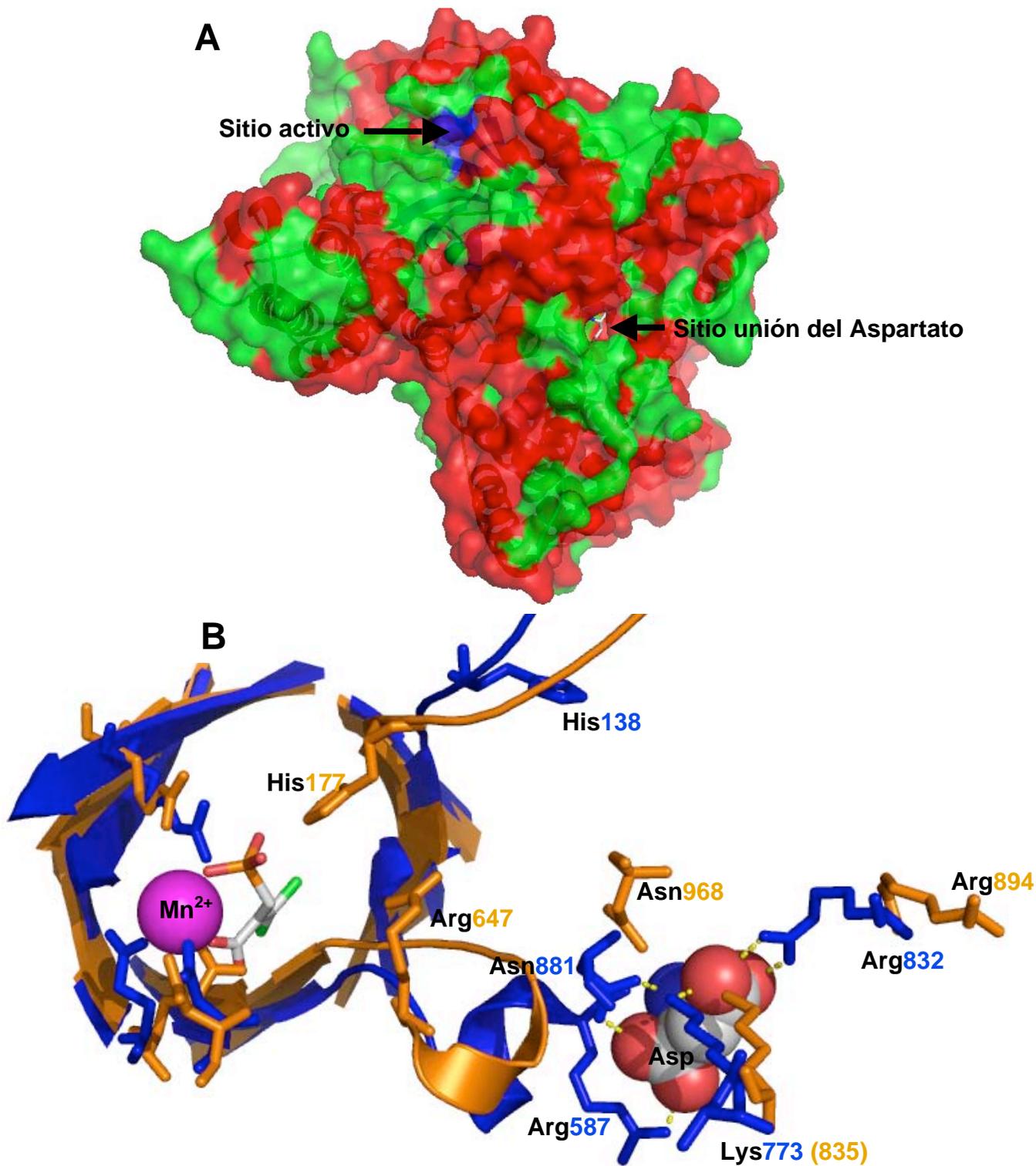


Figura 11. Sitio de unión del inhibidor alostérico aspartato. Panel A, estructura de superficie del sitio del Asp en EcPEPC-Asp (código PDB 1FIY). Panel B, sobreposición del sitio de unión del inhibidor en la estructura EcPEPC-DCDP-Mn²⁺-Asp en azul (código PDB 1JQN) y C4ZmPEPC-sulfato en naranja (código PDB 1JQO). Las figuras se realizaron con el programa PyMol (DeLano, 2002).

2.2.11.2 b) Sitio alostérico de azúcares fosforilados

La estructura de C4ZmPEPC obtenida con el anión sulfato unido mostró el posible sitio de los azúcares fosforilados. El sulfato se une en la intercara entre los monómeros de una unidad dimérica (Figura 12a Panel A) en una región en la que existen cuatro residuos positivos: las argininas 183, 184, 231 de una subunidad (Figura 12b Panel C) y la 372 de la subunidad vecina (Figura 12a Panel B; Matsumura et al., 2002). El anión forma puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de Arg183 y Arg231, con el nitrógeno peptídico de Arg184 y con la cadena lateral y el nitrógeno peptídico de la Ser185 (Figura 12b Panel C). La Arg184 está formando dos puentes de hidrógeno fuertes con el Glu360 de la otra subunidad, mientras que el hidroxilo de la Ser185 de uno de los monómeros de la unidad dimérica forma dos puentes de hidrógeno con la cadena lateral de la Arg372 de la subunidad vecina (en el otro monómero también pudieran existir esos puentes de hidrógeno pero serían más débiles). Estas interacciones entre los dos monómeros en la zona del sitio alostérico para azúcares fosforilados pudieran participar en la transmisión de la señal alostérica de una subunidad a la otra. Simulaciones de dinámica molecular *in silico* indican que el grupo fosfato de la Glc6P ocuparía la misma posición que el anión sulfato en el cristal de la C4ZmPEPC (Mancera and Carrington, 2005).

Se sabe por estudios de velocidad inicial que los azúcares fosforilados no requieren de Mg^{2+} para unirse a su sitio alostérico (Mújica-Jiménez et al., 1998), lo que se confirma con la estructura de C4ZmPEPC con el anión sulfato unido en ausencia de un metal.

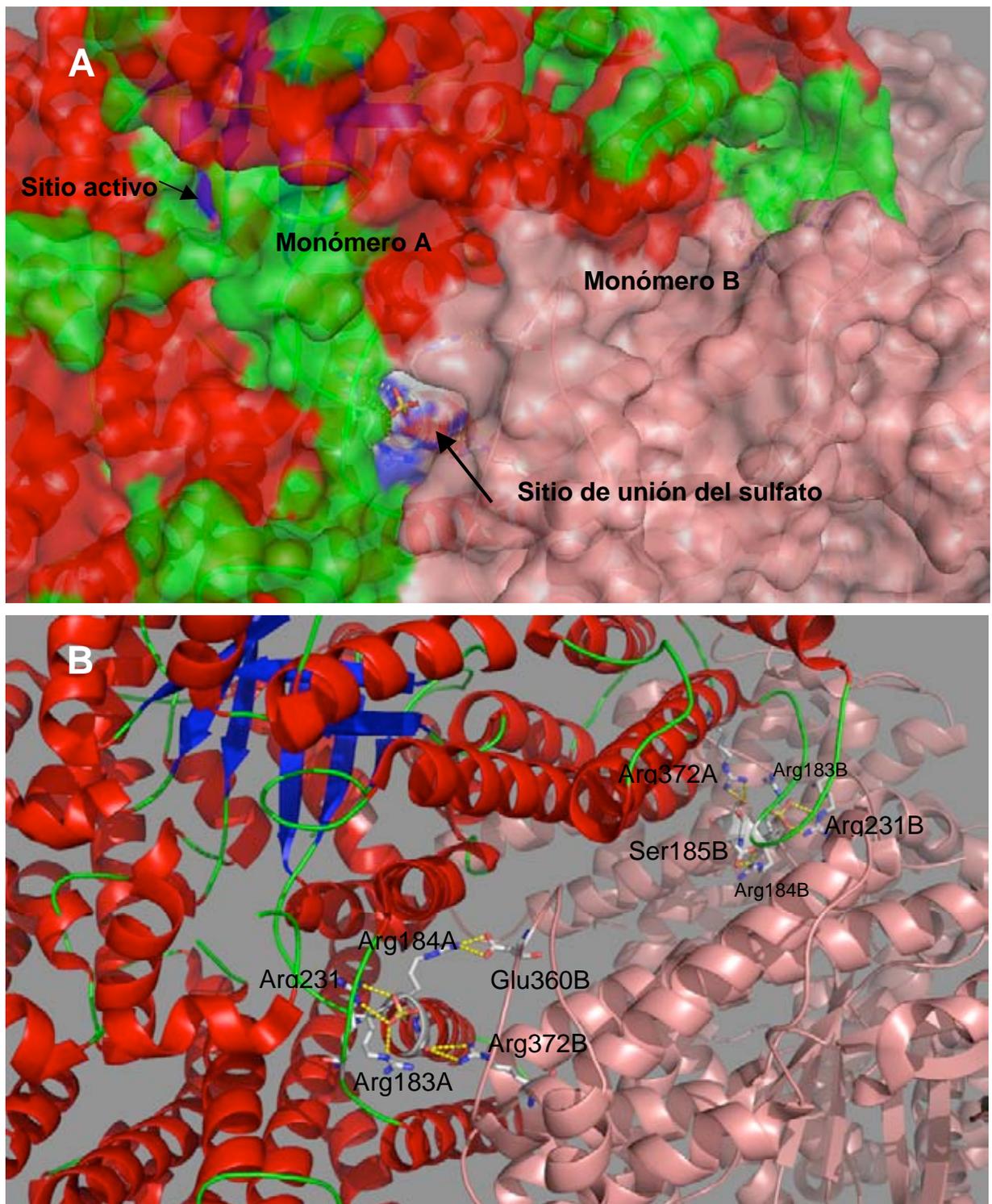


Figura 12a. Sitio de azúcares fosforilados en C4ZmPEPC. Panel A, sitio activo y del sulfato indicado con flechas en estructura de superficie. Panel B, dímero de C4ZmPEPC (código PDB 1JQO) con el sitio de unión del sulfato, mostrando la estructura secundaria en listones. La letra A corresponde a los residuos de la cadena A (rojo), mientras que la letra B corresponde a los residuos de la cadena B (rosa) de C4ZmPEPC.

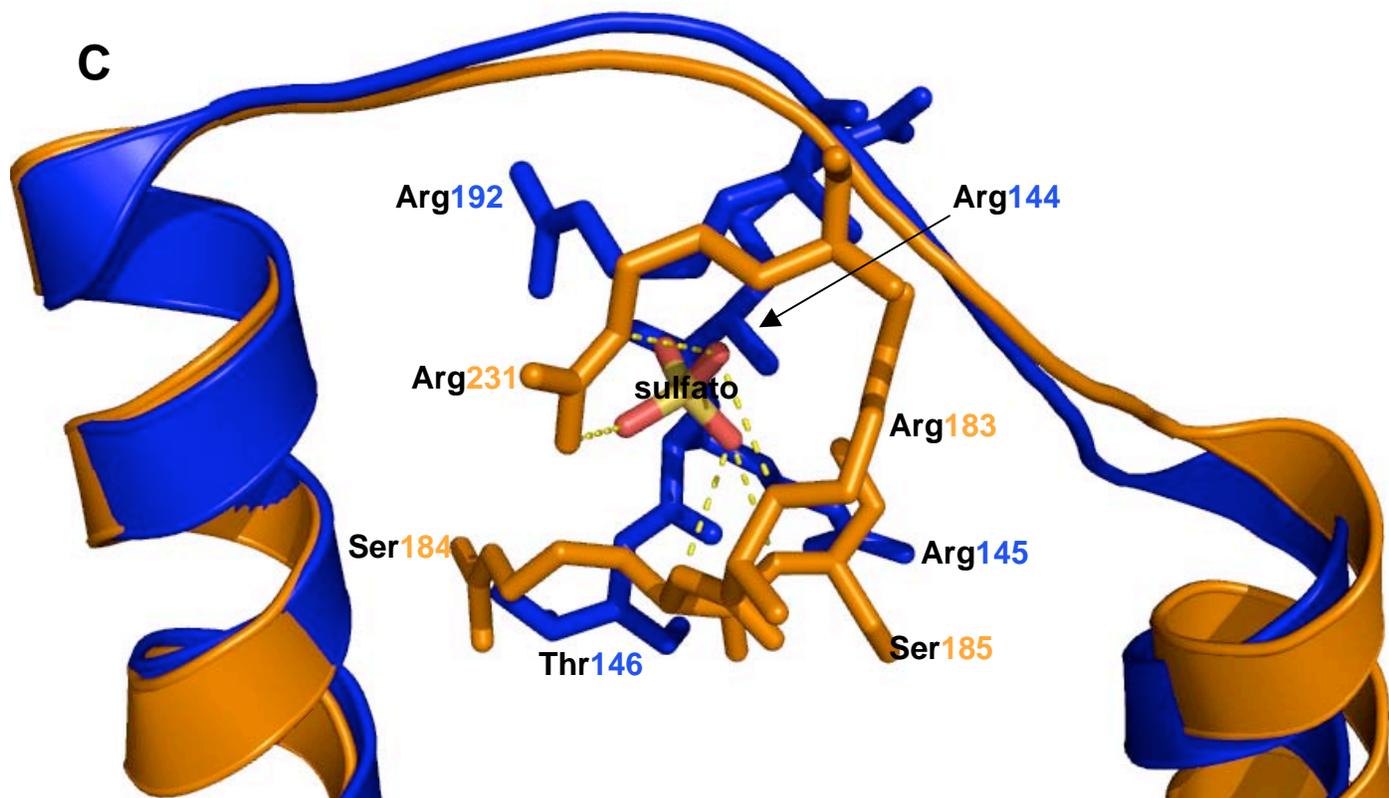


Figura 12b. Sitio de azúcares fosforilados en C4ZmPEPC. C) Sobreposición del sitio de unión del sulfato en C4ZmPEPC en color naranja (código PDB 1JQO) y EcPEPC EcPEPC-Mn²⁺-DCDP-Asp en azul (código PDB 1JQN). Las figuras se realizaron con el programa PyMol (DeLano, 2002).

2.2.11.2 c) Sitio alostérico de aminoácidos neutros

Los estudios de mutagénesis sitio dirigida en 7 residuos que comprenden la región 226-232 de C4ZmPEPC sugirieron que el sitio de unión de la Gly puede estar muy cerca de los sitios propuestos de unión de la Glc6P y del inhibidor malato (Yuan et al., 2006) (Figura 13). Las enzimas mutantes R226Q y E229A mostraron una disminución en la afinidad por la Gly y por los inhibidores malato o aspartato (Yuan et al., 2006). La Gly puede evitar la inhibición por malato aumentando la $I_{0.5}$ por el inhibidor (Gillinta and Grover, 1995; Gao and Woo, 1996; Tovar-Méndez et al., 2000). Además existe evidencia cinética de que la Gly y el malato son mutuamente excluyentes (Tovar-Méndez et al., 2000).

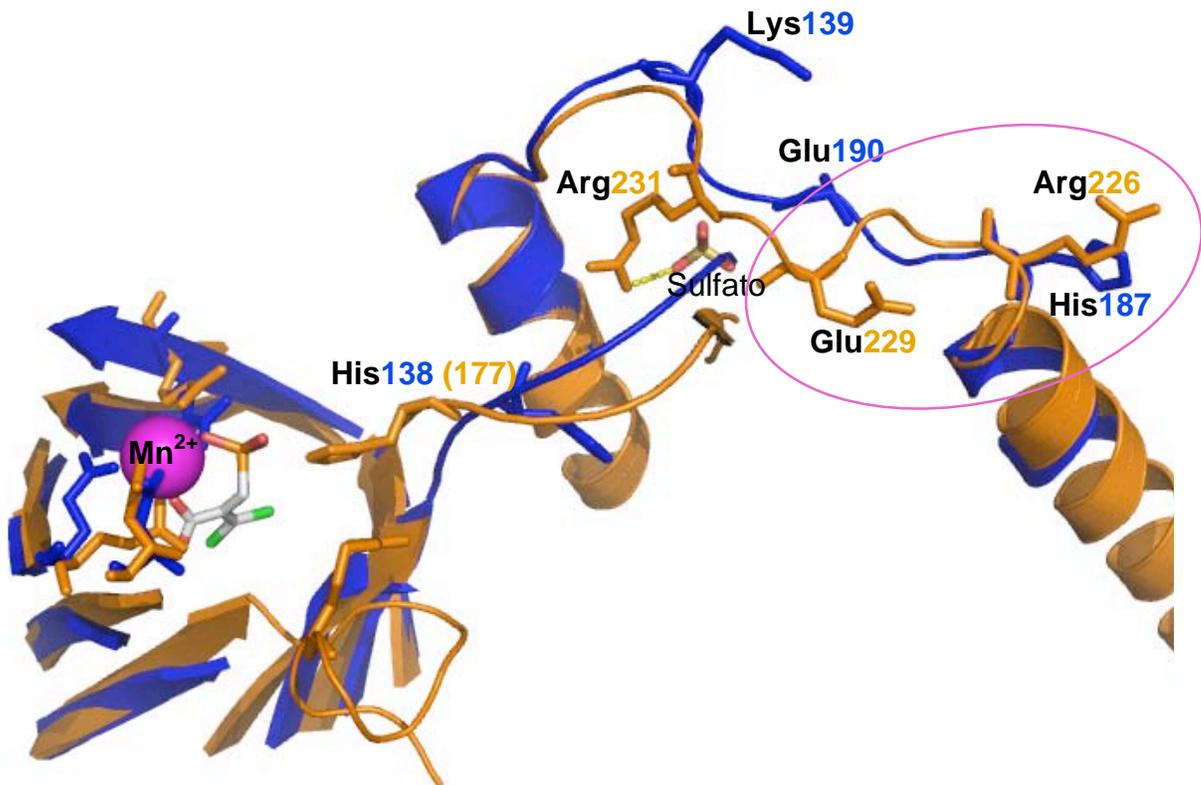


Figura 13. Posible sitio de unión de Gly en C4ZmPEPC. Sobreposición de las estructuras de EcPEPC-Mn²⁺-DCDP-Asp, en color azul (código PDB 1JQN) y C4ZmPEPC, en color naranja (código PDB 1JQO). El sitio probable de la Gly se muestra dentro de la línea rosa. Las representaciones de las estructuras se realizaron con el programa PyMol (DeLano, 2002).

2.3 Técnicas para el estudio de cambios conformacionales de las proteínas

Son numerosas las técnicas que pueden usarse para detectar y caracterizar los cambios conformacionales asociados a la transición alostérica. A continuación describiré brevemente las más utilizadas.

El espectro de dicroísmo circular en la región del UV lejano es una de las técnicas más utilizadas en el estudio de cambios conformacionales en solución. Esta técnica evalúa características globales de la estructura secundaria en las proteínas y permite cuantificar las proporciones relativas de hélices α , hebras β , giros y estructura no repetitiva ("random coil"). La fluorescencia de residuos aromáticos como el Trp (fluorescencia intrínseca), es de gran utilidad para monitorear el microambiente de una proteína y proporcionar información de cambios conformacionales. Sin embargo, el requisito para realizar fluorescencia intrínseca es que los sitios de interés a monitorear tengan un residuo de aminoácido fluorescente, y que estos no estén muy próximos entre sí por que de lo contrario habrá transferencia de energía y apagamiento de la fluorescencia. La fenilalanina, tirosina y triptofano pueden emitir fluorescencia al ser excitados por luz en la región UV del espectro electromagnético. La fluorescencia de la fenilalanina en presencia de tirosina y triptofano 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 triptofano (Teale, 1960; Freifelder, 1982), por lo que casi no se utiliza con la excepción de si la proteína no tiene Trp. La fluorescencia del triptofano es la que generalmente se usa cuando se quiere estudiar la fluorescencia intrínseca de las proteínas, aunque se deben considerar los factores antes mencionados teniendo en cuenta además que la fluorescencia de los triptofanos también puede apagarse, si el triptofano tiene un grupo ácido protonado junto a él (Freifelder, 1982), entre otros factores.

La fluorescencia de compuestos como el 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) (fluorescencia extrínseca) es otra de las técnicas en el estudio de cambios conformacionales que nos da información sobre la estructura terciaria de proteínas. El

ANS que en solventes polares es un fluoróforo muy débil, disuelto en solventes no polares o unido a las regiones hidrofóbicas de las proteínas emite una señal de fluorescencia clara (Brand et al., 1967), detectando así cambios de polaridad y viscosidad en el microambiente, sin afectar la unión de los ligandos a la proteína.

Las técnicas de cinética rápida (por ejemplo, mediante flujo detenido o “stopped flow”) acopladas a las técnicas espectroscópicas permiten determinar la cinética de la unión de un ligando a la proteína, si ésta se lleva a cabo en escalas de tiempo de milisegundos, y la cinética del cambio conformacional asociado a la transición alostérica, que generalmente es más lento. Además, actualmente, es posible hacer aún más lento el cambio conformacional de proteínas como la hemoglobina, que ha sido el paradigma de las proteínas alostéricas, fijándolas a un soporte sólido como sílica para estudiar el fenómeno de unión mediante espectroscopia de fluorescencia (Shibayama and Saigo, 1995; Bettati and Mozzarelli, 1997; Bruno et al., 2001; Shibayama and Saigo, 2001). La encapsulación de proteínas en sílica gel no sólo hace más lentos los cambios conformacionales que se dan a nivel terciario, sino que fija a la proteína en un estado cuaternario (T o R), ya que los movimientos mayores de la proteína están limitados por el soporte sólido (Shibayama and Saigo, 1995; Bettati and Mozzarelli, 1997; Das et al., 1999; Juszczak and Friedman, 1999; Shibayama, 1999; Khan et al., 2000; Shibayama and Saigo, 2001).

Una de las técnicas usadas para la elucidación de la dinámica de proteínas en solución es la resonancia magnética nuclear (NMR de sus siglas en inglés), mediante la cual podemos caracterizar subconformaciones de una proteína así como los movimientos de los átomos de la cadena principal y de las cadenas laterales (Fischer et al., 1998; Kay, 1998; Wand, 2001). Sin embargo, tiene el inconveniente de que sólo las proteínas pequeñas pueden ser estudiadas. Además, se requiere una concentración de proteína en el intervalo milimolar y el que la proteína no se agregue en solución.

La proteólisis limitada también ha sido muy utilizada para estudiar cambios conformacionales en las proteínas nativas, inclusive se ha usado para monitorear los procesos de agregación de proteínas a amiloides. La proteólisis limitada requiere que la proteína tenga sitios de corte específicos expuestos para que una proteasa sea capaz de romper el enlace peptídico en esa región. A partir de estructuras tridimensionales de

algunas proteínas sujetas a proteólisis se sabe que el corte no ocurre dentro de elementos de estructura secundaria (por ejemplo dentro de hélices α), sino sólo en las asas. Esto es muy importante porque la técnica permite identificar sitios de mayor flexibilidad o de desplegamiento localizado de una cadena polipeptídica (Fontana et al., 2004). Para poder llevar a cabo experimentos que produzcan resultados óptimos es necesario considerar factores como concentración baja de proteasa, tiempos de reacción cortos y una temperatura preferentemente baja. Sin embargo, la determinación de estas condiciones no es fácil y depende fundamentalmente del propósito del experimento y las características de la proteína que se utilice como sustrato.

Finalmente, la disponibilidad de microcalorímetros ayuda a estudiar la dinámica molecular de una macromolécula a nivel termodinámico, lo que permite cuantificar cambios en la entropía y entalpía relacionados con cambios conformacionales en una proteína (Reinhart et al., 1989).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los aspectos aún no aclarados sobre la regulación de C4ZmPEPC es el del mecanismo responsable de los efectos alostéricos. Se ha propuesto (Frank et al., 1999; Frank et al., 2001) que la regulación alostérica de la enzima puede explicarse de acuerdo al modelo concertado de MWC (Monod et al., 1965). En el caso de la C4ZmPEPC, la conformación T tendría alta afinidad por el inhibidor malato, mientras que la conformación R tendría alta afinidad por el sustrato y los activadores alostéricos. De acuerdo a este modelo, el sustrato y los activadores desplazarían el equilibrio hacia la forma R, mientras que el inhibidor malato lo haría hacia la forma T. Los resultados de los estudios de unión utilizando la técnica de flujo detenido son consistentes con un desplazamiento por la unión de los ligandos del equilibrio preexistente entre dos formas de la enzima (modelo MWC) y no con la inducción por los ligandos de un cambio conformacional que sería consistente con el modelo de regulación alostérica propuesto por Koshland, Nemethy y Filmer (Koshland et al., 1966). Sin embargo, resultados experimentales obtenidos en nuestro laboratorio, tanto de unión como de velocidad inicial (Tovar-Méndez et al., 1995; Tovar-Méndez et al., 1997; Mújica-Jiménez et al., 1998; Tovar-Méndez et al., 1998; Tovar-Méndez et al., 2000) no pueden explicarse por un mecanismo de regulación alostérica que contemple sólo dos estados conformacionales como propone el modelo MWC. Los resultados antes mencionados sugieren particularidades muy interesantes en la regulación de la C4ZmPEPC, concretamente la existencia de más de un estado de alta afinidad, o R, que la hacen diferente de otras enzimas alostéricas, pero que aún no se pueden integrar de forma concluyente en un modelo particular del comportamiento alostérico de esta enzima.

4. HIPÓTESIS

Los dos tipos de activadores de la enzima C4ZmPEPC, azúcares fosforilados y aminoácidos neutros, llevan a la enzima a diferentes estados conformacionales de alta afinidad o diferentes estados R según la nomenclatura del modelo MWC, que a su vez son distintos del que resulta de la saturación por el PEP.

5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo general*

Estudiar la unión de los ligandos, sustrato, activadores e inhibidor, de la C4ZmPEPC no fosforilada (forma de noche) usando la fluorescencia extrínseca del ANS como herramienta para detectar tanto la unión como el estado conformacional resultante.

5.2 *Objetivos particulares*

1. Determinar los cambios en fluorescencia extrínseca del ANS unido a la enzima C4ZmPEPC cuando ésta se titule con sus ligandos.
2. A partir de los cambios observados, determinar los parámetros de unión de estos ligandos y el efecto que la unión de alguno de ellos tenga sobre la unión de otro(s), en ausencia y presencia de glicerol.
3. Comparar los cambios máximos en la fluorescencia y los parámetros de unión de los ligandos a la enzima obtenidos en ausencia y presencia de glicerol.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 *Reactivos*

PEP (sal de monociclohexil amonio), 2- β -mercaptoetanol, glucosa 6 fosfato (sal de monosodio), NADH (sal disódica), Glc6P, malato, Gly, málico deshidrogenasa de corazón de porcino, EDTA (sal disódica), ANS y HEPES se compraron a Sigma Aldrich.

6.2 *Métodos*

6.2.1 *Purificación y ensayo de actividad de C4ZmPEPC*

La enzima se purificó a partir de hojas de maíz (Chalqueño) de 8 semanas de crecimiento, de acuerdo al protocolo puesto a punto en el laboratorio (Tovar-Méndez et al., 1997). La actividad de PEPC se midió espectrofotométricamente en un ensayo enzimático acoplado, utilizando málico deshidrogenasa, y siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm, en cubetas de 1 cm de paso de luz a 30 ± 1 oC (Figura 14) . El medio de ensayo estándar consistió en una solución de HEPES-KOH 100 mM, pH 7.4, conteniendo EDTA 1 mM, NADH 0.2 mM, NaHCO₃ 10 mM, PEP 5 mM, 10 mM MgCl₂ y 4 unidades de málico deshidrogenasa en un volumen final de 500 μ L. La reacción se inició adicionando 2 μ L de solución de enzima. Para medir la actividad se utilizó un espectrofotómetro DU-7500, Beckman Instruments, Fullerton, CA que cuenta con un equipo de circulación de agua con temperatura controlada. La unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que produce la transformación de 1 μ mol de sustrato por minuto a 30 oC bajo nuestras condiciones experimentales. Los estudios de inhibición por malato para probar la completa desfosforilación de la enzima se realizaron como se ha reportado previamente (Tovar-Méndez et al., 1998).

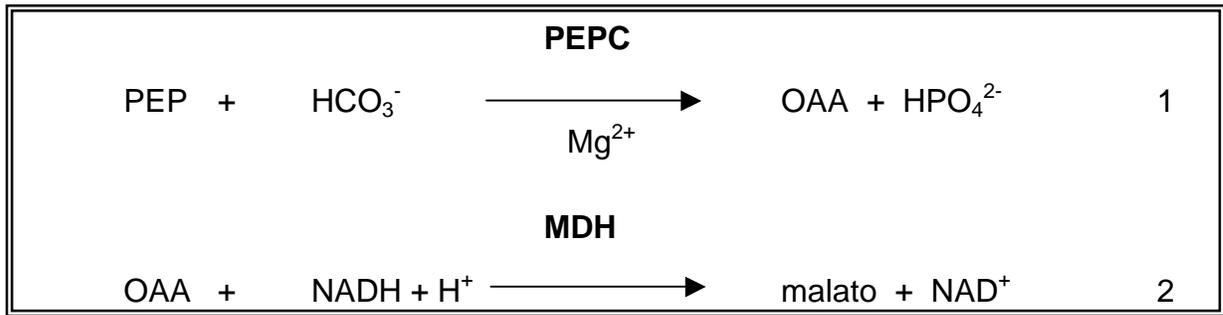


Figura 14. Ensayo acoplado de PEPC. 1. La PEPC carboxila al fosfoenolpiruvato tomando como fuente de CO₂ el bicarbonato presente en el medio, en presencia de Mg²⁺. 2. El oxalacetato producido es reducido a malato por la málico deshidrogenada dependiente de NADH (MDH), el nucleótido es consumido del medio para formar simultáneamente su forma oxidada.

6.2.2 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de PEPC se determinó usando su absorptividad molar, ϵ_{280} 109,895 M⁻¹cm⁻¹, calculado a partir de la secuencia de aminoácidos de C4ZmPEPC (Gill and Von Hippel, 1989). La pureza de la preparación de la enzima se determinó por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y revelado con Azul de Coomassie.

6.2.3 Experimentos de unión al equilibrio mediante fluorescencia extrínseca

Para los experimentos de unión utilizamos una concentración de C4ZmPEPC-OH (forma de noche de la C4ZmPEPC) de 1.4 μ M, disuelta en un amortiguador de HEPES-KOH 50 mM, pH 7.3, EDTA 0.1 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, en ausencia o presencia de glicerol 10 % (v/v). Los estudios se realizaron a 30 °C. A la celda se le añade un exceso de ANS (30 μ M) tras lo cual se le adiciona la solución madre de ligando hasta lograr la saturación de la enzima. La longitud de onda utilizada para excitar al ANS fue de 370 nm. La fluorescencia de este compuesto se registró en un intervalo de longitud de onda de emisión de 400-600 nm. Se realizaron controles para determinar el efecto de la dilución y agitación sobre la fluorescencia y con ellos se corrigieron los datos experimentales antes de su análisis.

6.2.4 Análisis de datos

Para determinar los parámetros de unión de los ligandos a la enzima se graficó la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de emisión máxima, expresada como el por ciento de la fluorescencia en ausencia de este ligando, frente a la concentración del ligando. Los datos experimentales se analizaron por regresión no lineal, utilizando el programa Origin (Microcal Origin) formulado con el algoritmo de Marquardt (1963). Los datos de titulación en los que el cambio de fluorescencia depende de la concentración del ligando variable de forma hiperbólica, se ajustaron a la ecuación de una hipérbola:

$$IF = IF [L] / (L_{0.5} + [L]) \quad \mathbf{1}$$

en donde IF es el cambio máximo o mínimo de intensidad de fluorescencia producido por el ligando, $[L]$ concentración de ligando y $L_{0.5}$ es la concentración de ligando que produce la mitad del cambio máximo de fluorescencia.

Los datos de titulación en los que el cambio de fluorescencia varía con la concentración del ligando en forma sigmoideal, se ajustaron a una expresión derivada de la ecuación de Hill:

$$IF = IF [L]^h / (L_{0.5}^h + [L]^h) \quad \mathbf{2}$$

en donde IF es el cambio máximo o mínimo de intensidad de fluorescencia producido por el ligando, $[L]$ concentración de ligando, $L_{0.5}$ es la concentración de ligando que produce la mitad del cambio máximo de fluorescencia y h es el número de Hill.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Titulación de la enzima por sus ligandos en presencia y ausencia de glicerol

Mediante espectroscopía de fluorescencia, se estudió la unión a la enzima C4ZmPEPC de cuatro de sus ligandos: el PEP y los efectores alostéricos Glc6P, Gly y malato. En este trabajo decidimos trabajar con la forma no fosforilada (de noche) como un primer acercamiento en esta investigación. Dado que encontramos que la unión de ligandos a la enzima no produce cambios importantes en la fluorescencia intrínseca de triptofanos que nos permitieran determinar los parámetros de unión, decidimos utilizar la fluorescencia extrínseca del ANS (Heitz and Brand, 1971; Brand and Gohlke, 1972; Wang and Portis, 1991). En estos estudios determinamos el cambio conformacional que resulta de la unión de la C4ZmPEPC por sus ligandos, que asociamos con el cambio máximo en la fluorescencia extrínseca, y dos aspectos de la unión: 1) la afinidad de la enzima por el ligando con el que se esté titulando, medida por el parámetro $L_{0.5}$ que es la concentración de ligando que produce el 50% del cambio total de fluorescencia y 2) el número de Hill (h) que nos indica el grado de cooperatividad entre los sitios de unión de las subunidades de la enzima para un ligando en particular.

En la primera parte del proyecto estudiamos la unión de los ligandos a la enzima libre o previamente saturada con algún ligando en presencia de glicerol, éste compuesto se usó para mimetizar la elevada concentración de proteína y alta viscosidad existente *in vivo*. El glicerol ha sido ampliamente utilizado para mantener la estabilidad de muchas proteínas, incluida la C4ZmPEPC, durante su purificación y almacenamiento, dada la capacidad de este compuesto de favorecer la interacción proteína-proteína (Gekko and Timasheff, 1981, 1981). En el caso de la C4ZmPEPC el glicerol aumenta su actividad y afinidad por el sustrato PEP Mg y anula la cooperatividad homotrópica positiva por el sustrato (Podestá and Andreo, 1989; Mújica-Jiménez et al., 1998). No se sabe exactamente cuál es el mecanismo por el cual el glicerol aumenta la actividad de la enzima, aunque se ha propuesto que lo hace evitando la disociación que ocurriría a las pequeñas concentraciones de proteína a las que se mide la actividad

enzimática *in vitro* (Podestá and Andreo, 1989). Sin embargo, como se ha mencionado, se ha demostrado que el tiempo medio de inactivación por dilución de la enzima en el medio de ensayo en ausencia de ligandos es de 190 min, mientras que el ensayo de actividad es de 30 a 60 segundos, por lo que la enzima en este tiempo se encontrará como tetrámeros activos haya o no glicerol en el medio. Por todo ello, consideramos interesante determinar los parámetros de unión tanto en presencia como en ausencia del glicerol.

Como ejemplo de los resultados obtenidos en los estudios que aquí reportamos, en la Figura 15 se muestran los espectros de emisión del ANS obtenidos cuando la enzima se titula con PEP en presencia del fluoróforo tanto en ausencia como en presencia de glicerol. Se puede observar una disminución importante en la intensidad máxima de fluorescencia, sobre todo en presencia de glicerol, a medida que se incrementa la concentración del sustrato, y un corrimiento en la longitud de onda de emisión máxima (λ_{\max}) hacia el rojo, lo cual es una indicación de que el fluoróforo se une menos a la enzima a medida que el PEP se une y/o que el ambiente de la región o regiones de la proteína a la(s) que se une el fluoróforo es menos hidrofóbico (Heitz and Brand, 1971; Brand and Gohlke, 1972). Esto es una indicación de que hubo un rearrreglo conformacional cuando el PEP se unió a la enzima, y ésta mostró menos cavidades hidrofóbicas a las que pudo unirse el ANS.

En la Figura 16 se muestra el análisis de todos los espectros obtenidos de la unión de los cuatro ligandos a la enzima libre, análisis que nos permite conocer tanto el cambio máximo de fluorescencia como los parámetros de unión de los ligandos. Para este análisis consideramos sólo los cambios en la intensidad de fluorescencia a la λ_{\max} porque son más importantes y, por tanto, más fáciles de analizar, que los cambios en la λ_{\max} .

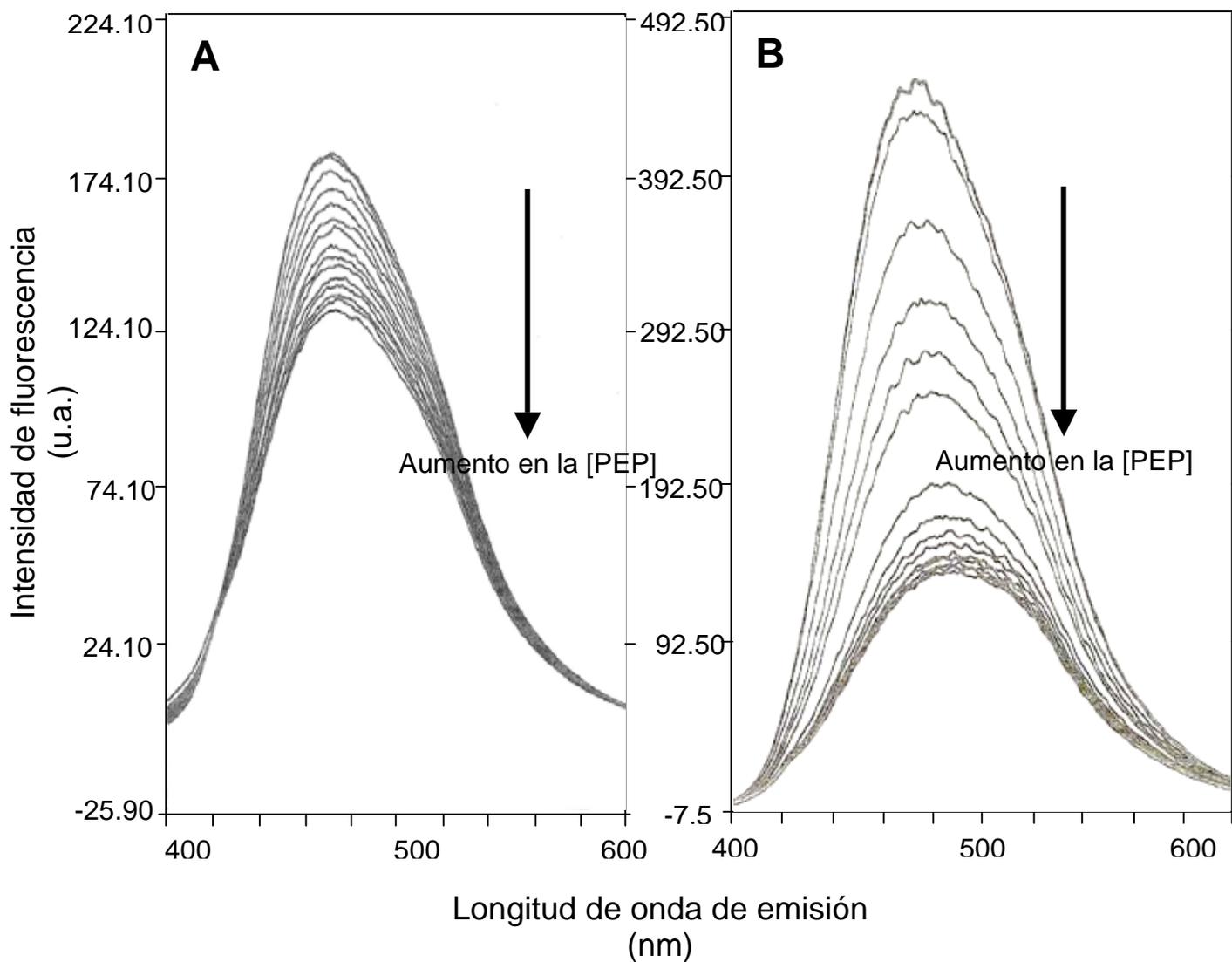


Figura 15. Efecto de la concentración de PEP (de 0-10 mM) sobre los espectros de fluorescencia extrínseca del ANS en la C4ZmPEPC-OH. Los experimentos de unión se realizaron en un amortiguador de HEPES-KOH 50 mM, pH 7.3, EDTA 0.1 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, en ausencia (Panel A) o presencia de glicerol 10 % (v/v) (Panel B). Los estudios se realizaron a 30 °C. Se utilizó una concentración de ANS de 30 μ M, y una concentración de proteína de 1.4 μ M (0.15 mg/mL). La longitud de onda de excitación del ANS fué de 370 nm.

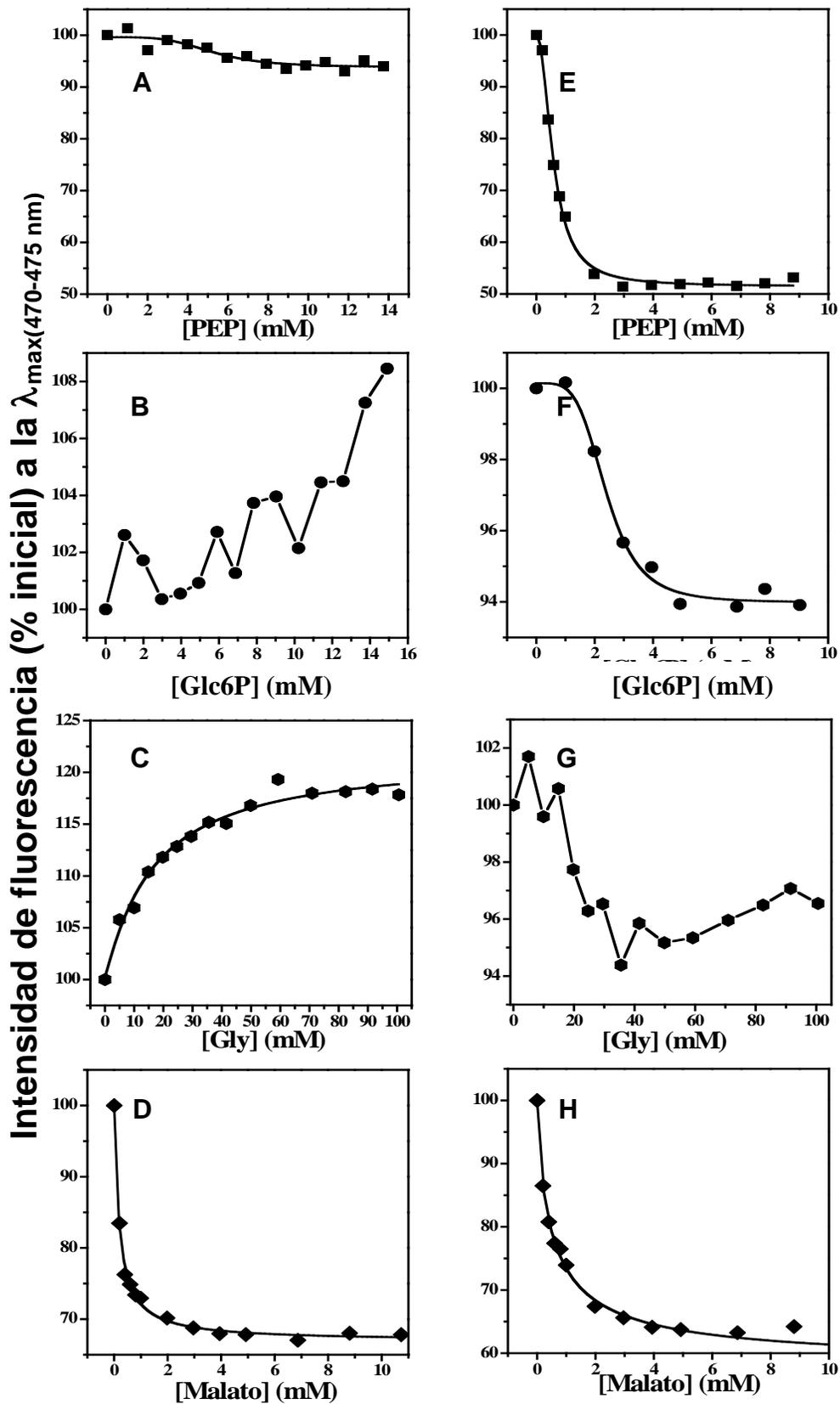


Figura 16. Intensidad de fluorescencia en función de la concentración de los cuatro ligandos a la enzima libre en ausencia (A-D) y presencia (E-H) de glicerol.

Con los datos de unión de la Glc6P a la enzima en ausencia de glicerol y con los de la unión de la Gly en presencia de glicerol no fue posible obtener buenos ajustes, ya que aunque en los dos casos se observan ligeros cambios en la fluorescencia al ir titulando con el ligando, los valores son muy dispersos en comparación con los obtenidos en los estudios de la unión del resto de los ligandos. Éste fue también el caso cuando las titulaciones con estos activadores se hicieron en presencia de concentraciones saturantes de otros ligandos.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos cuando la enzima libre se tituló con los cuatro ligandos usados en este estudio.

Tabla 3. Parámetros de unión de los ligandos a C4ZmPEPC-OH en ausencia y presencia de glicerol.

Ligando variable	Sin glicerol			Con glicerol		
	$L_{0.5}$ (mM)	h	$IF_{min \text{ ó } max}$ (% inicial)	$L_{0.5}$ (mM)	h	$IF_{min \text{ ó } max}$ (% inicial)
PEP	7.00± 0.63	3.37 ± 0.85	93	0.58±0.02	2.1±0.16	50
Glc6P	ND	ND	ND	2.40±0.11	4.0±0.00	94
Gly	16.63±3.15	1.08 ± 0.20	117	ND	ND	ND
Malato	0.23± 0.02	0.99 ± 0.11	70	0.51±0.06	0.82±0.09	65

ND: Parámetro no determinado.

Como puede observarse en la Figura 16 grafico A y E y Tabla 3, el glicerol favorece notablemente la unión del PEP bajo condiciones no catalíticas de nuestros experimentos, igual que lo hace bajo condiciones catalíticas (Podestá and Andreo, 1989; Mújica-Jiménez et al., 1998; Tovar-Méndez et al., 2000). El PEP se une cooperativamente tanto en ausencia como en presencia de glicerol, pero la cooperatividad es mucho mayor cuando no hay glicerol en el medio. Además, el cambio máximo en la intensidad de fluorescencia producido por la unión del PEP es bastante menor si no está presente el cosoluto. En conjunto, estos resultados indican que la conformación de la enzima en presencia de glicerol es muy diferente del que tiene en su ausencia. Aunque desconocemos las diferencias entre estas conformaciones son a nivel terciario o cuaternario.

Al titular a la enzima con la Glc6P en un medio sin glicerol (Figura 16, grafico B y Tabla 3), si se observó un cambio pequeño en la fluorescencia del ANS inducido por este activador, aunque no se obtuvo un buen ajuste de los datos por lo que no fue posible determinar los parámetros de unión para este activador. Tampoco se pudo medir esta unión en experimentos en los que se estudió la protección ofrecida por la Glc6P frente a la insensibilización de la enzima al activador producida por modificación química con piridoxal 5 fosfato (un reactivo específico para lisinas) (Tovar-Méndez et al., 1995). Sin glicerol el activador Glc6P no fue capaz de proteger a la enzima frente a la insensibilización por el piridoxal 5 fosfato, pero sí lo fue cuando los experimentos se realizaron en presencia del cosoluto. Conjuntamente, estos resultados parecen indicar que la Glc6P no se une, o se une pobremente en ausencia del glicerol, es decir que la enzima en estas condiciones (no cosoluto y condiciones no catalíticas) no tiene bien conformado el sitio alostérico para el activador (Figura 16, grafico B y Tabla 3). Una explicación alternativa es que sí se una la Glc6P, pero que lo haga de forma que no altere la unión del ANS ni proteja a la Lys sujeto de la modificación química con PLP. De cualquier forma, estos resultados están de nuevo indicando diferencias entre las conformaciones que la enzima tiene en presencia o ausencia de glicerol.

En presencia de glicerol, el valor de 4 del número de Hill nos indica que la Glc6P se une con la máxima cooperatividad posible, ya que la enzima es tetramérica (Figura 16, grafico F y Tabla 3). Este resultado, junto con la ausencia de cambios claros en la fluorescencia cuando no hay glicerol en el medio, sugiere que con o sin glicerol el equilibrio entre dos formas de la enzima, la que no une a la Glc6P y la que sí la une, está muy desplazado hacia la primera (sin glicerol), pero que en presencia del cosoluto existe aunque sea una pequeña proporción de enzima capaz de unir al activador y, por tanto, de desplazar el equilibrio hacia la forma que si lo une (Figura 16 grafico B y F; Tabla 3).

Con respecto al activador Gly (Figura 16 grafico C y G; Tabla 3), mientras que la presencia del glicerol en el medio no nos permitió obtener los datos de la unión de este activador, en ausencia de este cosoluto sí se observaron cambios en la fluorescencia extrínseca de la enzima inducidos por la Gly. Estos resultados pudieran explicarse por las mismas razones que las dadas para el caso de la Glc6P, pero en el caso de la Gly

otra posible explicación sería que el cosoluto se una en o cerca del sitio de unión de este activador estorbando su unión. Es necesario probar el efecto de otros cosolutos, como por ejemplo polietilenglicol, comparándolos con los observados con glicerol, para poder discernir si los efectos de éste último sobre la unión de los ligandos son inespecíficos, es decir, si se deben al efecto del cosoluto sobre las propiedades fisicoquímicas de la solución, o podrían ser específicos, es decir se deben, al menos en parte, a la unión del glicerol a la enzima. El obtener una estructura cristalográfica de la C4ZmPEPC en presencia de glicerol permitiría comprobar o descartar en forma definitiva la unión del glicerol a la enzima.

La unión de la Gly a la enzima libre en ausencia de glicerol (Figura 16, grafico C; Tabla 3) produjo un aumento en la intensidad máxima de fluorescencia con respecto a la observada cuando el ligando no está presente. Ello indica que el cambio conformacional que la enzima posee cuando está saturada con la Gly une mejor al ANS que la enzima libre no unida a ningún ligando, y contrasta con los resultados obtenidos con los otros ligandos, los que disminuyen la unión del ANS a la enzima (Figura 16 y Tabla 3). Parece entonces que la Gly favorece un cambio conformacional de la enzima con más regiones hidrofóbicas expuestas. El cambio en la conformación de la enzima inducido por la Gly parece darse a nivel de estructura terciaria y no cuaternaria, ya que no se observó ninguna cooperatividad en la unión del activador.

Es interesante que, a juzgar por el cambio máximo en la intensidad de la fluorescencia a la λ_{max} que producen, ninguno de los dos activadores, ni la Glc6P ni la Gly, llevan a la enzima a la misma conformación que el PEP, lo que sugiere al menos tres diferentes estados de alta afinidad, no un único estado R como propone el modelo MWC.

Por lo que respecta a malato (Figura 16, grafico D y H; Tabla 3), es interesante que se une a la enzima libre con mayor afinidad que el PEP (30 veces mayor) cuando no está presente el glicerol y mantiene su afinidad cuando está el cosoluto. Puesto que se conoce que la inhibición por malato es fundamentalmente de tipo competitivo (González et al., 1984; Rodríguez-Sotres et al., 1987), estos resultados indicarían que es un inhibidor muy potente, sobre todo porque, además, los niveles intracelulares del inhibidor son más altos que los del PEP (Tovar-Méndez et al., 2000). Sin embargo, hay

que tener en cuenta que el verdadero sustrato de la reacción catalizada por la C4ZmPEPC es el complejo PEP_{Mg} y que la afinidad de la enzima por este complejo es significativamente más alta que por el PEP libre (Tovar-Méndez et al., 1998).

Tampoco conocemos la razón por la que en presencia de glicerol el inhibidor se une a la enzima con ligera cooperatividad negativa (este resultado se repite en todos los experimentos de unión del inhibidor a C4ZmPEPC y es consistente con el que se observó en estudios cinéticos). Hay dos posibles explicaciones: la primera es que en presencia del cosoluto la unión del inhibidor a su sitio alostérico se dificulte a medida que se vayan ocupando estos sitios, es decir que exista una verdadera cooperatividad negativa entre los sitios de malato de las subunidades de la enzima. La segunda posibilidad es que los sitios alostéricos de diferentes subunidades no posean la misma afinidad por el inhibidor, es decir, que en la molécula tetramérica de enzima exista heterogeneidad de estos sitios de unión al inhibidor. A pesar de que se cuenta con un cristal de C4ZmPEPC obtenido en ausencia del inhibidor y que éste no muestra heterogeneidad en el sitio alostérico para malato (Matsumura et al., 2002) no podemos concluir que la primera explicación sea la válida, por que este cristal se obtuvo en ausencia de glicerol.

7.2 Unión de PEP a la enzima saturada con activadores o inhibidor

En la Figura 17 y en la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos cuando la enzima previamente saturada con la Glc6P, la Gly o el inhibidor se tituló con el PEP.

Para facilitar la comparación y la interpretación de los datos se incluyen en esta última tabla los resultados obtenidos con la titulación con el PEP de la enzima libre que se dieron en la Figura 16 y en la Tabla 3.

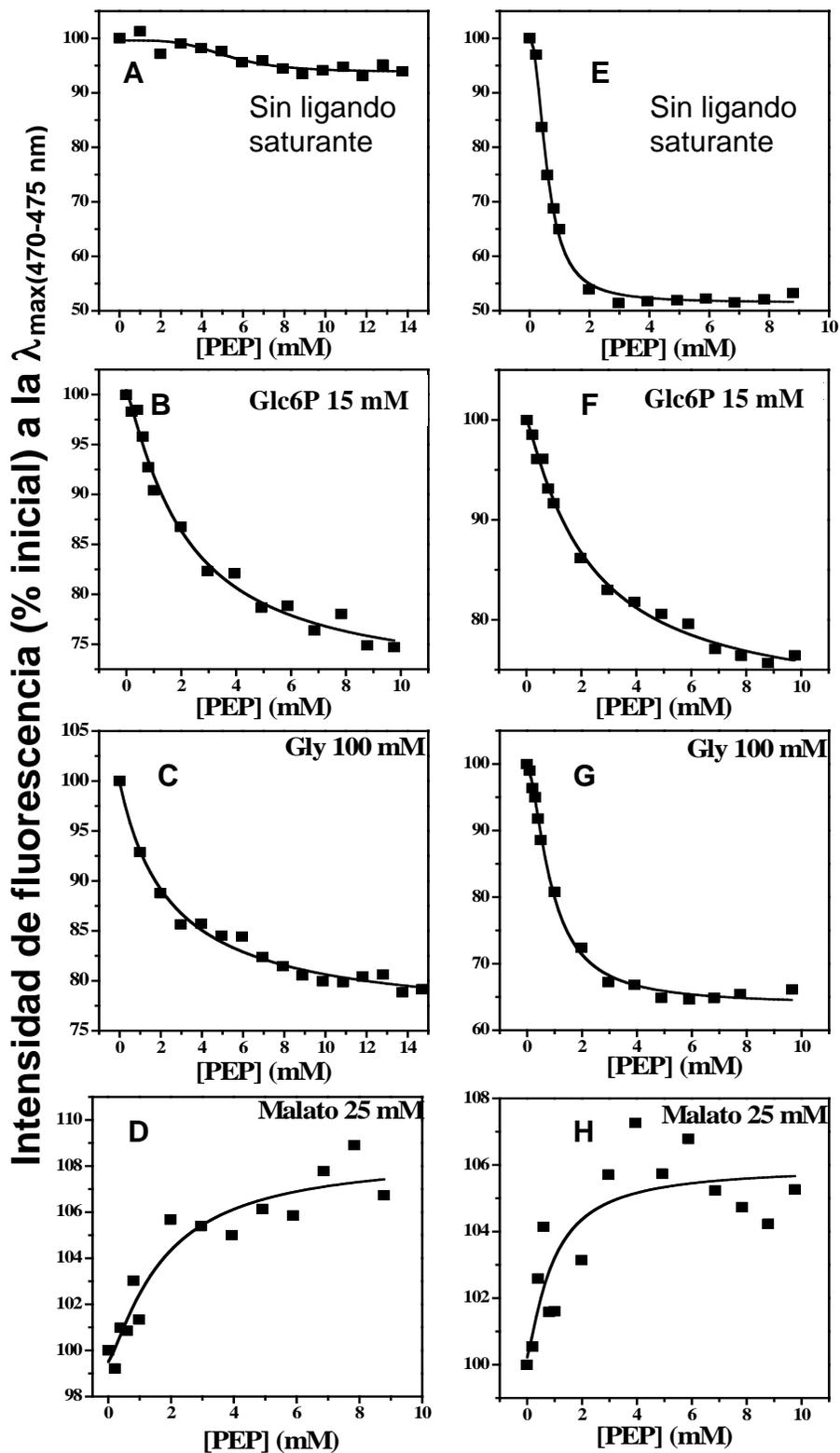


Figura 17. Intensidad de fluorescencia en función de la [PEP] de la enzima saturada con activadores o inhibidor, en ausencia (B-D) y presencia (F-H) de glicerol. La titulación por PEP a la enzima libre en ausencia y presencia de glicerol se muestra en el Panel A y E, respectivamente.

Tabla 4. Parámetros de unión de PEP a C4ZmPEPC-OH previamente saturada con sus efectores alostéricos.

Ligando fijo-saturante	Sin glicerol			Con glicerol		
	$L_{0.5}$ (mM)	h	IF_{min} (% inicial)	$L_{0.5}$ (mM)	h	IF_{min} ó max (% inicial)
ninguno	7.00± 0.63	3.37 ± 0.85	93	0.58 ±0.02	2.1±0.16	50
Glc6P	2.15± 0.43	1.16 ± 0.19	75	2.25 ±0.33	1.12±0.13	75
Gly	4.28± 0.76	1.00 ± 0.00	75	0.87± 0.05	1.06 ± 0.12	65
Malato	1.75± 0.88	1.27 ± 0.61	108	0.93± 0.63	1.26 ± 1.04	105

En ausencia del cosoluto, la Glc6P y la Gly favorecen la unión del PEP a la enzima (Figura 17, graficos B yC; Tabla 4) , aunque menos de lo que lo hace el propio glicerol. En presencia de glicerol ninguno de los activadores favorece la unión del PEP (Figura 17, graficos F y G; Tabla 4), incluso la Glc6P parece estorbarla. Es probable que glicerol por sí mismo lleve al sitio activo a la conformación idónea para unir al PEP y que, por ello, los activadores no puedan tener un efecto adicional.

Independientemente del activador con el que previamente se sature a la enzima, el PEP se une sin cooperatividad tanto en ausencia como en presencia de glicerol (Tabla 4). Este resultado sugiere que las diferencias entre los estados de alta afinidad producidos por el ligando y los activadores se dan a nivel de estructura terciaria, no cuaternaria.

Por el momento, no podemos explicar por qué en ausencia de glicerol se favorece la unión del PEP a la enzima saturada previamente con el malato (Figura 17, graficos D y H; Tabla 4), cuando hubiéramos esperado todo lo contrario. Incluso en presencia de glicerol, el incremento en la $L_{0.5}$ es bastante pequeño, curiosamente menor que el incremento que se observó en la enzima saturada con la Glc6P. Pudiera ser que los efectos inhibitorios se ejerzan sobre el complejo PEP_{Mg}, que es sobre el que se lleva a cabo la reacción de carboxilación, y no sobre la unión del PEP libre. Por otro lado es importante mencionar que el inhibidor y el PEP no parecen ser mutuamente excluyentes, como lo muestra la estructura de la EcPEPC obtenida en ausencia de

glicerol con el inhibidor (en este caso aspartato) unido a su sitio alostérico y un análogo del sustrato unido al sitio activo. De acuerdo a esa estructura, la inhibición parece mas bien deberse a que no puede llevarse a cabo la catálisis porque la His catalítica está alejada del sitio activo (Matsumura et al., 2002), y no a un efecto del inhibidor sobre la unión del sustrato. Nuestros resultados son consistentes con la formación de un complejo ternario enzima-PEP-inhibidor.

No encontramos diferencias significativas en los cambios máximos de la intensidad de fluorescencia provocados por la unión de PEP a la enzima previamente saturada con sus activadores alostéricos, tanto en presencia como en ausencia de glicerol (Figura 17, Tabla 4). En la enzima saturada previamente con el malato (Figura 17, graficos D y H; Tabla 4) se observó un incremento con respecto al cambio máximo observado en la enzima libre, sobre todo en presencia de glicerol, lo que indica una mayor exposición de regiones hidrofóbicas de la enzima unida a malato que en la enzima unida a malato y a PEP. Alternativamente, pudiera ser que el PEP haya desplazado al malato de su sitio de unión en la enzima, regresando a ésta a la conformación característica del complejo enzima-PEP que vimos uné más al ANS que el complejo enzima-malato (Tabla 3). Sin embargo, de ser éste el caso la $L_{0.5}$ para PEP hubiera aumentado, no disminuido como se observó.

7.3 Unión de Glc6P a la enzima saturada con el sustrato, Gly o malato

En la Figura 18 y en la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de la titulación de la enzima previamente saturada con alguno de los otros tres ligandos usados en nuestro estudio, con la Glc6P. Para facilitar la comparación y la interpretación de los datos, se incluyen en esta última tabla los resultados obtenidos de la titulación de la enzima libre con la Glc6P que se dieron en la Figura 16 y en la Tabla 3.

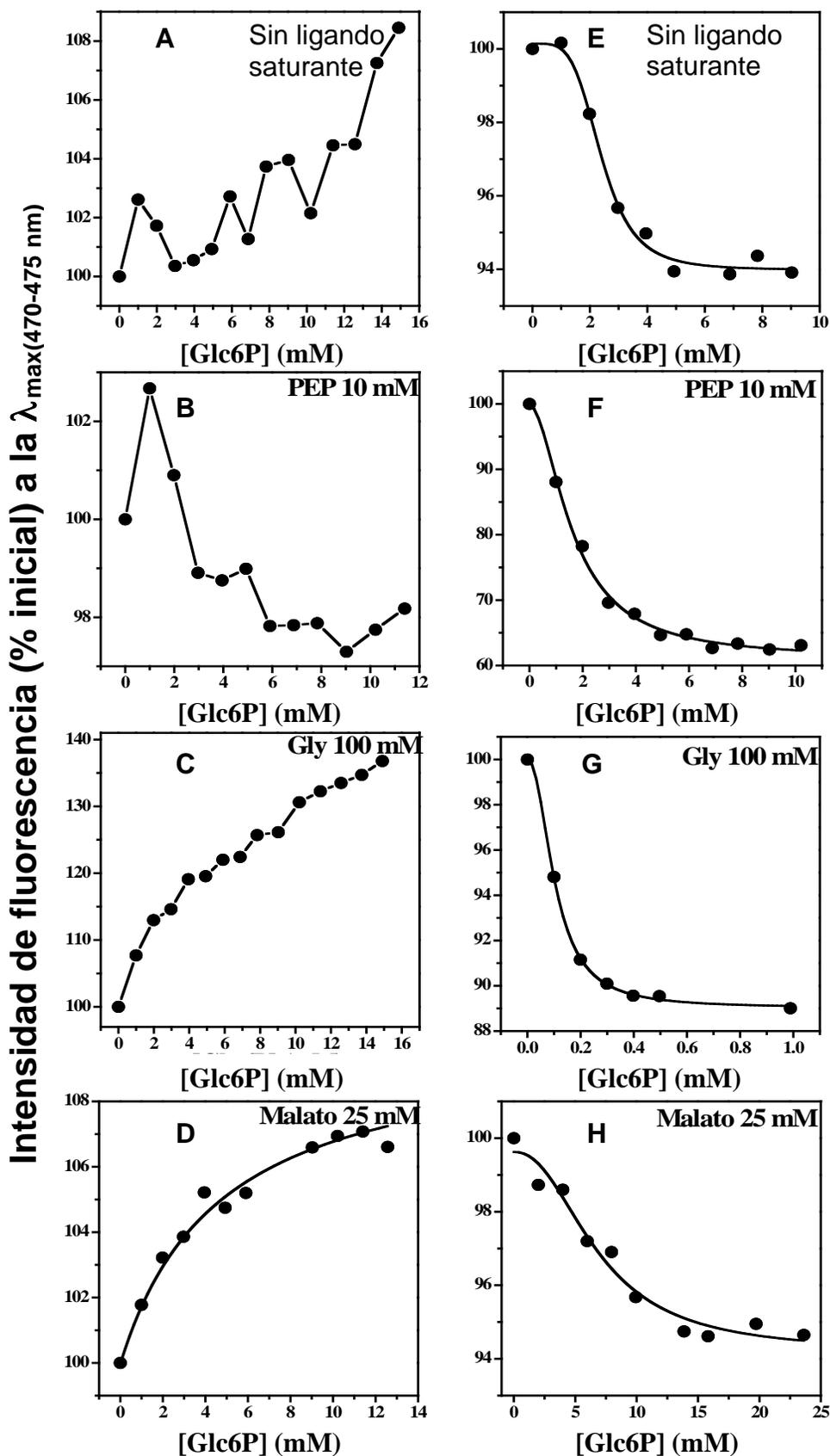


Figura 18. Intensidad de fluorescencia en función de la [Glc6P] de la enzima saturada con el PEP, la Gly o el inhibidor, en ausencia (B-D) y presencia (F-H) de glicerol. La titulación por la Glc6P a la enzima libre en ausencia y presencia de glicerol se muestra en el Panel A y E, respectivamente.

Tabla 5. Parámetros de unión de Glc6P a C4ZmPEPC-OH previamente saturada con sus efectores alostéricos.

Ligando fijo-saturante	Sin glicerol			Con glicerol		
	$L_{0.5}$ (mM)	h	IF_{max} (% inicial)	$L_{0.5}$ (mM)	h	IF_{min} (% inicial)
ninguno	ND	ND	ND	2.40±0.11	4.0±0.00	94
PEP	ND	ND	ND	1.63± 0.09	1.84 ± 0.17	65
Gly	ND	ND	ND	0.10 ±0.00	2.15±0.12	90
Malato	4.72± 0.75	1.00 ± 0.00	106	6.87± 1.01	2.25 ± 0.74	95

ND: Parámetro no determinado.

En ausencia de glicerol no fue posible determinar la unión de la Glc6P a la enzima, aunque ésta hubiera sido saturada previamente con el PEP o la Gly (Figura 18, gráficos B y C; Tabla 5). Como ya se comentó anteriormente no fue posible ajustar los datos, o la tendencia de los mismos es muy pobre. Es probable que el cambio conformacional de la enzima saturada con el PEP y la Glc6P o con la Gly y la Glu6P (complejos ternarios) en ausencia de glicerol no difiera o difiera muy poco de la conformación de los complejos binarios enzima-PEP o enzima-Gly en cuanto a su capacidad de unir al ANS, aunque no sabemos la razón por la que no observamos cambios, no se puede descartar que exista un cambio conformacional diferente de la enzima en estas condiciones. En presencia del cosoluto, sí se observaron cambios en la fluorescencia extrínseca que permitieron detectar la unión de la Glc6P a los complejos binarios enzima-PEP y enzima-Gly. Cuando comparamos los parámetros de esta unión con la que ocurre a la enzima libre, encontramos que la Gly favorece 24 veces la unión de la Glc6P, mientras que el PEP sólo la favorece 1.5 veces. Es claro por tanto que ambos complejos binarios difieren en la conformación del sitio alostérico para la Glc6P. Se sabe que ambos tipos de activadores, los azúcares fosforilados y los aminoácidos neutros, tienen efectos sinérgicos sobre la actividad de la enzima (Bandarian et al., 1992; Gillinta and Grover, 1995), lo que es consistente con el incremento en la afinidad de la enzima por la Glc6P provocado por la Gly. El incremento

pobre observado en estos estudios de unión en la afinidad por el activador provocado por el PEP contrasta con el efecto mucho mayor observado en estudios de velocidad inicial (Tovar-Méndez et al., 2000), lo que podría deberse a que bajo condiciones catalíticas el ion Mg^{2+} está presente, y por lo tanto es el PEPMg el que tiene un efecto mayor sobre la afinidad del activador. De ser esta la razón, ello indicaría que el efecto importante del sustrato sobre la unión de la Glc6P la ejerce el complejo PEPMg más que el PEP libre. Y viceversa, que el efecto de la Glc6P sobre la unión del sustrato se ejerce sobre la unión del complejo con el metal, lo que explicaría el que en nuestros estudios no encontrásemos una disminución en la $L_{0.5}$ para el PEP cuando la enzima se ha saturado previamente por la Glc6P (Tabla 4).

La unión en presencia de glicerol de la Glc6P tanto al complejo enzima-PEP, como al complejo enzima-Gly es cooperativa (Figura 18, graficos F y G; Tabla 5), pero menos que la unión a la enzima libre que mostró una cooperatividad máxima (Figura 18, grafico E; Tabla 5). Nuevamente, estos resultados no se pueden explicar mediante el modelo de sólo dos estados de MWC, ya que el PEP o la Gly deberían llevar a la enzima al estado R, que ya no sufriría ningún cambio conformacional a nivel cuaternario por la saturación con otro activador.

En ausencia del glicerol no nos es posible comparar los parámetros de unión de la Glc6P al complejo enzima-malato con los de la unión a la enzima libre, debido a que no fue posible obtener los últimos (Figura 18, gráficos A y D; Tabla 5). En presencia de glicerol como era de esperarse, el malato si estorba la unión del activador Glc6P, pero el efecto no es muy importante (Figura 18, gráficos E y H; Tabla 5).

7.4 Unión de Gly a la enzima saturada con PEP, Glc6P o malato

En la Figura 19 y en la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de la titulación con el activador Gly de la enzima previamente saturada con alguno de los otros tres ligandos. Para facilitar la comparación y la interpretación de los datos se incluyen en esta última tabla los resultados obtenidos de la titulación de la enzima libre con la Gly que se dieron en la Figura 16 y en la Tabla 3.

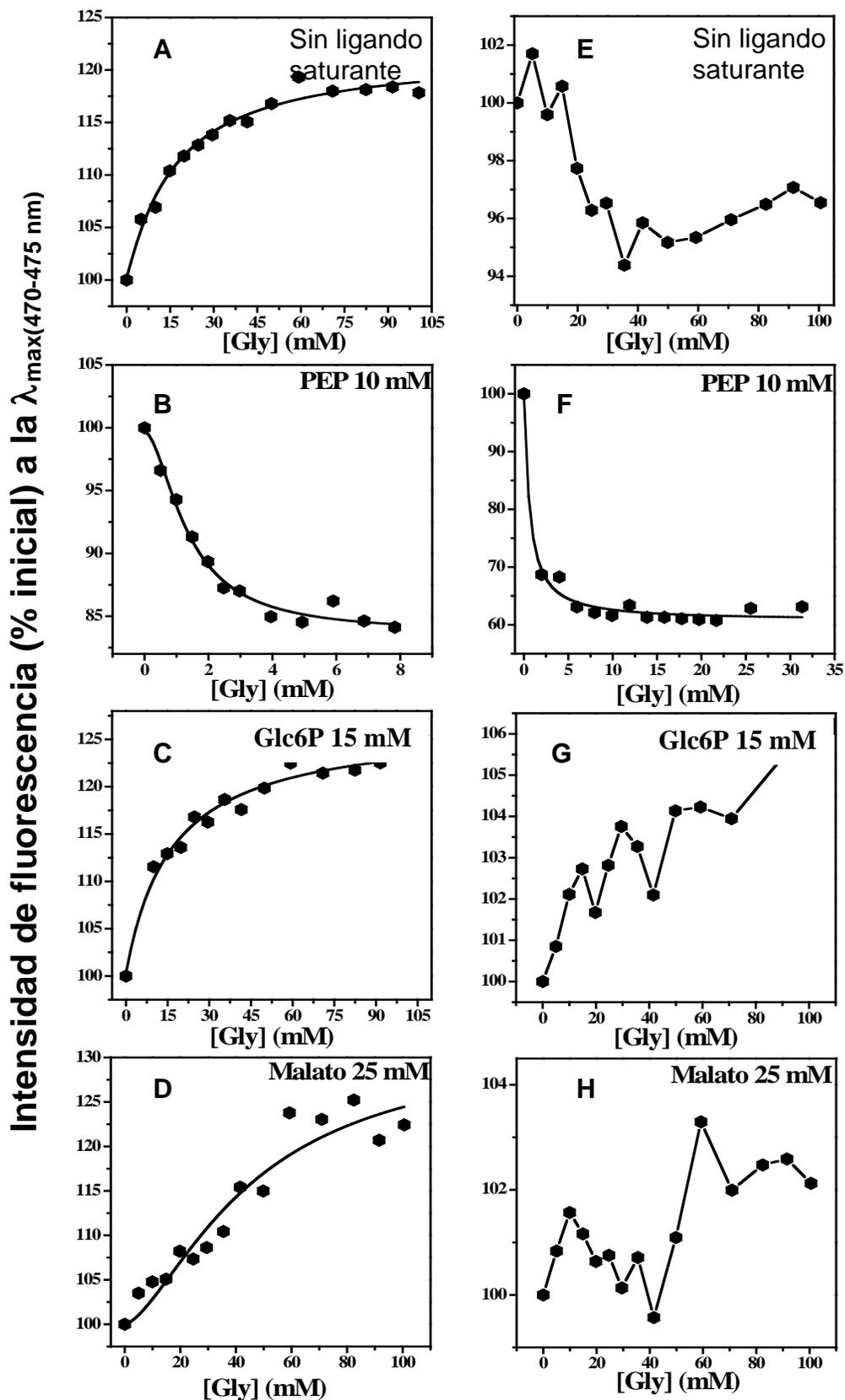


Figura 19. Intensidad de fluorescencia del ANS en función de la [Gly] en la enzima saturada con el PEP, la Glc6P o el inhibidor, en ausencia (B-D) y presencia (F-H) del glicerol. La titulación por la Gly a la enzima libre en ausencia y presencia de glicerol se muestra en el Panel A y E, respectivamente.

Tabla 6. Parámetros de unión de Gly a C4ZmPEPC-OH previamente saturada con sus efectores alostéricos.

Ligando fijo-saturante	Sin glicerol			Con glicerol		
	$L_{0.5}$ (mM)	h	IF_{max} ó max (% inicial)	$L_{0.5}$ (mM)	h	IF_{min} (% inicial)
ninguno	16.63± 3.15	1.08 ± 0.20	117	ND	ND	ND
PEP	1.36± 0.13	1.76 ± 0.30	84	0.85± 0.04	1.17 ± 0.58	60
Glc6P	16.45± 2.55	1.00 ± 0.00	122	ND	ND	ND
Malato	45.54± 20.61	1.53 ± 0.51	120	ND	ND	ND

ND: Parámetro no determinado.

La unión de la Gly a la enzima libre o saturada con otro ligando no pudo observarse en presencia de glicerol, excepto cuando la enzima estaba saturada con el PEP (Figura 19, gráficos E-H; Tabla 6). No podemos saber cómo se une la Gly a los complejos enzima-Glc6P o enzima-malato, pero sí que se une con alta afinidad al complejo enzima-PEP, mucho más alta que con la que se une la Glc6P a este mismo complejo (ver este resultado en la Figura 18, Tabla 5. En el caso de la Gly sí parece que los efectos activadores se ejercen a nivel de la unión del PEP libre.

Sorprendentemente, sin glicerol no encontramos que la unión previa de la Glc6P a la enzima aumentara la afinidad por la Gly, un aumento que sí se había observado en la afinidad por la Glc6P cuando la Gly era el primer ligando que saturaba a la enzima (Figura 18, Tabla 5). La razón de estas diferencias puede estar en que en un caso hay glicerol en el medio y en el otro no. Lamentablemente, no podemos conocer si existe la reciprocidad esperada en los efectos de la Glc6P sobre la unión de la Gly y viceversa, bajo las mismas condiciones, ya que no fue posible determinar la unión de la Glc6P en ausencia de glicerol ni la de la Gly en presencia de glicerol.

En ausencia de glicerol no se observó cooperatividad de unión de la Gly a la enzima, excepto cuando ésta se saturó previamente con el PEP o el malato (Figura 19, gráficos A-D; Tabla 6). De acuerdo al modelo de MWC, era de esperarse cooperatividad positiva de unión del activador si la enzima se había saturado previamente con el inhibidor y, por tanto, estaba mayoritariamente en la forma T que no une o une

pobrementemente el activador. La cooperatividad sería la consecuencia del desplazamiento del equilibrio hacia la forma R a medida que se fuese uniendo el activador. Pero en términos del mismo modelo, no es explicable el que haya cooperatividad positiva cuando la enzima ya haya sido llevada al estado R, que es el que une al activador, por la saturación con el PEP.

Igual que sobre la unión de la Glc6P, el inhibidor malato dificulta la unión de la Gly, disminuyendo la afinidad de la enzima por el activador un poco más de dos veces. Éste es un efecto menor que el observado en estudios de velocidad inicial (Tovar-Méndez et al., 2000), lo que nos lleva a pensar que bajo condiciones catalíticas el efecto directo del inhibidor sobre la unión de los activadores, o viceversa, se amplifica a través del efecto que inhibidores y activadores tienen sobre la unión del sustrato PEP Mg. En otras palabras, si el inhibidor disminuye la unión del sustrato, esto se refleja indirectamente en una disminución de la unión del activador. Y por el contrario, si un activador aumenta la unión del sustrato ello se traduce indirectamente en una disminución en la unión del inhibidor. De esta forma, los activadores y el inhibidor tendrían unos sobre la unión de los otros tanto efectos directos como indirectos. En los estudios que aquí reportamos sólo podemos observar los efectos directos y esto explicaría la menor magnitud del efecto observado.

En ausencia de glicerol, el cambio máximo en la intensidad de la fluorescencia fue muy similar cuando se tituló a la enzima libre con la Gly, o la enzima previamente saturada con la Glc6P o el malato, y este cambio consistió en un incremento en la fluorescencia con respecto a la que se observa antes de titular con la Gly (Figura 19, graficos A-D; Tabla 6). Este resultado indica que la Gly lleva a la enzima libre o a los complejos enzima-Glc6P y enzima-malato a una conformación con más regiones hidrofóbicas expuestas. Por el contrario, la saturación con la Gly produjo una disminución en la fluorescencia extrínseca cuando la enzima se había previamente saturado con el PEP con respecto a la que muestra la saturación de la enzima libre. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos cuando se satura el complejo binario enzima-Gly con el PEP (Figura 17, Tabla 4) y el complejo binario enzima-PEP con la Gly (Figura 19, Tabla 6), lo que en ambos casos lleva a la formación del complejo ternario enzima-PEP-Gly, se puede concluir que este complejo ternario es más cerrado

y con menos capacidad de unir al ANS que los complejos binarios. Por otra parte, de nuevo estos resultados sugieren que el cambio conformacional que posee el complejo enzima-PEP es diferente al del complejo enzima-Glc6P, en este caso en lo que respecta al sitio alostérico para la Gly, es decir, de nuevo sugieren la existencia de diferentes estados de alta afinidad de la enzima.

7.5 Unión del inhibidor malato a la enzima saturada con sustrato y activadores

En la Figura 20 y en la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de la titulación con el inhibidor malato de la enzima, previamente saturada con el sustrato o los activadores. Para facilitar la comparación y la interpretación de los datos se incluyen en esta última tabla los resultados obtenidos de la titulación de la enzima libre con el malato que se dieron en la Figura 16 y en la Tabla 3.

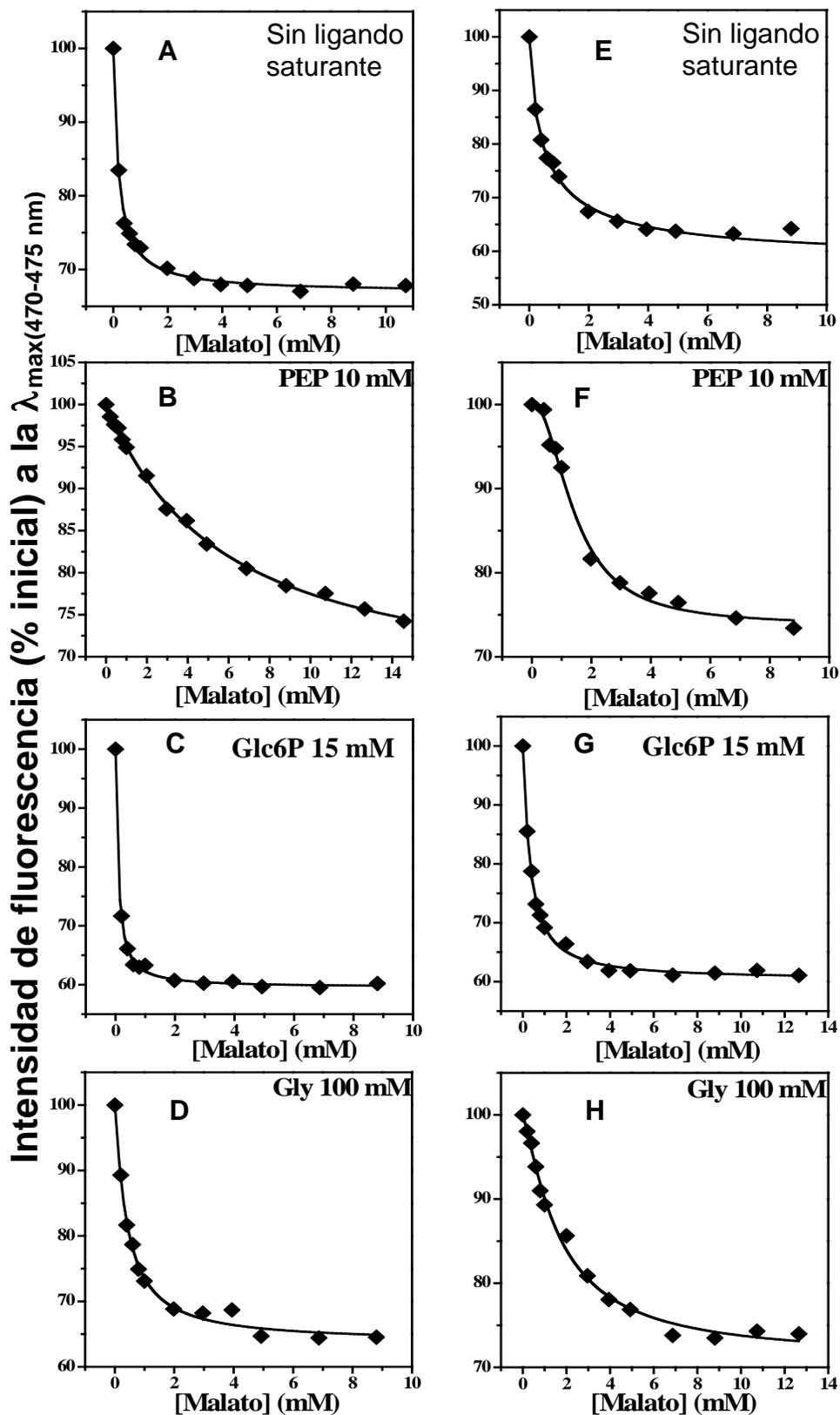


Figura 20. Intensidad de fluorescencia en función de la [malato] en la enzima saturada con el PEP y activadores, en ausencia (B-D) y presencia (F-H) de glicerol. La titulación por malato a la enzima libre en ausencia y presencia de glicerol se muestra en el Panel A y E, respectivamente.

Tabla 7. Parámetros de unión de unión del inhibidor malato a C4ZmPEPC-OH previamente saturada con sustrato o activadores.

Ligando fijo-saturante	Sin glicerol			Con glicerol		
	$L_{0.5}$ (mM)	h	IF_{min} (% inicial)	$L_{0.5}$ (mM)	h	IF_{min} (% inicial)
ninguno	0.23± 0.02	0.99 ± 0.11	70	0.51±0.06	0.82±0.09	65
PEP	6.08± 1.28	0.93 ± 0.09	80	1.44± 0.11	2.05 ± 0.25	75
Glc6P	0.12± 0.01	0.93 ± 0.12	60	0.33 ±0.02	1.11±0.07	60
Gly	0.53± 0.03	1.06 ± 0.07	65	1.41± 0.07	1.50 ± 0.09	70

Ya sea en ausencia o presencia de glicerol, el PEP y la Gly disminuyen la afinidad de la enzima por el inhibidor (Figura 20, Tabla 7), pero mientras que en ausencia del cosoluto PEP la disminuye 27 veces (Figura 20, grafico B; Tabla 7), en su presencia sólo lo hace unas tres veces (Figura 20, grafico F; Tabla 7). El activador Gly sólo disminuye la afinidad por el inhibidor unas 2-3 veces en ambas condiciones (Figura 20, Tabla 7), lo que es comparable con el efecto observado del inhibidor sobre la unión de la Gly en ausencia de glicerol (Figura 19, Tabla 6). Por tanto, en este caso sí se observan efectos recíprocos entre el activador y el inhibidor. Tanto en ausencia como presencia de glicerol, la Glc6P no sólo no disminuyó la afinidad de la enzima por el inhibidor sino que incluso la aumentó. Por un lado, estos resultados son consistentes con la incapacidad de la Glc6P de revertir la inhibición producida por el malato (Tovar-Méndez et al., 2000), pero por otro no muestran reciprocidad con los efectos de malato sobre la unión de la Glc6P (Tabla 5), ya que el malato disminuye la afinidad de la enzima por la Glc6P unas tres veces. Por el momento, no conocemos las razones de estas discrepancias.

Más importante aún es la falta de reciprocidad entre el efecto de malato sobre la unión del PEP (Tabla 4) y el efecto del PEP sobre la unión del malato (Tabla 7) observada en estos estudios. Mientras que la previa saturación de la enzima con malato favorece la unión del PEP, la previa saturación de la enzima con el PEP dificulta la unión del malato. Comparando las estructuras cristalográficas de la EcPEPC (con

inhibidor unido) y a la de la C4ZmPEPC (sin inhibidor) parece que una diferencia importante es la posición de un residuo de arginina que participa en la unión del inhibidor (Kai et al., 1999) y en la catálisis (Yano et al., 1995). Este residuo está en el sitio alostérico cuando el inhibidor está unido, contribuyendo a su unión por enlace de tipo iónico con su cadena lateral (Kai et al., 1999) y cercano al sitio activo, en ausencia del inhibidor (Matsumura et al., 2002). Pero curiosamente esta arginina no parece ser importante en la unión del sustrato puesto que en otra estructura de EcPEPC en la que están unidos a la enzima tanto el inhibidor como un análogo del sustrato (Matsumura et al., 2002) permanece en el sitio del inhibidor. En otras palabras, la interacción de la arginina con el inhibidor es mucho más fuerte que la que pudiera hacer con el sustrato, puesto que el análogo no es capaz de alejarla del sitio alostérico y llevarla al sitio activo. Quizás la Arg647 sea la causante de la falta de reciprocidad entre los efectos del sustrato y el inhibidor. Desafortunadamente, no se cuenta por el momento con una estructura que tenga un análogo del sustrato en el sitio activo y el sitio alostérico de malato vacío, estructura que nos permitiría conocer si este residuo de arginina interacciona de alguna forma con el sustrato en ausencia del inhibidor o sólo es un residuo que participa en algún paso de la catálisis. Tampoco se tiene una estructura de la enzima completamente vacía (forma T sin inhibidor) que nos muestre la posición de este residuo y si pudiera ser un estorbo para la unión del sustrato.

En ausencia del cosoluto el inhibidor se unió a la enzima saturada con sustrato y activadores sin cooperatividad (Figura 20, graficos A-D; Tabla 7), lo que sugiere que los cambios conformacionales provocados por la saturación con malato bajo esta condición se dan a nivel de cada subunidad, sin afectar la afinidad de las otras subunidades por el inhibidor. En presencia de glicerol sí se observó cooperatividad de unión del malato a la enzima saturada con el PEP y la Gly (Figura 20, gráficos E-H; Tabla 7). Por tanto, la saturación de los complejos enzima-PEP y enzima-Gly con el malato sí involucra comunicación entre los sitios alostéricos del inhibidor de manera que los cambios que ocurren en una subunidad se propagan a las otras aumentando en éstas la afinidad por el inhibidor. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos cuando la enzima previamente saturada con malato se titula con el PEP o la Gly (Tabla 4 y 6), en los que también se observa cooperatividad en la unión y con los obtenidos cuando esta misma

enzima se satura con la Glc6P en ausencia de glicerol, en los que no se observa cooperatividad en la unión del activador.

8. CONCLUSIONES

Nuestros resultados permiten concluir en forma general:

1. Los complejos enzima-PEP, enzima-Glc6P y enzima-Gly tienen una conformación diferente, como lo mostraron las diferencias en los cambios de fluorescencia extrínseca. Por lo tanto, proponemos que al menos existen tres conformaciones diferentes de alta afinidad, o formas R, de la C4ZmPEPC. Las diferencias entre estos estados de alta afinidad pueden darse a nivel de estructura terciaria y/o a nivel de estructura cuaternaria.
2. En presencia de glicerol la enzima libre posee una conformación diferente a la que tiene en su ausencia, que se manifiesta, por ejemplo, en que el glicerol favorece la unión del sustrato PEP a la enzima libre y dificulta la del inhibidor malato.

9. PERSPECTIVAS

Aunque los resultados aquí mostrados no pueden explicarse con un modelo de solo dos estados conformacionales, es necesario aportar mayor evidencia experimental que confirme la existencia de múltiples estados conformacionales involucrados en la regulación alostérica de esta importante enzima. Con este objetivo y para completar los estudios aquí reportados, proponemos que se debería hacer, al menos, lo siguiente:

1. Sobre-expresar a la C4ZmPEPC-OH con una cola de histidinas en su extremo amino terminal, para asegurarnos que se obtiene una proteína no truncada tras una cromatografía de afinidad, y además facilitar su purificación.
2. Completar los estudios de unión al equilibrio del sustrato y efectores alostéricos a la forma de oscuridad de la C4ZmPEPC usando ~ gba~jo c'on diciones en las que no haya bicarbonato, para investigar el efecto del metal sobre la unión de los ligandos, sobre todo del PEP.
3. Por medio de estudios de unión al equilibrio caracterizar la unión de los ligandos a la forma de luz de la enzima, como se ha hecho con la forma de oscuridad.
4. Estudiar el cambio conformacional resultante de los complejos cuaternarios enzima-sustrato-activador-inhibidor.
5. Estudiar la cinética de los cambios conformacionales por medio de la técnica de flujo detenido, utilizando la fluorescencia del ANS.
6. Determinar la relación existente entre la constante de velocidad asociada al cambio conformacional frente a la concentración de ligando, para determinar si la unión de un determinado ligando induce un cambio conformacional o estabiliza un estado conformacional preexistente.
7. Completar los estudios cinéticos de velocidad inicial de las formas de la enzima de luz y oscuridad bajo condiciones cercanas a las fisiológicas, para caracterizar funcionalmente los posibles estados conformacionales de la enzima.
8. Estudiar la estabilidad de la enzima con sustrato o activadores unidos frente a pH o agentes coatrópicos (urea o cloruro de guanidina), mediante dicroísmo circular o fluorescencia extrínseca.
9. Explorar otras técnicas, como digestión parcial de los complejos enzima-ligando(s) seguida de SDS-PAGE, para caracterizar las diferentes conformaciones de la enzima.

Además, para conocer las características estructurales que tiene cada conformero y que expliquen sus propiedades cinéticas se requiere cristalizar a la C4ZmPEPC con sustrato o alguno de los activadores, ya que resolver la estructura con alguno

de estos ligandos permitiría definir posibles conformaciones producidas por el sustrato o un activador específico. De particular interés, sería obtener un cristal con Gly unido, lo que permitiría identificar de forma inequívoca el sitio de unión de los aminoácidos neutros a la enzima.

10. REFERENCIAS

- Bakrim N, Prioul JL, Deleens E, Rocher JP, Arrio-Dupont M, Vidal J, Gadal P, Chollet R** (1993) Regulatory Phosphorylation of C4 Phosphoenolpyruvate Carboxylase (A Cardinal Event Influencing the Photosynthesis Rate in Sorghum and Maize). *Plant Physiol* **101**: 891-897
- Bandarian V, Phoehner J, Grover SD** (1992) Metabolite activation of crassulacean acid metabolism and C4 phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol* **100** 1411-1416
- Bandurski RS** (1955) Further studies on the enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphorylenolpyruvate and carbon dioxide. *J Biol Chem* **217**: 137-150
- Bazzaz FA, Fajer ED** (1992) Plant life in a CO₂-rich world. *Scientific American* **1**: 18-24
- Bettati S, Mozzarelli A** (1997) T state hemoglobin binds oxygen noncooperatively with allosteric effects of protons, inositol hexaphosphate, and chloride. *J Biol Chem* **272**: 32050-32055
- Bläsing OE, Ernst K, Streubel M, Westhoff P, Svensson P** (2002) The non-photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylases of the C4 dicot *Flaveria trinervia* -- implications for the evolution of C4 photosynthesis. *Planta* **215**: 448-456
- Brand L, Gohlke J** (1972) Fluorescence probes for structure. *Annu Rev Biochem* **41**: 843-868
- Brand L, Gohlke J, 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
- Brown WV, Smith BN** (1972) Grass, evolution, the Krantz syndrome, 13C/12C ratios and continental drift. *Nature* **239**: 345-346
- Bruno S, Bonaccio M, Bettati S, Rivetti C, Viappiani C, Abbruzzetti S, Mozzarelli A** (2001) High and low oxygen affinity conformations of T state hemoglobin. *Protein Sci* **10**: 2401-2407
- Chollet R, Vidal J, O'Leary MH** (1996) Phosphoenolpyruvate Carboxylase: A Ubiquitous, Highly Regulated Enzyme in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 273-298
- Coombs J, Baldry CW, Bucke C** (1973) The C4 pathway in *Pennisetum purpureum*: the allosteric nature of PEP carboxylase. *Planta* **110**: 95-107
- Cooper TG, Wood HG** (1971) The carboxylation of phosphoenolpyruvate. The active species of CO₂ utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase y pyruvate carboxylase. *J Biol Chem* **246**: 5488-5490
- Das TK, Khan I, Rousseau DL, Friedman JM** (1999) Temperature dependent quaternary relaxation in sol-gel encapsulated hemoglobin *Biospectroscopy* **5**: S64—S70
- DeLano WLT** The PyMOL Molecular Graphics System, San Carlos, CA, USA: DeLano Scientific, 2002
- Dong LY, Masuda T, Kawamura T, Hata S, Izui K** (1998) Cloning, expression, and characterization of a root-form phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*: comparison with the C4-form enzyme. *Plant Cell Physiol* **39**: 865-873

- Dong LY, Ueno Y, Hata S, Izui K** (1997) Effects of site-directed mutagenesis of conserved Lys606 residue on catalytic and regulatory functions of maize C4-form phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Cell Physiol* **38**: 1340-1345
- Duff S, Chollet R** (1995) In Vivo Regulation of Wheat-Leaf Phosphoenolpyruvate Carboxylase by Reversible Phosphorylation. *Plant Physiol* **107**: 775-782
- Ernst K, Westhoff P** (1997) The phosphoenolpyruvate carboxylase (ppc) gene family of *Flaveria trinervia* (C4) and *F. pringlei* (C3): molecular characterization and expression analysis of the ppcB and ppcC genes. *Plant Mol Biol* **34**: 427-443
- Fischer M, Majumdar A, Zuiderweg E** (1998) Protein NMR relaxation: theory, applications and outlook. *Prog NMR Spectrosc* **33**: 207-272
- Fontana A, de Laureto PP., Spolaore B, Frare E, Picotti P, Zambonin M** (2004) Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim Pol* **51**: 299-321
- Frank J, Vater J, Holzwarth JF** (1999) Kinetics and equilibrium binding of phosphoenolpyruvate (PEP) to phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) from *Zea mays*. *Phys Chem Chem Phys* **1**: 455-461
- Freifelder D** (1982) *Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, Ed 2nd ed. W.H. Freeman, New York
- Fujita N, Miwa T, Ishijima S, Izui K, Katsuki H** (1984) The primary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the ppc gene and deduced amino acid sequence. *J Biochem* **95**: 909-916
- Furbank R, Taylor W** (1995) Regulation of Photosynthesis in C3 and C4 Plants: A Molecular Approach. *Plant Cell* **7**: 797-807
- Gao Y, Woo KC** (1995) Site-directed mutagenesis of Lys600 in phosphoenolpyruvate carboxylase of *Flaveria trinervia*: its roles in catalytic and regulatory functions. *FEBS Lett* **375** 95-98
- Gao Y, Woo KC** (1996) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Zea mays* by protein phosphorylation and metabolites and their roles in photosynthesis. *Aust J Plant Physiol* **23**: 25-32
- Gekko K, Timasheff S** (1981) Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* **20**: 4667-4676
- Gekko K, Timasheff S** (1981) Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry* **20**: 4677-4686
- Gill SC, Von Hippel PH** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**: 319-326
- Gillinta J, Grover S** (1995) Kinetic interactions of glycine with substrates and effectors of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Photosynth Res* **45**: 121-126
- González DH, Iglesias AA, Andreo CS** (1984) On the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by L-malate. Effect of pH. *J Plant Physiol* **116**: 425-434
- Hansen DE, Knowles JR** (1982) The stereochemical course at phosphorus of the reaction catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxylase. *J Biol Chem* **257**: 14795-14798
- Hatch MD** (1987) C4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim Biophys Acta* **895**: 81-106
- Hatch MD** (1988) C4 photosynthesis: A unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochem Biophys Acta* **895**: 81-106

- Hatch MD, Slack CR** (1970) Photosynthetic CO₂ fixation pathways. *Ann Rev Plant Physiol* **21**: 141-162
- Heitz J, Brand L** (1971) Fluorescence changes associated with denaturation of alcohol dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* **144(1)**: 286-291
- Hermans J, Westhoff P** (1990) Analysis of expression and evolutionary relationships of phosphoenolpyruvate carboxylase genes in *Flaveria trinervia* (C₄) and *F. pringlei* (C₃). *Mol Gen Genet* **224(3)**: 459-468
- Hermans J, Westhoff P** (1992) Homologous genes for the C₄ isoform of phosphoenolpyruvate carboxylase in a C₃ and a C₄ *Flaveria* species. *Mol Gen Genet* **234(2)**: 275-284
- Huber SC, Edwards GE** (1975) Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase from C₄ plants by malate and aspartate. *Can J Bot* **53**: 1925-1933
- Izui K, Matsumura H, Furumoto T, Kai Y** (2004) Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 69-84
- Janc JW, O'Leary MH, Cleland WW** (1992) A kinetic investigation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*. *Biochemistry* **31**: 6421-6426
- Jenkins CLD, Harris RLN, McFadden HG** (1986) 3,3-dichloro-2-dihydroxyphosphinoylmethyl-2-propenoate, a new, specific inhibitor of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem Int* **14**: 219-226
- Jiao J, Echevarria C, Vidal J, Chollet R** (1991) Protein turnover as a component in the light/dark regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase activity in C₄ plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2712-2715
- Jiao JA, Chollet R** (1989) Regulatory serylphosphorylation of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase by a solute protein kinase from maize leaves. *Arch Biochem Biophys* **269**: 526-535.
- Jiao JA, Chollet R** (1991) Posttranslational Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in C(4) and Crassulacean Acid Metabolism Plants. *Plant Physiol* **95**: 981-985
- Juszczak LJ, Friedman JM** (1999) UV resonance Raman spectra of ligand binding intermediates of sol-gel encapsulated hemoglobin. *J Biol Chem* **274**: 30357-30360
- Kai Y, Matsumura H, Inoue T, Terada K, Nagara Y, Yoshinaga T, Kihara A, Tsumura K, Izui K** (1999) Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: a proposed mechanism for allosteric inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 823-828
- Kai Y, Matsumura H, Izui K** (2003) Phosphoenolpyruvate carboxylase: three-dimensional structure and molecular mechanisms. *Arch Biochem Biophys* **414**: 170-179
- Kay L** (1998) Protein dynamics from NMR. *Nat Struct Biol* **5**: 513-517
- Kern D, Zuiderweg E** (2003) The role of dynamics in allosteric regulation. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 748-757
- Khan I, Shannan CF, Dantsker D, Friedman AJ, Gonzales-de-Apodeca JP, Friedman JM** (2000) Sol-gel trapping of functional intermediates of hemoglobin: Geminate and bimolecular recombination studies. *Biochemistry* **39**: 16099-16109
- Koshland DEJ, Nemethy G, Filmer D** (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* **5**: 365-385

- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Leegood RC, Osmond CB** (1990) En: *Plant Physiol Biochemistry and Molecular Biology*, Vol 274-298 pp. 274-298 pp, Longman Scientific & Technical England
- Lepiniec L, Keryer E, Philippe H, Gadal P, Cretin C** (1993) Sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: structure, function and molecular evolution. *Plant Mol Biol* **21**: 487-502
- Lindsley J, Rutter J** (2006) Whence cometh the allosterome? *PNAS* **103**: 10533-10535
- Mancera RL, Carrington BJ** (2005) The molecular binding interactions of inhibitors and activators of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **755**: 151-159
- Marés J, Leblová S** (1980) PEPC (EC 4.1.1.31) from leaves of maize (*Zea mays*), sorghum (*Sorghum vulgare*) and millet (*Panicum miliaceum*). *Photosynthetica* **14**: 25-31
- Matsumura H, Terada M, Shunsuke S, Tsuyoshi I, Yoshinaga T, Katsura I, Yasushi K** (1999) Plausible phosphoenolpyruvate binding site revealed by 2.6 Å structure of Mn²⁺ bound phosphoenolpyruvate carboxylase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **458**: 93-96
- Matsumura H, Xie Y, Shirakata S, Inoue T, Yoshinaga T, Ueno Y, Izui K, Kai Y** (2002) Crystal structures of C₄ form maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylases. *Structure* **10**: 1721-1730
- Miyao M, Fukayama H** (2003) Metabolic consequences of overproduction of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. *Arch Biochem Biophys* **414**: 197-203
- Miziorko HM, Nowak T, Mildvan AS** (1974) Spinach leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: purification, properties, and kinetic studies. *Arch Biochem Biophys* **163**: 378-389
- Monod J, Wyman J, Changeux J** (1965) On the nature of allosteric transitions. A plausible model. *J Mol Biol* **12**: 88-118
- Monson RK, Moore BD** (1989) On the significance of C₃-C₄ intermediate photosynthesis to the evolution of C₄ photosynthesis. *Plant C and Environment* **12**: 689-699
- Moore PD** (1982) Evolution of photosynthetic pathway in flowering plants. *Nature* **295**: 647-648
- Mújica-Jiménez C, Castellanos-Martínez A, Muñoz-Clares RA** (1998) Studies of the allosteric properties of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase with the phosphoenolpyruvate analog phosphomycin as activator. *Biochim Biophys Acta* **1386**: 132-144
- Mukerji SK** (1977) Corn leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. The effect of divalent cations on activity. *Arch Biochem Biophys* **182**: 352-359
- Nguyen T, Ngam-Ek A, Jenkins J, Grover S** (1988) Metal Ion Interactions with Phosphoenolpyruvate Carboxylase from *Crassula argentea* and *Zea mays*. *Plant Physiol* **86(1)**: 104-107
- Nimmo GA, Nimmo HG, Hamilton ID, Fewson CA, Wilkins MB** (1986) Purification of the phosphorylated night form and dephosphorylated day form of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Bryophyllum fedtschenkoi*. *Biochem J* **239**: 213-220

- Nimmo GA, Wilkins MB, Fewson CA, Nimmo HG** (1987) Persistent circadian rhythms in the phosphorylation state of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Bryophyllum fedtschenkoi* leaves and in its sensitivity to inhibition by malate. *Planta* **170**: 408-415
- Nimmo HG** (2003) Control of the phosphorylation of PEPC in higher plants. *Arch Biochem Biophys* **414**: 189-196
- Nishikido T, Takanashi H** (1973) Glycine activation of PEP carboxylase from monocotyledonous C4 plants. *Biochem Biophys Res Commun* **53**: 126-133
- O'Leary M, Rife J, Slater J** (1981) Kinetic and isotope effect studies of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochemistry* **20**: 7308-7314
- Podestá FE, Andreo CS** (1989) Maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol* **90**: 427-433
- Reinhart G, Hartleip S, Symcox M** (1989) Role of coupling entropy in establishing the nature and magnitude of allosteric response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 4032-4036
- Rodríguez-Sotres R, Lopez-Pozos R, Muñoz-Clares A** (1987) Further Studies of the Regulation of Maize Leaf Phosphoenolpyruvate Carboxylase by Light. *J Plant Physiol* **129**: 191-199
- Rodríguez-Sotres R, Muñoz-Clares RA** (1990) Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch Biochem Biophys* **276**: 180-190
- Rustin P, Meyer CR, Wedding RT** (1988) Identification of substrate and effector binding sites of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*. *J Biol Chem* **33**: 17611-17614
- Rustin P, Meyer CR, Wedding RT** (1991) Fluorescence study of chemical modification of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula argentea*. *Plant Physiol* **97**: 1011-1016
- Sage RF** (2001) Environmental and evolutionary preconditions for the origin and diversification of the C4 photosynthetic syndrome. *Plant Biol* **3**: 202-213
- Sheen J** (1999) C4 Gene expression *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 187-217
- Shibayama N** (1999) Kinetics of the allosteric transition in hemoglobin within silicate sol-gel *J Am Chem Soc* **121**: 444-445
- Shibayama N, Saigo S** (1995) Fixation of the quaternary structures of human adult haemoglobin by encapsulation in transparent porous silica gels. *J Mol Biol* **251**: 203-209
- Shibayama N, Saigo S** (2001) Direct observation of two distinct affinity conformations in the T state human deoxyhemoglobin. *FEBS Lett* **492**: 50-53
- Sterner R, Höcker B** (2005) Catalytic versatility, stability, and evolution of the (beta α)₈-barrel enzyme fold. *Chem Rev* **105**: 4038-4055
- Stiborová M, Leblová S** (1985) Activation of maize (*Zea mays* L.) phosphoenolpyruvate carboxylase by glucose-6-phosphate and glycine: effects of pH and Mg²⁺. *Photosynthetica* **19(2)**: 177-182
- Svensson P, Bläsing OE, Westhoff P** (2003) Evolution of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch Biochem Biophys* **414**: 180-188
- Takahashi-Terada A, Kotera M, Ohshima K, Furumoto T, Matsumura H, Kai Y, 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
- Tazoe Y, Noguchi K, Terashima I** (2006) Effects of growth light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in leaves of a C4 plant, *Amaranthus cruentus*. *Plant Cell Environ* **29**: 691-700
- Tchen T, Vennesland B** (1955) Enzymatic carbon dioxide fixation into oxal-acetate in wheat germ. *J Biol Chem* **213(2)**: 533-546
- Teale FWJ** (1960) The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solutions. *Biochem J* **76**: 381-388
- Terada K, Izui K** (1991) Site-directed mutagenesis of the conserved histidine residue of phosphoenolpyruvate carboxylase. His138 is essential for the second partial reaction. *Eur J Biochem* **202**: 797-803
- Ting IP, Osmond CB** (1973) Photosynthetic Phosphoenolpyruvate Carboxylases: Characteristics of Alloenzymes from Leaves of C(3) and C(1) Plants. *Plant Physiol* **51**: 439-447
- Toh H, Kawamura T, Izui K** (1994) Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Cell Environ* **17**: 31-43
- Tovar-Méndez A, Mújica-Jiménez C, Muñoz-Clares RA** (1997) Desensitization to glucose 6-phosphate of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by pyridoxal 5'-phosphate. *Biochim Biophys Acta* **1337**: 207-216
- Tovar-Méndez A, Mújica-Jiménez C, Muñoz-Clares RA** (2000) Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol* **123**: 149-160
- Tovar-Méndez A, Rodríguez-Sotres R, López-Valentín DM, Muñoz-Clares RA** (1998) Re-examination of the roles of PEP and Mg²⁺ in the reaction catalysed by the phosphorylated and non-phosphorylated forms of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves of *Zea mays*. Effects of the activators glucose 6-phosphate and glycine. *Biochem J* **332** 633-642
- Tovar-Méndez A, Yampara-Iquise H, Mújica-Jiménez C, Muñoz-Clares RA** (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. Kluwer, Dordrecht, pp 155-158.
- Uedan K, Sugiyama T** (1976) Purification and characterisation of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiol* **57**: 906-910
- Voznesenskaya E, Franceschi VR, Kiirats O, Freitag H, Edwards GE** (2001) Kranz anatomy is not essential for terrestrial C4 plant photosynthesis. *Nature* **414**: 543-546
- Wand A** (2001) Dynamic activation of protein function: a view emerging from NMR spectroscopy. *Nat Struct Biol* **8**: 926-931
- Wang ZY, Portis AR, Jr** (1991) A fluorometric study with 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (ANS) of the interactions of ATP and ADP with rubisco activase. *Biochem Biophys Acta* **1079**: 263-267
- Wedding RT, Black MK, Meyer CR** (1989) Activation of higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol* **90**: 648-652
- Westheimer FH** (1987) Why nature chose phosphates. *Science* **235**: 1173-1178

- Willeford KO, Wedding RT** (1992) Oligomerization and regulation of higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol* **99**: 755-758
- Willeford KO, Wu M-X, Meyer CR, Wedding RT** (1990) The role of oligomerization in regulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **168**: 778-785
- Wu MX, Wedding RT** (1985) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Crassula* by interconversion of oligomeric forms. *Arch Biochem Biophys* **240**: 655-662
- Yano M, Terada K, Umiji K, Izui K** (1995) Catalytic role of an arginine residue in the highly conserved and unique sequence of phosphoenolpyruvate carboxylase. *J Biochem (Tokyo)* **117**: 1196-1200
- Yuan J, Sayegh J, Mendez J, Sward L, Sanchez N, Sanchez S, Waldrop G, Grover S** (2006) The regulatory role of residues 226-232 in phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Photosynth Res* **88**: 73-81
- Zhang XQ, Li-B., Chollet R** (1995) In vivo regulatory phosphorylation of soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol* **108**: 1561-1568